



HAL
open science

Rôle de l'autophagie dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection par des *Escherichia coli* producteurs de colibactine associés au cancer colorectal

Laurène Salesse

► **To cite this version:**

Laurène Salesse. Rôle de l'autophagie dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection par des *Escherichia coli* producteurs de colibactine associés au cancer colorectal. Biologie cellulaire. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC077 . tel-03656917

HAL Id: tel-03656917

<https://theses.hal.science/tel-03656917>

Submitted on 2 May 2022

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

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

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT

Thèse

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

Spécialité : Microbiologie cellulaire

Soutenue le 8 décembre 2021

SALESSE Laurène

Rôle de l'autophagie dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection par
des *Escherichia coli* producteurs de colibactine
associés au cancer colorectal

Rapporteurs :

Mme MATHONNET Muriel, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU de
Limoges/ Université de Limoges

Mme MENARD Armelle, Ingénieur de Recherche Hors Classe, Université de Bordeaux

Examineurs :

M. BONAZZI Matteo, Directeur de recherche, Institut de Recherche en Infectiologie de
Montpellier

M. VILLEGGER Romain, Maître de conférences, Université de Poitiers

M. BARNICH Nicolas, Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne

Directrice de thèse :

Mme NGUYEN Hang, Chargée de Recherche, Université Clermont Auvergne

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

Remerciements

Je tiens à remercier **Madame Muriel Mathonnet** et **Madame Armelle Ménard** d'avoir accepté d'être les rapportrices de ce travail de recherche, d'y consacrer du temps pour le lire, l'analyser et l'évaluer. Je tiens également à remercier **Monsieur Matteo Bonazzi** et **Monsieur Romain Villéger** d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail de recherche.

Merci à l'ensemble des membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

Je souhaite évidemment remercier **Nicolas Barnich** et **Hang Nguyen** de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse dans ce laboratoire. Un immense merci à toi, **Hang**, pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces trois années. Même si nous ne nous sommes pas toujours compris, c'est grâce à toi que je suis devenue la personne que je suis aujourd'hui. Bien que j'aie toujours eu un fort attrait pour le monde de la recherche, c'est lors de mon stage de master que j'ai réalisé sous ta supervision, que j'ai su que j'en ferai mon métier. C'est d'ailleurs grâce à toi que j'ai obtenu la bourse de l'école doctorale car tu as toujours été disponible quand j'en avais besoin pour me faire répéter encore, encore, encore et encore... Merci infiniment pour m'avoir fait confiance pour les manips, de m'avoir encadrée avec subtilité. J'ai beaucoup aimé travailler en autonomie tout en sachant que tu étais là si j'avais la moindre question et le moindre souci. Comme je te l'ai déjà dit, tu as été et tu resteras un vrai modèle à suivre. J'espère un jour devenir toute aussi brillante que toi. Mille merci pour tout !!!!!!!

Guillaume, merci pour ces bons moments passés à tes côtés. Je ne sais pas comment tu fais mais tu as toujours les bons mots pour nous faire pouffer de rire. Même si je ne suis pas restée longtemps, j'ai beaucoup apprécié travailler au deuxième étage, dans ton univers masculin rempli de testostérone. **Mathilde**, je te remercie d'avoir pris le temps de relire ma partie discussion, de tes conseils avisés, de tes petits mails décalés et surtout de m'avoir rassurée le jour J. **Jérémy**, c'est grâce à toi que j'ai pu encadrer mon unique stagiaire, je te remercie pour cette opportunité. **Valérie, Delphine** et **Elisabeth**, merci pour les bons moments passés durant ces trois années.

Une immense merci à mes copines d'aventure, **Claire, Mélissa, Gwen** et **Alex**. Vous avez été beaucoup plus que des copines de travail mais plutôt de réelles amies. Je suis obligée de commencer par toi, **Claire**, qui a toujours été là pour me soutenir, pour m'apprendre la vie. Même si j'avais quelques doutes quant à notre possible entente à ton arrivée du fait de ton fort tempérament, ce sont finalement bien nos différences nous ont rapprochées. Je ne sais toujours pas à quoi correspond la référence Catherine et Liliane mais ce qui est sûr, c'est que nous sommes toujours fourrées ensemble, à manipuler, à se promener et surtout à cancaner. **Melissa**, si seulement les autres personnes te connaissaient comme nous, ils arrêteraient de te comparer à une pauvre petite chose fragile et sans défense. Sans trop en dévoiler pour laisser un peu suspense pour ta vidéo de thèse, je dois dire que tu es très agile dans le lancer d'objets en tout genre. J'aurais plein d'autres choses à raconter sur toi ma petite poulette mais encore un peu de patience, tout arrive à point à qui sait attendre. **Gwen**, comment dire... et bien tu as été LA révélation de ces trois années. En master tu me faisais peur, à crier et à t'agiter partout. Quand

tu es revenue de ton congés maternité, j'osais à peine te regarder et puis les semaines passantes, j'ai appris à te découvrir. Finalement tu es toute aussi gentille qu'intimidante. J'admire la femme que tu es ; forte, dévouée, attentionnée, rigolote, toujours de bonne humeur et avec un rire communicatif et surtout J'ADOOOOOOORE tes bons gâteaux. Ma petite **Alex**, le laboratoire ne serait pas le même sans toi. Tout comme Gwen, tu nous as bien fait rire en nous racontant de tes petites anecdotes. Bien que tu aies eu des phases difficiles, tu as été notre petit rayon de soleil et tu connais tout l'amour que j'ai pour toi. J'espère de tout cœur que la distance ne va pas estomper notre amitié, surtout qu'une petite surprise vous attends d'ici quelques semaines 😊.

Merci aussi à toute la communauté de Techniciens et Ingénieurs qui ont au quotidien participé au bon fonctionnement du labo. Merci toi **Adeline**, de m'avoir soutenue dans les moments difficiles, d'avoir été un peu ma seconde maman. **Caroline**, merci pour ton aide précieuse pour commander les mix SoAdvanced. **Virginie**, merci beaucoup ma petite vivi pour tous tes conseils BIO, développement durable... Ta petite puce est plus que magnifique et a l'air tout aussi malicieuse que toi. **Sandra**, merci beaucoup pour ton aide à l'animalerie. Je me souviens encore des premières vacances de Noël où nous étions toutes les deux à quatre pattes à la recherche de la souris perdue en EOPS. **Patricia**, tu es peut-être la seule personne que j'ai tout aussi aimée que détestée surtout lors des déménagements successifs. Blague à part, tu as été d'une aide précieuse pour la vie quotidienne du laboratoire et surtout pour tout ce qui concerne l'animalerie. Tu as toujours répondu présente quant on en avait besoin. Mille merci ma patoche, tu es une femme en or !!! **Mika**, **Lucas** et **Fred**, merci les gars pour votre bonne humeur. **Laurent**, que dire pour toi mon petit lolo. Une coiffure toujours impeccable, des habits toujours propres et mis du bon côté.. Voilà ce qui te caractérise !! Ma conscience te remercie d'avoir été mon tueur de souris attiré.

Je souhaite également remercier toutes les autres personnes. Ce fût trois années en or avec bien sûr des hauts et des bas mais vous avez toujours été là pour moi. MERCI !!!

Résumé

Les souches d'*Escherichia coli* productrices de colibactine, appelées CoPEC pour *Colibactin-producing E.coli*, sont apparues comme des acteurs majeurs impliqués dans la pathogénicité du cancer colorectal (CCR). Les CoPEC induisent des dommages à l'ADN et une instabilité chromosomique dans les cellules eucaryotes qui favorisent la carcinogenèse colorectale dans des modèles murins prédisposés au développement du CCR. Nous avons montré, dans une précédente étude, que l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales (CEI) limite les effets pro-carcinogènes des CoPEC dans un modèle murin génétiquement susceptible, *Apc^{Min/+}*.

Le premier objectif de la thèse était de regarder si les CoPEC sont capables d'induire le développement tumoral dans un modèle murin de CCR associé à l'inflammation chronique qui ne présente pas de susceptibilité génétique ou d'utilisation d'agents carcinogènes. Nous avons montré qu'à la suite de l'infection par la souche CoPEC 11G5 ou son mutant incapable de produire la colibactine, le score clinique et le score inflammatoire sont augmentés chez les souris sauvages et accentués lors d'une déficience de l'autophagie dans les CEI. L'infection par la souche 11G5 mais pas par le mutant favorise l'apparition de carcinomes invasifs qui est augmentée lors d'une autophagie déficiente. La formation des carcinomes invasifs est associée avec l'accumulation de dommages à l'ADN, indépendamment de l'inflammation. En conclusion, les CoPEC induisent la carcinogenèse colorectale dans un modèle murin de CCR associé à l'inflammation chronique ne présentant pas de susceptibilité génétique ou l'utilisation d'agents carcinogènes.

Comme les cellules myéloïdes (MC) sont une composante importante du microenvironnement tumoral, notre second objectif était d'examiner le rôle de l'autophagie au sein de ces cellules dans la tumorigenèse colorectale des souris *Apc^{Min/+}* à la suite de l'infection par des CoPEC. Nous avons montré que la déficience de l'autophagie dans les MC augmente le volume mais pas le nombre de tumeurs colorectales chez les souris *Apc^{Min/+}* suite à l'infection par la souche 11G5 mais pas par la souche mutante 11G5 Δ *clbQ*. Ceci est accompagné par une augmentation de la production de cytokines, une dérégulation de l'expression des gènes liés à la réponse des cellules T infiltrantes et à l'accélération de la prolifération des cellules coliques. Dans les BMDM (*Bone marrow-derived macrophages*), la déficience de l'autophagie entraîne une augmentation du nombre intracellulaire de la 11G5 et favorise la production de cytokines pro-inflammatoires induite par la 11G5, mais cet effet est également observé suite à l'infection par la 11G5 Δ *clbQ*. Par rapport à la condition non infectée ou infectée avec la 11G5 Δ *clbQ*, l'infection par la 11G5 entraîne une augmentation de la production de ROS et de la sécrétion de l'IL-1 β par les BMDM qui est favorisée par la déficience de l'autophagie. En conclusion, l'autophagie dans les MC est nécessaire pour inhiber l'accroissement tumoral dans le modèle murin *Apc^{Min/+}* infecté avec les CoPEC. Les données préliminaires suggèrent que cela pourrait être médié par l'inhibition de la production de ROS induite par CoPEC, qui sont d'importants régulateurs de la sécrétion l'IL-1 β et de la réponse des cellules T dans le microenvironnement tumoral.

Abstract

Colibactin-producing strains of *Escherichia coli*, called CoPEC for Colibactin-producing *E.coli*, have emerged as major players involved in the pathogenicity of colorectal cancer (CRC). CoPEC induce DNA damage and chromosomal instability in eukaryotic cells that promote colorectal carcinogenesis in mouse models of CRC development. We have shown in a previous study that autophagy in intestinal epithelial cells (IEC) limits the pro-carcinogenic effects of CoPEC in a genetically susceptible mouse model, *Apc^{Min/+}*.

The first objective of the thesis was to investigate whether CoPECs are able to induce tumor development in a mouse model of CRC associated with chronic inflammation that does not exhibit genetic susceptibility or use of carcinogens. We showed that infection with CoPEC strain 11G5 or the colibactin-deficient strain, clinical and inflammatory scores are increased in wild-type mice and accentuated upon autophagy deficiency in ILCs. Infection with the 11G5 strain but not with the mutant promotes the development of invasive carcinomas, which is increased upon autophagy deficiency. The formation of invasive carcinoma is associated with the accumulation of DNA damage, independently of inflammation. In conclusion, CoPEC induce colorectal carcinogenesis in a mouse model of CRC associated with chronic inflammation without genetic susceptibility or the use of carcinogenic agents.

As myeloid cells (MCs) are an important component of the tumor microenvironment, our second objective was to examine the role of autophagy within these cells in colorectal tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice to CoPEC infection. We show that autophagy deficiency in MCs increases the volume but not the number of colorectal tumors in *Apc^{Min/+}* mice following infection with the 11G5 strain but not the 11G5 Δ clbQ mutant strain. This is accompanied by increased cytokine production, deregulation of gene expression related to the infiltrating T-cell response, and accelerated colonic cell proliferation. In BMDM (Bone Marrow-Derived Macrophages), autophagy impairment leads to an increase in intracellular 11G5 numbers and promotes 11G5-induced proinflammatory cytokine production, but this effect is also observed following infection with 11G5 Δ clbQ. Compared with the uninfected or 11G5 Δ clbQ-infected condition, 11G5 infection results in increased ROS production and IL-1 β secretion by BMDMs that is promoted by the impairment of autophagy. In conclusion, autophagy in MCs is required to inhibit tumor growth in the *Apc^{Min/+}* mouse model infected with CoPECs. Preliminary data suggest that this may be mediated by inhibition of CoPEC-induced ROS production, which are important regulators of IL-1 β secretion and T cell response in the tumor microenvironment.

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
RESUME	4
SOMMAIRE.....	5
ABREVIATIONS.....	9
INDEX DES FIGURES	12
INDEX DES TABLEUX	14
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1. LE CANCER COLORECTAL.....	16
1.1. <i>Epidémiologie</i>	16
1.2. <i>Structure et physiologie du côlon</i>	16
1.2.1. Généralités.....	16
1.2.2. Caractéristiques de l'épithélium colique	17
1.2.3. Les tissus intestinaux impliqués dans la réponse immunitaire.....	17
1.3. <i>La séquence adénome-carcinome</i>	18
1.3.1. Généralités.....	18
1.3.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse colorectale.....	19
1.3.2.1. Les principales voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse colique	19
1.3.2.2. Les différents phénotypes de la carcinogenèse colorectale	23
1.3.2.3. Les évènements moléculaires associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et rôle de l'inflammation dans le CCR	25
1.4. <i>L'étiologie des CCR</i>	25
1.4.1. Les maladies génétiques prédisposantes.....	26
1.4.2. Les maladies inflammatoires chroniques prédisposantes.....	27
1.4.3. Les CCR sporadiques.....	27
1.5. <i>Rôle du microenvironnement tumoral dans la carcinogenèse colique</i>	30
1.5.1. Les cellules impliquées dans le CCR.....	30
1.5.1.1. Rôles des lymphocytes dans le CCR	30
1.5.1.2. Rôles des cellules myéloïdes dans le CCR.....	34
1.5.2. Le concept d'immuno-édition ou des 3 ^E	37
1.5.3. Immuno-édition et CCR	38
1.6. <i>Diagnostic du CCR</i>	41
1.6.1. Les facteurs pronostiques	41
1.6.2. Les facteurs histologiques	41
1.6.3. Les facteurs moléculaires et sériques	42
1.7. <i>La prise en charge thérapeutique</i>	43
1.8. <i>Immunothérapies à l'essai</i>	44
2. ROLE DU MICROBIOTE DANS LA CARCINOGENESE COLORECTALE	46
2.1. <i>Dysbiose intestinale et CCR</i>	46
2.2. <i>Les effets des micro-organismes sur le métabolisme</i>	47
2.3. <i>Microbes, immunité et CCR</i>	50
2.3.1. Impact de la translocation bactérienne sur le CCR	50
2.3.2. Altération du micro-environnement tumoral par les bactéries pro-carcinogènes.....	51

2.4.	<i>La carcinogénèse induite par les bactéries spécifiques</i>	53
2.4.1.	<i>Enterococcus faecalis</i>	53
2.4.2.	<i>Peptostreptococcus anaerobius (P. anaerobius)</i>	54
2.4.3.	<i>Streptococcus gallolyticus (S. bovis)</i>	55
2.4.4.	<i>Bacteroides fragilis enterotoxigenic (ETBF)</i>	56
2.4.5.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	57
2.4.6.	<i>Escherichia coli</i>	59
2.5.	<i>Microbiote et CCR : Diagnostic, Pronostic et Traitement.</i>	65
2.5.1.	<i>Le microbiote intestinal comme biomarqueur pour le diagnostic du CCR</i>	65
2.5.2.	<i>Le microbiote intestinal comme biomarqueur dans le pronostic et l'issue à long terme du CCR.</i>	66
2.5.3.	<i>Le microbiote intestinal comme biomarqueur dans la réponse aux traitements</i>	67
3.	L'AUTOPHAGIE	69
3.1.	<i>Généralités</i>	69
3.2.	<i>Mécanisme moléculaire de la macro-autophagie</i>	69
3.2.1.	<i>L'initiation</i>	70
3.2.2.	<i>L'élongation</i>	71
3.2.3.	<i>La maturation et la dégradation du contenu par le lysosome</i>	71
3.3.	<i>Autophagie et réponse aux bactéries intracellulaires : la xénophagie</i>	72
3.3.1.	<i>La reconnaissance des bactéries par la xénophagie</i>	72
3.3.2.	<i>L'interaction entre les bactéries et la xénophagie</i>	73
3.4.	<i>Autophagie et cancer</i>	75
3.4.1.	<i>Le rôle bivalent de l'autophagie dans le développement cancéreux</i>	75
3.4.2.	<i>L'implication de l'autophagie dans le développement cancéreux</i>	76
3.4.3.	<i>Autophagie et cellules immunitaires infiltrantes</i>	81
3.4.3.1.	<i>L'autophagie dans les cellules tumorales et impact sur le microenvironnement immunitaire.</i>	81
3.4.3.2.	<i>Rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires infiltrées</i>	83
3.5.	<i>Rôle de l'autophagie dans le CCR</i>	86
3.6.	<i>L'autophagie comme cible thérapeutique du cancer</i>	89
	TRAVAIL EXPERIMENTAL	92
	CONTEXTE SCIENTIFIQUE	93
	ETUDE 1	95
	RESULTATS EXPERIMENTAUX	96
	ETUDE 2	114
	RESULTATS EXPERIMENTAUX	115
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	148
1.	IMPLICATION DE L'AUTOPHAGIE AU SEIN DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALE DANS LA REPONSE DE L'HOTE SUITE A L'INFECTION PAR DES COPEC	149
1.1.	<i>Etude du rôle de l'autophagie et des CoPEC dans l'initiation de la tumorigénèse colorectale</i>	149
1.2.	<i>Mécanisme de régulation de l'autophagie dans les CEI par une infection par des CoPEC</i>	150
1.3.	<i>Etude de l'implication de l'autophagie et d'une colonisation par des CoPEC dans la modulation de microbiote intestinal</i>	152
2.	IMPLICATION DE L'AUTOPHAGIE AU SEIN DES CELLULES MYELOÏDES DANS LA REPONSE DE L'HOTE A LA SUITE DE L'INFECTION PAR DES COPEC	154

2.1.	<i>Caractérisation du rôle de l'autophagie dans les cellules myéloïdes dans la composition du microenvironnement tumoral à la suite d'une infection par les CoPEC.....</i>	154
2.2.	<i>Autophagie ou LC3-associated phagocytosis.....</i>	156
2.3.	<i>Etude du rôle de l'autophagie et des CoPEC dans la polarisation macrophagique et le développement du CCR.....</i>	158
2.4.	<i>Etude du rôle de l'autophagie dans les cellules dendritiques à la suite de l'infection par les CoPEC.....</i>	160
3.	IMPACT DE L'INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE SUR LA CARCINOGENESE COLORECTALE INDUITE PAR LES CoPEC.....	162
	CONCLUSION GENERALE.....	164
	VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	166
	BIBLIOGRAPHIE	167
	ANNEXE	193

Abréviations

4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal	CLR	Cullin E3 ubiquitin ligases
5-FU	5-fluoro-uracile	CMA	Chaperone-mediated autophagy
ACE	Antigène carcino-embryonnaire	CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
AIEC	Adherent-invasive Escherichia coli	CMS	Consensus Molecular Subtype
AKT	AKT8 virus oncogene cellular homolog	CoPEC	Colibactin-producing E.coli
AL	Anastootic leak	CQ	Chloroquine
ALR	Autophagic lysosome reformation	CSL	CBF1 suppressor of hairless lag-1
AOM	Azoxymethane	CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4
APC	Adenomatous polyposis coli	CTP	Camptothecin
APM	Antigen processing machinery	CXCL	C-X-C motif ligand
ARG1	Arginase 1	DC	Dendritic cells
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	DCA	Deoxycholic
ATG	Autophagy related genes	DCC	Deleted in cancer colorectal
BAG1	BAG cochaperone 1	DNAJB1	Dna J heat shock protein family member B1
BBC3	BCL2 binding component 3	DSB	Double-strand breaks
BHA	Butylated hydroxyanisole	DSS	Dextran sodium sulfate
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cells	EGFR	Epidermal growth factor receptor
BMDM	Bone marrow-derived macrophages	EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
BMPRI1A	Bone morphogenetic protein receptor type 1A	ERK	Extracellular signal-regulated kinase
CA	Cholic acid	ETBF	Enterotoxigenic Bacteroides fragilis
CAC	Colitis-associated cancer	FIP200	Focal adhesion kinase (FAK) family kinase-interacting protein 200 kD
CCL	C-C motif ligand	FKBP1B	FKBP prolyl isomerase 1B
CCR	Cancer colorectal	Gal-GalNAc	D-galactose-β(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine
CDK	Cyclin-dependant kinase	GALT	Gut-associated lymphoid tissue
CDT	Cytolethal distending toxin	GAS	Group A Streptococcus
CEI	Cellules épithéliales intestinales	GFP	Green florescent protein
CIF	Cell cycle-inhibiting factor	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3B
CIMP	CpG island methylator phenotype	H₂S	Hydrogen sulfide
CIN	Chromosomal instability		

HCQ	Hydroxichloroquine	MSI-L	Microsatellite instability Low
HLA	Human leukocyte antigens	mTOR	Mammalian target of rapamycin
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer	MUTYH	MutY homolog
HSC70	Heat shock cognate 71 kDa protein	NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase	NCR	Natural cytotoxicity receptors
IEL	Intraepithelial lymphocyte	NDP52	Nuclear dot protein 52
Ig	Immunoglobuline	NEDD8	Neuronal precursor cell-expressed protein 8)
iNOs	NO synthase inductible	NICD	NOTCH intracellular domain
JAK	Janus kinase	NK	Natural killer
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog	NKG2D	Natural killer Group 2D
LAG-3	Lymphocytes-activation gene 3	NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
LAMP2A	Lysosomal-associated membrane protein type 2A	NOX2	Complex NADPH oxidase 2
LAP	Lc3-associated phagocytosis	NRPS	Non-ribosomal peptide synthetases
LB	Lymphocyte B	PAF	Polypose adénomateuse familiale
LC3	Light chain 3	PCWBR2	Putative cell wall binding repeat 2
LCA	Lithocholic acid	PD-1	Programmed cell death 1
LEF	Lymphoid enhancer factor	PD-L1	Programmed-death cell ligand
LIR	LC3-interacting region	PE	Phosphatidylethanolamine
LT	Lymphocyte T	PEA15	Proliferation and apoptosis adaptor protein 15
MAML	Mastermind-like	PEX14	Peroxisomal biogenesis factor 14
MAP1LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3	PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
MC	Cellules myéloïdes	PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
MDSC	Cellule myéloïde immunosuppressive	PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
MEK	MAPK-ERK-Kinase	PIP3	Phosphatidylinositol 3, 4, 5 trisphosphate
MGMT	Methylguanine DNA methyltransferase	PKS	Polyketide synthases
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	PPT1	Palmitoy-protein thioesterase 1
Min	Multiple intestinal neoplasia	PRR	Pathogen recognition receptor
MLH	MutL homolog	PTEN	Phosphatase and tensing homolog
MMP	Matrix metalloproteinase	RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
MSI	Microsatellite instability	RAS	Rat sarcoma
MSI-H	Microsatellite instability High	RE	Réticulum endoplasmique

ROS	Reactive oxygen species	TNM	Tumor node metastasis
SERPINA1	Serpin family A member 1	TME	Tumor microenvironment
SMAD	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>	TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
SNAI1	Snail family transcriptional repressor 1	Treg	T régulateurs
SSB	Single-strand breaks	TSC2	Tuberous sclerosis protéine
SSTIII	Système de sécrétion de type III)	TWIST1	<i>Twist</i> Family BHLH Transcription Factor 1
TAM	Tumor-associated macrophages	ULK1	UNC kinase-51-like-kinase
TAXBP1	Tax1-binding protein 1	UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i>
TCF	T-cell factor	VAMP7	Vesicle associated membrane protein 7
TCR	Recepteur des cellules T	VEGFR	Vascular endothelial growth factor
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse	VMP1	Vacuole membrane protein 1
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>	VPS34	Vacuolar protein sorting
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes	WIPI	WD repeat protein interacting with phosphoinositides
TLR	Toll-like receptor		

Index des figures

Figure 1 : Incidence du CCR dans le monde

Figure 2 : La paroi du tube digestif du côlon

Figure 3 : Les cellules de l'épithélium intestinal

Figure 4 : La séquence adénome-cancer

Figure 5 : La voie Wnt/b-caténine

Figure 6 : La voie p53

Figure 7 : La voie Ras/MAPK

Figure 8 : La voie PI3K/AKT/mTOR

Figure 9 : La fonction des NK dans le cancer

Figure 10 : La fonction des LT régulateurs dans le cancer

Figure 11 : Les mécanismes impliqués dans la fonction immunosuppressive des MDSC dans le cancer

Figure 12 : Les mécanismes impliqués dans la fonction pro-tumorale des TAN dans le cancer

Figure 13 : Les principaux rôles des TAM dans le cancer

Figure 14 : Le principe de l'immunoédition dans le cancer

Figure 15 : Les différents stades du CCR selon la classification « TNM »

Figure 16 : Classification CMS du CCR

Figure 17 : Dysbiose et CCR

Figure 18 : Mécanismes par lesquels le microbiote intestinal module la carcinogénèse colorectale

Figure 19 : Rôle pro-carcinogène d'*Enterococcus faecalis* dans le CCR

Figure 20 : Rôle pro-carcinogène de *S. bovis* dans le CCR

Figure 21 : Rôle Pro-carcinogène de ETBF dans le CCR

- Figure 22** : Rôle pro-carcinogène de *F. nucleatum* dans le CCR
- Figure 23** : Mécanisme d'action de la cyclomoduline CIF
- Figure 24** : Mécanisme d'action de la cyclomoduline CDT
- Figure 25** : Mécanisme d'action de la cyclomoduline CNF
- Figure 26** : Mécanisme d'action de la colibactine
- Figure 27** : Les différentes formes d'autophagie
- Figure 28** : Les étapes de la macro-autophagie
- Figure 29** : Les bactéries qui échappent à la reconnaissance de l'autophagie
- Figure 30** : Rôle de l'autophagie dans l'expression du CMH de classe I
- Figure 31** : Rôle de l'autophagie dans le trafic et la fonction des cellules immunitaires
- Figure 32** : Rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral
- Figure 33** : Mécanismes pro-tumoraux de l'autophagie dans le CCR
- Figure 34** : Rôle de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales dans la carcinogenèse colorectale associée à la colonisation des CoPEC
- Figure 35** : Modèle proposé du rôle de CoPEC et de l'autophagie dans l'initiation du CCR associé à l'inflammation chronique
- Figure 36** : Modèle proposé du rôle de l'autophagie dans les cellules myéloïdes dans la carcinogenèse colorectale associée à la colonisation des CoPEC
- Figure 37** : Les effet du transfert de microbiote associé à la muqueuse des souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔCEI}* et des souris contrôles sur la tumorigenèse colorectale des souris *Apc^{Min/+}*
- Figure 38** : La voie LAP
- Figure 39** : L'inflammasome NLRP3
- Figure 40** : L'infection par les CoPEC semble induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains THP-1

Index des tableaux

Tableau 1 : Liste des microARN dérégulés chez les patients atteints de CCR et colonisés par les CoPEC

Tableau 2 : Listes des transcrits codant pour les protéines de l'autophagie ciblés par les microARN qui sont retrouvés augmentés (rouge) et diminués (vert) chez les patients CoPEC+

Tableau 3 : Liste des antibiotiques utilisés pour le transfert de flore

Synthèse bibliographique

Cancer colorectal

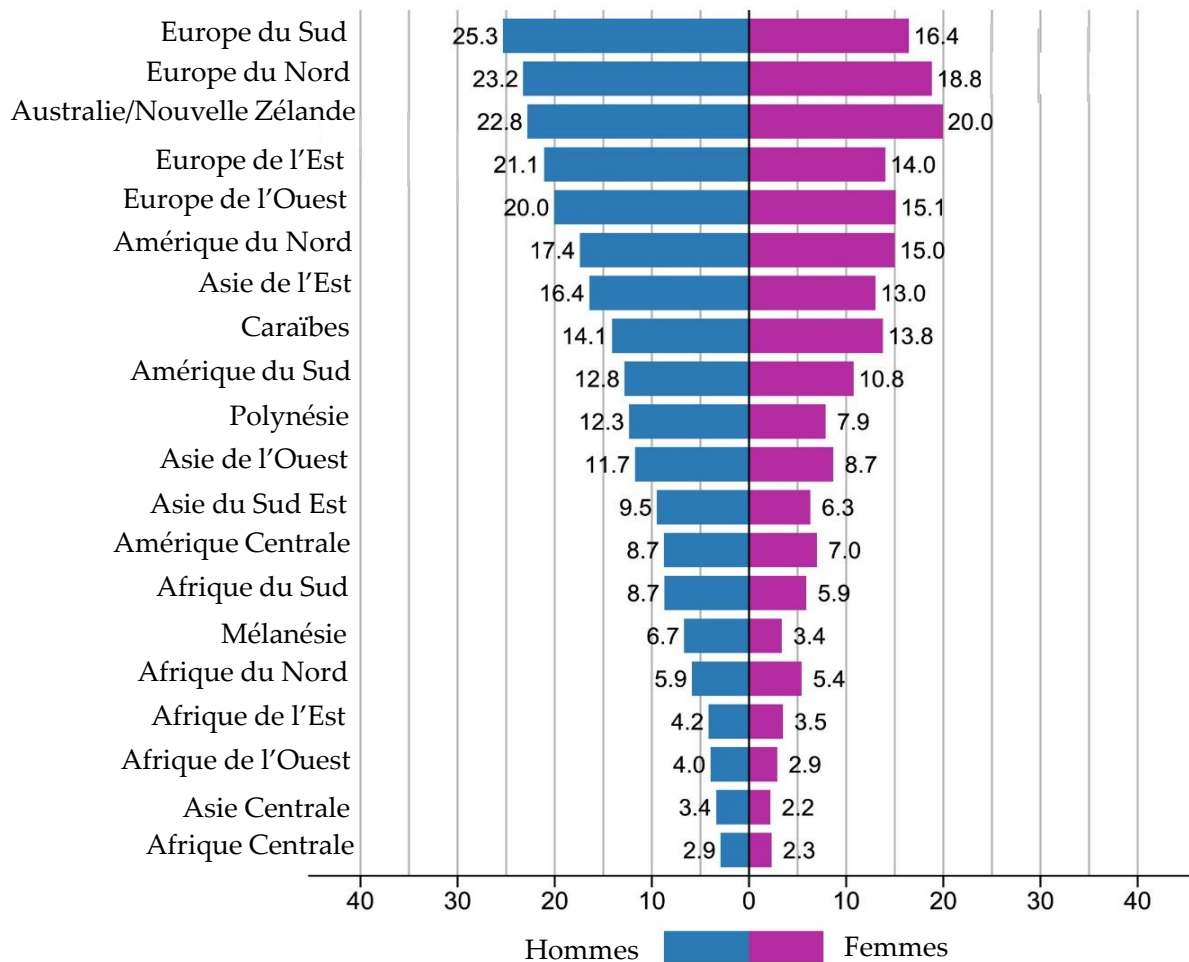


Figure 1 : Incidence du CCR dans le monde.

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

(Modifiée d'après l'organisation mondiale de la santé, chiffres de 2020, Sung et al., 2021)

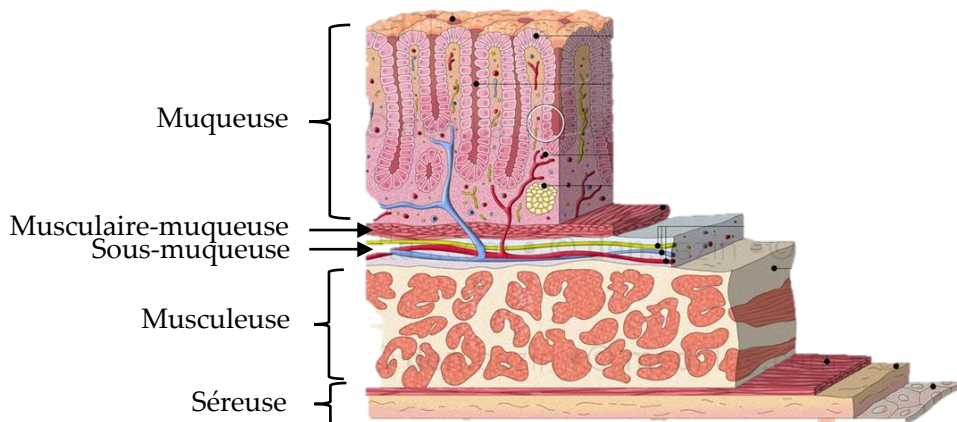


Figure 2 : La paroi du tube digestif du côlon.

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

(Modifiée d'après <http://www.medillus.com/portfolio/histologie/>)

1. Le cancer colorectal

1.1. Epidémiologie

Avec 1.9 million de nouveaux cas et 935 000 décès dans le monde en 2020, le CCR (Cancer colorectal) se place au troisième rang en termes d'incidence, derrière le cancer du sein et du poumon. Etant à l'origine d'une cause de décès sur dix par cancer, le CCR est la seconde cause de mortalité, devancé par le cancer du poumon (Sung et al., 2021). En 2019, en France, le CCR a provoqué le décès de 18 000 personnes et 45 000 ont été nouvellement diagnostiquées (selon l'Institut National du Cancer). Cependant, il existe une forte disparité entre les pays, puisque le nombre de cas augmente trois fois plus dans les pays développés tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Europe ou bien l'Amérique du Nord, comparativement aux pays en voie de développement où l'incidence reste encore relativement faible, comme en Afrique ou encore en Amérique centrale (**Figure 1**). Cette augmentation ne se traduit pas nécessairement par une hausse de la mortalité qui se voit même décliner, due notamment à l'amélioration des techniques de dépistage. Le devenir des patients dépendant largement du stade de la maladie au moment du diagnostic, une détection précoce du CCR permet une meilleure prise en charge thérapeutique et donc de meilleures chances de survie.

1.2. Structure et physiologie du côlon

1.2.1. Généralités

Le tractus digestif possède diverses fonctions. Les plus connues sont la digestion et l'assimilation des aliments. Il participe aussi activement à la protection de l'organisme contre des agents pathogènes et des molécules nocives, grâce à son rôle barrière. Le côlon, situé entre l'intestin grêle et le rectum, est, quant à lui, impliqué dans la réabsorption hydroélectrolytique, la dégradation des composés non-digestibles et le stockage des selles avant défécation.

L'organisation histologique permettant le bon déroulement des fonctions attribuées au côlon est, comme l'ensemble du tube digestif, divisée en une muqueuse, une sous-muqueuse, une musculuse et une séreuse (**Figure 2**). La muqueuse est la tunique la plus complexe au contact de la lumière. Elle est composée d'un épithélium, d'un chorion (appelée aussi lamina propria) riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, et d'une fine couche musculaire de soutien appelée musculaire muqueuse (Humphries and Wright, 2008).

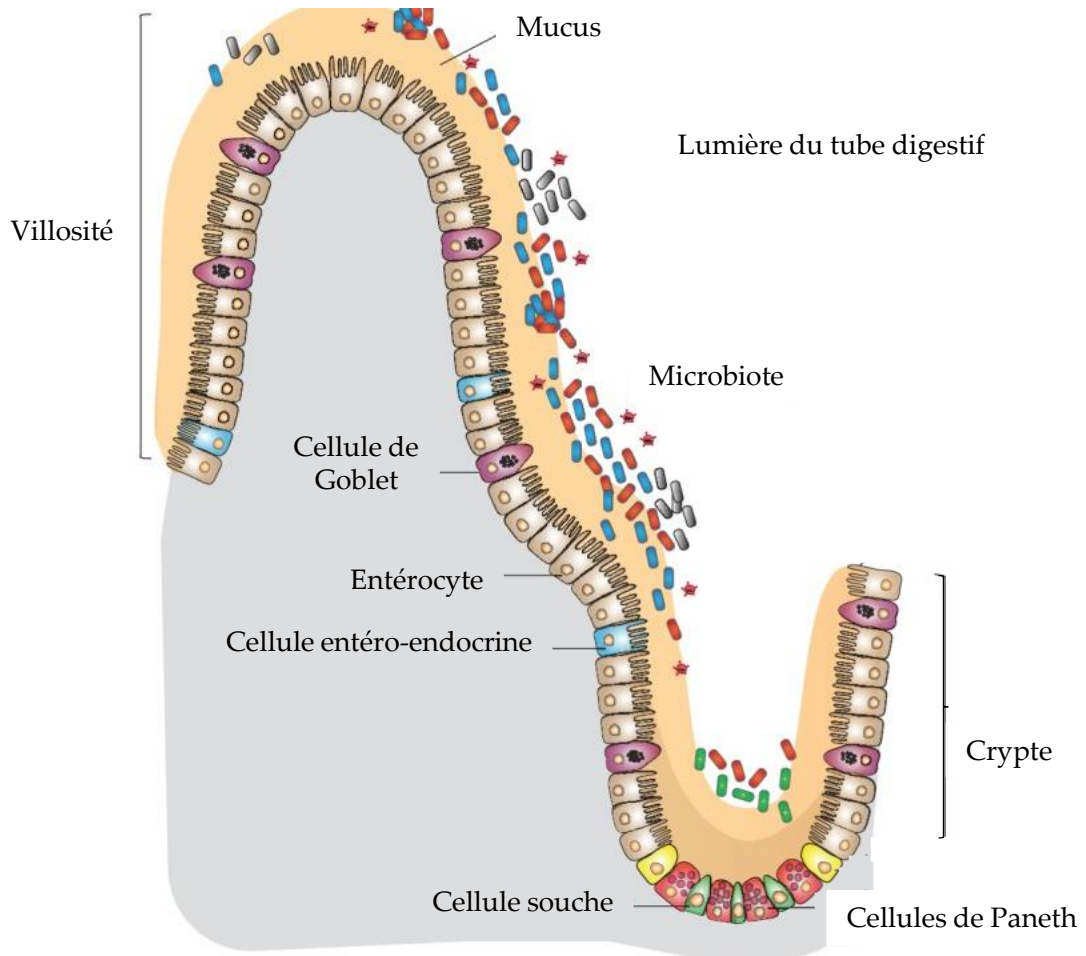


Figure 3 : Les cellules de l'épithélium intestinal.

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

(Modifiée d'après Dis Model Mech et al., 2016)

La muqueuse intestinale est pourvue d'invaginations nommées cryptes ou glandes de Lieberkühn. Grâce à la présence de cellules souches situées au fond des cryptes, le renouvellement de l'épithélium intestinal est constant et rapide (Clevers, 2013). Chez l'homme, il est remplacé tous les quatre à cinq jours, faisant de lui le tissu qui se renouvelle le plus activement de tout l'organisme.

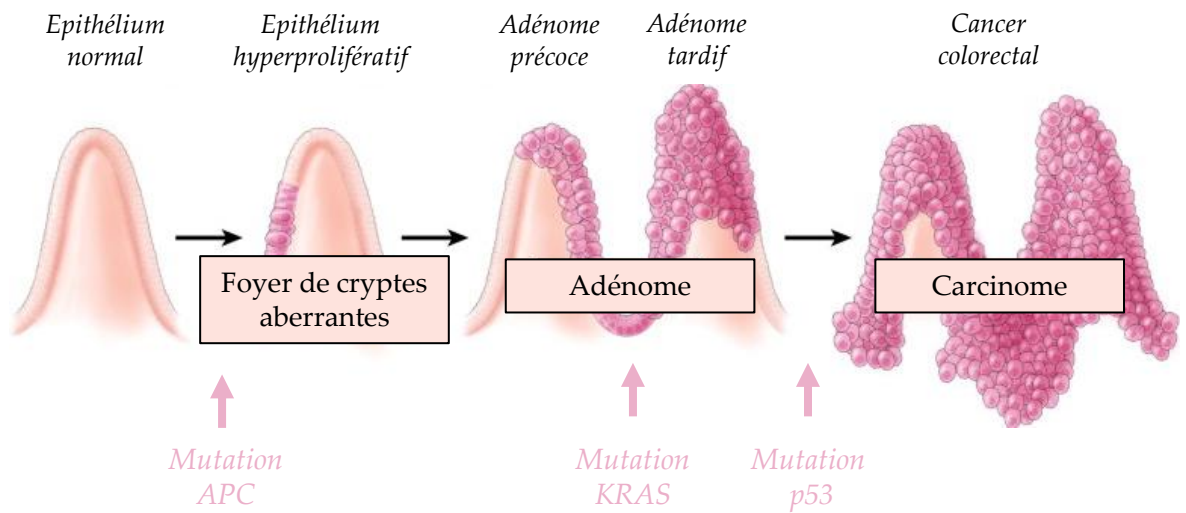
1.2.2. Caractéristiques de l'épithélium colique

Contrairement à la muqueuse de l'intestin, celle du côlon est dépourvue de villosités mais présente un nombre important de cryptes. Les cellules souches pluripotentes présentes au fond de ces structures sont bordées par des cellules mésenchymateuses, appelées myofibroblastes péri-cryptiques (Humphries and Wright, 2008). Les cellules souches, grâce à leur division asymétrique, permettent à la fois leur auto-renouvellement mais également la production de cellules épithéliales, remontant progressivement à la surface des cryptes au cours de leur différenciation (van der Flier and Clevers, 2009).

L'épithélium colique est composé de quatre types cellulaires : (i) les entérocytes, qui réalisent l'absorption intestinale, (ii) les cellules calciformes qui sécrètent le mucus et des glycoprotéines permettant la lubrification des selles et favorisent la fonction barrière de l'épithélium, (iii) les cellules endocrines qui sécrètent des hormones ayant une activité paracrine et endocrine et (iv) les cellules de Paneth qui sécrètent des peptides (défensines) et des lysozymes antimicrobiens (**Figure 3**) (Allaire et al., 2018). La proportion de chaque type cellulaire de l'épithélium colique est différente de celle observée au niveau de l'intestin. L'épithélium colique présente un nombre moins important d'entérocytes, puisque sa fonction première est la réabsorption hydrique et d'électrolytes et non pas de nutriments. Il contient également une quantité plus faible de cellules de Paneth qui sont présentes seulement au fond des cryptes, à proximité des cellules souches pour assurer leur fonction (Ganz, 2000). *A contrario*, le nombre de cellules calciformes est plus important au niveau du côlon.

1.2.3. Les tissus intestinaux impliqués dans la réponse immunitaire

Au sein de la muqueuse intestinale, qui est en constante confrontation avec de possibles pathogènes ou pathobiontes, existent trois lignes de défense immunitaire de l'hôte qui sont : (i) l'épithélium, (ii) la *lamina propria* et (iii) les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT : *Gut-associated lymphoid tissue*) (Ahluwalia et al., 2017)



CCR sporadique

Figure 4 : La séquence adénome-cancer.

La transformation d'un épithélium normal en carcinome colorectal fait intervenir une accumulation de mutations génétiques et épigénétiques induisant la formation tout d'abord de foyers de cryptes aberrantes puis d'adénomes précoces et tardifs, aboutissant à la formation d'un carcinome. Cette longue séquence, depuis la première cellule dysplasique jusqu'au cancer invasif, a été baptisée « séquence adénome-cancer » par Fearon et Vogelstein. (Modifiée d'après Terzic et al., 2010)

En plus de sa fonction barrière, l'épithélium colique contient de nombreuses cellules immunitaires, appelées lymphocytes intraépithéliaux (IELs : *Intraepithelial lymphocytes*). Grâce à leur proximité avec la lumière intestinale, ils constituent la première ligne de défense immunitaire contre des pathogènes (Cheroutre et al., 2011). Ils sont exclusivement composés de LT (*Lymphocyte T*) capables de reconnaître les antigènes *via* l'interaction de leurs récepteurs T avec les complexes d'histocompatibilité des cellules présentatrices d'antigènes. Le maintien des IELs au sein de l'épithélium est régulé par leurs interactions avec les cellules épithéliales intestinales engageant leurs protéines de surface respectives CD103 et E-cadhérines (Cepek et al., 1994).

La *lamina propria* 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 (Mowat and Agace, 2014). Ses fonctions principales sont de prévenir et de répondre à une invasion de la muqueuse par des pathogènes. Les lymphocytes présents sont majoritairement composés de LT et LB (*Lymphocyte B*) sécréteurs d'IgA (*Immunoglobuline A*) dont notamment les LT CD4⁺ auxiliaires, LT CD8⁺ cytotoxiques et les LT régulateurs (Mowat and Agace, 2014).

Le GALT regroupe trois foyers lymphoïdes différents : les plaques de Peyer, les follicules isolés et les ganglions mésentériques (Mason et al., 2008). Les plaques de Peyer, localisées dans la partie distale de l'iléon, sont principalement composées de LB mais contiennent également des LT CD4⁺ et CD8⁺, des cellules dendritiques et des macrophages. Les follicules isolés ont une composition et une structure similaire aux plaques de Peyer mais sont répartis tout le long du tube digestif y compris le côlon. Contrairement aux autres tissus, les ganglions mésentériques sont alimentés par des vaisseaux lymphatiques (Newberry and Lorenz, 2005). Ils permettent l'initiation de la réponse immunitaire à la suite d'une présentation des antigènes aux lymphocytes par les cellules dendritiques activées provenant de la *lamina propria*.

1.3. La séquence adénome-carcinome

1.3.1. Généralités

La chronologie des événements amenant la transformation d'un épithélium sain à un carcinome a été décrite par Volgestein et Fearon en 1990 et nommée la séquence adénome-cancer (**Figure 4**). Des mutations génétiques au *niveau des cryptes de Lieberkühn* marquent la

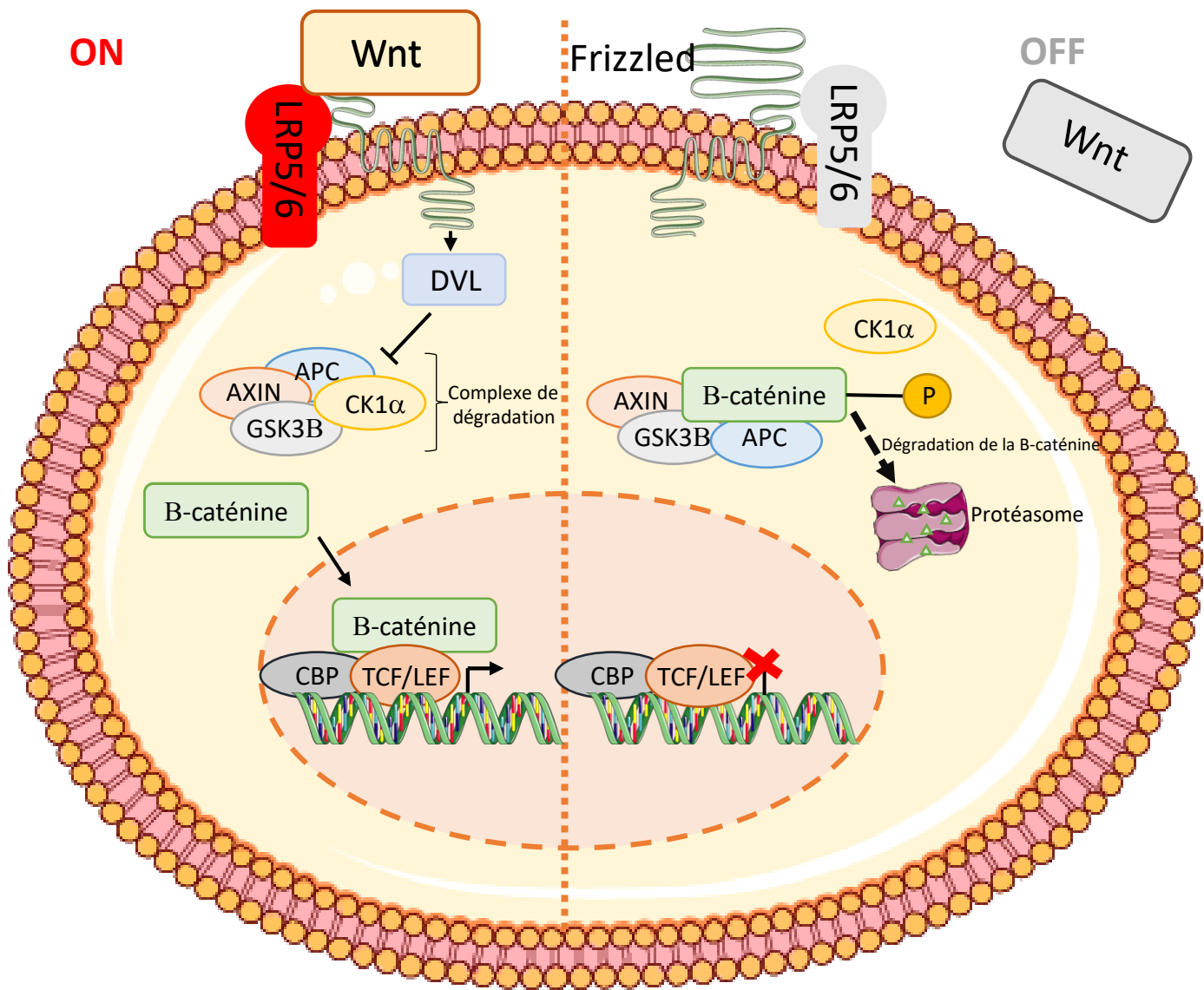


Figure 5 : La voie Wnt/ β -caténine.

En présence d'un ligand WNT sur son récepteur, composé du récepteur Frizzled et de la protéine LRP5/6, la protéine Dvl (*Dishevelled*) est recrutée permettant la dissociation du complexe de destruction de la β -caténine, qui comprend les protéines Axine, APC (*Adenomatous polyposis coli*), les kinases GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) et CK1 α (*Casein kinase 1 α*), avec la β -caténine. Cette dernière transloque dans le noyau où elle s'associe à un ensemble de molécules impliquées dans la transcription, en particulier les facteurs TCF/LEF (*Transcription factor*) permettant la transcription de nombreux gènes de prolifération, dont le gène c-myc et celui de la cyclin D1, tous deux engagés dans la prolifération cellulaire.

En absence de stimulation des récepteurs Frizzled par un ligand WNT, la β -caténine est phosphorylée par le complexe de destruction. Cette phosphorylation la conduit vers une ubiquitine-ligase puis vers le protéasome où elle est dégradée.

transition d'un épithélium normal à un épithélium hyper-prolifératif, puis d'un adénome précoce à tardif, jusqu'au développement d'un carcinome et ceci sur une durée de 10 à 20 ans (Fearon and Vogelstein, 1990). Le premier événement du processus de la carcinogenèse colorectale correspond à une mutation du gène suppresseur de tumeur *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) dans 60% des CCR. L'inactivation de la protéine APC conduit à une activation constitutive de la voie WNT, avec pour conséquence une dérégulation de la prolifération cellulaire, amenant à la formation d'un adénome précoce à partir d'un épithélium sain. La mutation activatrice du proto-oncogène *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog*) représente 35-40% des CCR et favorise la transformation d'un adénome précoce à intermédiaire, du fait de son rôle dans la prolifération et la survie des cellules. S'ensuivent des mutations retrouvées dans les gènes *DCC* (*Deleted in cancer colorectal*) et *TP53* qui conduisent à la transition de l'adénome intermédiaire au carcinome. La protéine DCC ainsi que TP53 jouent toutes deux un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Bien que 85-90% des CCR sporadiques résultent de la formation d'adénomes, seulement 10% de ceux-ci se développent en cancer (Conteduca et al., 2013).

1.3.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse colorectale

Les CCR comptent trois phénotypes distincts : le phénotype CIN (*Chromosomal instability*), le phénotype MSI (*Microsatellite instability*) et le phénotype CIMP (*CpG island methylator phenotype*). Selon le phénotype et les aberrations associées, différentes voies de signalisation, régulant des processus comme la prolifération, la survie, la migration ou encore l'invasion, sont altérées.

1.3.2.1. Les principales voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse colique

- La voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine est une voie majeure impliquée dans la carcinogenèse colorectale, où plus de 80% des CCR décrits développent des mutations dans l'un de ses composants et notamment, dans le gène *APC* (Aitchison et al., 2020). Dans des conditions physiologiques, le β -caténine est maintenue inactive au sein du cytoplasme, grâce à un complexe de dégradation qui, par son action de phosphorylation, la conduit à la dégradation dans le protéasome 26S.

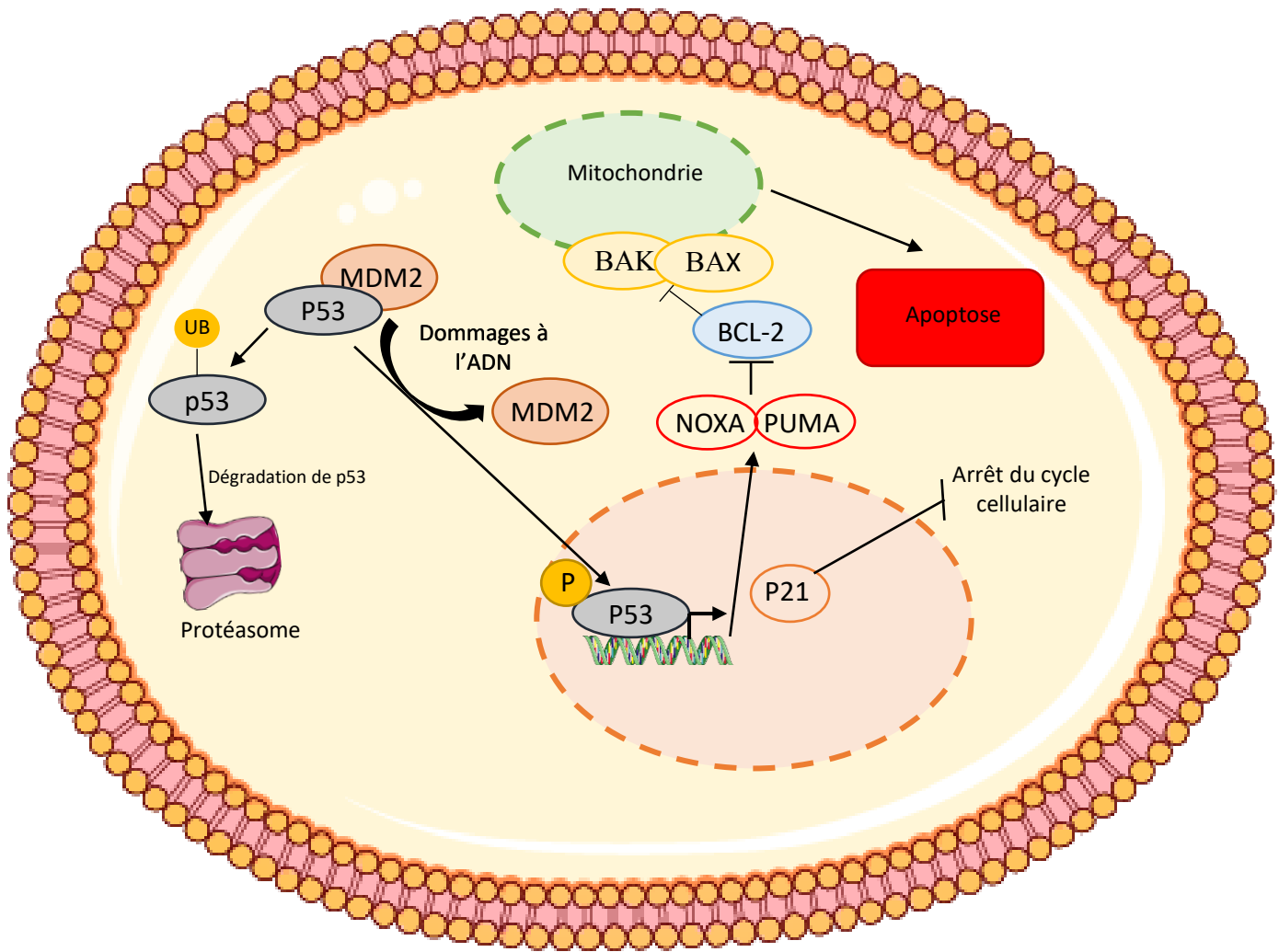


Figure 6 : La voie p53.

La voie de signalisation p53 est activée en réponse à différents stress cellulaires tels que des dommages à l'ADN, l'hypoxie ou encore l'activation d'oncogènes. P53 est alors dissociée de sa protéine inhibitrice, MDM2, est phosphorylée et transloque dans le noyau pour agir comme un facteur de transcription. Les gènes cibles dont notamment p21, PUMA (*Bcl-2-binding component 3*) et NOXA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein1*) agissent sur le cycle cellulaire et l'apoptose. Alors que P21 inhibe la progression du cycle cellulaire, PUMA et NOXA induisent l'apoptose *via* l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, conduisant ainsi à l'activation des protéines pro-apoptotiques, BAK et BAX et l'apoptose cellulaire.

Le complexe de dégradation est formé de trois protéines adaptatrices, l'Axine, APC et GSK3B (*Glycogen synthase kinase 3B*) (**Figure 5**).

Dans le CCR, la mutation d'au moins un allèle du gène suppresseur de tumeur *APC* entraîne la formation d'une protéine APC tronquée, incapable d'interagir avec le complexe Axine/GSK3. La β -caténine, n'étant plus phosphorylée, migre jusqu'au noyau. Elle interagit alors avec les facteurs de transcription TCF (*T-cell factor*) ou LEF (*Lymphoid enhancer factor*) pour activer l'expression des gènes cibles, impliqués notamment dans la prolifération, l'inflammation, l'apoptose et la sénescence cellulaire (Zhang and Shay, 2017).

Néanmoins, dans 5-10% des CCR sporadiques, des mutations existent dans d'autres composants de la voie Wnt/ β -caténine, telles que des mutations dans les sites de phosphorylation de la β -caténine, dans les gènes codant pour les E3 ligases, RNF43 et Znf3 ou encore au niveau des gènes codant pour TCF dont notamment des mutations dans les séquences microsatellitaires de *TCF7L2* (Chang et al., 2018; Mikaeel et al., 2021; Yu et al., 2016).

- La voie p53

La protéine p53 est un facteur de transcription inductible par différents stress cellulaires, tels que l'hypoxie, les dommages à l'ADN et l'activation d'oncogène. Par son action sur p21, un inhibiteur des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines, p53 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 mais aussi en phase G2/M, permettant ainsi le maintien de la stabilité génomique. p53 a également un rôle dans le contrôle de la mort cellulaire puisqu'il peut conduire à la surexpression des protéines pro-apoptotiques de la famille de BCL-2, avec pour conséquence l'activation de la cascade des caspases et l'induction de la transcription des gènes codant pour les récepteurs de mort FAS (Levine, 2020) (**Figure 6**).

La prévalence des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* est très élevée dans les CCR, puisqu'elle peut atteindre 43,28% (Bouaoun et al., 2016). Plus de 90 % des mutations se situent au niveau des sites de liaison à l'ADN, provoquant ainsi la perturbation de l'interaction de p53 avec ses gènes cibles. Les conséquences des mutations du gène *TP53* sont déterminantes quant à l'évolution du CCR, puisqu'elles sont associées à la migration, l'invasion, la capacité à induire des métastases et sont impliquées dans l'angiogenèse (Liebl and Hofmann, 2021).

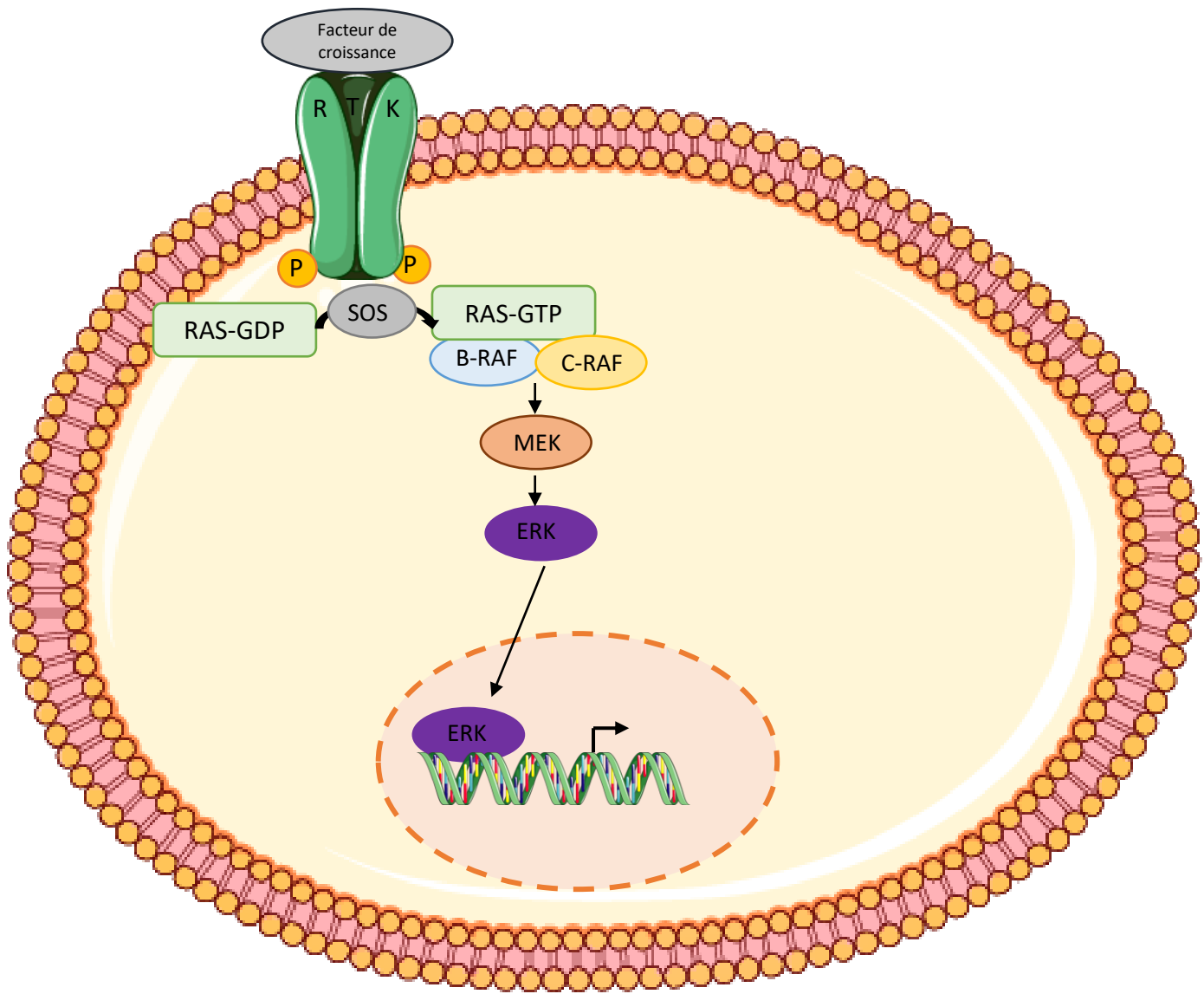


Figure 7 : La voie RAS/MAPK.

L'activation de la voie débute par la fixation d'un ligand, les facteurs de croissance, sur un récepteur à tyrosine kinases tel que EGFR ou VEGFR. La protéine SOS transforme la forme RAS-GDP inactive en RAS-GTP active. Ceci entraîne la phosphorylation et l'activation de la protéine RAF qui, à son tour, active par phosphorylation la kinase MEK. Puis, la kinase MEK par double phosphorylation de ERK, entraîne sa translocation au noyau et l'expression de gènes cibles.

- La voie TGF- β /SMAD

La voie TGF- β /SMAD (*Transforming growth factor-beta/Small mothers against decapentaplegic*) est qualifiée de voie « suppresseur de tumeur ». La fixation du ligand TGF- β sur son récepteur permet son activation par phosphorylation. S'ensuit la formation d'un complexe entre des protéines faisant partie de la famille SMAD et la protéine SMAD4. Le complexe nouvellement formé transloque dans le noyau où il s'associe avec des facteurs de transcription ou des protéines intervenant dans le remodelage de la chromatine, afin d'activer la transcription de gènes cibles tels que des initiateurs de l'apoptose ou des inhibiteurs du cycle cellulaire (Tzavlaki and Moustakas, 2020). Une fois dérégulée, cette voie intervient dans la progression du cancer et dans l'induction de la transition épithélial-mésenchymateuse (Ahmadi et al., 2019).

Chez les patients atteints de CCR, 30% d'entre eux présentent des mutations dans le gène codant pour la protéine SMAD4 (Mehrvarz Sarshekeh et al., 2017). La perte de cette protéine est tenue également responsable de la résistance des patients à un agent cytotoxique, le 5-fluoruracil et est positivement corrélée avec la progression du CCR (Wasserman et al., 2019). Néanmoins, la seule perte de SMAD4 ne suffit pas pour initier la carcinogénèse car le risque de développer un carcinome est relativement faible. Cependant, lorsqu'elle est associée à une mutation du gène APC, elle en favorise la progression. La perte d'expression de SMAD4 est également en lien avec une altération de l'infiltration des monocytes au sein du microenvironnement tumoral, contribuant à la formation de métastases (Wasserman et al., 2019).

- La voie RAS/MAPK

La voie de signalisation RAS/MAPK (*Rat sarcoma/Mitogen-activated protein kinase*) transmet des signaux *via* des récepteurs à tyrosine kinase comme l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) ou VEGFR (*Vascular endothelial growth factor*) (**Figure 7**). La cascade de signalisation qui en découle transforme la forme RAS-GDP inactive en RAS-GTP active. Son recrutement à la membrane ainsi que son activation entraînent la phosphorylation et l'activation de la protéine RAF (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*) puis la kinase MEK (*MAPK-ERK-Kinase*) et ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*). L'activation de cette dernière entraîne sa translocation au niveau du noyau et la transcription des gènes cibles codant pour des facteurs de transcription

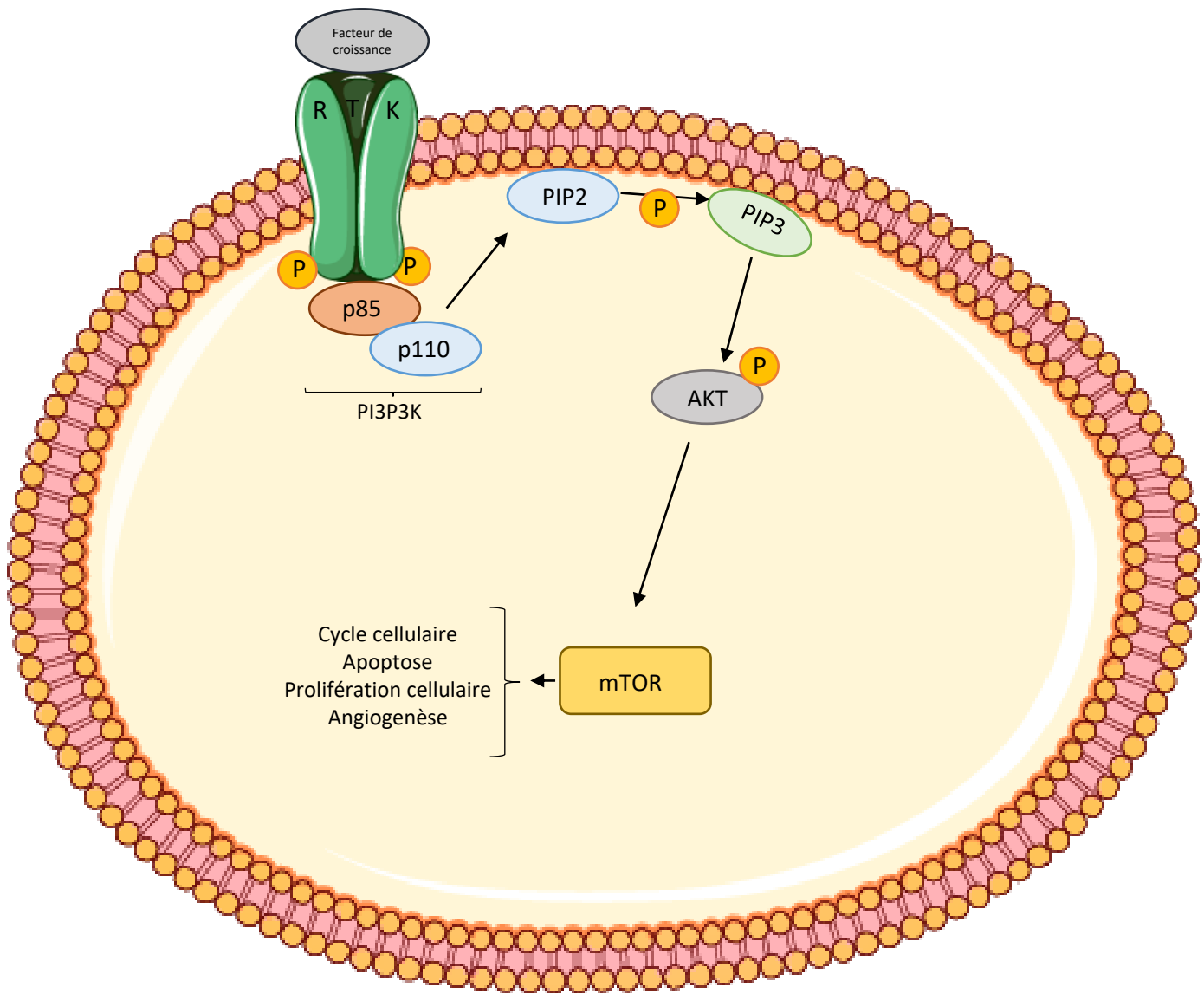


Figure 8 : La voie PI3K/AKT/mTOR.

L'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR débute par la fixation d'un ligand, les facteurs de croissance, sur un récepteur à tyrosine kinase tel que EGFR ou VEGFR. La partie intracellulaire du récepteur est alors phosphorylée et sert de station d'ancrage aux sous-unités régulatrices de PI3K, p85 et p110. L'activation de la PI3-kinase conduit au recrutement de la kinase AKT à proximité de la membrane plasmique où elle est phosphorylée. AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles en aval dont mTOR. La protéine mTOR joue différents rôles selon les protéines qu'elle active ou inhibe, tels que la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse.

c-FOS, c-MYC, c-JUN ou JUMB. L'expression d'un grand nombre de gènes est alors stimulée, en particulier celle de *CYCLIN D1* et *CDK (Cyclin-dependant kinase)-6* ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en phase G1 (Guo et al., 2020c).

Dans le cadre du CCR, une dérégulation de la voie MAPK, à travers une altération des protéines KRAS et BRAF, est fréquemment détectée dans respectivement 44% et 10% des cas (Costigan and Dong, 2020). Des mutations dans le gène *KRAS* sont associées à un mauvais pronostic mais également à un cancer de stade avancé et à la présence de métastases, et sont en lien avec une résistance à la chimiothérapie. De ce fait, attribuer une monothérapie est souvent un échec, conduisant à un faible taux de survie (Garcia-Carbonero et al., 2020; Wong et al., 2020).

- La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR (*Phosphoinositide 3 kinase/AKT8 virus oncogene cellular homolog/Mechanistic target of rapamycin*), tout comme la précédente, transmet des signaux provenant de nombreux récepteurs à tyrosine kinase. À la suite de l'activation de ces récepteurs, les protéines kinases PI3K sont recrutées au niveau de la membrane plasmique. La phosphorylation du PIP2 (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) génère du PIP3 (*Phosphatidylinositol 3, 4, 5 trisphosphate*) qui agit comme un second messenger pour l'activation d'un proto-oncogène, une sérines/thréonine kinase, AKT. Cet oncogène dissocie le complexe TSC1 et TSC2 (*Tuberous sclerosis proteine 1 or 2*), ce qui a pour conséquence d'activer la protéine mTOR qui joue un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire et de la disponibilité en nutriments (Aoki and Fujishita, 2017) (**Figure 8**).

L'importance de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le développement du CCR peut être perçue par l'utilisation grandissante d'inhibiteurs (Bahrami et al., 2018; Elmenier et al., 2019; Reita et al., 2019). Des mutations dans le gène *PI3K* sont détectées dans 16% des CCR et généralement associées à des mutations de *KRAS* ou *BRAF*. Le comportement du cancer est en lien direct avec ces mutations. Lorsqu'elles sont présentes, le cancer est qualifié d'agressif avec la présence de métastases, le pronostic est généralement mauvais, l'apparition d'une chimio résistance apparaît et la survie à trois ans est faible (Liao et al., 2012; Narayanankutty*, 2019).

- La voie NOTCH

La voie NOTCH est une voie de signalisation juxtacrine, activée quand le récepteur NOTCH interagit avec l'un de ses ligands, situé à la surface d'une cellule voisine. S'ensuit une série de clivages dans le but de libérer la partie soluble du récepteur, NICD (*NOTCH intracellular domain*). Après avoir migré dans le noyau, le NICD se lie ensuite aux facteurs de transcription CSL (*CBF1 suppressor of hairless lag-1*) et MAML (*Mastermind-like*) pour former un complexe trimérique et initier la transcription de gènes cibles. La fixation du domaine intracellulaire de NOTCH sur l'ADN est finement régulée par deux enzymes : cdk-8 et l'ubiquitine ligase, Fbxw7. Ces dernières entraînent l'ubiquitination de NICD qui est nécessaire pour sa dégradation protéasomale (Li et al., 2017).

Des dérégulations de la voie NOTCH ont été rapportées dans 86% des CCR. Elles sont particulièrement marquées lors d'un développement tumoral avancé et associées à un faible taux de survie. Une expression accrue des récepteurs NOTCH-3 et NOTCH-4 a été définie dans respectivement 73% et 56 % des carcinomes. Leurs ligands, Jagged et Delta, sont également surexprimés jusqu'à 52% des CCR et leurs gènes cibles, dont notamment *HES1* et *HEY1* ont eux aussi été montrés comme altérés dans 33% et 24% des CCR. Etant donné que la voie NOTCH est montrée comme particulièrement dérégulée au sein des carcinomes par rapport aux adénomes, elle pourrait être impliquée dans la transition d'un développement précoce à tardif du CCR (Shaik et al., 2020). La voie NOTCH a également un rôle dans le processus métastatique, puisque les cellules cancéreuses présentant une hyperactivation de la voie NOTCH 1, induisent le recrutement de neutrophiles qui sécrètent alors la chimiokine CXCL5 et TGF- β . En retour, ces médiateurs agissent sur les cellules cancéreuses en favorisant le processus métastatique (Ruland, 2019).

1.3.2.2. Les différents phénotypes de la carcinogenèse colorectale

- Le phénotype CIN

Le phénotype CIN est observé dans 65 à 70% des CCR sporadiques. Les mécanismes sous-jacents impliquent généralement un défaut de ségrégations chromosomiques telles qu'une altération dans le contrôle de séparation des chromatides sœurs ou bien une perte d'hétérozygotie. Les pertes alléliques fréquemment retrouvées sont localisées dans des régions chromosomiques où se situent des gènes suppresseurs de tumeur tels que *APC* sur le

chromosome 5q, *TP53* sur le chromosome 17p, *DCC* et *SMAD2/4* sur le chromosome 18q. *A contrario*, un gain de matériel chromosomique est associé à des régions où se localisent des proto-oncogènes, tel que *KRAS* sur le chromosome 12. En plus de ces modifications, le phénotype CIN est également identifié par l'accumulation de mutations dans les proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur décrits précédemment, ce qui contribue davantage à l'établissement du CCR (Ham-Karim et al., 2019; Pino and Chung, 2010; Wielandt et al., 2020).

- Le phénotype MSI

Le phénotype MSI est rencontré dans 10 à 15% des CCR sporadiques et la quasi-totalité des cancers héréditaires sans polypose, appelés également HNPCC (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer*). Ce phénotype est caractérisé par des altérations dans de courtes séquences répétées, les séquences microsatellitaires. Dans le cadre du MSI, le mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN, appelé système MMR, est défaillant. Ceci ayant pour conséquence d'instaurer une instabilité génomique à l'intérieur de ces séquences. En 2019, une méta-analyse a associé le statut MSI avec un meilleur taux de survie ainsi qu'un meilleur taux de survie sans récurrence chez les patients atteints d'un CCR de stade II (Petrelli et al., 2019).

Le statut MSI est déterminé par l'utilisation de marqueurs microsatellitaires définis par l'Institut National du Cancer et peut ainsi être classifié en trois catégories :

- Les cancers MSI-H (*High* : à haut niveau d'instabilité) : les tumeurs ont au moins 30% des marqueurs mutés. Pour les CCR sporadiques MSI-H, le défaut est principalement dû à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* (*Human MutL homolog*), un des trois composants du système MMR.
- Les cancers MSI-L (*Low* : à faible niveau d'instabilité) : les tumeurs ont moins de 30% des marqueurs mutés. Cette instabilité est créée par l'hyperméthylation du gène codant pour l'enzyme de réparation de l'ADN, *MGMT* (*Methylguanine DNA methyltransferase*).
- Les cancers MSS (microsatellite stable) sans instabilité.

- Le phénotype CIMP

Le phénotype CIMP est observé dans 20 à 30% des cas de CCR. Les îlots CpG sont des régions riches en cytosines et en guanines qui se trouvent préférentiellement au niveau des régions

promotrices. L'inactivation transcriptionnelle des gènes suppresseurs de tumeur, par l'hyperméthylation de leur promoteur, est un phénomène couramment impliqué dans différents types de cancers, dont le CCR (Jung et al., 2020). Plusieurs études ont montré que la perte d'expression du gène *APC* est dû à une hyperméthylation de son promoteur et s'effectue à des temps précoces du développement de la carcinogénèse. Elle est inversement corrélée au statut de méthylation des gènes *TP53* et *BRAF* (Liang et al., 2017). La méthylation de ces deux gènes est fréquemment associée à des tumeurs CIMP dites à forte hyperméthylation. En comparaison, les tumeurs CIMP à hyperméthylation plus faible sont plutôt en relation avec la mutation *KRAS* et possèdent moins de gènes méthylés (Advani et al., 2018).

1.3.2.3. Les évènements moléculaires associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et rôle de l'inflammation dans le CCR

Les CCR associés aux MICI (*Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*) que l'on appelle aussi CCR associés à une colite (ou CAC : *Colitis-associated cancer*), représentent seulement 1,4% des CCR mais sont à l'origine de 15% des décès dus aux MICI (Zhou et al., 2019). La survie des patients est moindre et peut être expliquée par un diagnostic tardif de la maladie (Taylor et al., 2020). Bien que les étapes majeures du développement du CCR, de la mise en place d'un épithélium hyper-prolifératif jusqu'à l'apparition d'un carcinome, soient similaires avec celles des CCR sporadiques, le déroulement des événements moléculaires sont quant à eux bien distincts. Contrairement à la séquence adénome-cancer, le CCR associé aux MICI présente des mutations précoces dans le gène *TP53* et les mutations du gène *APC* interviennent plus tardivement (Kameyama et al., 2018).

1.4. L'étiologie des CCR

Seulement 8% des CCR font intervenir des prédispositions génétiques, se présentant sous deux formes ; la polypose adénomateuse familiale et le cancer héréditaire sans polype. Dans la majorité des cas, environ 90%, les CCR sont dits sporadiques, c'est-à-dire sans prédispositions génétiques, dont 20% surviennent au sein de « familles à risque », sans qu'une anomalie génétique précise ne soit identifiée. Enfin, 1 à 2% des CCR surviennent dans le cadre des MICI (Pearlman et al., 2017; Zhou et al., 2019).

1.4.1. Les maladies génétiques prédisposantes

- La polypose adénomateuse familiale (PAF)

La PAF touche une personne sur dix mille et représente environ 1% des CCR. Elle est caractérisée par l'apparition de milliers de petits polypes au niveau du côlon et du rectum, dès le plus jeune âge. Leur présence garantit le risque de développer un CCR qui peut atteindre 100% dès l'âge de 40 ans. La PAF résulte d'une mutation sur le gène *APC*, au sein du chromosome 6. La plupart des mutations sont de type non-sens mais, suivant leur localisation, le génotype et le phénotype peuvent différer et conduire à une manifestation de la maladie en dehors du côlon (Carr and Kasi, 2020). Dans de rares cas, les mutations ne concernent pas le gène *APC* mais plutôt *MUTYH* (*MutY homolog*) qui est impliqué dans les réparations des dommages à l'ADN par excision de base (Sutcliffe et al., 2019).

- Le cancer héréditaire sans polypose

Le cancer héréditaire sans polypose - ou également appelé syndrome de Lynch - est plus fréquent que la PAF, puisqu'il représente 2-4% des cas de CCR, avec une prévalence de deux pour dix mille habitants (Porkka et al., 2019). Chez les patients atteints du syndrome de Lynch, le développement des tumeurs est causé par une instabilité microsatellitaire, où l'on retrouve principalement des mutations au niveau des gènes *MLH1* et *MLH2* (Yao et al., 2021). Les patients atteints du syndrome de Lynch sont prédisposés à développer d'autres cancers hors du tube digestif tels que le cancer de l'endomètre, estomac, pancréas ou encore voies biliaires (Bujanda and Herreros-Villanueva, 2017; Cloyd et al., 2018; Kim et al., 2020b; Singh and Resnick, 2017).

- La polypose juvénile

La polypose juvénile est caractérisée par le développement de multiples polypes chez les adolescents, dès l'âge de 20 ans, majoritairement au niveau du côlon et du rectum. Bien que la plupart des polypes soient bénins, certains d'entre eux progressent en tumeurs malignes et prédisposent les patients au développement de différents cancers (côlon, estomac, intestin grêle, pancréas) dans 9 à 50 % des cas, dès l'âge de 35 ans. La polypose juvénile a une prévalence d'un sur un cent mille et les altérations génétiques associées sont similaires à celles précédemment décrites dans le CCR puisqu'elle résulte, dans 86 et 91% des cas, d'une

altération germinale du gène *SMAD4* et *BMPR1A* (*Bone morphogenetic protein receptor type 1A*), un récepteur de type sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des TGF- β (Blatter et al., 2020; Ma et al., 2018).

1.4.2. Les maladies inflammatoires chroniques prédisposantes

Une relation étroite entre la présence d'une inflammation chronique et le développement de cancers n'a cessé d'être confirmée par différentes études cliniques. La première méta-analyse en 2001, prenant en compte 54 478 patients de 116 études, a permis d'établir une prévalence du CCR s'élevant à 3,7%, chez des patients atteints de la rectocolite hémorragique, une forme de MICI (Eaden et al., 2001). Néanmoins, ce chiffre n'a cessé de diminuer pour atteindre aujourd'hui une moyenne de 1,4% (Zhou et al., 2019). Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, une autre forme de MICI, le développement tumoral est plus important et la survie à cinq ans est moindre en comparaison avec la rectocolite hémorragique pour atteindre respectivement 39,3% et 67,1% (Vetter et al., 2021).

Le syndrome métabolique est reconnu depuis longtemps comme une maladie inflammatoire chronique, qui pourrait favoriser le développement du CCR. Le syndrome métabolique est défini par l'association de plusieurs pathologies, telles que l'obésité, une résistance à l'insuline, une hyperglycémie ou bien une dyslipidémie (une quantité anormale de lipides) qui augmente le risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Le risque de développer un CCR est plus élevé de 25% à 54% par rapport à des sujets sains, suivant l'avancement du syndrome. Néanmoins, une disparité existe entre les hommes et les femmes, lesquelles ont un risque moindre allant de 9 à 37% (Lee et al., 2020). Cette distinction entre genres pourrait être expliquée par une différence du nombre de sujets pris en compte dans les études, mais également par une diversité dans les fonctions biologiques entre hommes et femmes. A ce jour, aucune étude n'a pu mettre en lumière pourquoi les hommes et les femmes pourraient être affectés différemment par le CCR associé au syndrome métabolique.

1.4.3. Les CCR sporadiques

La majorité des cas de CCR sont dits « sporadiques », c'est-à-dire sans prédispositions génétiques ou historique familial. Des facteurs de risque liés au mode de vie ont été décrits comme pouvant jouer un rôle important dans le développement tumoral. En 2017, les Fonds Mondial de Recherche contre le Cancer et l'Institut Américain de Recherche contre le Cancer

ont conclu qu'un régime alimentaire non adapté, la consommation d'alcool et le tabagisme sont considérés comme des causes potentielles de développement de la maladie (2017).

- Impact de l'alimentation

L'alimentation joue un rôle primordial dans la survenue du cancer, puisqu'il est estimé qu'une personne ayant un régime alimentaire non adapté voit le risque de développer un CCR augmenté de 25% (Garcia-Larsen et al., 2019). A travers les études menées sur des populations du monde entier, deux habitudes alimentaires sont à distinguer. La première, qualifiée de « saine », est caractérisée par un apport élevé en fruits, légumes, céréales complètes, poisson et autres fruits de mer. La seconde, quant à elle, est qualifiée de « mauvaise » et se définit par un apport élevé en viandes rouges, produits transformés, boissons sucrées et grains raffinés (Tabung et al., 2017). Les mécanismes biologiques liés à une alimentation saine ou mauvaise et le développement du CCR sont probablement multifactoriels et sont le reflet d'une interaction complexe entre les différents composés alimentaires. Selon une méta-analyse réalisée par WCRF-AICR, la consommation journalière de 100 grammes de viande rouge ou transformée augmente de 12% le risque de développer un CCR (Vieira et al., 2017). A l'inverse, une alimentation saine, particulièrement riche en fibre, réduit le temps de transit du bol alimentaire dans la lumière du tube digestif, diminuant ainsi l'exposition de l'épithélium colique aux éléments carcinogènes et est inversement corrélé avec le risque de développer un CCR (Hidaka et al., 2020).

- Impact de la consommation d'alcool

L'éthanol présent dans les boissons alcoolisées est un facteur de risque reconnu dans le développement du CCR. Son premier métabolite, l'acétaldéhyde, est un composé caractérisé de carcinogène par l'Agence Internationale pour la Recherche (International Agency for Research on Cancer, Agents Classified by the IARC Monograph; 2018). Des études révèlent qu'une prise élevée d'alcool, plus de trois verres par jour, ainsi que le temps d'exposition à l'alcool est en relation directe avec le risque accru de développer un CCR (Lin et al., 2020; McNabb et al., 2020). L'acétaldéhyde formé provoque des lésions à la muqueuse, une augmentation de la perméabilité membranaire, des dommages à l'ADN et des altérations épigénétiques (Diao et al., 2020; Dumitrescu, 2018; Hodkinson et al., 2020).

- Impact du tabagisme actif

Le tabagisme actif est responsable de 16,3% des cancers en 2018. Le cancer colorectal est le troisième cancer où l'incidence du tabagisme est la plus élevée (Al-Zalabani, 2020). Une méta-analyse a mis en lumière un lien indéniable entre le temps et l'intensité du tabagisme sur le risque de développer un CCR, avec une diminution significative chez des personnes qui ont arrêté de fumer, il y a plus de 25 ans (Botteri et al., 2020). Ceci pourrait être dû à un changement épigénétique, puisqu'une méthylation à l'ADN similaire entre des anciens fumeurs et des personnes n'ayant jamais fumé a été trouvée. Ce résultat suggère que l'arrêt du tabagisme actif pourrait rétablir la méthylation du génome, diminuant ainsi le risque de 50 % de développer un CCR, dû au tabagisme, lorsque l'arrêt persiste au moins depuis 10 ans (Nishihara et al., 2013).

- Implication du microbiote intestinal

Il a été suggéré que la survenue du CCR pourrait être influencée par le microbiote intestinal, étant donné que le tube digestif est en constante exposition avec celui-ci. Une étude, se basant sur des échantillons de biopsies de carcinomes coliques et de muqueuses saines, a révélé une modification du microbiote, appelée dysbiose, associée à la muqueuse des patients atteints de CCR comparativement aux sujets sains (Flemer et al., 2017). L'implication du microbiote intestinal dans la carcinogenèse colorectale a été ensuite déterminée en utilisant des modèles murins prédisposés au développement du CCR. L'un des modèles les plus connus est le modèle de souris *Apc^{Min/+}* (Min : *Multiple intestinal neoplasia*), qui possède une mutation du gène *Apc* induisant la formation d'un codon stop. Ces souris développent de multiples adénomes au niveau de l'intestin et du côlon (Moser et al., 1990). Une étude réalisée sur les souris *Apc^{Min/+}* a montré un nombre plus faible de tumeurs colorectales chez les souris axéniques, par rapport à celles possédant un microbiote (Li et al., 2012). Une étude plus récente a montré que les souris conventionnelles traitées avec l'agent carcinogène AOM (*Azoxymethane*) puis gavées avec les échantillons fécaux de patients atteints de CCR développent plus de tumeurs colorectales que celles recevant les fèces de sujets sains (Wong et al., 2017a), confirmant ainsi l'impact du microbiote intestinal dans le développement du CCR. Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal peut influencer le CCR sont développés dans la suite de ce manuscrit.

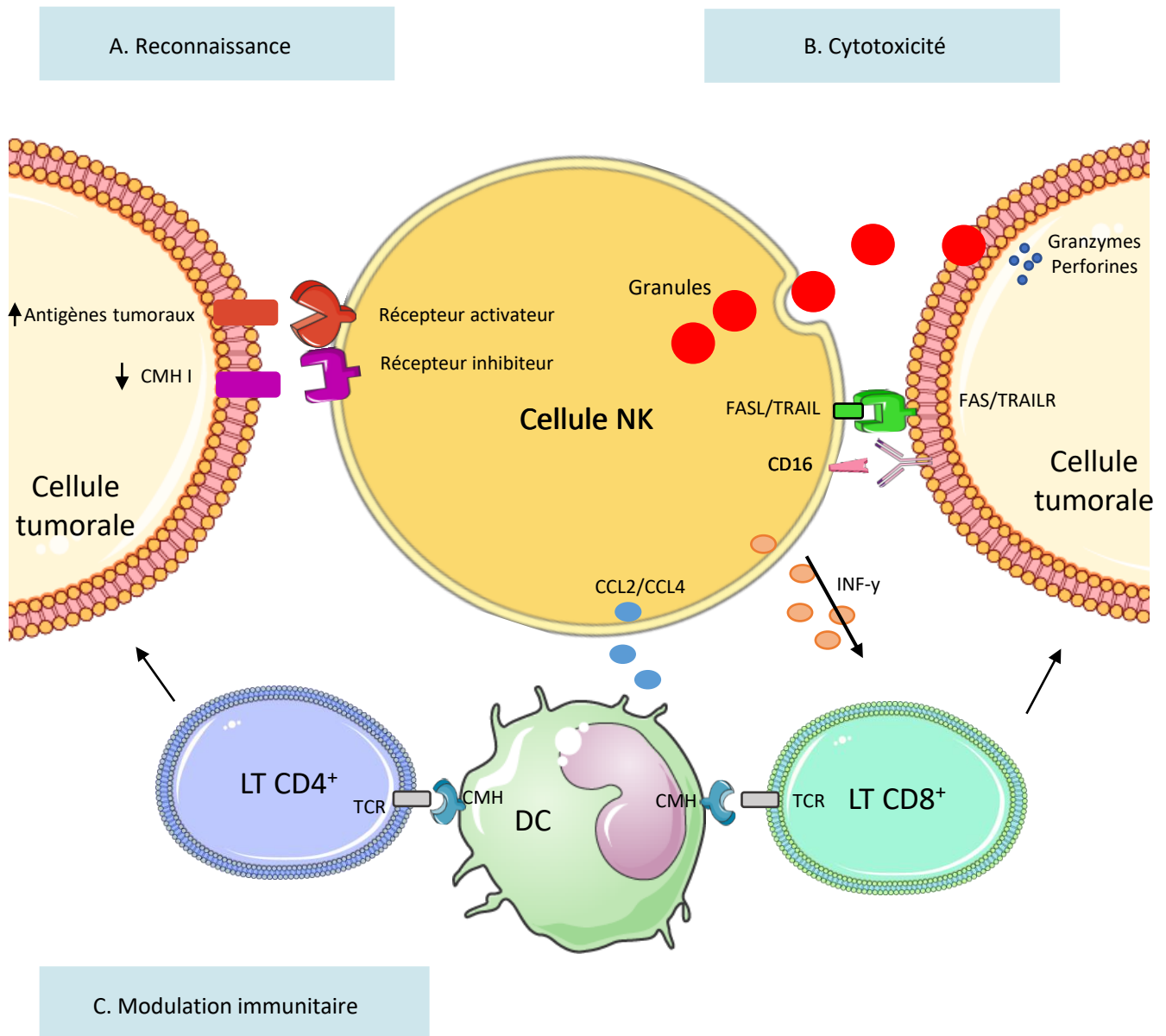


Figure 9 : La fonction des NK dans le cancer.

Les cellules NK (*Natural killer*) fonctionnent comme des effecteurs cytotoxiques et comme des régulateurs de l'immunité innée et adaptative.

- Étant des cellules tueuses innées, les NK reconnaissent le niveau d'expression des ligands tumoraux ainsi que le CMH (*Complexe majeur d'histocompatibilité*) de classe I des cellules tumorales, respectivement par leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs. L'équilibre qui existe entre les deux détermine l'état d'activation des cellules NK.
- Après activation, les cellules NK induisent la lyse de la cellule tumorale cible par la sécrétion de granules (granzyme B et perforine), l'interaction avec les récepteurs de mort (FAS/TRAIL) et les anticorps cytotoxiques (CD16).
- Les cellules NK activées sécrètent des chimiokines et cytokines (CCL3, CCL4, IFN- γ) qui favorisent la maturation et le recrutement des cellules dendritiques qui, en retour modulent la réponse immunitaire adaptative par l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques et des LT CD4⁺ à travers l'interaction entre le CMH et les récepteurs TCR.

1.5. Rôle du microenvironnement tumoral dans la carcinogenèse colique

1.5.1. Les cellules impliquées dans le CCR

En condition physiologique, différentes populations immunitaires sont présentes au sein du tissu colique pour maintenir l'homéostasie. Suite à l'apparition de cellules tumorales, le système immunitaire est programmé pour les éliminer. Le micro-environnement tumoral est composé d'un ensemble de cellules immunitaires qui comprend plus particulièrement des cellules myéloïdes comme les cellules myéloïdes suppressives, les macrophages et les neutrophiles mais également des lymphocytes, tels que les cellules NK (*Natural killer*), les LT (*Lymphocyte T*) et les LB (*Lymphocyte B*). Bien que le système immunitaire soit d'abord préjudiciable pour les cellules tumorales, elles sont capables d'échapper à sa surveillance, facilitant ainsi la progression du CCR.

1.5.1.1. Rôles des lymphocytes dans le CCR

- Les Natural killers

Les NK 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'antigènes. Les NK jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire du cancer puisqu'ils limitent l'apparition des tumeurs et contrôlent leur développement ainsi que leur dissémination (Wu et al., 2020). Les mécanismes mis en jeu sont de deux types : (i) l'induction de l'apoptose par l'interaction de récepteurs membranaires entre la cellule cible et la cellule immunitaire et (ii) la mise en place d'une cytotoxicité par la dégranulation de granzymes et de perforines cytotoxiques et la production d'IFN- γ . Les NK reconnaissent une expression altérée des protéines de surface des cellules aberrantes et tumorales, comme par exemple une diminution des protéines du CMH (*Complexe majeur d'histocompatibilité*) de classe I, via le récepteur NCR (*Natural cytotoxicity receptors*) ou NKG2D (*Natural killer Group 2D*) (Long et al., 2013). Bien que les NK participent à la destruction des cellules aberrantes et tumorales, leur rôle est surtout important à un stade précoce de la carcinogenèse (Sconocchia et al., 2014) (**Figure 9**).

Dans le cadre du CCR, une récente étude a montré que les NK agissent sur les cellules cancéreuses à travers la sécrétion de perforines et granzymes, comme précédemment décrit (Díaz-Basabe et al., 2021). Cependant l'analyse de l'activité des NK circulants, au sein d'une

cohorte de 872 patients, montre qu'elle est affaiblie chez ceux atteints d'un CCR (Jobin et al., 2017). Il est intéressant de noter à ce propos que, bien que les tumeurs primaires coliques expriment d'avantage les ligands aux récepteurs des cellules NK, l'expression de ces derniers dans la circulation sanguine est diminuée chez les patients atteints de CCR (Krijgsman et al., 2020). L'hypothèse pourrait être une possible modulation du phénotype des NK ainsi que de leur fonction, par les cellules tumorales. Ces dernières pourraient alors échapper à la reconnaissance immunitaire dans la circulation systémique, amenant à la formation de métastases. En lien avec cette hypothèse, un nombre très faible de cellules NK au sein des métastases hépatiques dans le CCR est d'ailleurs observé (Pugh et al., 2014). Cependant, malgré leur infiltration appauvrie tout du long de la séquence adénome-cancer, le rôle des NK dans le pronostic du CCR n'a pas encore été spécifié. Une quantification d'IFN- γ sécrété par les cellules NK sanguins a néanmoins été utilisée pour évaluer leur statut cytotoxique et se révèle être efficace puisque dans l'étude, elle présente une valeur prédictive de 99,4% (Jobin et al., 2017).

- Les LT CD8⁺

Les LT CD8⁺ sont des cellules qui présentent un fort pouvoir cytotoxique médié par la sécrétion de perforines, Fas ligand et TFN- α (Raskov et al., 2021). Des études ont montré qu'une infiltration importante des LT CD8⁺ au sein des tumeurs pourrait prédire une survie sans récurrence dans plusieurs types de cancers, comme celui du mélanome ou du poumon (Djenidi et al., 2015; Koh et al., 2017).

Dans le cadre du CCR, une forte concentration en LT CD8⁺ dans les tissus cancéreux est significativement associée avec un pronostic et une issue favorables pour le patient (Hu et al., 2019). L'augmentation de l'infiltrat en LT CD8⁺ dans les tumeurs est également inversement corrélée avec la formation de métastases (Hu et al., 2019). Ce résultat suggère donc qu'une expression augmentée en LT CD8⁺ contribuerait à prévenir la formation de métastases des cellules cancéreuses. Ainsi, l'infiltration des LT CD8⁺ dans les tissus cancéreux pourrait être un marqueur pronostic. Un immunoscore a d'ailleurs été élaboré. Il prend en considération : (i) la densité de l'infiltrat des LT CD8⁺ dans le centre de la tumeur, (ii) dans la marge invasive et (iii) la densité des LT CD8⁺ mémoires dans le centre de la tumeur et dans la marge invasive

(Pagès et al., 2018). Ce score immunologique semble d'ailleurs être un meilleur facteur de prédiction de la récurrence tumorale que celui couramment employé.

- Les LT CD4⁺ auxiliaires

Les LT CD4⁺ sont activés grâce aux cellules présentatrices d'antigènes et principalement les cellules dendritiques (DC : *Dendritic cells*), à travers le CMH de classe II. Une fois activés, les LT CD4⁺ se différencient en plusieurs sous-groupes : (i) les Th1 qui permettent la sécrétion de cytokines et favorisent la réponse anti-tumorale, (ii) les Th2 qui accélèrent le développement tumoral, (iii) les Th17 qui sécrètent de l'IL-17 mais leur rôle reste aujourd'hui controversé et (iv) les Treg (*T régulateurs*) qui inhibent la réponse immunitaire et représentent un mécanisme d'échappement du système immunitaire.

Les Th1 jouent un rôle dans la réponse contre les cellules aberrantes et tumorales coliques, en amplifiant la réponse CD8⁺ et en activant les macrophages antitumoraux. L'expression des gènes de la réponse Th1 (*T-bet*, *IRF1*, *IL12RB2* et *STAT4*) dans les tissus tumoraux est ainsi associée à une meilleure survie des patients atteints de CCR (Tosolini et al., 2011).

Les Th2 sont dits pro-tumoraux puisqu'ils limitent l'activité des LT cytotoxiques et favorisent l'angiogenèse. Cependant, leur présence dans le micro-environnement tumoral ne semble pas avoir d'impact sur le pronostic des patients atteints de CCR (Tosolini et al., 2011). Plus récemment, chez des patients atteints de CCR présentant des métastases dans les ganglions lymphatiques, le ratio Th1/Th2 a été observé dans le tissu métastasé. Ce *ratio* est en corrélation avec la survie du patient puisqu'un *ratio* supérieur à 1 est significativement associé à une amélioration de la survie globale, avec une médiane de 83,5 mois, comparativement à des patients présentant un faible *ratio*, qui est de 35,5 mois (Nizri et al., 2016).

Les Th17 sont impliqués dans l'inflammation chronique et la carcinogenèse (Korn et al., 2009). Cependant, à ce jour, son rôle reste controversé. Les premières études leur attribuent un rôle antitumoral, car ils favorisent le recrutement et l'activité de plusieurs cellules immunitaires comme les lymphocytes, les NK et les DC au sein des tumeurs de l'œsophage (Lu et al., 2013). Les patients atteints de CCR qui ont un niveau élevé en IL-17, auraient tendance à avoir un meilleur pronostic (Lin et al., 2015). Néanmoins, la majorité des publications suggèrent que la réponse Th17 amplifie la carcinogenèse colorectale (Razi et al., 2019). Le pourcentage de

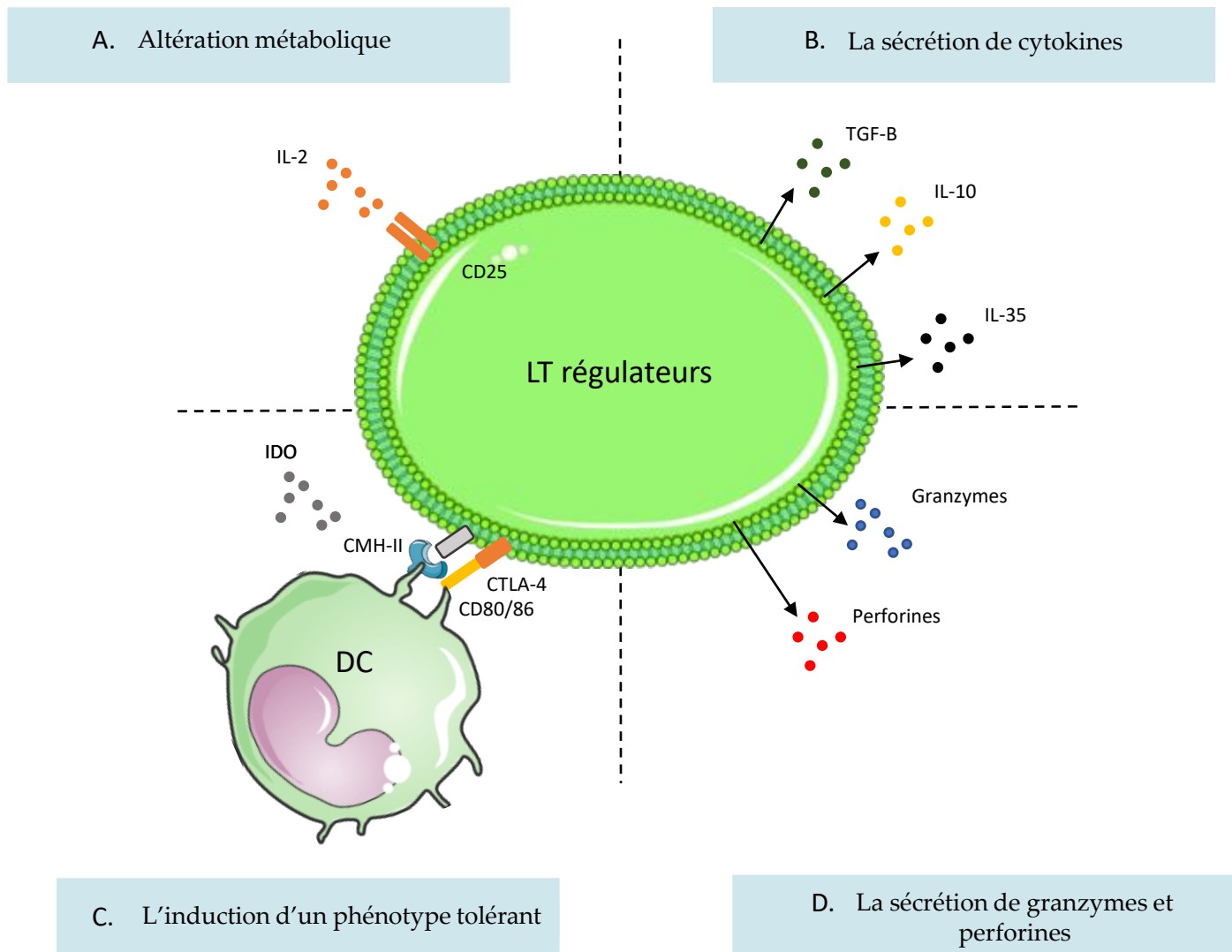


Figure 10 : La fonction des LT régulateurs dans le cancer.

Les cellules LTreg (*Lymphocytes T régulateurs*) ont développé divers mécanismes pour altérer la réponse immunitaire présente au sein du microenvironnement tumoral.

- A) L'altération métabolique de l'IL-2 est causée par une augmentation de l'expression de CD25 (un récepteur à haute affinité pour l'IL-2) au sein des LTreg qui limite ainsi la prolifération des autres lymphocytes.
- B) La sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10, TGF-B et IL-35.
- C) La manipulation des cellules présentatrices d'antigènes à travers l'interaction entre les récepteurs de surface des cellules Treg tel que CTLA-4 (*Cytotoxic t-lymphocyte antigen 4*) avec le récepteur CD80/86, induisant la sécrétion de IDO (*Indoleamine 3, 3 dioxygenase*) par les cellules dendritiques diminuant ainsi la disponibilité en tryptophane créant un phénotype tolérant.
- D) La sécrétion de granzymes et de perforines amène à la destruction des lymphocytes cibles.

cellules Th17 est accentué de façon significative dans les tumeurs de patients atteints de CCR par rapport aux patients contrôles, à des stades précoces du développement (Doulabi et al., 2018). La production de l'IL-17 a été également examinée tout du long de la séquence adénome-cancer. Bien qu'elle s'intensifie au sein des adénomes, l'IL-17 persiste jusqu'au stade carcinome (Cui et al., 2012). Singulièrement, l'augmentation de l'expression de l'IL-17 est associée à une augmentation du score dysplasique, qui est l'un des paramètres histologiques les plus importants pour évaluer la progression néoplasique. Pour terminer, l'IL-17 se révèle être un acteur majeur dans l'induction d'une chimiorésistance chez des patients atteints de CCR, qui serait notamment médiée par son interaction avec des régulateurs-clés de l'apoptose (Sui et al., 2019).

Les Treg sont décrits comme une sous-population de LT qui a pour rôle principal la suppression de la réponse immunitaire, afin d'éviter une auto-immunité. Ils sont caractérisés par l'expression du récepteur de l'IL-2, CD25 (Sakaguchi et al., 1995). Les Treg utilisent différents mécanismes pour supprimer la réponse immunitaire, comme : (i) la privation d'IL-2 au sein du microenvironnement, (ii) la sécrétion de cytokines immunosuppressives, (iii) l'utilisation de perforines et de granzymes et enfin, (iv) la manipulation des cellules présentatrices d'antigènes (**Figure 10**). Dans le cadre du CCR, les Treg sont associés avec la progression du développement tumoral (Ling et al., 2018). Ainsi, l'infiltration des Treg dans le côlon est significativement augmentée dans les tumeurs au regard de la muqueuse saine, tout comme chez les patients atteints d'un CCR métastasé comparativement aux patients ne présentant aucune métastase (Loddenkemper et al., 2006). Plus récemment, les Treg ont été décrits comme pouvant inhiber la réponse cytotoxique des LT CD8⁺ dans le CCR (Fujimoto et al., 2018).

- Les LB

Les LB ont un rôle fondamental dans la production d'anticorps, la présentation antigénique ainsi que l'immunosuppression (Deng and Galipeau, 2014). Lorsque le CCR apparaît, les LB présents dans la circulation sanguine et les ganglions mésentériques modifient leur phénotype pour devenir actifs (Zirakzadeh et al., 2013). Ils peuvent alors activer les LT antitumoraux grâce à leur fonction de cellule présentatrice d'antigènes. Cependant, une densité accrue en LB

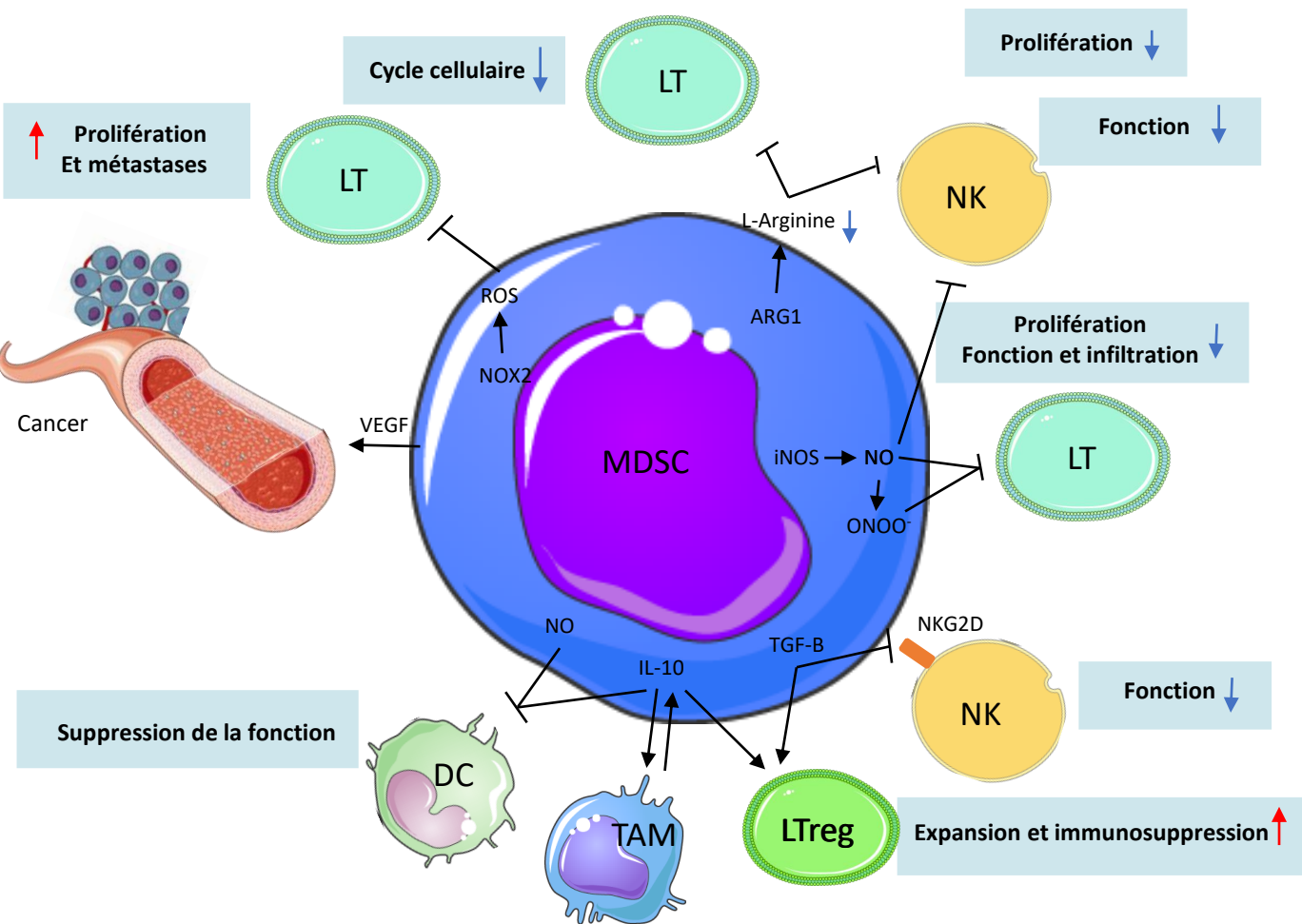


Figure 11 : Les mécanismes impliqués dans la fonction immunosuppressive des MDSC dans le cancer.

Les MDSC (*Myeloid-derived suppressor cell*) suppriment la prolifération et la fonction des LT ainsi que celles des NK par la production de ARG1 (*Arginase-1*), iNOS (*Oxyde nitrique synthase*) et ROS (*Reactive oxygen species*). La peroxyntrite (ONOO⁻) induit une diminution de l'infiltrat des LT CD8⁺, alors que TGF-β inhibe le récepteur activateur des NK (NKG2D : *Natural Killer Group 2D*). La sécrétion d'IL-10 et la production de NO agissent sur les dendritiques en supprimant leur fonction de présentation antigénique. L'IL-10 favorise également la différenciation des TAM (*Tumor-associated macrophages*) en phénotype M2. Pour finir, les Treg sécrètent du VEGF qui promeut la formation de métastases.

au sein des tumeurs est seulement prédictive d'une issue clinique favorable, lorsque les patients présentent un CCR à droite du côlon plutôt qu'à gauche (Berntsson et al., 2016).

1.5.1.2. Rôles des cellules myéloïdes dans le CCR

Les MDSC (*Cellule myéloïde suppressive*), TAN (*Tumor-associated neutrophil*) et TAM (*Tumor-associated macrophages*) sont des acteurs essentiels impliqués dans le développement et la progression du cancer.

○ Les cellules myéloïdes suppressives

Les MDSC représentent une population hétérogène de granulocytes et monocytes qui prolifèrent rapidement lors d'une infection, d'une inflammation et d'un cancer (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Comme son nom l'indique, ces cellules possèdent une fonction immunosuppressive et aident les cellules cancéreuses à échapper à la surveillance du système immunitaire. Leur fonction est associée avec l'activation de deux enzymes, la iNOs (*NO synthase inductible*) et l'ARG1 (*Arginase 1*) qui sont responsables du métabolisme de L-arginine, essentielle pour la prolifération et la fonction des LT (Geiger et al., 2016; Rodriguez et al., 2017). La production de NO et de ROS (*Reactive oxygen species*) lors de cette réaction est impliquée dans l'inactivation du TCR (*Recepteur des cellules T*) des lymphocyte T, amenant à la mort cellulaire (Bronte and Zanovello, 2005) (**Figure 11**).

Dans le cadre du CCR, une corrélation positive entre la présence de MDSC dans la circulation périphérique des patients a été montrée et est positivement associée avec un cancer de stade avancé (Toor et al., 2016). L'analyse transcriptomique des MDSC circulants révèle une augmentation de l'expression de la voie JAK/STAT (*Janus kinase*) par rapport aux cellules présentatrices d'antigènes (Shirasuna et al., 2020). Ceci est lié à une augmentation notamment, des voies du TGF- β et de chimiotactisme, favorisant la progression du CCR (Shirasuna et al., 2020). Les MDSC jouent aussi un rôle dans le développement métastatique puisqu'ils sont à l'origine de niches prémétastatiques (Lin et al., 2019a). La concentration des MDSC dans le foie est également associée avec un nombre important de métastases hépatiques dans un modèle murin de CRLM (*CRC liver metastasis*) (Lin et al., 2019a). Comme évoqué précédemment, les MDSC agissent plus particulièrement sur les LT. Dans ce modèle murin, les MDSC présents dans les tissus métastatiques inhibent de façon significative la prolifération des LT (Lin et al.,

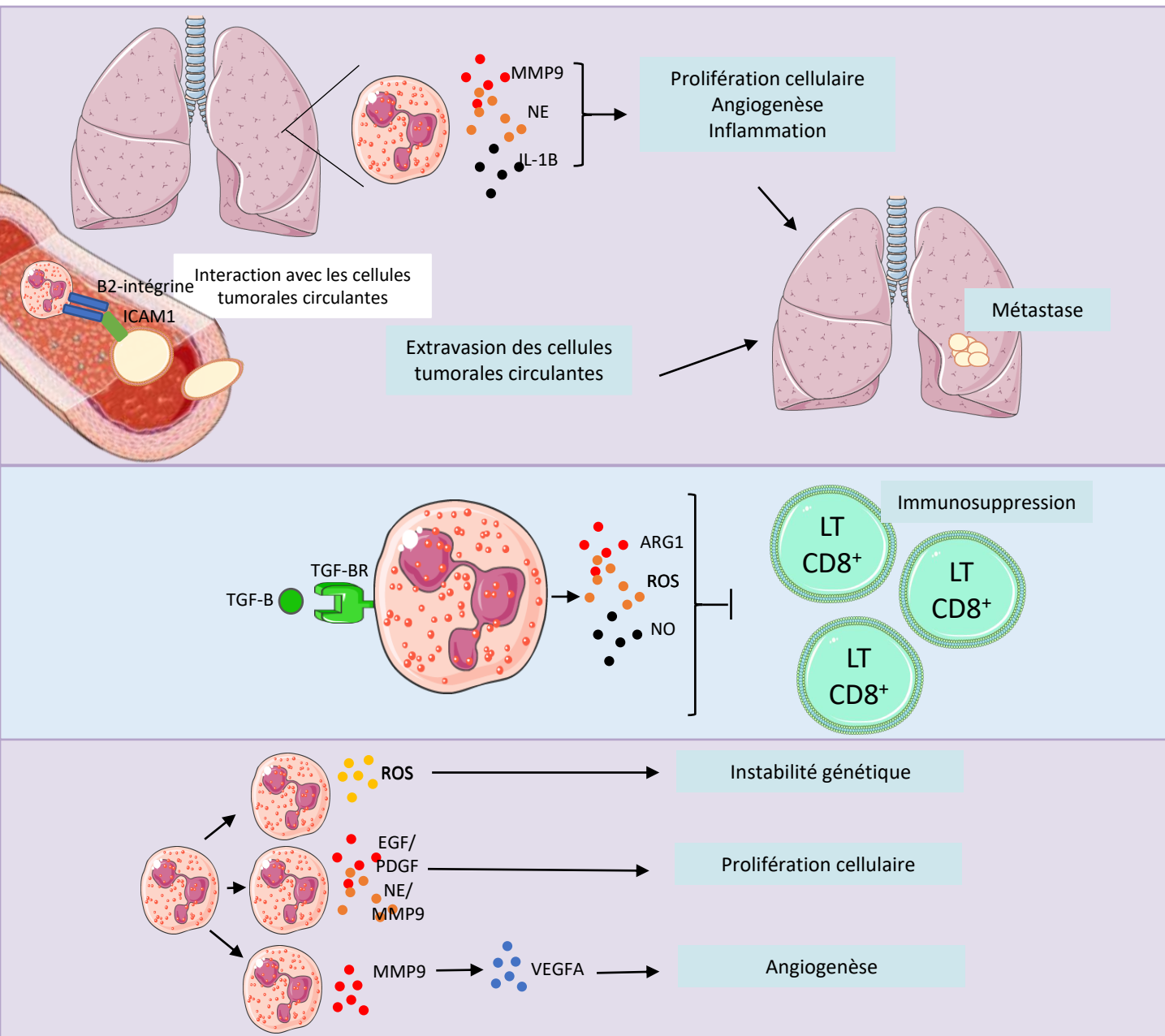


Figure 12 : Les mécanismes impliqués dans la fonction pro-tumorale des TAN dans le cancer.

Les neutrophiles peuvent soutenir le développement tumoral par différents mécanismes incluant la suppression de l'activité des LT, l'induction d'une instabilité génétique, la prolifération des cellules tumorales, la mise en place d'une angiogénèse et la formation de métastases.

Mise en place de métastases : La mobilisation des neutrophiles dans les niches pré-métastatiques soutient l'arrivée des cellules métastatiques par la production de différents médiateurs comme IL-1 β , la MMP9 (*Matrix metalloproteinase 9*) ou le NE (*Neutrophil elastase*). Les neutrophiles circulants escortent les cellules tumorales circulantes par leur interaction avec le récepteur β 2-intégrine et ICAM1 et favorisent leur survie ainsi que leur extravasation.

L'immunosuppression : Les molécules présentes dans le micro-environnement, comme TGF- β induisent l'expression de ARG1, ROS et NO qui inhibent la fonction des LT CD8 $^+$.

L'instabilité génétique : les neutrophiles induisent une instabilité génétique au sein des cellules tumorales par notamment la production de ROS.

La prolifération tumorale : les neutrophiles soutiennent la prolifération tumorale par la production de facteurs de croissance comme EGF (*Epidermal growth factor*) and PDGF (*Platelet-derived growth factor*). La sécrétion de NE et MMP9 clive l'intégrine qui active la prolifération des cellules cancéreuses.

Favorise l'angiogénèse : les neutrophiles soutiennent l'angiogénèse à travers la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que MMP9 qui activent VEGF de la matrice extracellulaire.

2019a). Chez les patients, les MDSC seraient à l'origine d'une chimiorésistance et prédicteurs de mauvais pronostic (Lin et al., 2019a; Liu et al., 2020b).

- Les neutrophiles

Les neutrophiles sont, à l'origine, décrits comme les premières cellules à répondre de l'immunité innée. Ils sont classiquement caractérisés par leur habilité à induire la phagocytose, la sécrétion d'enzymes permettant la lyse cellulaire ainsi que la production de ROS (Nathan, 2006). Dans le contexte d'un microenvironnement tumoral, les neutrophiles associés aux tumeurs présentent une grande plasticité. Ils peuvent ainsi se différencier en phénotype N1 dits antitumoraux ou en phénotype N2 dits protumoraux (Giese et al., 2019). Les neutrophiles de type N1 ont un rôle cytotoxique, ils limitent l'immunosuppression ainsi que la production d'arginase. *A contrario*, les neutrophiles N2 favorisent le développement tumoral en exprimant de l'arginase et supportant l'angiogenèse (Giese et al., 2019) (**Figure 12**).

Dans le cadre du CCR, aucune association entre l'infiltration au sein des tumeurs des TAN (*Tumor-associated neutrophils*) et le pronostic des patients n'a été encore établi. Cependant, l'augmentation du *ratio* neutrophiles sur lymphocytes dans la circulation sanguine est associée avec un mauvais pronostic (Li et al., 2018). Un *ratio* élevé a également été rapporté comme une issue défavorable à la suite d'une résection de métastases hépatiques, chez des patients atteints de CCR (Halazun et al., 2008). Pour finir, l'effet des TAN sur la survie des patients est à ce jour incertain. Cependant, un comptage manuel des neutrophiles au sein de tissu cancéreux basé sur leur morphologie, puisqu'il n'existe aucun anticorps spécifique, montre qu'une augmentation des TAN favoriserait la survie globale des patients en stade II (Berry et al., 2017).

- Les macrophages

Les macrophages associés aux tumeurs sont des cellules clés de l'immunité innée présentes au sein du micro-environnement tumoral. Elles régulent le développement tumoral, la réponse immunitaire adaptative, l'angiogenèse ainsi que la formation de métastases (Cassetta and Pollard, 2020). Les TAM (*Tumor-associated macrophages*) représentent la principale composante du système immunitaire inné au sein du microenvironnement et constituent jusqu'à 50% de la masse tumorale (Solinas et al., 2009). Tout comme les TAN, les TAM peuvent se différencier

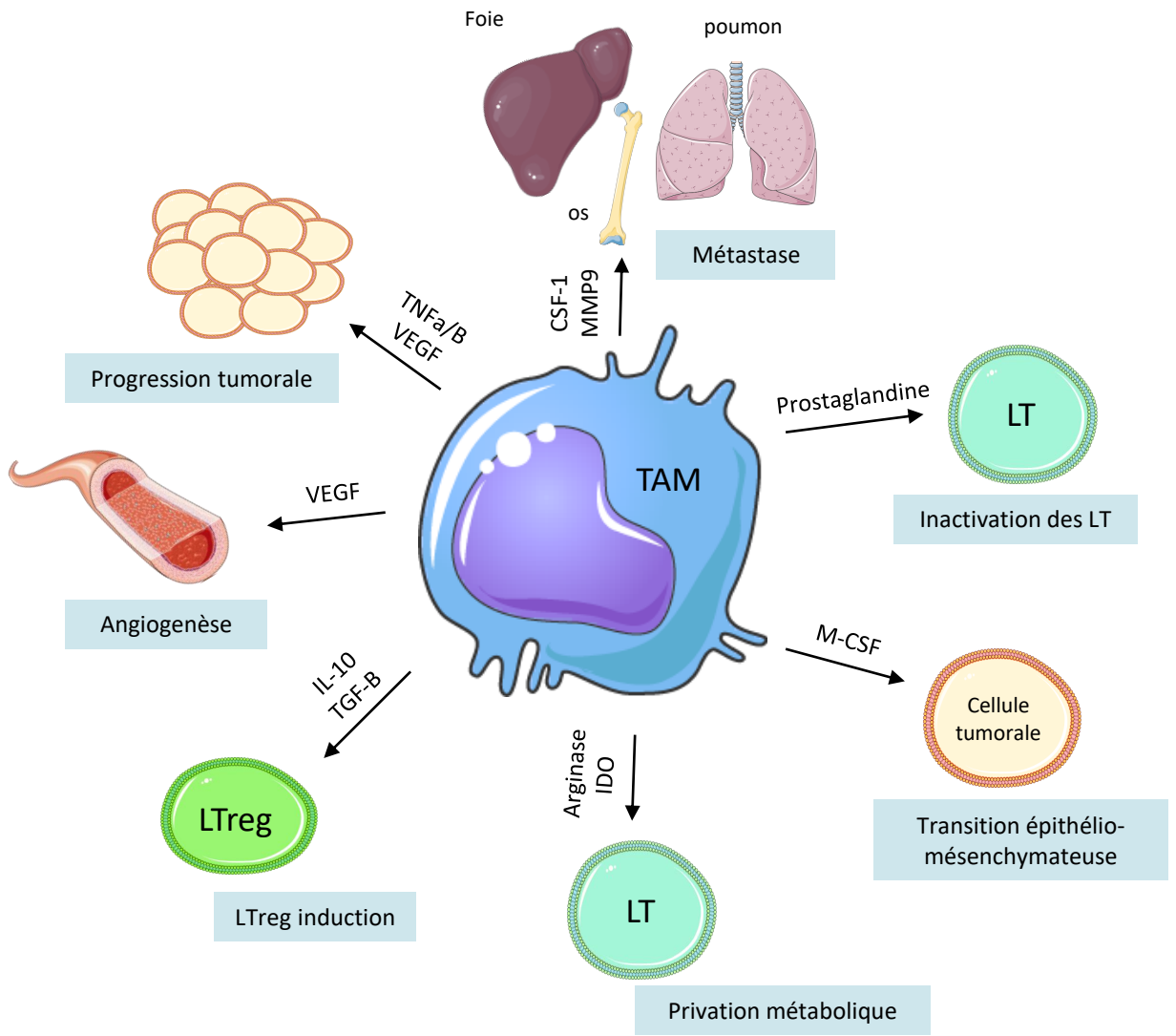


Figure 13 : Les principaux rôles des TAM dans le cancer.

Des marqueurs spécifiques et différents facteurs dérivés des TAM sont impliqués dans de multiples processus allant de l'initiation jusqu'au développement tumoral. Les TAM favorisent la croissance tumorale et l'angiogenèse par la sécrétion de $TNF-\alpha/\beta$ et VEGF, l'induction des LT régulateurs par la sécrétion de l'IL-10 et TGF- β , la privation métabolique des LT par la production de l'ARG1 et IDO, l'inactivation des LT par la sécrétion de prostaglandine, la transition épithélio-mésenchymateuse, l'invasion la migration ainsi que la formation de métastases par la sécrétion de la CSF-1 et MMP9.

en deux phénotypes, le phénotype M1 et M2 (Cassetta and Pollard, 2020). Les macrophages de types M1 sont caractérisés par leur habilité à sécréter une quantité importante de cytokines pro-inflammatoires, de favoriser la réponse Th1, de produire des ROS et d'avoir une forte activité tumoricide (Cassetta and Pollard, 2020). *A contrario*, les macrophages de type M2 favorisent la réponse Th2, la stimulation des LTreg immunosuppresseurs, l'angiogenèse et donc la progression tumorale (Cassetta and Pollard, 2020) (**Figure 13**). L'activité anti et pro-tumorale des TAM dépend largement des conditions hypoxiques de son environnement. Les TAM auront une activité tumoricide accrue, s'ils sont localisés dans un contexte où le stress hypoxique est moindre alors que dans une situation où le développement tumoral est avancé, les macrophages auront tendance à se différencier en phénotype M2 et donc à avoir des capacités pro-tumorales.

Dans le cadre du CCR, les premières études montrent qu'une augmentation de l'infiltrat macrophagique au sein du microenvironnement tumoral est corrélée avec une amélioration de la survie des patients et inversement associée avec l'avancement de la maladie (Forsell et al., 2007; Nakayama et al., 2002). Cependant, de récentes publications mettent en évidence l'importance de distinguer le phénotype M1 ou M2 des TAM dans le pronostic des patients. Les macrophages de type M2 sont associés avec une survie amoindrie alors qu'aucune association pour les macrophages de type M1 n'a été réalisée (Väyrynen et al., 2021). Néanmoins, un *ratio* M1/M2 élevé est en corrélation avec de meilleures chances de survie (Väyrynen et al., 2021). Les TAM favorisent la chimiorésistance chez des patients atteints de CCR affichant des métastases hépatiques, puisque ces derniers présentent une progression sans récurrence amoindrie lorsque la concentration des TAM dans les tissus métastasés est enrichie (Shibutani et al., 2021). En lien avec ce résultat, une dernière étude montre que les macrophages de phénotype M2 favorisent la progression tumorale, ainsi que son pouvoir invasif. En effet, un nombre élevé de TAM de type M2 est retrouvé au niveau du front invasif spécifiquement au stade du développement qui correspond à l'invasion de la sous-muqueuse (Inagaki et al., 2021). Le nombre de M2 est enfin associé à une invasion lymphatique et à la formation de métastases au niveau des ganglions mésentériques (Inagaki et al., 2021).

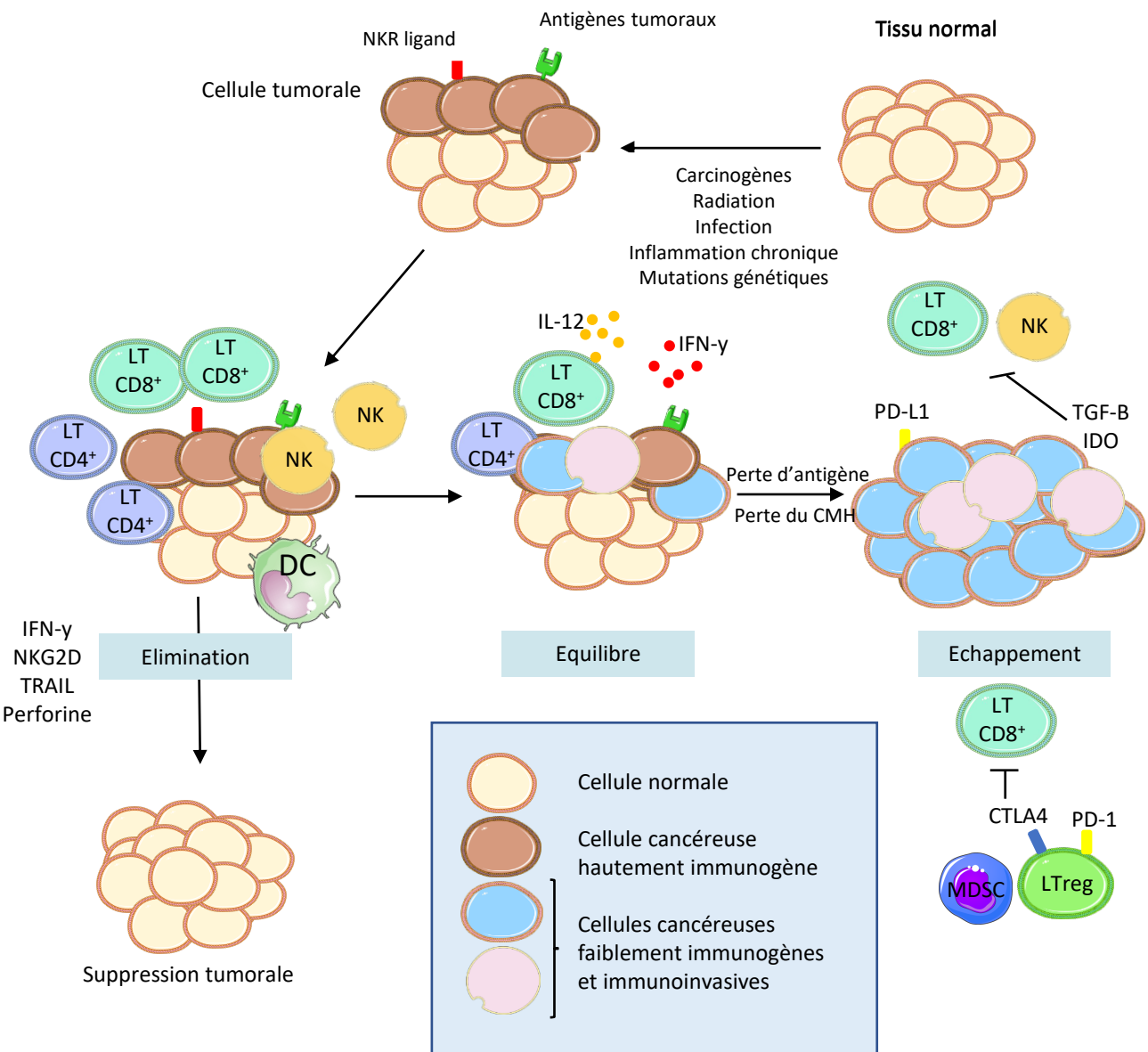


Figure 14 : Le principe de l'immunoédition dans le cancer.

Lors du développement tumoral, l'expression des antigènes tumoraux et du ligand des cellules NK, activent l'immunité innée et adaptative pour détecter et détruire les cellules tumorales. Des variants cellulaires ayant survécu à la phase d'élimination rentrent dans la phase d'équilibre où seule l'immunité adaptative, représentée par les LT CD4⁺ CD8⁺ et IFN-γ, est nécessaire à leur maintien en dormance. Après une pression de sélection constante de ces cellules génétiquement instables, des variants ne sont plus reconnus par l'immunité adaptative, deviennent insensibles aux mécanismes des effecteurs immunitaires et induisent un état immunosuppresseur par l'expression de PD-L1, TGF-β et IDO. Ces cellules tumorales rentrent alors dans la phase d'échappement qui favorise une croissance tumorale jusqu'à l'apparition clinique de la pathologie.

1.5.2. Le concept d'immuno-édition ou des 3^E

Le rôle de l'immunité dans le cancer a émergé avec la possibilité de développer, dès les années 90, des modèles immunodéficients. L'idée que le système immunitaire contrôle le développement tumoral, appelée immunosurveillance, a été décrite pour la première fois à partir du constat que les individus immunosupprimés ou immunodéficients présentaient un risque plus élevé de développer un cancer. En 2002, trois phases d'immuno-édition sont exposées par Schreiber et collègues : (i) la phase d'élimination dans laquelle le système immunitaire parvient à détruire les cellules épithéliales aberrantes, (ii) la phase d'équilibre, où le système immunitaire contient le développement tumoral mais n'empêche pas la génération de nouveaux clones tumoraux, et (iii) la phase d'échappement dans laquelle les cellules tumorales résistantes à l'immunité antitumorale échappent au système immunitaire. C'est lors de cette dernière phase que les tumeurs apparaissent (Tavakoli et al., 2021) (**Figure 14**).

○ L'élimination

Durant la phase d'élimination, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs agissent conjointement pour détecter et détruire les lésions cancéreuses avant qu'elles ne deviennent cliniquement visibles. Les cellules tumorales expriment des molécules de surface comme celles induites par le stress, des antigènes tumoraux comme les molécules du CMH de classe I ou bien les ligands du récepteur NKG2D, reconnus respectivement par les LT CD8⁺ et les cellules NK. Les cellules dendritiques peuvent également prendre en charge ces antigènes et les présenter aux LT. Ces effecteurs ainsi activés, sécrètent de l'IFN- γ , qui assure un effet anti-tumoral *via* l'induction de l'apoptose (Wang et al., 2018a). Les LT CD8⁺ induisent également l'apoptose des cellules cancéreuses, soit en interagissant avec les récepteurs de mort FAS et TRAIL (*Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*), exprimés à la surface des cellules tumorales, soit en sécrétant des perforines et des granzymes. Les LT effecteurs expriment des molécules co-stimulantes telles que CD28, CD137, OX40 qui favorisent leur prolifération ainsi que leur survie. Les cellules immunitaires innées telles que les macrophages (M1) et les granulocytes contribuent aussi à l'immunité antitumorale par la sécrétion de TNF- α , IL-1, IL-12 et ROS. Durant la phase d'élimination, la balance est en faveur de l'immunité antitumorale due à l'augmentation de l'expression des antigènes tumoraux, du CMH de classe I et des

récepteurs FAS et TRAIL à la surface des cellules tumorales et l'augmentation de perforine, granzymes, IFN- γ , IL-1, IL-12 TNF- α au sein du microenvironnement (Tavakoli et al., 2021).

- L'équilibre

Durant la phase d'équilibre, le système immunitaire adaptatif maintient la tumeur dans un état d'une dormance fonctionnelle. Certaines cellules cancéreuses subissent des changements génétiques ou épigénétiques à cause d'une pression immunitaire constante, faisant naître de nouveaux clones cancéreux. Ces derniers résistent à la reconnaissance immunitaire, par exemple, grâce à une perte d'antigène ou un défaut dans la présentation antigénique, et induisent une immunosuppression. La phase d'équilibre est alors une balance entre la présence de cytokines anti-tumorales (IL-12, IFN- γ) et pro-tumorales (IL-10, IL-23) (Tavakoli et al., 2021).

- L'échappement

Durant la phase d'échappement, le système immunitaire échoue à restreindre la croissance tumorale et des signes cliniques commencent à apparaître. Les cellules cancéreuses échappent à la reconnaissance immunitaire, expriment des molécules permettant d'augmenter leur résistance, leur survie, instaurent une immunosuppression (PD-L1 : *Programmed-death cell*) et sécrètent des cytokines pro-angiogéniques. Par ailleurs, les MDSC, les macrophages de phénotype M2, et les DC expriment des molécules immunorégulatrices (arginase, iNOS) et sécrètent des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β) qui inhibent la prolifération des LT CD8⁺ et l'apoptose des cellules cancéreuses. Les MDSC induisent la génération de LTreg qui expriment des récepteurs inhibiteurs (CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4*), LAG-3 (*Lymphocytes-activation gene 3*), suppriment la réponse antitumorale et favorise donc la croissance tumorale. Durant cette phase, la balance est renversée en faveur d'une progression tumorale de par la présence de cytokines et molécules immunosuppressives [IL-10, TGF- β , VEGF, IDO (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*), PD-L1] (Tavakoli et al., 2021).

1.5.3. Immuno-édition et CCR

Les théories de l'immunosurveillance et immuno-édition sont également valables pour le CCR et se déroulent comme décrit précédemment. Chez l'homme, les connaissances restent

limitées. Néanmoins, il a été montré des associations en faveur des principes d'immunosurveillance et immuno-édition (Fletcher et al., 2018).

Le concept d'immunosurveillance se manifeste très précocement dans le CCR et des changements dans la composition, la densité et la localisation des lymphocytes infiltrés aux tumeurs (TILs : *tumor infiltrating lymphocytes*) peuvent être utilisés avec précision comme facteur de pronostic (Galon et al., 2006). Par exemple, un infiltrat riche en TIL et cellules NK est associé à un bon pronostic surtout s'il est accompagné par la présence de LT CD3⁺, CD8⁺ ou de LT mémoires (Anitei et al., 2014). L'accumulation des altérations génétiques, tout au long de la séquence adénome-cancer est source d'antigènes tumoraux potentiellement impliqués dans l'immunosurveillance. Ainsi, des motifs de TIL CD4⁺, CD8⁺, DC et autres cellules immunitaires se voient progressivement altérés durant le développement tumoral (Jang, 2013; Maglietta et al., 2016).

L'utilisation d'animaux génétiquement modifiés a permis de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent de l'immunosurveillance dans la carcinogenèse colique. Les modèles murins immunodéprimés, tels que *ifn^{-/-}*, *rag2^{-/-}* et *Balbc*, présentent une susceptibilité accrue à un agent chimique – AOM - induisant l'apparition de tumeurs spontanées. Un nombre important d'études menées sur l'immunité ont utilisé le modèle murin *Apc^{Min/+}*. Il a été montré que la composition en cellules immunitaires ainsi que le profil cytokinique pro-inflammatoire sont altérés au sein des adénomes dans ce modèle (Akeus et al., 2014; Kettunen et al., 2003). Le nombre de tumeurs est retrouvé comme significativement augmenté dans le modèle *rag2^{-/-} Apc^{Min/+}* et un transfert adoptif de LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ permet de réduire la progression tumorale (Erdman et al., 2005). La modulation du phénotype des polypes observés, en invalidant différents gènes tels que STAT6 ou FasL, est associée à un changement de l'infiltrat immunitaire et notamment en neutrophiles, MDSC et TIL (Fingleton et al., 2007; Jayakumar and Bothwell, 2017). Pour finir, une étude plus récente montre qu'une inhibition de l'autophagie dans le modèle *Apc^{Min/+}* induit une régression du développement tumoral, dépendante des LT CD8⁺ (Lévy et al., 2015). Ainsi les données cliniques et celles fournies à partir de modèles murins soutiennent fortement que l'immunosurveillance se manifeste à des stades très précoces du CCR et peut être modifiée par des altérations génétiques se produisant au cours de la tumorigenèse colique.

Une perte ou une diminution d'expression des molécules du CMH de classe I, également connues comme les antigènes de leucocytes humains (HLA : *Human leukocyte antigens*), sont fréquemment détectées dans les cancers, comme le CCR (Dunne et al., 2020). Dû à la diminution de HLA, des mutations ou une diminution de la régulation des composants de la machinerie traitant les antigènes (APM : *Antigen processing machinery*) sont retrouvées augmentées dans les CCR de phénotype MSI ou présentant une mutation *KRAS* (Ferrone and Dranoff, 2010). Les tumeurs avec un défaut de l'APM ne possèdent pas d'antigènes de surface et ne sont ainsi pas détectées par les LT CD8⁺.

Les cellules NK et quelques LT expriment à leur surface un récepteur NKG2D. Les ligands spécifiques de ce récepteur sont quant à eux exprimés par les cellules cancéreuses et corrélés avec l'infiltration des cellules NK (Meckawy et al., 2019). Néanmoins, au cours de la carcinogenèse colique, l'expression des ligands est diminuée, suggérant la mise en place d'une sélection, au cours de l'immunoédition, des cellules cancéreuses qui ne peuvent pas être reconnues par les cellules NK et LT NKG2D⁺ (McGilvray et al., 2009).

Les cellules tumorales produisent également des molécules immunosuppressives telles que TGF- β ou IDO. Plus le développement tumoral évolue, plus le microenvironnement devient progressivement immunosuppresseur. Les cellules participant à ce phénomène sont les LT régulateurs et MDSC qui deviennent plus abondantes que les cellules cytotoxiques, comme les LT CD8⁺ (Finn, 2008).

Plusieurs voies de signalisation sont couramment régulées à la hausse dans le CCR, ce sont celles impliquant PD-1 et CTLA-4. PD-1 est exprimé à la surface des LT activés. Une fois lié à ses ligands PD-L1 et PD-L2, qui se situent à la surface des cellules cancéreuses, la réponse des LT est freinée. Ceci est dû notamment à une diminution de la production de cytokines ainsi qu'une réduction de leur prolifération. De façon similaire, CTLA-4 présent à la surface des LT, se lie à ses ligands CD80/CD86 qui se situent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Ceci a pour conséquence de prévenir la co-stimulation et ainsi l'activation constitutionnelle des LT (Teng et al., 2015). Malgré la détection de TIL PD-1⁺, son ligand PD-L1 est rarement exprimé dans les adénomes coliques mais surexprimé à des stades plus avancés (Wei et al., 2020). Il en est de même pour CTLA-4 qui est d'ailleurs associé à de mauvais pronostics (Omura et al., 2020). L'immunosurveillance se révèle être une barrière

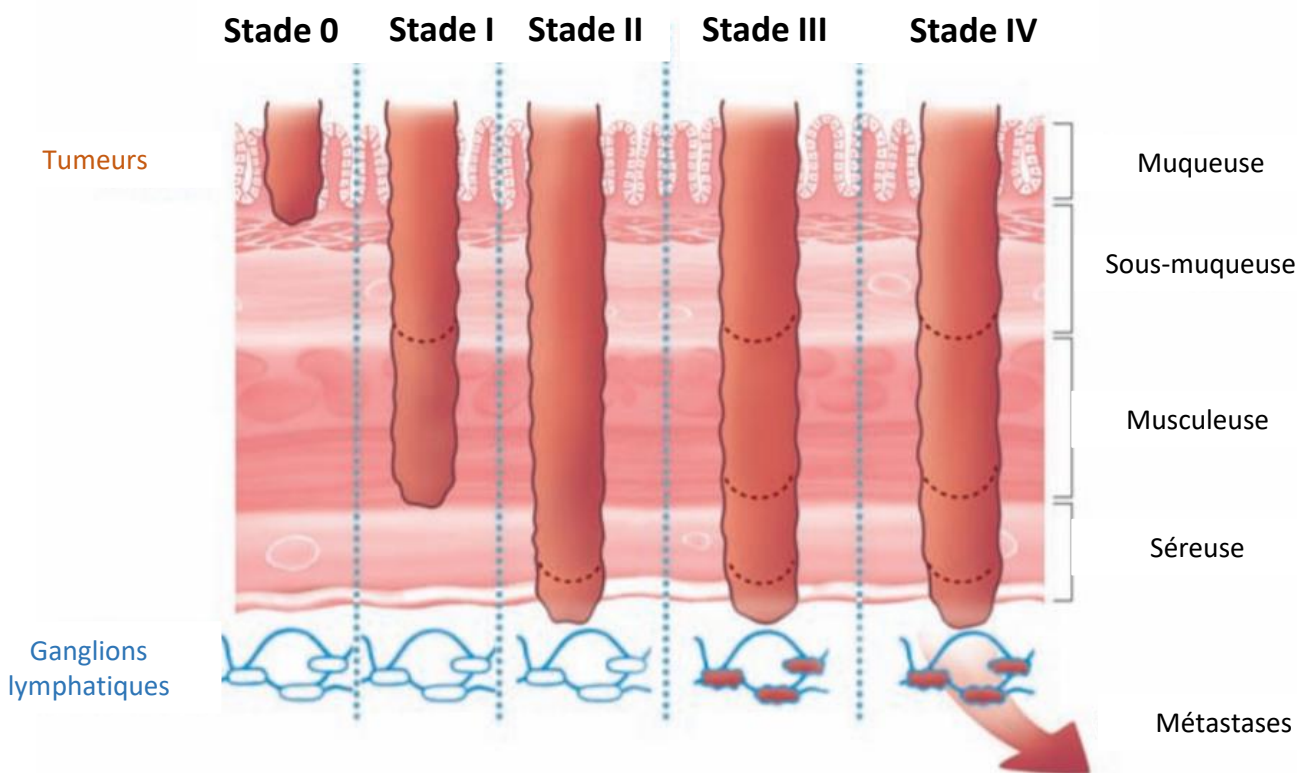


Figure 15 : Les différents stades du CCR selon la classification « TNM ».

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

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

Stade I : la tumeur envahit la sous-muqueuse ou la musculieuse.

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

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

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

(Modifiée d'après INCa, 2013)

critique pour le développement du CCR, que ce soit à des stades précoces ou invasifs et représente une cible attractive pour lutter contre le CCR.

1.6. Diagnostic du CCR

Les patients atteints de CCR peuvent présenter une multitude de symptômes comme un saignement du rectum, de l'anémie ou bien des douleurs abdominales. Néanmoins, dans la plupart des cas, le CCR est une maladie asymptomatique jusqu'à atteindre des degrés plus tardifs. C'est pourquoi en France, un test de dépistage est préconisé tous les deux ans à partir de 50 ans, l'âge étant un facteur de risque. Il s'agit du test Hemocult ou test au Gaïac qui permet de détecter grâce à la présence, en petite quantité, de sang dans les selles, l'existence de lésions précancéreuses ou d'un cancer. Une seconde méthode de dépistage fait son apparition, c'est le test ADN fécal multicibles (*Multitarget stool DNA testing*) (Imperiale et al., 2014). Ce dernier a pour avantage de tester, en plus de la présence d'hémoglobines, l'existence d'aberrations moléculaires fréquemment associées au CCR. Bien que ces deux tests aient montré une sensibilité équivalente, un résultat positif ne suffit pas à lui seul à poser un diagnostic et doit être systématiquement accompagné d'une coloscopie (Brenner and Chen, 2017).

1.6.1. Les facteurs pronostiques

A ce jour, de nombreux facteurs tels que la morphologie tumorale, la présence d'infiltrat inflammatoire ou bien de marqueurs protéiques et génotypiques ont été démontrés comme influençant le pronostic du CCR. Toutefois, par manque de standardisation, aucun de ces paramètres n'est utilisé en clinique et seule la classification TNM (*Tumor node metastasis*) permet de caractériser le stade d'avancement de la maladie au moment du diagnostic.

1.6.2. Les facteurs histologiques

La classification TNM établie par l'Union Internationale Contre le Cancer est aujourd'hui incontestée et indispensable quant à l'évaluation CCR (**Figure 15**). Elle renseigne sur le niveau d'envahissement de la tumeur dans les couches tissulaires sous-jacentes (T), la présence d'attente ganglionnaire mesurée après l'examen d'au moins douze ganglions (N) ainsi que le statut métastatique (M). Cinq stades tumoraux sont répertoriés (Tis à T4), trois niveaux d'extension ganglionnaire (N0 à N2) et la présence ou non de métastase (M0, M1). La combinaison de ces trois facteurs sert à définir de façon globale l'avancée de la maladie et de

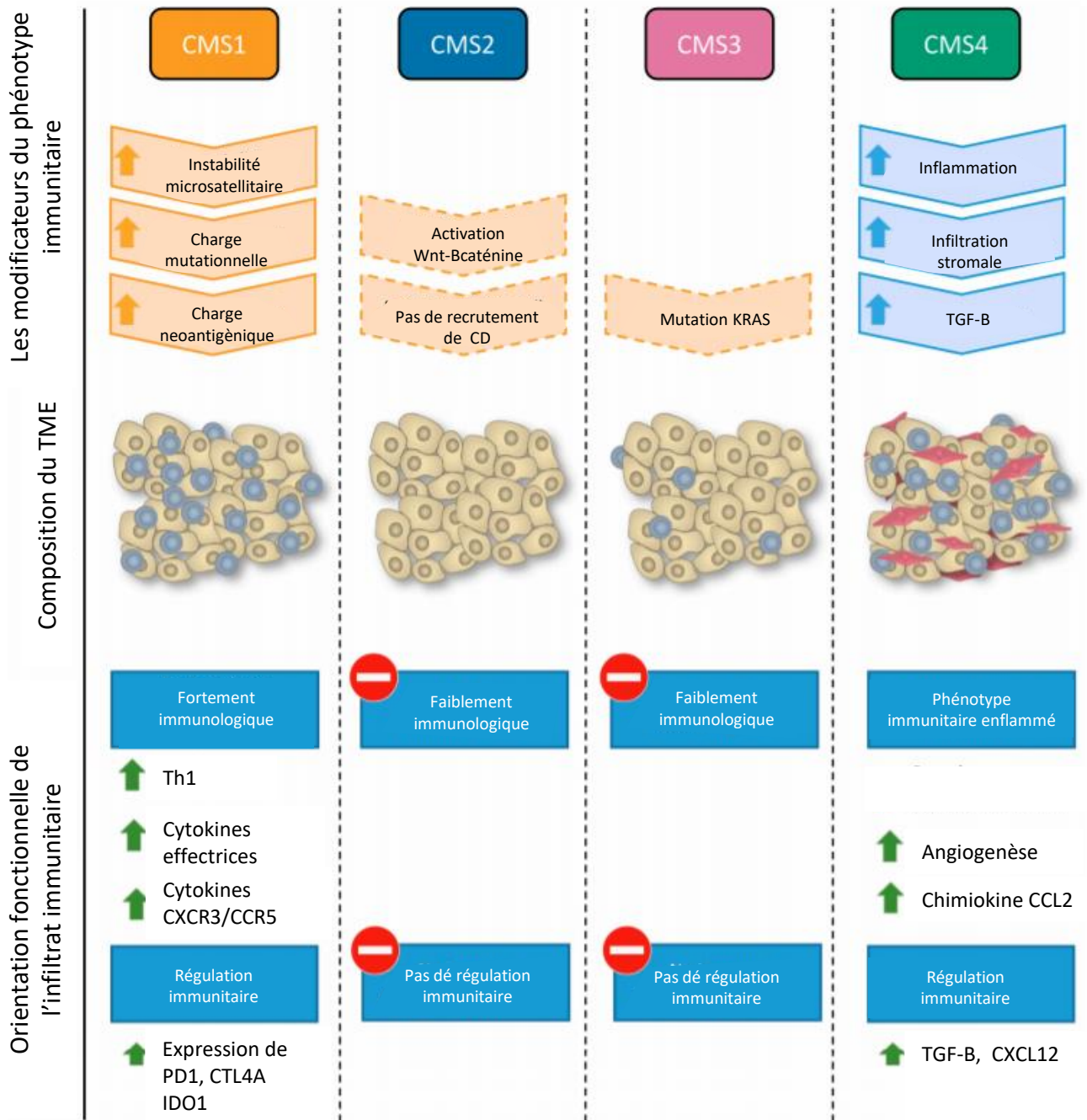


Figure 16 : Classification CMS du CCR.

Le profil transcriptomique et mutationnel du CMS (*Consensus molecular subtypes*) est associé avec les caractéristiques immunitaires intra-tumorales. Le microenvironnement tumoral de type CMS1 ou CMS4 est caractérisé par un haut niveau de lymphocytes intra-tumoraux (bleu) alors que les fibroblastes associés au cancer (rouge) sont surtout présents dans le CMS4. Ces deux consensus présentent des orientations fonctionnelles du système immunitaire différentes : alors que les tumeurs CMS1 ont une orientation favorable par une forte expression immunogène associée avec une augmentation de points de contrôle immunitaire, les tumeurs de type CMS4 ont un phénotype immunitaire enflammé, caractérisé par une augmentation de la voie de signalisation de TGF-B et une augmentation de l'angiogenèse. CMS2 et CMS3 sont tous les deux faiblement immunogènes caractérisés par une exclusion des lymphocytes intra-tumoraux et une faible expression des transcrits associés à l'immunité.

(Modifiée d'après Roelands et al., 2017)

la distinguer parmi 5 stades, TNM 0, TNM I, TNM II, TNM III et TNM IV sur lesquelles sera basé le traitement. Le stade 0 est le stade le plus précoce. Les cellules cancéreuses sont localisées *in situ* au niveau de la muqueuse de la paroi intestinale. Les cliniciens ne parlent pas encore de cancer mais de lésions pouvant évoluer en cancer. Au stade I, le cancer est décrit comme localisé, la tumeur envahit les couches de tissu qui entourent la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculature. Au stade II, le cancer est localement avancé mais est toujours considéré comme un stade précoce. Les cellules cancéreuses envahissent toutes les couches de la paroi intestinale sans pour autant atteindre d'autres organes. Au stade III, le cancer localement avancé est défini comme étant à des stades tardifs puisqu'apparaît l'envahissement des ganglions lymphatiques voisins par les cellules cancéreuses. Enfin le stade IV est décrit comme cancer métastatique, il s'est alors propagé au-delà du côlon (Rosen and Sapra, 2020). Comme mentionné précédemment, une prise en charge précoce de la maladie permet aux patients d'avoir de meilleures chances de survie. Ainsi, la survie à 5 ans dépend directement du stade auquel le CCR a été diagnostiqué puisqu'elle est de 74% pour un stade I et chute à 5% pour un stade métastatique (Recio-Boiles et al., 2020).

1.6.3. Les facteurs moléculaires et sériques

Afin de déterminer le traitement le plus approprié, un bilan d'extension peut être ordonné. Celui-ci s'effectue par un dosage sérique des ACE (*antigène carcino-embryonnaire*). Un taux élevé d'ACE est un facteur de mauvais pronostic puisque ces derniers, par leur action sur la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration et la formation des métastases, influencent positivement le développement de la pathologie (Zhang et al., 2019).

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*) (Sawayama et al., 2020). Elle a été établie à partir de l'analyse des données provenant de plus de 4 000 échantillons tumoraux de patients et est basée sur des facteurs moléculaires, cliniques et biologiques. Cette classification CMS prend en compte le phénotype tumoral, l'activation des voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse colique ainsi que l'abondance et la nature des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (**Figure 16**).

1.7. La prise en charge thérapeutique

La chirurgie est le principal traitement du CCR. Elle peut être accompagnée de chimiothérapie avant la chirurgie, afin de stabiliser ou de faire régresser le développement cancéreux (néoadjuvante), après la chirurgie, pour diminuer le risque de récurrences en éliminant d'éventuelles cellules tumorales résiduelles (adjuvante) ou alors lorsque la chirurgie est impossible en raison d'un développement tumoral trop avancé et/ou de l'état général trop précaire du patient.

En pratique, la prise en charge thérapeutique des patients atteints de CCR se base sur deux critères principaux : la classification TNM et des facteurs propres aux patients tels que la comorbidité. Cela permet de catégoriser les patients en quatre groupes distincts, afin d'adopter la meilleure stratégie thérapeutique (Van Cutsem et al., 2014).

Le groupe 0 réunit des patients ne présentant aucune métastase et avec un pronostic favorable (TNM I et II). Dans ce cas-là, le traitement consiste à la simple résection chirurgicale, c'est-à-dire à l'ablation du segment atteint. La chimiothérapie n'ayant pas montré de bénéfice quant à une meilleure survie des patients, elle ne se voit pas administrée.

Le groupe 1 englobe des patients avec des métastases opérables, sous traitement d'une chimiothérapie néoadjuvante et pouvant subir une résection chirurgicale.

Parmi le groupe 2, les patients ont un cancer disséminé inopérable. Le traitement proposé n'est plus curatif mais palliatif avec l'intention de réduire les symptômes, l'agressivité et l'extension de la maladie. Dans un premier temps, une chimiothérapie néoadjuvante sera préconisée. Si le patient répond à ce traitement, une ablation est envisageable pour maintenir une survie sans progression sinon le traitement par chimiothérapie sera maintenu.

Pour finir, le groupe 3 comprend les patients avec un cancer inopérable, pour lesquels un traitement intensif n'est pas envisageable, où les symptômes sont inexistantes et qui ne présentent pas de risques de détérioration, la stratégie est d'augmenter le temps sans traitement et de prévenir la progression tumorale en utilisant un agent cytotoxique.

Comme évoqué précédemment, les patients atteints de CCR et présentant des métastases sont traités principalement par chimiothérapie. Elle est composée de 5-FU (*5-fluoro-uracile*), acide folinique et oxaliplatine (FLOXFOX) (Thésaurus national de cancérologie digestive 2018). Pour

les CCR présentant des stades avancés (TNM III), l'administration d'une bi ou trichimiothérapie de type CAPOX (*Capecitamine et Oxiliplatine*) ou FLOXFOX est préconisée (Thésaurus National de cancérologie digestive, 2018).

1.8. Immunothérapies à l'essai

Afin de contrer l'état immunosuppresseur au sein du TME et favoriser l'immunité antitumorale, plusieurs stratégies sont à ce jour à l'essai. Ceci inclut : (i) la suppression des cellules ou voies de signalisation qui favorisent l'immunosuppression du TME, (ii) l'engagement de cellules immunostimulantes à travers des stimulations externes ou traitements et (iii) le remplacement des cellules immunitaires avec des cellules immunitaires réactivées. Bien évidemment, une combinaison de ces trois stratégies parviendrait à l'obtention de résultats prometteurs.

Alors que les thérapies anti PD-1/PD-L1 ont démontré une grande efficacité chez les patients atteints de CCR avec MSI-H/déficient pour le système de réparation des mésappariements, la monothérapie se voit inefficace pour les patients présentant un CCR avancé de type MSS (Le et al., 2015). Une stratégie combinant des anti-PD-1 ou anti-PD-L1 avec des anti-CTLA-4 a été examinée pour favoriser la réponse immunitaire antitumorale. Le durvalumab (anti-PD-L1) associé au tremelimumab (anti-CTLA-4) a montré une amélioration modérée de la survie globale chez les patients avec des CCR de type MSS qui sont normalement traités avec une chimiothérapie. Toutefois, aucune différence dans la survie sans progression n'est observable (Chen et al., 2019a).

Les thérapies ciblant VEGF, telles que le bevacizumab, ont montré une atténuation du microenvironnement immunosuppresseur, en diminuant le nombre de LT régulateurs dans des études pré-cliniques et chez les patients atteints de CCR (Terme et al., 2013). Cependant, l'ajout d'un anti-PD-L1 au fluorouracil et bevacizumab comme traitement de première ligne chez les patients présentant des métastases, ne conduit à aucune amélioration (Grothey et al., 2018).

Une stratégie alternative est de bloquer les cytokines qui permettent le recrutement des LT régulateurs, MDSC et des TAM. Par exemple, TGF- β contribue à ce processus à des stades tardifs de la carcinogenèse. Bien que l'utilisation d'inhibiteur de TGF- β comme monothérapie se soit révélée décevante (Akhurst and Hata, 2012), un traitement combinatoire d'un inhibiteur de TGF- β (galunisertib) avec un agent anti-PD-1 ou anti PD-L1 est testé dans un essai clinique ([NCT02423343](#) and [NCT02734160](#)) ainsi qu'un inhibiteur de STAT3 (BBI608) en combinaison

avec du perbrolizumab, qui est à ce jour en phase Ib/II pour des patients atteints d'un CCR MSS en phase métastatique ([NCT02851004](#)).

Pour finir, des transferts adoptifs sont également exploités pour favoriser l'activité des cellules immunitaires. Les LT cytotoxiques ainsi que les NK sont les populations principalement impliquées dans la réponse anti-tumorale. En comparaison avec d'autres stratégies, des transferts adoptifs présentent différents avantages, comme l'expansion *ex vivo* de lymphocytes qui peuvent être génétiquement modifiés. Dans une étude en phase I/II, des lymphocytes de ganglions lymphatiques ont été multipliés *ex vivo* et transfusés aux patients atteints de CCR qui ont subi une chirurgie palliative ou radicale. Le taux de survie à 24 mois était significativement plus élevé chez les patients ayant été transfusés que chez les contrôles (Zhen et al., 2015).

Microbiote « sain »

Dysbiose

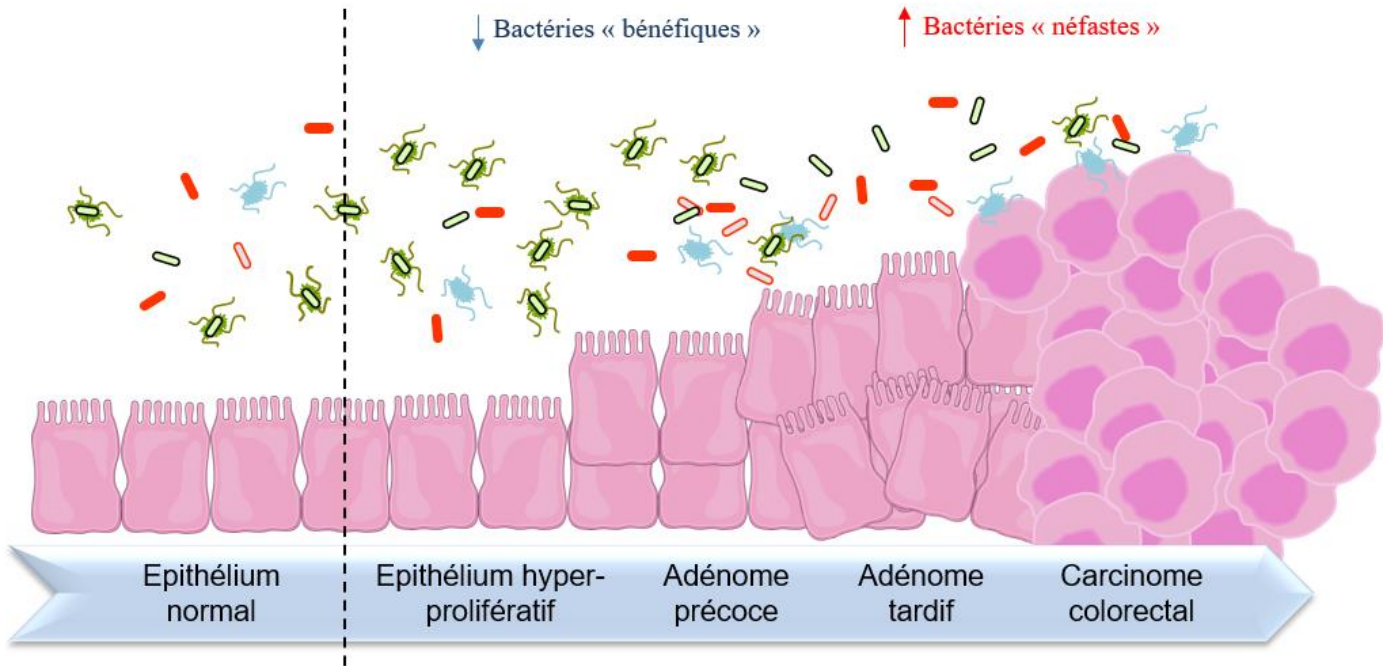


Figure 17 : Dysbiose et CCR.

La muqueuse intestinale des patients à risque de développer un CCR est colonisée par des bactéries dites « néfastes ». Ces bactéries peuvent induire une inflammation colique, augmenter la prolifération cellulaire et/ou produire des composés génotoxiques qui peuvent contribuer à l'accumulation de mutations au cours de la séquence adénome-cancer. Ce processus oncogénique s'accompagne de modification du micro-environnement et peut exercer une pression de sélection sur la flore microbienne locale.

2. Rôle du microbiote dans la carcinogenèse colorectale

Le côlon des mammifères qui a co-évolué avec un écosystème microbien, où une interaction symbiotique, facilite le développement de l'hôte et du microbiote, grâce au façonnage d'un système immunitaire robuste. Le dialogue complexe et bidirectionnel qui existe entre l'hôte et le microbiote permet une coexistence paisible entre les composants du bol alimentaire et les bactéries commensales, ainsi que la défense contre des agents pathogènes et le maintien de l'homéostasie intestinale. Cependant, dans le cadre du CCR, ces interactions peuvent être dérégulées, amenant à une modification de la composition du microbiote où émergent des bactéries ayant des propriétés génotoxiques. Ces changements sont accompagnés d'une détérioration de la barrière intestinale permettant la translocation des micro-organismes qui peuvent favoriser la mise en place de mécanismes pro-tumoraux.

2.1. Dysbiose intestinale et CCR

Les premières évidences d'une interaction entre l'hôte et le microbiote dans le cadre du CCR a émergé en 1975 quand l'agent carcinogène, le diméthylhydrazine, induit moins de tumeurs chez des modèles murins axéniques comparativement à ceux possédant un microbiote (Reddy et al., 1974). Une seconde étude a mis en lumière ce lien, où des souris ayant reçu une transplantation fécale de patients atteints de CCR, développent plus de polypes intestinaux que celles transplantées avec les selles de patients sains (Wong et al., 2017a).

Grâce au développement des techniques d'analyse de l'ARN 16S ainsi que de la métagénomique, il est maintenant incontestable que les patients atteints de CCR présentent une composition taxonomique relativement différente des patients contrôles. Cette modification du microbiote est appelée dysbiose (Olesen and Alm, 2016). Les études montrent que les patients atteints de CCR ont globalement une diversité taxonomique accrue d'espèces microbiennes présentes dans les fèces, avec un enrichissement de certaines d'entre elles (Gao et al., 2020). Les agents microbiens retrouvés plus abondamment dans les tumeurs coliques sont dits pro-carcinogènes et comprennent : *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gallolyticus* et *Peptostreptococcus anaerobius*. Les genres dits protecteurs comme *Roseburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* et *Bifidobacterium* sont quant à eux diminués au sein des tissus cancéreux (**Figure 17**).

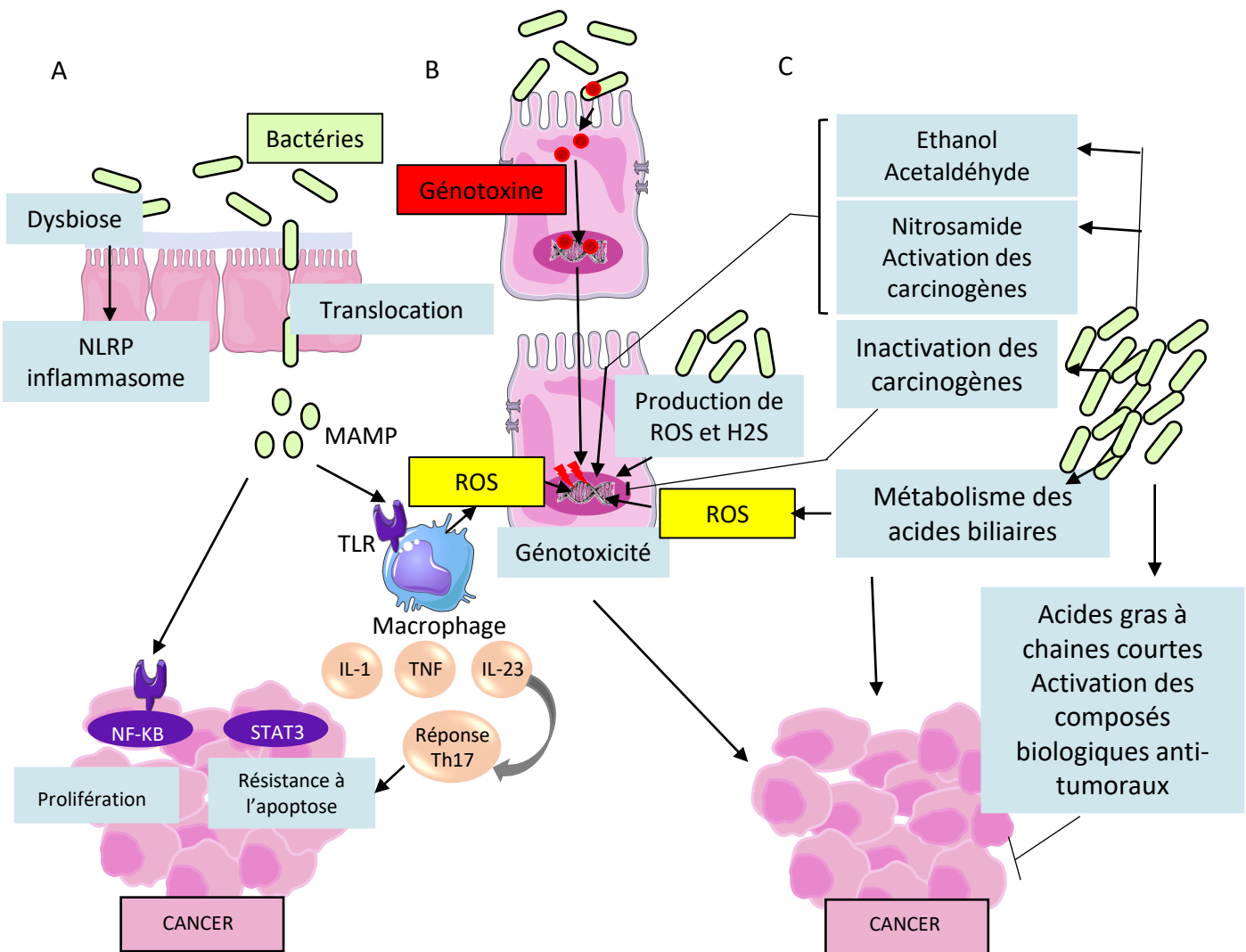


Figure 18 : Mécanismes par lesquels le microbiote intestinal module la carcinogénèse colorectale.

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

- Des phénomènes de dysbiose et la modulation des défenses de l'hôte pourraient favoriser des translocations bactériennes responsables de l'induction de phénomènes inflammatoires, induisant la prolifération cellulaire et régulant l'apoptose. Des motifs antigéniques particuliers de ces micro-organismes, les MAMPs (*Microbe-associated molecular patterns*), sont reconnus par les TLRs (*Toll-like receptor*) de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, cellules épithéliales ou cellules tumorales.
- Des génotoxines bactériennes produites par les bactéries sont internalisées, créant des dommages à l'ADN et modulant le cycle cellulaire. Les ROS produits par les cellules immunitaires en réponse à l'infection et/ou par les bactéries elles-mêmes, peuvent également être génotoxiques.
- Le métabolisme microbien participe à la conversion, à la production et à l'activation de composés pro-carcinogènes, tels que l'acétaldéhydes, les nitrosamines et des acides biliaires secondaires. Il participe toutefois également à des processus anti-néoplasiques tels que l'inactivation de certains carcinogènes, la production d'acide gras à chaînes courtes et l'activation de composés phytochimiques protecteurs.

L'abondance de certaines bactéries est corrélée avec le score clinique et la chimiosensibilité du patient, comme c'est le cas pour *Fusobacterium*, ce qui laisse penser que la composition microbienne pourrait être utilisée comme biomarqueur (Gao et al., 2020; Mima et al., 2016; Yu et al., 2017). Cependant, affirmer que la dysbiose est une cause ou une conséquence du CCR et lui attribuer l'initiation ou la progression reste à ce jour difficile. Cela est dû notamment à une différence considérable de la composition du microbiote entre les individus (Shanahan et al., 2021). Néanmoins, une signature microbienne au sein du CCR a été récemment publiée. Elle montre un enrichissement de 29 espèces à travers 8 localisations géographiques, ce qui laisse suggérer une définition du microbiome associé au CCR (Wirbel et al., 2019). Mais les grandes questions plus mécanistiques concernant la physiologie observée et le lien entre l'activité oncogénique de la communauté microbienne, *via* par exemple la production de métabolites ou la génotoxicité de certaines bactéries, n'ont pas encore été résolues (**Figure 18**).

2.2. Les effets des micro-organismes sur le métabolisme

Au-delà du rôle spécifique de certaines bactéries, l'activité collective du microbiote sur le CCR mérite une plus ample attention. Plusieurs produits issus du métabolisme bactérien sont impliqués dans le développement du CCR et directement associés à l'apport alimentaire. Cela inclut les produits issus du métabolisme protéique, des acides biliaires secondaires, provenant d'un apport élevé de gras, et les acides gras à chaînes courtes, métabolisés à partir des carbohydrates et produits phytochimiques.

- Les métabolites dérivés des protéines

Le métabolisme des protéines par le microbiote intestinal produit de nombreux acides aminés. Le sulfite d'hydrogène ou H₂S (*Hydrogen sulfide*) est un composé luminal produit par les bactéries sulfato réductrices du côlon, principalement à partir d'acides aminés. Il est utilisé comme source d'énergie par les cellules épithéliales coliques et impliqué dans le CCR. Cependant, des données conflictuelles sur ses effets pro-inflammatoires et son action sur la prolifération persistent. Pour autant, l'H₂S produit par des bactéries réduisant le sulfate possède des rôles cytotoxiques et génotoxiques. Wang et collègues lui assimilent également une action sur l'immunité, amenant à un déséquilibre du *ratio* Th1/Th2 (Wang et al., 2018b). Ce résultat a pour conséquence l'instauration d'un état pro-inflammatoire et l'activation de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF-κB. Une inhibition de la synthèse de H₂S

restaure, *in vitro*, la sensibilité des cellules issues du cancer colorectal à l'agent de chimiothérapie le 5-FU, laissant penser que le sulfite d'hydrogène pourrait être impliqué dans la chimiorésistance des patients (Chen et al., 2019b). *A contrario*, une étude récente attribuée au H₂S un effet plutôt bénéfique, en limitant la prolifération des cellules cancéreuses Caco-2, de par son action sur l'apoptose et sur le cycle cellulaire (Sakuma et al., 2019).

D'autres métabolites dérivés des protéines ont été étudiés comme l'acide 4-hydroxyphenylacétique, le phénol ou encore l'acide phénylacétique, produits à partir de la tyrosine. Tous possèdent un rôle cytotoxique voire génotoxique dans le cadre du CCR (Armand et al., 2019).

- Les acides biliaires

Un autre métabolite produit par le microbiote intestinal est l'acide biliaire qui peut être classifié en deux groupes : l'acide biliaire primaire et l'acide biliaire secondaire. L'acide biliaire primaire comme l'acide cholique (CA : *Cholic acid*) est transformé par le microbiote intestinal en acide biliaire secondaire comme l'acide lithocholique (LCA : *lithocholic acid*) et désoxycholique (DCA : *Deoxycholic*).

Les acides biliaires sont des composés naturels qui dérivent du cholestérol. Ils sont importants pour la digestion des lipides et interviennent dans le métabolisme du glucose (Shapiro et al., 2018). Toutefois, un lien étroit existe entre les acides biliaires et la survenue du CCR. Chez les patients atteints de CCR, un enrichissement de la concentration en acides biliaires secondaires est d'ailleurs retrouvé dans les carcinomes (Yachida et al., 2019). Le microbiote intestinal est capable de produire ce métabolite, spécifiquement lors d'un régime alimentaire de type « occidental », c'est-à-dire riche en gras et en sucre et pauvre en fibres. Des études montrent que l'acide biliaire secondaire DCA inhibe l'apoptose, diminue l'activité des inhibiteurs du cycle cellulaire et augmente la production d'espèces oxygénées réactives, qui sont à l'origine de dommages à l'ADN (Li and Cao, 2016). L'administration de DCA chez les souris *Apc^{Min/+}* favorise ainsi la tumorigenèse *via* la stimulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Liu et al., 2018). Les récentes études se focalisent plus particulièrement sur les capacités de l'acide biliaire à être employé comme facteur de pronostic/diagnostic. La première s'est intéressée à la concentration en acides biliaires dans le sérum de 56 patients atteints d'un carcinome, 59 patients présentant des adénomes et 60 patients contrôles (Uchiyama et al.,

2021). Les résultats montrent que la concentration en acides biliaires pourrait être un marqueur employé pour diagnostiquer du CCR, puisque son taux de réussite à discriminer les patients est de 66,3% dans cette cohorte (Uchiyama et al., 2021). Enfin, la dernière étude met en lumière le rôle des acides biliaires comme facteur de pronostic de la survie à 3 ans ainsi que de la survie globale des patients. Une concentration importante en acides biliaires totaux dans le sérum est inversement corrélé avec le pronostic des patients (Cao et al., 2021a).

- Les acides gras à chaîne courte

De nombreux travaux se sont intéressés au rôle protecteur des acides gras à chaîne courte tels que le butyrate. Ces derniers sont produits à partir des fibres alimentaires, qui, après avoir subi une hydrolyse, sont fermentées par le microbiote intestinal pour donner des acides gras à chaîne courte. Par l'utilisation de modèles murins de CCR, le butyrate se révèle être un agent anti-tumoral puisqu'il est associé à une diminution de la prolifération des cellules épithéliales intestinales, due à la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la voie Wnt, et joue un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium colique, évitant ainsi une possible translocation bactérienne (Lavoie et al., 2020; Lazarova et al., 2014). Le butyrate favorise également l'inhibition des histones désacétylases, ce qui limite la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et accentue les fonctions anti-microbiennes des macrophages (Schulthess et al., 2019). En se liant à son récepteur, le butyrate favorise également la différenciation des LT CD4⁺ sécrétant la cytokine anti-inflammatoire IL-10, qui induit en retour l'apoptose des cellules épithéliales intestinales (Singh et al., 2014). Bien que le butyrate ait des propriétés anti-inflammatoires sur des cancers déjà établis, son action de ralentir la réparation des plaies pourrait être préjudiciable à des stades plus précoces de la maladie. La génétique de l'hôte pourrait également déterminer le statut pro ou anti-cancéreux du butyrate dans le CCR. Chez des modèles murins *Apc^{Min/+}*, déficients pour le système de réparation de mésappariements *Apc^{Min/+}/Msh2^{-/-}*, le butyrate induit une hyper-prolifération des cellules épithéliales intestinales (Belcheva et al., 2014).

Pour aller plus loin, une récente étude s'est intéressée au rôle de *Clostridium butyricum*, une bactérie productrice de butyrate utilisée comme probiotique sur la carcinogenèse colique (Chen et al., 2020a). Cette bactérie produit des effets favorables puisqu'elle limite la tumorigenèse colorectale chez des souris *Apc^{Min/+}* soumises à un régime occidental. Elle réduit

également l'émergence de bactéries pathogéniques et augmente l'apparition de bactéries dites bénéfiques (Chen et al., 2020a). L'étude mécanistique qui en découle démontre *in vitro* que cette bactérie diminue la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose des cellules tumorales coliques en agissant principalement sur la voie Wnt/ β -caténine (Chen et al., 2020a). Le butyrate pourrait également augmenter la chimiosensibilité des patients à l'agent de chimiothérapie FOXO3A, en agissant sur le métabolisme des cellules cancéreuses par son action inhibitrice de voie de signalisation AKT (Geng et al., 2021; Park et al., 2020)

Bien que le régime alimentaire puisse avoir un effet direct sur la carcinogénèse (Fernández-Villa et al., 2020), il peut également altérer l'écosystème microbien en modifiant l'abondance de bactéries spécifiques et de métabolites. Par exemple, un régime associé à un enrichissement d'espèces bactériennes métabolisant le soufre est corrélé avec une augmentation du risque de développer un cancer du côlon, dû à des potentielles activités génotoxiques (Nguyen et al., 2020).

Afin d'identifier d'autres métabolites qui pourraient jouer un rôle dans la survenue de la maladie, des méta-analyses protéomiques ont été effectuées dans les selles d'individus atteints du syndrome de Lynch et au sein d'adénomes et de carcinomes (Long et al., 2020; Yachida et al., 2019; Yan et al., 2020). Ces études ont identifié un enrichissement de métabolites oxydants qui pourraient être la conséquence d'une augmentation d'espèces oxygénées réactives et d'espèces azotées réactives dans le côlon des patients atteints de CCR (Long et al., 2020). Cependant, de plus amples études sont nécessaires pour établir un lien de cause à effet.

2.3. Microbes, immunité et CCR

Les bactéries sont capables d'induire une inflammation associée au développement tumoral. Néanmoins, les voies de signalisation par lesquelles le microbiote influence le microenvironnement tumoral et, en retour, comment celui-ci module le microbiote environnant font l'objet des recherches actuelles.

2.3.1. Impact de la translocation bactérienne sur le CCR

La rupture de la barrière intestinale permet un afflux de micro-organismes potentiellement nocifs au sein du tissu, ainsi que la formation d'agrégats bactériens invasifs, appelés biofilms. Le biofilm consiste en une communauté bactérienne définie, qui inclut *B. fragilis*, *E. coli* et *F. nucleatum*, enfermée dans une matrice polymérique (Dejea et al., 2018). Les biofilms sont

détectés au sein des polypes, à des stades très précoces chez les patients atteints de FAP et sont mis en cause dans la formation d'adénomes, qui est un stade plus tardif du CCR (Dejea et al., 2018). Bien que la fonction précise du biofilm dans le développement du CCR soit à ce jour approximative, l'inoculation des tissus CCR présentant des biofilms chez les souris *Apc^{Min/+}* est responsable d'un développement cancéreux accentué, en comparaison des tissus CCR sans biofilms (Tomkovich et al., 2019). Néanmoins, plusieurs interrogations s'imposent. Les propriétés pro-carcinogènes du biofilm sont-elles la conséquence d'espèces bactériennes spécifiques, de la communauté, ou bien est-ce la réponse de l'hôte qui est inefficace face au biofilm ?

La translocation bactérienne causée par une rupture de la barrière intestinale est corrélée avec la production de différentes cytokines pro-inflammatoires dont IL-23, IL-17 et IL-6 que ce soit chez des modèles murins de CCR ou chez les patients atteints de CCR (Grivennikov et al., 2012). L'IL-23 et l'IL-6 sont des cytokines agissant sur la réponse immunitaire adaptative puisqu'elles induisent une réponse Th17 et donc la production d'IL-17 et d'IL-22 (Ghoreschi et al., 2010). L'IL-6 favorise également une prolifération aberrante des cellules épithéliales intestinales en se liant à son récepteur (Xu et al., 2019). Toutefois, dans le CCR, plusieurs cytokines jouent des rôles bivalents. Par exemple, IL-22, produite par les LT, peut favoriser la prolifération des cellules épithéliales intestinales et être un facteur anti-apoptotique, ce qui suggère un rôle pro-tumoral (Hernandez et al., 2018). Cependant, l'IL-22 peut également être un facteur anti-tumoral en agissant sur l'intégrité de la barrière intestinale et en induisant le système de réparation à l'ADN (Hernandez et al., 2018). Des rôles aussi disparates dans la carcinogenèse dépendent principalement de leur concentration ainsi que de la progression tumorale.

2.3.2. Altération du micro-environnement tumoral par les bactéries pro-carcinogènes

Les tumeurs créent un microenvironnement permissif en recrutant certaines populations immunitaires dont leur densité ainsi que leur composition peuvent être modulées par le microbiote. Par exemple, les chimiokines attirant les lymphocytes, CCL5 (*C-C motif ligand 5*), CCL20 et CXCL11 (*C-X-C motif chemokine 11*) sont associées avec les phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* et peuvent également être induites *in vitro* par les *F. nucleatum* et *E. coli* (Cremonesi et al., 2018). La génétique peut également affecter cette réponse. Un microbiote bien défini est

retrouvé corrélé avec la présence de LT CD8⁺ cytotoxiques ainsi qu'une réponse de type Th1, spécifiquement un modèle murin de CCR, présentant une déficience pour l'autophagie et pour le gène *Apc* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (Lévy et al., 2015). Modifier la composition du microbiote afin d'enrichir le microenvironnement tumoral de LT cytotoxiques est une stratégie thérapeutique potentiellement envisageable. Pour autant, une étude récente a montré que les LT cytotoxiques CD8⁺ n'ont pas toujours un rôle antitumoral. Un microbiote enrichi en *Prevotellaceae* est associé avec une hyperstimulation de LT CD8⁺, ce qui favorise une inflammation chronique, un épuisement précoce des LT et donc une réduction de la réponse antitumorale (Yu et al., 2020a). Le statut d'activation des cellules immunitaires et leur abondance sont donc d'une importance capitale pour caractériser leur rôle dans la tumorigenèse colique, car des LT dysfonctionnels participent principalement à l'échappement tumoral.

Dans le modèle murin *Apc^{Min/+}*, *Bacteroides fragilis* entérotoxigène (ETBF : *Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*) induit une réponse pro-carcinogène de type Th17 via l'activation de STAT3 (Wu et al., 2009). Ceci est accompagné par le recrutement des MDSC, qui suppriment l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ et favorisent l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse (Thiele Orberg et al., 2017). La toxine des ETBF induit une accumulation des MDSC spécifiquement au niveau du côlon distal. Cette localisation est retrouvée identique à l'activation de la voie de signalisation NF-κB dans les cellules épithéliales intestinales, qui permet la sécrétion des chimiokines attirant les cellules myéloïdes, CXCL1 et CXCL2 (Chung et al., 2018; Thiele Orberg et al., 2017).

De la même manière, l'infection par la bactérie associée au CCR, *Streptococcus gallolyticus* chez un modèle murin de CCR associé aux colites, favorise la tumorigenèse colorectale par le recrutement de MDSC et une augmentation des cytokines associées aux MDSC, IL-6 et IL-8 (Zhang et al., 2018b).

Un nombre plus important de tumeurs coliques est également observé chez les souris *Apc^{Min/+}* infectées avec les *F. nucleatum*. Ce résultat est accompagné d'une augmentation intratumorale des cellules myéloïdes immunosuppressives telles que les MDSC, TAM, TAN et DC. Les MDSC et TAM, isolés des tumeurs, suppriment la prolifération des LT CD4⁺ *ex vivo* (Kostic et al., 2013). Les *F. nucleatum* peuvent également agir sur l'inhibition de la cytotoxicité des NK,

permettant aux tumeurs d'échapper au système immunitaire (Gur et al., 2015). Une récente étude a montré que les *F. nucleatum* sont inversement associés avec la présence de LT mémoires au sein des tumeurs colorectales (Borowsky et al., 2021).

Pour finir, les CoPEC (*Colibactin-producing E.coli*) peuvent aussi affecter le micro-environnement tumoral et cela même à distance du site tumoral. Chez les patients atteints de CCR, tout comme chez les souris *Apc^{Min/+}*, la colonisation par les CoPEC réduit la densité des LT CD3⁺ infiltrés. Une diminution significative des LT anti-tumoraux dans les ganglions mésentériques est également observée chez les souris infectées par rapport aux souris non infectées. Les CoPEC pourraient alors induire un microenvironnement immunitaire pro-carcinogène à travers la modulation de la réponse antitumorale (Lopès et al., 2020).

La capacité des bactéries à cibler des effecteurs, comme l'activation de NF-κB, pourrait expliquer l'hétérogénéité des maladies associées au microbiote. Néanmoins, pointer les conséquences de la dysbiose, comme par exemple, le recrutement de certaines populations immunosuppressives, pourrait être une stratégie thérapeutique plus efficace qu'agir directement sur les bactéries mises en cause. Pour autant, des précautions doivent être prises du fait de la pléiotropie des facteurs dérivés des cellules immunitaires et de l'issue qui dépend de la densité, mais aussi du statut d'activation et de la localisation de ces cellules.

2.4. La carcinogenèse induite par les bactéries spécifiques

2.4.1. *Enterococcus faecalis*

Les *E. faecalis* sont des bactéries commensales qui pourraient être responsables de maladies humaines à travers la translocation de la muqueuse intestinale, cavité orale et génito-urinaire vers la circulation systémique. Les *E. faecalis* représentent la plus fréquente cause d'infection chez les adultes et des études mettent en lumière leur importance dans le développement cancéreux. Actuellement, aucun consensus sur le rôle des *E. faecalis* dans le CCR n'est établi et des études leur concèdent soit aucun rôle, soit un rôle protecteur, ou bien un rôle pro-carcinogène (de Almeida et al., 2018).

Une étude de Viljoen et collègues, prenant en compte 55 patients, n'a montré aucune association significative entre les *E. faecalis* et le développement du CCR. Cependant, la même étude révèle une association entre les caractéristiques clinico-pathologiques du CCR et la présence des *Fusobacterium spp.* ainsi que des ETBF (Viljoen et al., 2015). Chez les souris *Apc^{Min/+}*,

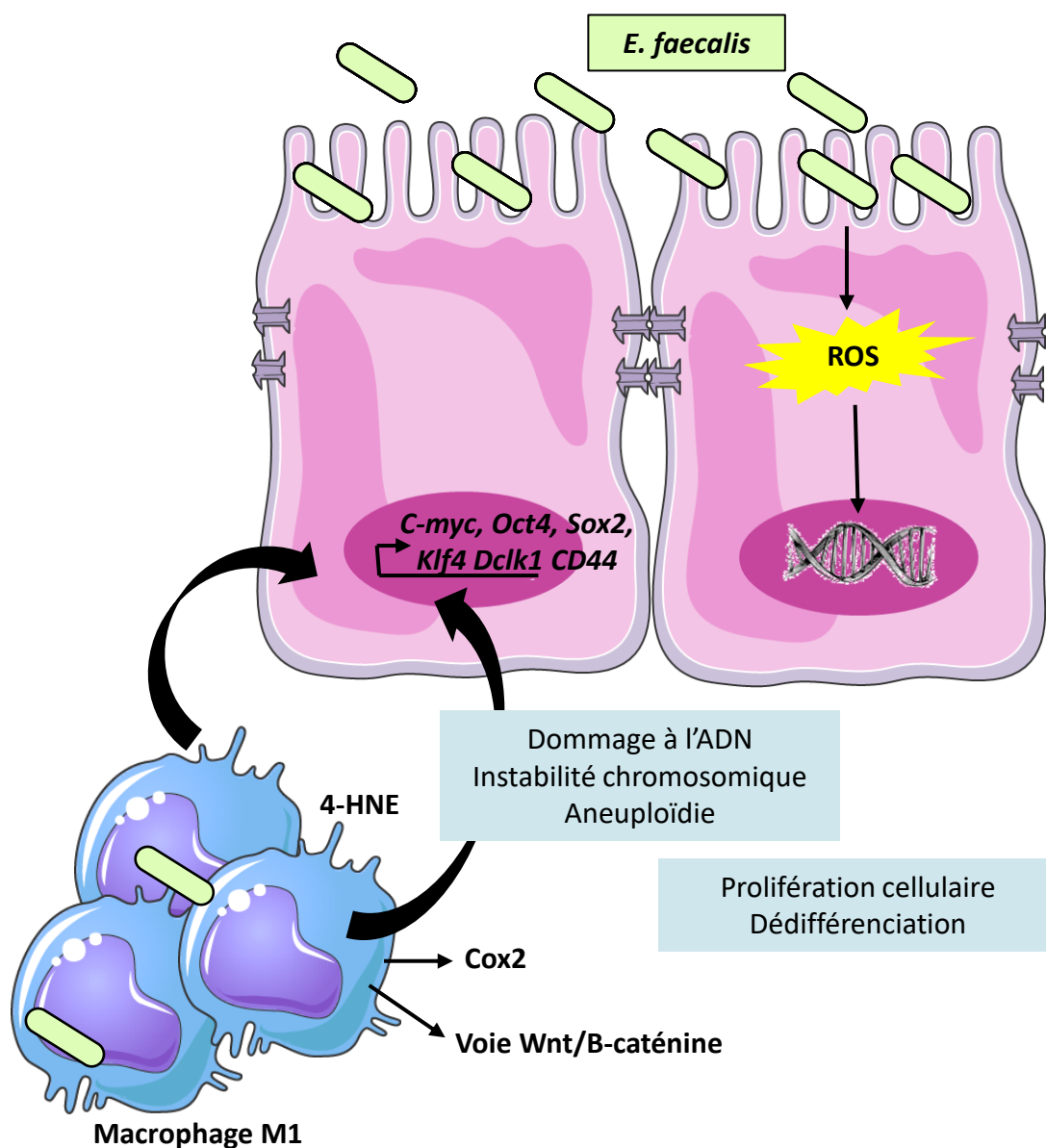


Figure 19 :Rôle pro-carcinogène d'*Enterococcus faecalis* dans le CCR.

Les bactéries appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis* sont capables d'induire des cassures doubles brin de l'ADN aux cellules épithéliales intestinales en produisant des ROS telles que des ion superoxydes O_2^- . Par ailleurs, les macrophages infectés par *E. faecalis* produisent une molécule réactive, le 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) *via* le médiateur inflammatoire Cox2 (*Cyclooxygenase-2*), induisent des cassures double brin de l'ADN par des effets non ciblés, conduisant à une instabilité génomique. Les macrophages de phénotype M1, infectés par *E. faecalis*, induisent l'activation de la voie Wnt/ β -caténine entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi que la dédifférenciation cellulaire liée à un accroissement des marqueurs de cellules souches.

les *E. faecalis* supprimeraient le développement tumoral en réduisant l'expression de c-Myc et Cyclin D1 au sein des polypes intestinaux (Miyamoto et al., 2017). Cependant, l'exposition des cellules épithéliales primaires aux macrophages infectés par la bactérie contribuerait au développement du CCR à travers l'instauration de mutations, d'une instabilité chromosomique et d'une dédifférenciation cellulaire (Wang et al., 2017b) (**Figure 19**).

Deux nouvelles études mettent en lumière le rôle complexe et ambigu de *E. faecalis* dans le cancer colorectal. La première suggère que la bactérie possède un rôle protecteur dans la carcinogenèse colique en améliorant la sévérité de l'inflammation intestinale des souris conventionnelles traitées au dextran sodium sulfate (Chung et al., 2019). L'étude *in vitro* révèle que son action serait due à sa capacité à inhiber le NLRP3 inflammasome des macrophages humain THP-1, à la suite d'une stimulation avec des bactéries commensales (Chung et al., 2019). En effet, son action sur les souris est inhibée lorsque ces dernières présentent une déficience du NLRP3 inflammasome (Chung et al., 2019). La seconde étude a regardé l'impact de différentes souches *E. faecalis*, isolées des fèces de patients atteints de CCR ou de sujets sains, sur la prolifération de diverses lignées cellulaires de CCR (De Almeida et al., 2019). Tout d'abord, les fèces des patients atteints de CCR présentent une diminution de l'abondance des *E. faecalis* comparativement aux patients sains. Les bactéries issues des donneurs atteints de CCR n'ont aucune incidence sur la prolifération des cellules issues de carcinome, alors que celles des donneurs sains inhibent la prolifération des cellules issues d'adénocarcinomes mais pas de carcinomes (De Almeida et al., 2019). Ainsi, ce résultat suggère que les *E. faecalis* auraient un impact minime sur la prolifération sur les cellules cancéreuses.

2.4.2. Peptostreptococcus anaerobius (*P. anaerobius*)

Les *P. anaerobius* sont des bactéries commensales résidentes de la cavité orale ainsi que dans le tractus digestif. Néanmoins, elles sont retrouvées enrichies dans les tissus CCR aussi bien à des stades adénomes que carcinomes (Nakatsu et al., 2015).

Une première étude révèle que les *P. anaerobius* sont capables de favoriser la formation d'une dysplasie colorectale chez des modèles murins traités à l'agent carcinogène, AOM (Tsoi et al., 2017). La prolifération des cellules infectées par ces bactéries serait soutenue par la biosynthèse de cholestérol, utilisée comme source d'énergie (Tsoi et al., 2017). Chez le modèle murin *Apc^{Min/+}*, les *P. anaerobius* accélèrent le développement tumoral, représenté par un nombre et un

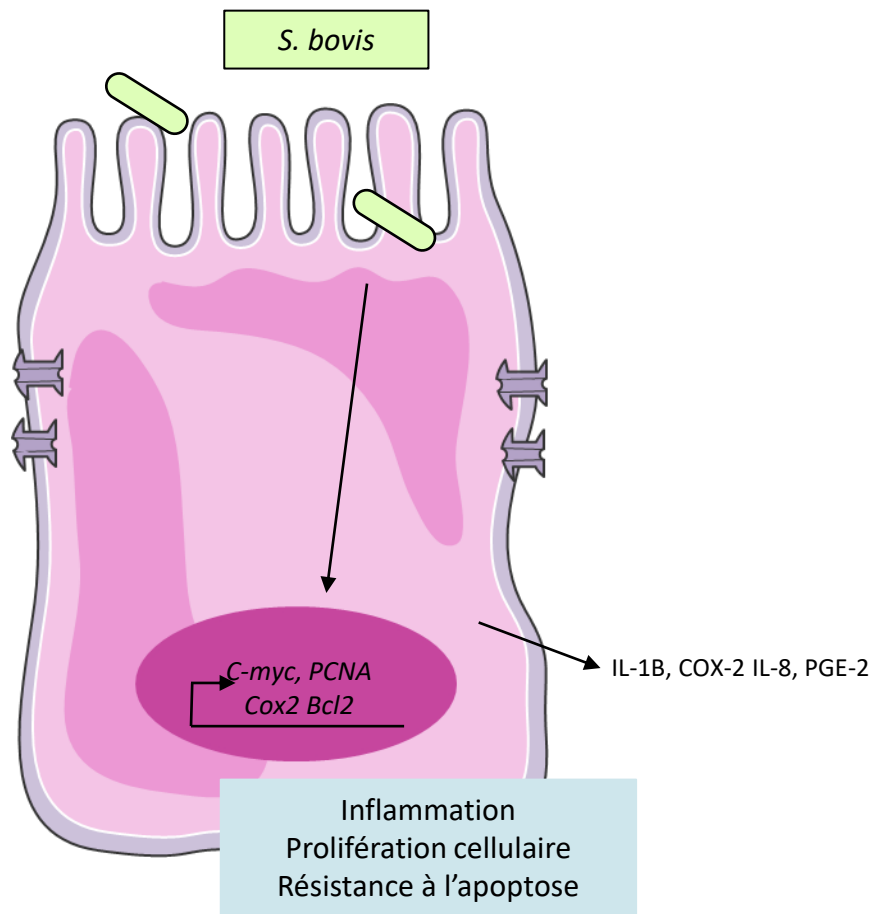


Figure 20 : Rôle pro-carcinogène de *S.bovis* dans le CCR.

Streptococcus bovis colonise la muqueuse des patients atteints de CCR. La participation de *S. bovis* au développement tumoral fait intervenir l'expression de cytokines pro-inflammatoire telles que l'IL-8, l'IL-1 β , PGE-2 et COX-2, des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), de l'oncogènes c-myc et du gène codant pour la protéine anti-apoptotique BCL-2. L'expression de ces facteurs pro-tumoraux pourrait contribuer à l'établissement d'un épithélium hyper-prolifératif.

volume tumoral augmentés (Long et al., 2019). Les mécanismes sous-jacents ont été décrits que très récemment. *In vitro*, les *P. anaerobius* adhèrent aux cellules cancéreuses grâce à sa protéine de surface, PCWBR2 (*Putative cell wall binding repeat 2*) qui interagit avec les récepteurs cellulaires α/β intégrines, surexprimés dans les tumeurs colorectales. Cette interaction induit l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT qui aboutit à une augmentation de la prolifération cellulaire, ainsi que l'activation de la voie NF- κ B. En retour, cette dernière favorise une réponse pro-inflammatoire. Pour finir, chez les souris *Apc^{Min/+}* infectées par les *P. anaerobius*, le micro-environnement tumoral est enrichi en MDSC, TAN qui sont généralement associés à l'inflammation chronique et à la progression tumorale (Long et al., 2019).

2.4.3. *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis*)

Les *S. bovis* représentent la principale cause d'une bactériémie chez les adultes. La colonisation du tube digestif par ces bactéries est fortement corrélée avec le développement du CCR (Aymeric et al., 2018; Little et al., 2019). Les recommandations américaines et européennes préconisent d'ailleurs la réalisation d'une coloscopie chez les patients présentant une bactériémie avec *S. bovis*.

En 2016, une large étude épidémiologique a pour la première fois montré une association significative entre l'exposition aux antigènes de *S. bovis* et le CCR. Elle a notamment souligné un risque accru de développer le CCR chez des sujets jeunes, de moins de 65 ans (Butt et al., 2016). La colonisation de *S. bovis* dans l'intestin des patients atteints de CCR se réalise à des temps très précoces, voire dès l'initiation lors des lésions tissulaires. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont depuis peu connus. Une première étude a montré le rôle de *S. bovis* dans la modulation du micro-environnement tumoral, expliqué dans le sous chapitre « L'altération du micro-environnement tumoral par les bactéries pro-carcinogènes ». Par exemple, l'infection par la bactérie chez des souris *Apc^{Min/+}* favorise la tumorigènes par le recrutement des MDSC. Une récente étude confirme l'association de *S. bovis* dans le CCR, puisque cette bactérie est détectée dans 15,9% des fèces et 36,4% des tissus cancéreux de patients Iraniens atteints de CCR, alors qu'elle n'est pas présente chez les sujets contrôles (Sheikh et al., 2020). Le mécanisme, par lequel *S.bovis* favorise la tumorigenèse colorectale, commence à être dévoilé. En effet, ce n'est que très récemment que l'importance de son système de sécrétion de type VII dans le CCR a été découverte. Une déficience dans ce système

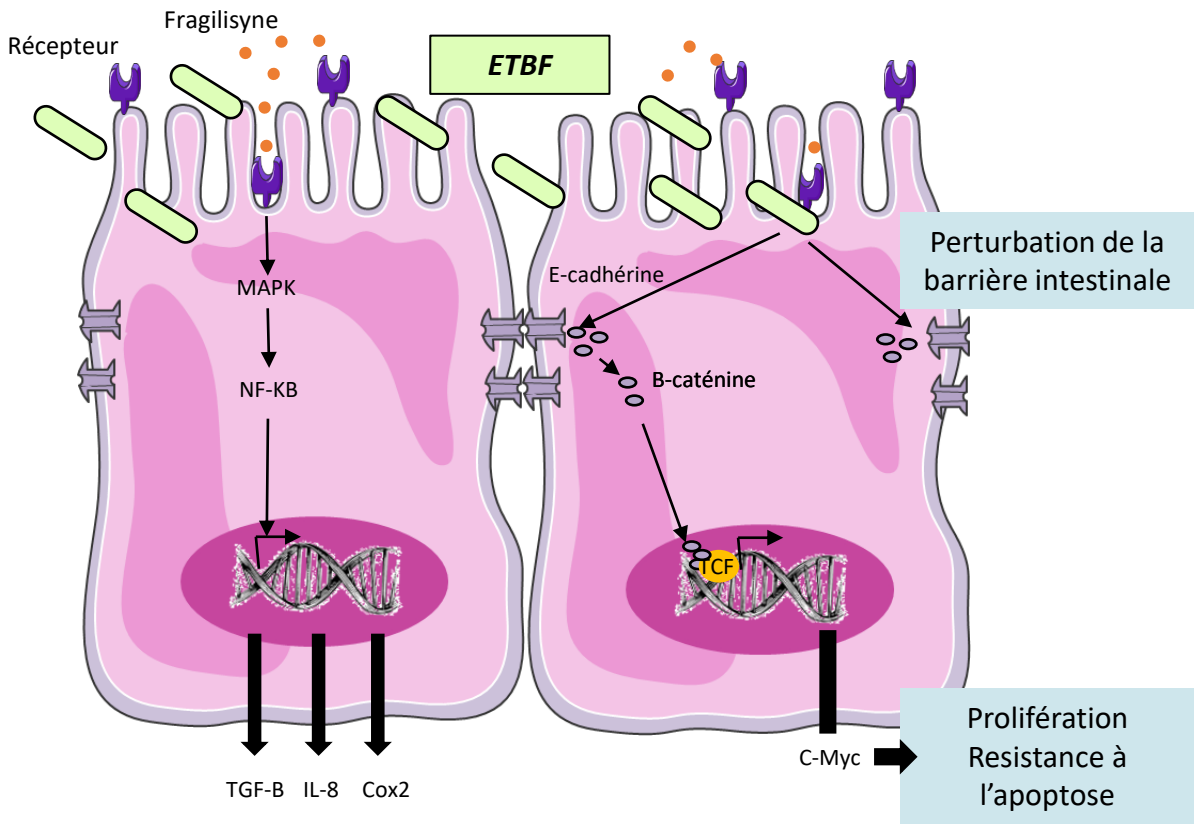


Figure 21 : Rôle pro-carcinogène de ETBF dans le CCR.

Les bactéries appartenant à l'espèce *Bacteroides fragilis* entérotoxigènes (ETBF) colonisent la muqueuse colique et sécrètent une toxine: la fragilysine. Sa fixation sur un récepteur spécifique présent au niveau des cellules épithéliales intestinales induit l'activation des voies de signalisation MAPK, NF-kB. La transduction du signal mène au clivage de l'E-cadhérine, à l'augmentation de l'expression de c-Myc, COX2 et aux cytokines et chimiokines telles qu'IL-8 et TGF-β. Le clivage de l'E-cadhérine initie une diminution de la fonction barrière qui potentiellement augmente l'exposition du système immunitaire aux antigènes de la bactérie. L'E-cadhérine conduit également à la libération de la B-caténine dans le cytoplasme qui transloque dans le noyau et active la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, comme *c-myc*. La sécrétion des chimiokines et cytokines par les cellules épithéliales intestinales favorise l'inflammation en réponse à ETBF.

empêche, tout d'abord, la bactérie d'adhérer aux cellules HT29 et abolit son habilité à stimuler la prolifération des cellules (Taylor et al., 2021). Ensuite, chez des souris conventionnelles, la déficience du système de sécrétion de type VII altère la capacité des bactéries à coloniser le tractus digestif. Pour finir, chez un modèle murin traité à l'AOM, *S. bovis* favorise le développement tumoral représenté par une augmentation du nombre de tumeurs en comparaison avec la bactérie mutante (Taylor et al., 2021) (**Figure 20**).

2.4.4. *Bacteroides fragilis enterotoxigenic* (ETBF)

Les ETBF sont des bactéries commensales qui colonisent le côlon. Certaines d'entre elles produisent une entérotoxine, appelée BTF (*B. fragilis toxin*) ou fragilisine. Cette toxine est la cause de diarrhée et de dommages à l'épithélium colique (Sears et al., 2008). Elle est également présumée être à l'origine d'une inflammation chronique et à l'initiation du CCR (Chung et al., 2018).

La BFT se lie à un récepteur inconnu à ce jour et entraîne le clivage de la partie extracellulaire de la protéine suppresseur de tumeur, l'E-cadhérine (Kharlampieva et al., 2015). Cela conduit à la perte de contact entre les cellules (Wu et al., 2007). En condition physiologique, le domaine intracellulaire de l'E-cadhérine est lié à la β -caténine. L'infection par les ETBF dissocie le complexe et la β -caténine agit alors comme un facteur de transcription, induisant la prolifération cellulaire à travers l'activation de la voie de signalisation c-Myc (Wong et al., 2018). L'E-cadhérine clivée active également la voie MAPK ainsi que NF- κ B (Ko et al., 2016). Cela favorise la sécrétion de l'IL-8, une chimiokine attirant les cellules polynucléaires, et COX2. En retour, ces dernières inhibent l'apoptose des cellules épithéliales intestinales (Ko et al., 2016). Enfin, la BFT peut également affecter l'expression génique et entraîner des changements épigénétiques *in vitro* (Allen et al., 2019) (**Figure 21**).

In vivo, les ETBF induisent une colite aiguë et persistante qui progressivement se transforme en hyperplasie chez des modèles murins dépourvus de pathogènes (Rhee et al., 2009; Wick et al., 2014). Une augmentation de l'IL-17, des dommages à l'ADN, ainsi que du nombre de tumeurs est observée chez des modèles murins de CCR à la suite d'une infection par ces bactéries (Chung et al., 2018; Wu et al., 2009). Pour aller plus loin, une récente étude montre que les ETBF sont capables de moduler l'expression des microARNs. En effet, l'infection par cette bactérie entraîne la méthylation du microARN, miR-149-3p, inhibant son expression. Ceci

a pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire des cellules issues de CCR ainsi que la tumorigenèse colique dans un modèle murin de CCR associé à une colite (Cao et al., 2021b). Ce microARN est transporté dans les exosomes des cellules cancéreuses pour agir à distance et éventuellement moduler la réponse Th17, observée lors de l'infection. Étonnamment, le niveau plasmatique de miR-149-3p diminue graduellement des patients sains jusqu'aux patients atteints de MICI et de CCR (Cao et al., 2021b). Il est également négativement corrélé avec l'abondance des ETBF chez les patients atteints de CCR (Cao et al., 2021b).

Chez 38% des patients atteints de CCR, une prévalence accrue de ETBF est retrouvée comparativement aux patients contrôles avec seulement 12% d'entre eux (Toprak et al., 2006). Le gène *bft* est préférentiellement associé à des CCR de stades tardifs (III/IV) mais aussi à des stades plus précoces : adénomes, lésions séreuses et dysplasies de bas grade (Haghi et al., 2019; Purcell et al., 2017). Cette bactérie est retrouvée chez des patients atteints de CCR mais également chez des individus qui ne présentent aucune histoire personnelle ou familiale avec le CCR (Zamani et al., 2019). Ce résultat suggère que l'exposition à ETBF est commune, qu'elle pourrait être un facteur de risque et potentiellement utilisée comme un marqueur prédictif de la survenue du CCR. Dans ce sens, une récente étude s'est intéressée à l'association de ETBF et *E.coli* comme facteur de diagnostic. Les immunoglobulines A et G dirigées contre ses deux bactéries ont été extraites à partir du sérum de patients atteints de CCR et de sujets sains. Ce marqueur est associé avec le développement du CCR, puisque sa présence est corrélée avec, au minima, 1,7 % de risque en plus de développer la maladie (Butt et al., 2021).

2.4.5. *Fusobacterium nucleatum*

Les *Fusobacterium nucleatum* sont des composants importants du microbiote oral qui sont attachés à des maladies orales et extra-orales comme la carcinogenèse colique. L'abondance de *F.nucleatum* est en lien direct avec un taux de survie amoindri pour les patients atteints de CCR et l'apparition de métastases au sein des ganglions mésentériques, ce qui en fait un potentiel biomarqueur (Castellarin et al., 2012; Mima et al., 2016).

Les *F.nucleatum* participent au processus carcinogénique à travers deux facteurs de virulence : la protéine d'adhésion FadA et la protéine autotransportrice Fap2. Cette dernière joue un rôle important dans l'enrichissement de la bactérie au sein du CCR, par sa liaison au D-galactose-

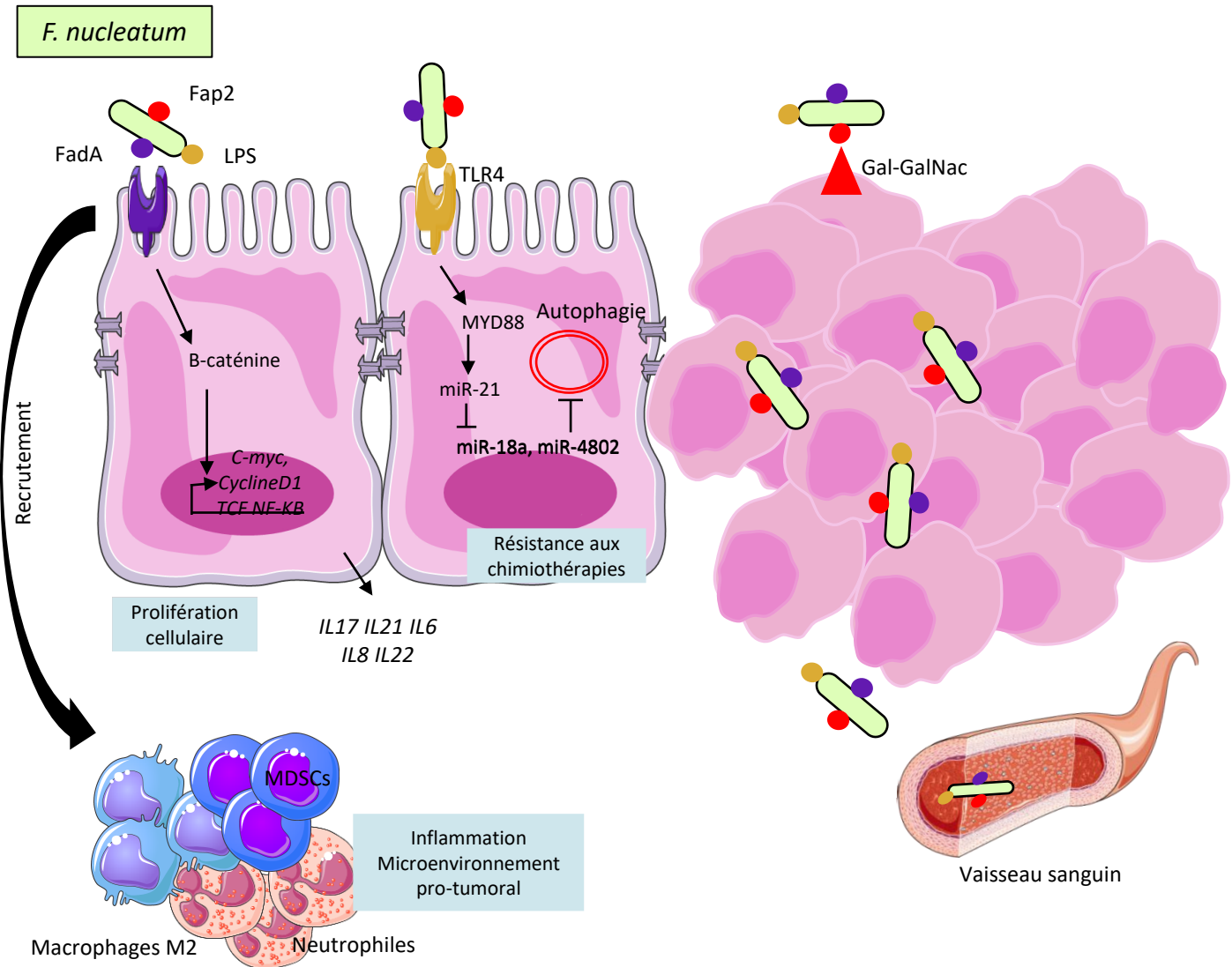


Figure 22 : Rôle pro-carcinogène *F. nucleatum* dans le CCR.

Les souches de *F. nucleatum* se lient aux cellules épithéliales intestinales au niveau de leur adhésine FadA. Cette interaction entraîne l'activation de la voie Wnt-B-caténine et par conséquent la transcription des gènes cibles, aboutissant à une augmentation de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'infection par *F. nucleatum* entraîne l'infiltration de macrophages de type M2, de neutrophiles et de cellules myéloïdes immunosuppressives au sein des tumeurs ainsi que la sécrétion de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, installant un micro-environnement propice au développement du CCR. L'activation de la voie TLR4/MYD88/NF-kB inhibe les microRNA 18a et 4802 ciblant des gènes de l'autophagie. L'autophagie ainsi activée favorise la résistance aux chimiothérapies. Pour terminer, les Gal-GalNAC situés sur les cellules tumorales sont des récepteurs de Fap2 favorisant le recrutement de *F. nucleatum* au sein des tumeurs.

$\beta(1-3)$ -N-acetyl-D-galactosamine (Gal-GalNAc), surexprimé chez les patients (Abed et al., 2016). FadA permet l'attachement et l'invasion de la bactérie aux cellules exprimant E-cadhérine et induit la prolifération cellulaire par l'activation de la β -caténine (Rubinstein et al., 2013). Une autre fonction de FadA est de provoquer une augmentation de la perméabilité cellulaire par la suppression des jonctions cellulaires, qui permet aux bactéries de transloquer au niveau de l'épithélium colique, ainsi que dans la circulation systémique (Fardini et al., 2011). De plus, FadA favoriserait la formation de dommages à l'ADN chez les souris *Ap^c^{Min/+}* infectées par les *F.nucleatum*. En effet, chez les souris infectées par les bactéries *FadA^{-/-}*, le nombre ainsi que le volume tumoral sont réduits chez ce modèle murin de CCR (Guo et al., 2020b). L'invasion de *F.nucleatum* favorise également une réponse pro-inflammatoire *via* l'activation de la voie MAPK et NF- κ B et conduit à la production d'espèces oxygénées réactives (Tang et al., 2016). Ces deux processus sont reconnus pour participer activement à la tumorigenèse colorectale (Landskron et al., 2014) (**Figure 22**).

Les *F.nucleatum* sont associées avec les CCR de phénotype MSI - high et CIMP, ce qui laisse penser que ces bactéries sont impliquées spécifiquement dans certains sous-types moléculaires du CCR (Lee et al., 2021). Les tumeurs qui possèdent une forte abondance de *F.nucleatum* sont plus invasives et présentent une concentration intra-tumorale plus importante en macrophage de phénotype M2 (Lee et al., 2021).

Une étude a mis en évidence une concentration augmentée en *F. nucleatum* au sein de tissus coliques chez les patients en récurrence. La récurrence pourrait résulter d'une résistance aux chimiothérapies induite par les *F.nucleatum* (Yu et al., 2017). De façon intéressante, *F. nucleatum* entraîne une chimiorésistance *via* l'activation du processus autophagique au sein des cellules cancéreuses (Yu et al., 2017). Le processus autophagique peut lui aussi affecter le CCR comme décrit dans la suite de ce manuscrit.

Les récentes études se sont d'abord intéressées au rôle de *F.nucleatum* dans la formation de métastases dans le cadre du CCR. Tout d'abord, la bactérie favoriserait la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses préalablement traitées au dextran sodium sulfate pouvant expliquer le phénotype observé chez le modèle murin de CCR associé aux colites (Yu et al., 2020b). En effet, l'infection par *F.nucleatum* entraîne une aggravation de la maladie chez des souris traitées au dextran sodium sulfate, laissant suggérer que les *F.nucleatum* pourraient

être impliqués dans la formation de métastases (Yu et al., 2020b). Chez les patients atteints de CCR, l'abondance de cette bactérie dans les fèces est d'ailleurs mise en évidence chez les patients présentant des métastases dans les ganglions mésentériques comparativement aux patients avec un cancer non métastasé (Chen et al., 2020b). Les études mécanistiques qui en découlent impliquent l'activation de la voie de signalisation NF- κ B. Cette dernière favorise aussi bien la migration des cellules du CCR *in vitro* que la formation de métastases *in vivo* (Chen et al., 2020b). Enfin, les *F.nucleatum* sont associés avec une densité significativement plus faible de LT CD8⁺ et une densité plus élevée en MDSC dans les tissus métastatiques du foie, chez des patients atteints de CCR au regard de ceux qui ne sont pas colonisés par la bactérie (Sakamoto et al., 2021).

Pour terminer, deux études se sont intéressées à l'utilisation des *F.nucleatum* comme possible marqueur dans le diagnostic et le pronostic du CCR. Concernant le diagnostic, les immunoglobulines A et G dirigés contre *F. nucleatum* dans le sérum sont détectés chez 86,7% des patients de CCR et 73,1% des patients présentant des lésions précancéreuses (Kurt and Yumuk, 2021). Enfin, une méta-analyse regroupant au total 3626 patients CCR a montré que les *F.nucleatum* sont associés avec un mauvais pronostic, puisque la survie globale ainsi que la survie sans récurrence sont limitées par rapport aux patients non colonisés par cette bactérie (Huangfu et al., 2021).

2.4.6. Escherichia coli

Les *E. coli* sont des bactéries qui colonisent le tube digestif des nouveau-nés, dès les premières heures après la naissance et entretiennent une relation de symbiose avec leur hôte. Néanmoins, certaines souches d'*E. coli* ont acquis des propriétés pathogéniques qui leur permettent de coloniser le tube digestif et de favoriser la survenue de pathologies intestinales.

Les souches d'*E. coli* sont divisées en 5 groupes phylogénétiques principaux selon leurs polymorphismes électrophorétiques d'enzymes métaboliques : A, B1, B2, D et E. Les souches commensales appartiennent dans la plupart des cas aux groupes A et B1, alors que les souches pathogènes appartiennent le plus souvent aux groupes B2 et D (Escobar-Páramo et al., 2004).

Plusieurs études ont mis en évidence que la muqueuse colique et les tumeurs de patients atteints de CCR sont anormalement colonisées par les souches d'*E. coli* de type B2 (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013; Maddocks et al., 2009; Martin et al., 2004; Prorok-Hamon et al., 2014;

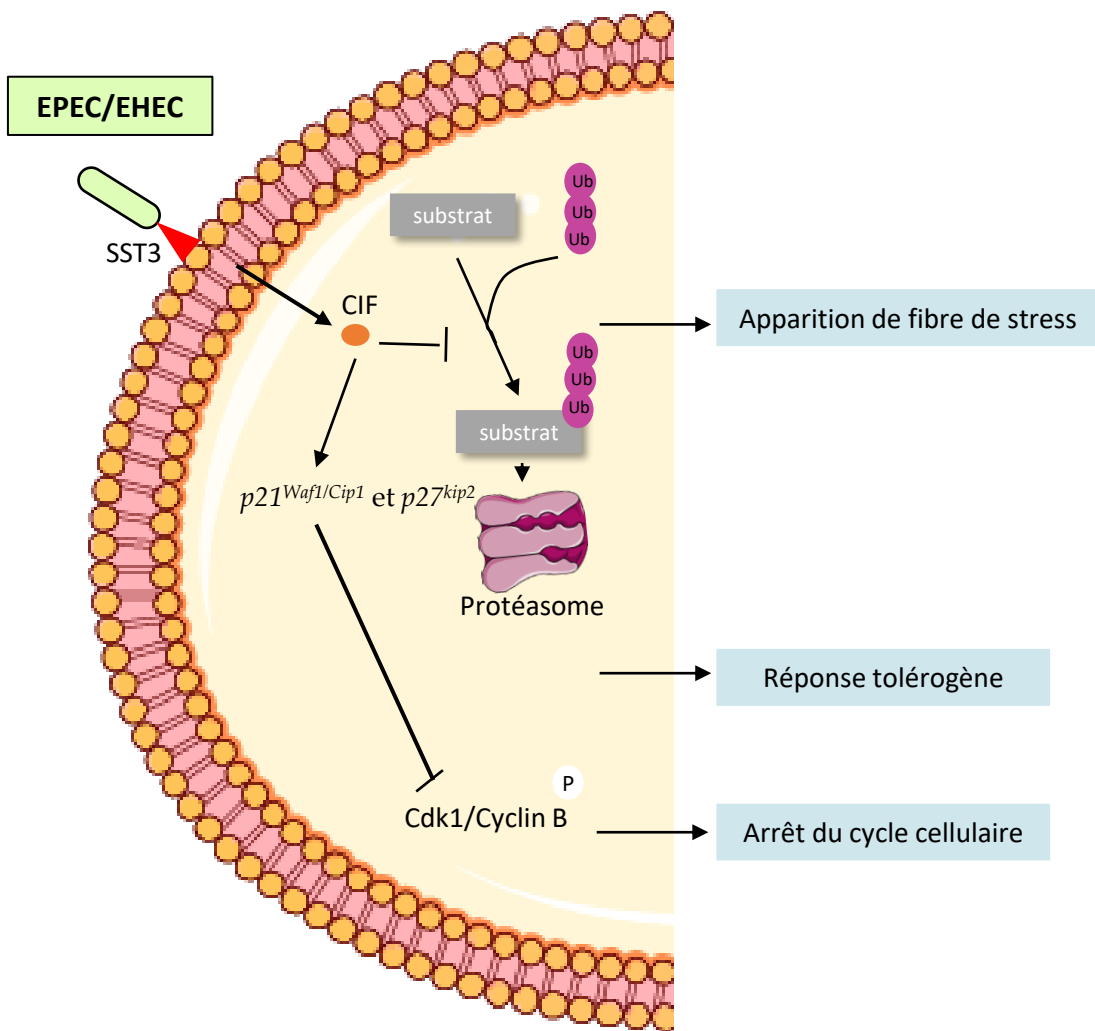


Figure 23 : Mécanisme d'action de la cyclomoduline CIF.

Après l'injection de CIF par le système de sécrétion de type 3 (SST3), la toxine inhibe la voie ubiquitine/protéasome. L'accumulation des substrats non dégradés conduit à la formation progressive de fibres de stress, d'adhérences focales et un élargissement cellulaire ayant pour conséquence une altération de la prolifération cellulaire avec l'absence complète de mitose. CIF a, par ailleurs, la capacité de moduler le système immunitaire en faveur d'une réponse toléroène qui pourrait faciliter la dissémination du pathogène. De plus, l'infection de la toxine au sein de la cellule entraîne l'inhibition de la phosphorylation du complexe CDK1-Cyclin D1, induisant le blocage du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M selon le stade du cycle au moment de l'infection ainsi qu'une accumulation de deux inhibiteurs des CDK, $p21^{Waf1/Cip1}$ et $p27^{kip2}$

Swidsinski et al., 1998). Une augmentation du nombre d'*E. coli* associés aux tumeurs et internalisés dans les tumeurs a été soulignée chez les patients atteints de CCR comparativement au nombre d'*E. coli* associés à la muqueuse saine chez les mêmes patients ou chez les patients contrôles (Bonnet et al., 2014).

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

- Cell cycle-inhibiting factor (CIF)

La toxine CIF est présente chez moins de 2% des *E. coli* et a été mise en évidence pour la première fois en 1997 (De Rycke et al., 1997). Elle est composée de deux domaines distincts : un domaine N-terminal qui porte un peptide d'adressage au SSTIII (*Système de sécrétion de type III*), qui lui permet d'être injectée dans la cellule, et un domaine C-terminal qui porte l'activité enzymatique de la toxine (Taieb et al., 2011). Ces effets sont caractérisés par la formation progressive de fibre de stress, d'adhérences focales et un élargissement cellulaire ayant pour conséquence une altération de la prolifération cellulaire avec l'absence complète de mitose (Taieb et al., 2011).

Après injection de CIF par le SSTIII, la toxine inactive l'enzyme E2 du système d'ubiquitination, en désaminant la glutamine située en position 40, ce qui inhibe la voie ubiquitine/protéasome. L'injection de la toxine au sein de la cellule entraîne l'inhibition de la phosphorylation du complexe CDK1-CYCLIN B, qui entraîne le blocage du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M selon le stade du cycle au moment de l'infection ainsi qu'une accumulation de deux inhibiteurs des CDK, *p21^{Waf1/Cip1}* et *p27^{kip2}* (Taieb et al., 2011). Certaines études ont mis en évidence la capacité de CIF à moduler le système immunitaire en faveur d'une réponse tolérogène qui pourrait faciliter la dissémination du pathogène (Taieb et al., 2011) (**Figure 23**). La CIF, dans les cellules épithéliales intestinales, bloque également l'activité bactéricide de la Perforine-1, en désaminant la protéine ubiquitine NEDD8 (*Neuronal precursor*

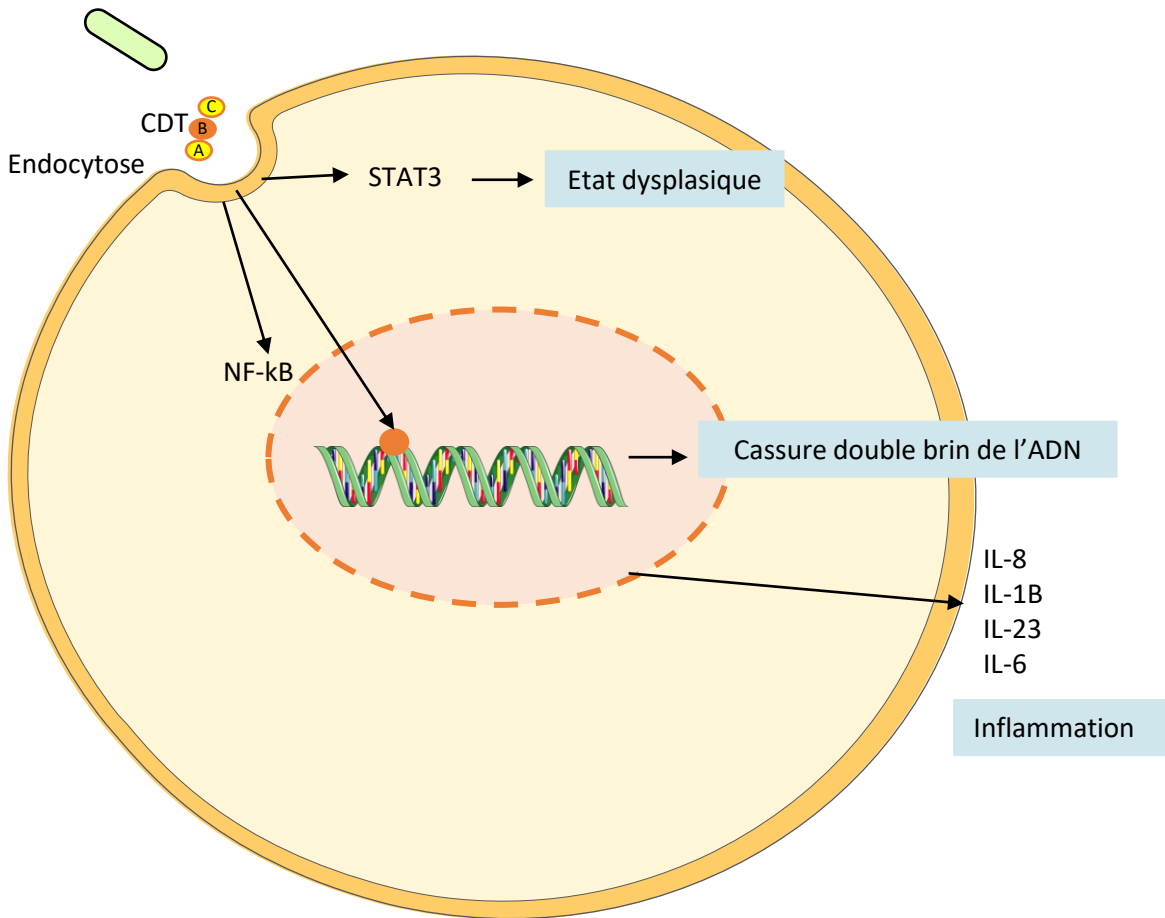


Figure 24 : Mécanisme d'action de la cyclomoduline CDT.

La sous-unité CDT-B de la CDT est internalisée par endocytose et transportée vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique puis transloquée dans le noyau. Cette cyclomoduline provoque des cassures simples brin de l'ADN qui sont converties en cassures doubles brin lors d'un bref arrêt du cycle cellulaire afin d'être réparées. La CDT induit également l'activation de la voie NF-kB et STAT3 responsables respectivement de la mise en place d'un état pro-inflammatoire et dysplasique. Enfin, une exposition chronique à la toxine induit des aberrations chromosomiques ayant pour conséquence une augmentation de la fréquence de mutation.

cell-expressed protein 8) nécessaire à la bonne fonction de la Perforine-1 (McCormack et al., 2015). La déamination de NEDD8 amène également à l'inhibition d'une E3 ligase (CLR : *Cullin E3 ubiquitin ligases*) ayant pour conséquence, un arrêt du cycle cellulaire (McCormack et al., 2015). Cette toxine exerce également son effet à travers l'induction de la voie ERK/MAPK qui en retour augmente l'activité basale de NF- κ B (Ng et al., 2018). L'activation de la voie ERK dépend également de l'activité désaminase de CIF (Ng et al., 2017). En plus d'activer la voie NF- κ B, ERK favorise la phosphorylation et donc l'activation de la protéine anti-apoptotique Bim permettant la survie des cellules infectées (Ng et al., 2017).

- Cytotoxic distending toxin (CDT)

La toxine CDT est identifiée pour la première fois en 1988 à partir des souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de diarrhée (Johnson and Lior, 1988). Bien que la CDT soit associée avec différentes maladies, son implication dans l'inflammation et le cancer est supportée par des études *in vitro* et *in vivo*. Les *E. coli* producteurs de la CDT sont détectés chez 15,8% des patients atteints de CCR (Buc et al., 2013). La CDT est retrouvée chez plusieurs espèces Gram négatives et est composée de trois sous-unités distinctes codées par un opéron, CDT-A, CDT-B et CDT-C (Jinadasa et al., 2011). Les sous-unités A et C constituent les éléments régulateurs, alors que la B est la sous-unité catalytique caractérisée par une activité phosphatase et DNase, responsable de la formation de cassure à l'ADN (Guerra et al., 2011). La CDT n'induit pas directement des cassures double-brin de l'ADN (DSB : *double-strand breaks*) mais des cassures simple-brin (SSB : *single-strand breaks*) qui sont converties en DSB durant la phase S, dû à l'inhibition de la fourche de réplication ainsi qu'au stress répliatif (Fedor et al., 2013). Les cellules subissent alors un bref arrêt du cycle cellulaire durant laquelle les dommages peuvent être réparés (Jinadasa et al., 2011). Si le processus échoue, la cellule meurt par l'apoptose ou la senescence suivant l'état d'activation de la protéine MAPK, p38. La présence des dommages à l'ADN stimule la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui a pour conséquence la mise en place d'une réponse inflammatoire. La CDT influence le processus inflammatoire par la production de cytokines pro-inflammatoires (Péré-Védrenne et al., 2016). Cependant, la CDT possède également des propriétés anti-inflammatoires, amenant à une diminution de la phagocytose au sein des macrophages, permettant aux bactéries de mieux coloniser l'hôte (Pons et al., 2019) (**Figure 24**). Les bactéries productrices de la CDT induisent un état dysplasique ainsi que la carcinogénèse colique chez des modèles murins *Rag2^{-/-}/Il10^{-/-}*, par l'augmentation de DSB et

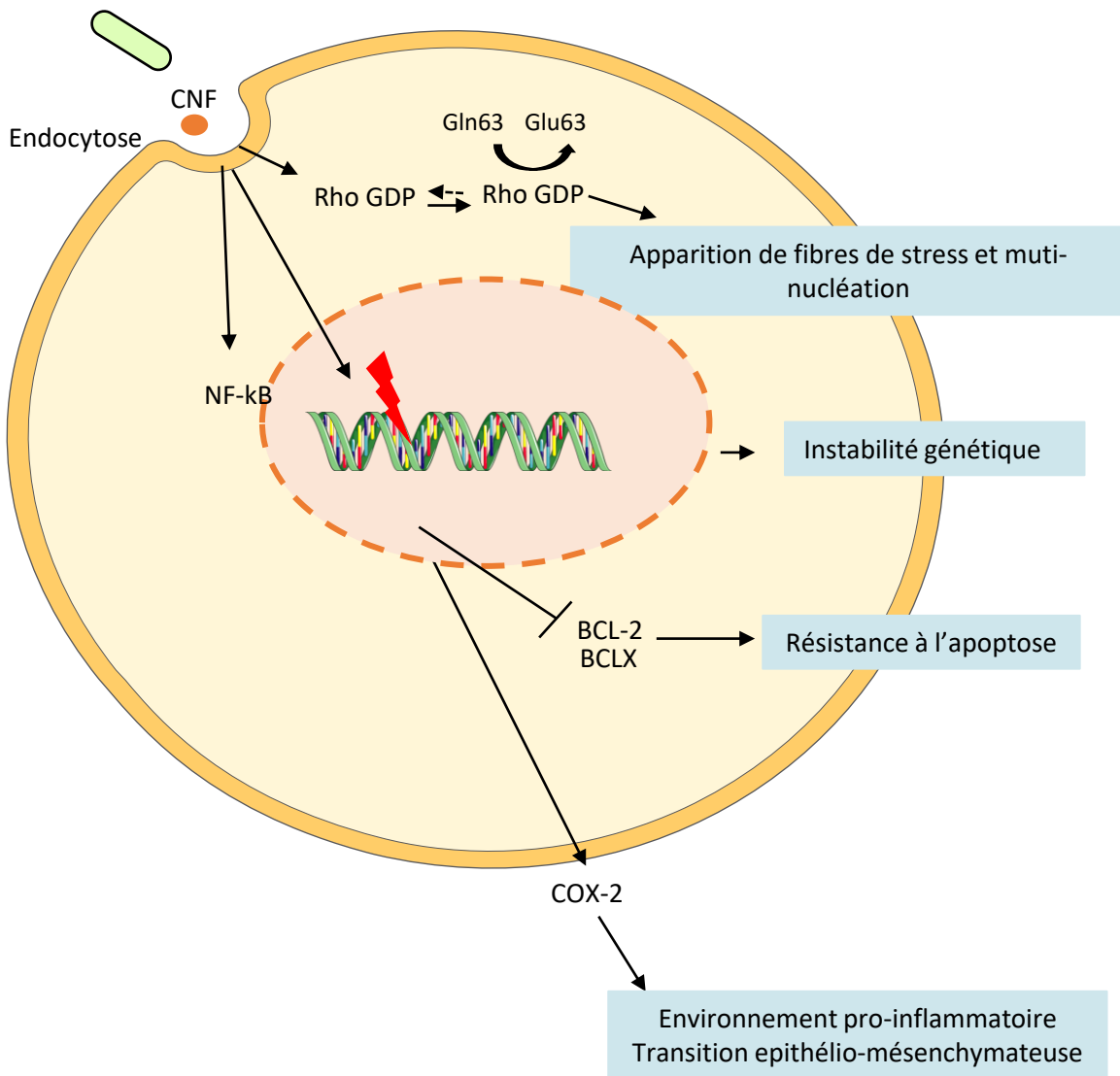


Figure 25 : Mécanisme d'action de la cyclomoduline CNF.

Après endocytose, les CNF exercent une activité transglutaminase et catalyse la désamination des protéines de la famille Rho GTPases sur la glutamine en position 63. Le blocage de l'hydrolyse de GTP entraîne l'activation des GTPases de façon constitutive et contribue à la progression du cycle cellulaire en interagissant avec des effecteurs protéiques spécifiques. Ainsi, la CNF favorise la transition G1/S en affectant la production de cyclin D1. De plus, CNF entraîne un contournement du point de contrôle en phase G1 qui induit des altérations au niveau du fuseau mitotique et de la ségrégation des chromosomes, pouvant ainsi générer des aberrations chromosomiques telles que des aneuploidies, signe d'une instabilité génétique ou endo-réplication pouvant conduire à la transformation cellulaire. Les CNF ont des propriétés anti-apoptotiques par leur capacité à activer la voie NF-κB, ayant pour conséquence une surexpression des protéines pro-apoptotiques BCL-2 et BCLX. L'activation de la voie de signalisation NF-κB active, par ailleurs, le médiateur pro-inflammatoire COX-2 qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse.

l'activation de STAT3 (Ge et al., 2017, 2019). Bien que la CDT possède des propriétés carcinogènes, cela peut être sous certaines conditions, comme une susceptibilité accrue au CCR.

- Cytotoxic Necrotizing factor 1 (CNF1)

La CNF1 est retrouvée enrichie dans la muqueuse de patients atteints de MICI, ainsi que dans la muqueuse de patients atteints de CCR comparativement aux patients contrôles (Buc et al., 2013; Darfeuille-Michaud et al., 2004).

La CNF1 active de façon permanente la famille des protéines Rho GTPases : Rho, Rac et Cdc42 (Fiorentini et al., 1997). Ces protéines régulent l'organisation du cytosquelette *via* son action sur l'actine et sont impliquées dans la régulation de la transcription, la migration, la polarité et le cycle cellulaire (Hall, 1998; Hodge and Ridley, 2016).

L'activation des Rho GTPases par la CNF1 induit des événements cellulaires qui sont dépendants de l'actine comme une augmentation de la mobilité cellulaire et une multinucléation (Fiorentini et al., 1988). Le CNF1 est qualifiée de cyclomoduline du fait de sa capacité à perturber le cycle cellulaire (Nougayrède et al., 2005). En effet, la CNF1 arrête la progression cellulaire en phase G2/M, stimule la synthèse de l'ADN et favorise la transition des cellules quiescentes en cellules prolifératives (Falzano et al., 2006). Une étude plus récente montre qu'un traitement avec la CNF1 bloque la mitose et permet une endoréplication avec la formation d'une polyploïdisation *in vitro* amenant les cellules à rentrer en sénescence réversible (Zhang et al., 2018c). Ceci augmente l'incidence d'une aneuploïdie qui est un signe d'une instabilité génomique (Zhang et al., 2018c). Le CNF1 agit également sur l'activation de la voie NF- κ B, protège de l'apoptose et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Boyer et al., 2004; Thomas et al., 2001). Pour finir, le CNF1 joue un rôle dans la transition epithelio-mésenchymateuse (Fabbri et al., 2020). Cependant, l'habilité de CNF1 à favoriser la carcinogenèse colique dépend largement de l'inflammation, permettant d'induire la transition epithelio-mésenchymateuse (Fabbri et al., 2020) (**Figure 25**).

- Colibactine

La colibactine est une génotoxine identifiée en 2006 (Nougayrède et al., 2006). Les *E. coli* producteurs de la colibactine (CoPEC : *Colibactin-producing E. coli*) proviennent de bactéries

commensales du tube digestif, de maladies infectieuses comme les septicémies, des méningites du nourrisson, des infections urinaires et des tissus issus du CCR. Bien que les CoPEC paraissent être originaires du phylogroupe B2, une récente étude a montré qu'ils pourraient être plus largement distribués au sein de la population des *E. coli* (Auvray et al., 2021).

Les CoPEC sont retrouvés communément chez les patients atteints de CCR (55-67%) en comparaison avec les sujets contrôles (18-21%) (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013). Une récente étude a montré une prévalence accentuée des gènes nécessaires pour la synthèse de la colibactine dans les tumeurs coliques plutôt que dans la circulation systémique des patients, suggérant que les CoPEC sont des bactéries associées aux tissus cancérogènes (Dohlman et al., 2021). Les CoPEC joueraient potentiellement un rôle dans l'agressivité tumorale puisque leur colonisation au sein de la muqueuse intestinale est dépendante de l'avancée de la maladie. Elle est augmentée chez les patients présentant un stade avancé, III ou IV du CCR par rapport à ceux de stade plus précoce, stade I (Bonnet et al., 2014).

La colibactine est synthétisée par un îlot génomique *pks*, qui regroupe 19 gènes codants pour des peptides synthétases non ribosomiques et polykétides synthétases (NRPS-PKS : *Non-ribosomal peptide synthetases-polyketide synthases*) qui sont les enzymes responsables de la biosynthèse de la toxine (Faïs et al., 2018). Bien que l'îlot *pks* soit identifié chez les *E. coli*, d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* le possède, comme *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Citrobacter koseri*. Cependant, ce n'est que très récemment que la structure de la colibactine a été découverte. (Wernke et al., 2020).

Les métabolites dérivés de CoPEC ou provenant du régime alimentaire de l'hôte altèrent la transcription des gènes *clb*. La spermidine, une polyamine produite lors du métabolisme bactérien est nécessaire pour la production de la colibactine (Chagneau et al., 2019). L'administration d'oligosaccharide tel que le glucose favorise la transcription de *clbA* et l'activité génotoxique de CoPEC (Oliero et al., 2021). *A contrario*, des facteurs inhibiteurs peuvent atténuer les métabolites favorisant la transcription de l'opéron *pks*, comme c'est le cas pour le sulfate ferreux (Oliero et al., 2021). Ceci insinue que la régulation de la production de colibactine est liée aux conditions métaboliques présentes dans la lumière du tube digestif.

La colibactine joue un rôle potentiel dans la carcinogénèse colique par l'induction de cassures double-brin de l'ADN dans les cellules eucaryotiques, d'une instabilité chromosomique à

travers la production de ROS et d'un arrêt du cycle cellulaire (Cuevas-Ramos et al., 2010; Gagnière et al., 2017; Nougayrède et al., 2006). L'activité pro-carcinogène des CoPEC a été étudiée dans différents modèles murins de CCR comme le modèle *Apc^{Min/+}*, le modèle *il10^{-/-}* traité à l'argent carcinogène AOM, le modèle traité à l'AOM et au dextran sodium sulfate et le modèle *Apc^{Min/+}/il10^{-/-}* (Arthur et al., 2012; Bonnet et al., 2014; Cougnoux et al., 2014; Tomkovich et al., 2019).

Les données actuelles démontrent que la colibactine alkyle l'ADN *via* un cycle de cyclopropane conjugué à une imine α , β -insaturée amenant à la formation d'adduit adénine-colibactine et la création de ponts inter brin de l'ADN. Ces derniers sont résolus en cassures double-brin durant la phase de réparation à l'ADN (Wilson et al., 2019; Xue et al., 2019). En plus des dommages à l'ADN, CoPEC contribue à l'apparition d'un stress oxydant, ce qui a pour conséquence une diminution de l'expression des protéines de réparation de l'ADN, MLH1 (*mutL homolog 1*) et MSH2 (*mutL homolog 2*), qui pourrait favoriser ainsi l'instabilité génomique (Gagnière et al., 2017). Il convient de souligner que des preuves solides en lien avec l'étiologie montrent que la colibactine pourrait jouer un rôle dans les premières étapes du CCR (Dziubańska-Kusibab et al., 2020; Iftekhar et al., 2021; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020). Une première étude révèle que les cassures double-brin de l'ADN sont enrichies en séquences hexamériques riches en AT. Ce locus correspondant à la cassure est un site à fort pouvoir mutationnel, identifié dans plusieurs cancers (Dziubańska-Kusibab et al., 2020; Lee-Six et al., 2019). Une infection par des CoPEC de courte durée permettrait aux organoïdes, issues de cellules épithéliales coliques humaines, d'avoir les mêmes caractéristiques que les cellules cancéreuses (augmentation de la prolifération, perturbation de la différenciation, plusieurs mutations dans les gènes relatifs à la voie de signalisation p53) (Iftekhar et al., 2021). Une signature mutationnelle est d'ailleurs observée dans les tumeurs et les métastases de patients atteints de CCR, exposés aux CoPEC (Pleguezuelos-Manzano et al., 2020). Les signatures mutationnelles causées par les CoPEC sont qualifiées pour 2,4% d'entre elles comme des mutations activatrices du CCR, avec 5,4% des mutations retrouvées dans le gène *APC*.

En plus de ces effets génotoxiques, l'infection par les CoPEC induit la senescence des cellules épithéliales qui est accompagnée par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et des facteurs de croissance, ayant pour conséquence la prolifération des cellules environnantes non infectées (Cougnoux et al., 2014). Le rôle pro-carcinogène des CoPEC a été seulement étudié

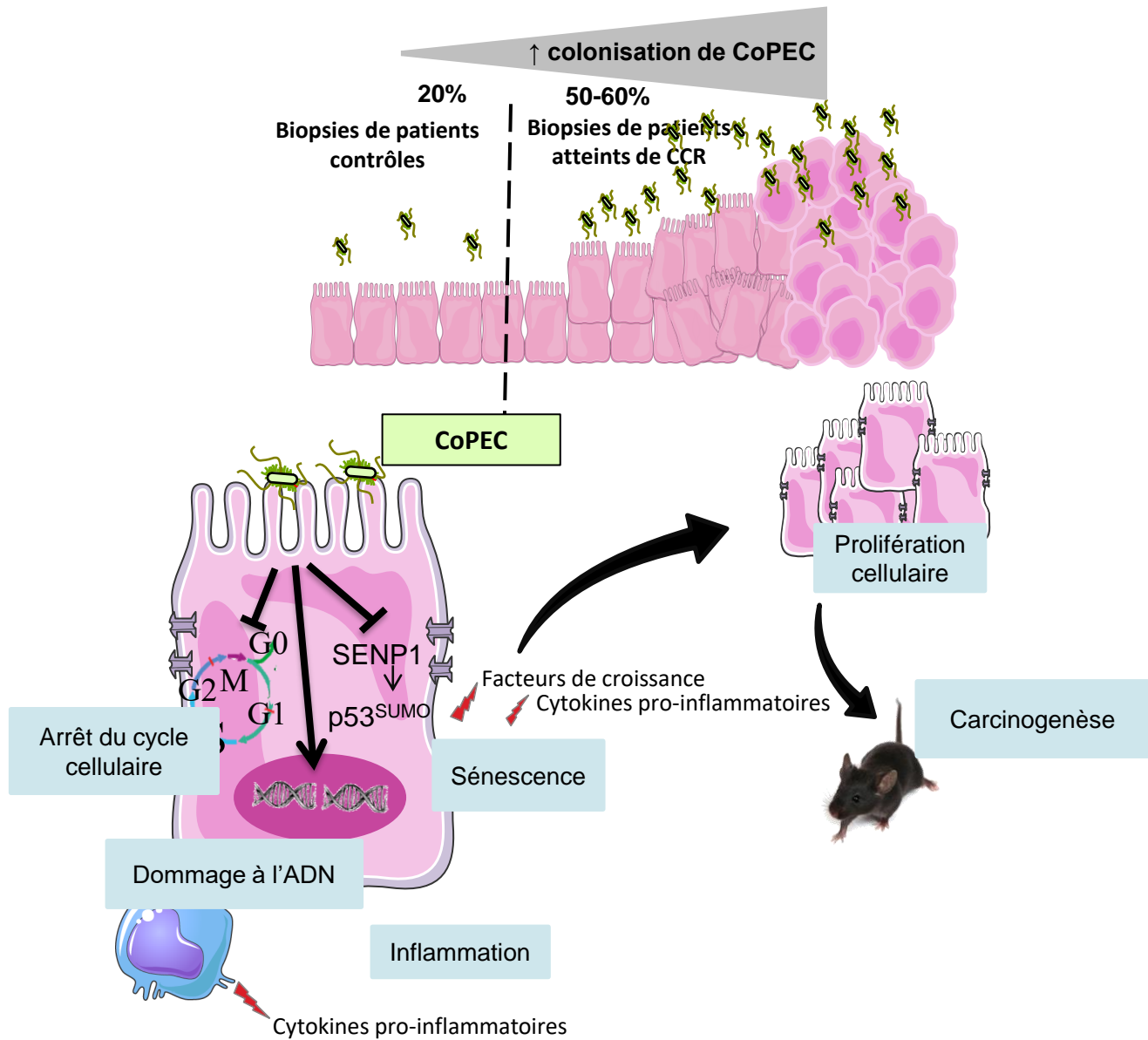


Figure 26 : Mécanismes d'action de la colibactine.

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

dans le cadre du CCR. Les mécanismes décrits ci-dessus, comme les effets à distance des médiateurs depuis le site d'infection, pourraient laisser penser qu'ils favoriseraient potentiellement la survenue d'autres types de cancer (**Figure 26**).

Les CoPEC pourraient être utilisés comme un marqueur de diagnostique ou de pronostic dans le cadre du CCR. La colonisation des CoPEC se trouve augmentée dans les CCR de phénotype MSI (Gagnière et al., 2017). La colonisation intestinale des CoPEC pourrait contribuer à la modulation de l'efficacité de l'immunothérapie, observée particulièrement chez des modèles murins de CCR (Lopès et al., 2020). Une diminution de la réponse aux anti-PD-1 est observée en xénogreffe chez des modèles murins infectés par les CoPEC. La présence de ces derniers dans le microbiote intestinal pourrait donc être un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR.

2.5. Microbiote et CCR : Diagnostique, Pronostic et Traitement.

2.5.1. Le microbiote intestinal comme biomarqueur pour le diagnostic du CCR

Actuellement, le taux de survie à 5 ans du CCR est de 90% pour des tumeurs localisées et peut rapidement descendre en dessous de 15%, en présence de métastase (Siegel et al., 2021). Pour cette raison, un diagnostic précoce, non invasif et accessible est décisif. Etant donné le lien étroit qui existe entre la dysbiose et le CCR, l'utilisation de marqueurs microbiens a récemment été rétabli comme un indicateur prometteur dans le diagnostic précoce. Ces dernières années, les méthodes de séquençage ont permis de mettre en lumière différentes signatures microbiennes, la plupart fécales, chez les patients atteints de CCR. Aucun consensus n'est à ce jour reconnu et aucune oncobactérie n'est universellement présente chez les patients. Cependant, les *F. nucleatum* sont apparus comme un marqueur fécal et tumoral (Zhang et al., 2019b). Quantifier l'abondance de *F. nucleatum* dans les fèces améliore les performances du test fécal d'immunohistochimie couramment utilisé dans le diagnostic de la maladie (Wong et al., 2017b). Bien que la plupart des études se soient concentrées sur des échantillons fécaux, Dohlman et collègues ont récemment découvert une signature microbienne prometteuse dans le sang des patients atteints de CCR, caractéristique d'une altération de la barrière épithéliale colique (Dohlman et al., 2021).

Les métabolites dérivés du microbiote pourraient également être une approche non invasive dans le diagnostic du CCR. Les échantillons en question proviendraient de fluides humains

tels que le sang, l'urine, la salive ou encore les fèces. Quatre études montrent le potentiel de l'utilisation du profil métabolique fécal dans le diagnostic de cette maladie (Le Gall et al., 2018; Lin et al., 2016, 2019b; Monleón et al., 2009). Les métabolites fécaux comme le lactate ou le glucose sont augmentés chez les patients atteints de CCR comparativement au groupe contrôle. Tout du long de la séquence adénome-carcinome, le niveau d'acides gras à chaîne courte, glutamate et succinate, varie significativement. L'acétate est d'ailleurs celui qui présente de meilleurs résultats pour discriminer les patients atteints de CCR du groupe contrôle (Le Gall et al., 2018; Lin et al., 2016, 2019b; Monleón et al., 2009).

Des études complémentaires sont cependant requises pour définir la dysbiose associée au CCR et ainsi proposer une signature microbienne. Toutefois, l'hétérogénéité des CCR devra être prise en compte. Le microbiote diffère suivant les caractéristiques tumorales comme les différents types de mutation/altération ainsi que la localisation de la tumeur. Les différences propres à chaque individu rentrent également en jeu dans la composition du microbiote comme le genre et le mode de vie.

2.5.2. Le microbiote intestinal comme biomarqueur dans le pronostic et l'issue à long terme du CCR

Des marqueurs microbiens spécifiques peuvent être utilisés comme un indicateur dans le pronostic et dans la survie des patients atteints de CCR. Tout comme pour le diagnostic, *F. nucleatum* se révèle être la bactérie la plus étudiée pour caractériser le pronostic. Une concentration élevée en *F. nucleatum* est associée à une survie sans récurrence raccourcie ainsi qu'une altération moléculaire de type CIMP-high, MSI-high et la présence de mutations de BRAF (Flanagan et al., 2014). Cette bactérie est également en lien avec un stade avancé du CCR, une localisation proximale de la tumeur et une survie diminuée des patients (Mima et al., 2016). La présence de *Bacteroides fragilis* dans la muqueuse colique est associée à un stade plus avancé de la maladie, et l'association de l'abondance de cette bactérie avec *F. nucleatum* est un marqueur pronostic d'une survie amoindrie (Wei et al., 2016). Concernant les *E. coli*, leur colonisation de la muqueuse colique est liée à un mauvais indicateur pronostic et les *E. coli* producteurs de cyclomodulines sont généralement en lien avec un stade TNM avancé, III ou IV (Bonnet et al., 2014). Cependant, des études complémentaires sont à réaliser, afin d'utiliser ces biomarqueurs comme facteurs de pronostic en routine.

2.5.3. Le microbiote intestinal comme biomarqueur dans la réponse aux traitements
Prendre en compte l'influence du microbiote intestinal sur l'efficacité de la thérapie fait naître la possibilité d'utiliser la communauté microbienne comme un marqueur prédictif pour le traitement du cancer. Les résultats des études cliniques et pré-cliniques soulignent que le microbiote pourrait influencer la réponse aux chimiothérapies et immunothérapies ainsi qu'à la radiothérapie et la chirurgie.

- Immunothérapie

Les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire, appelée ICI, qui comprennent des anti-PD-1 (*Programmed cell death 1*) et anti-CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4*) sont des traitements prometteurs dans la lutte contre le cancer, avec une amélioration de la survie. La prise d'antibiotiques inhibe les effets bénéfiques du traitement anti-PD-1 chez des patients atteints de cancer, suggérant une implication du microbiote (Routy et al., 2018). Cependant, la réponse aux traitements varie selon les individus. Les patients répondeurs ont une composition bactérienne différente des non répondeurs. Un enrichissement en *Fecalibacterium spp.* chez les patients répondeurs est observé alors que pour les patients non répondeurs ce sont *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Escherichia coli* et *Anaerotruncus colihominis* qui sont augmentées (Gopalakrishnan et al., 2018). Ainsi, une transplantation du microbiote fécal pourrait être envisagée. Baruch et collègues a montré la première preuve de concept de l'efficacité d'une transplantation fécale dans la réponse de l'immunothérapie chez des patients atteints de métastases (Baruch et al., 2021).

- Chimiothérapie et radiothérapie

De nombreuses études pré-cliniques montrent l'implication du microbiote intestinal dans l'efficacité des chimiothérapies dans le traitement du CCR, comme l'oxiplatine, ou la cyclophosphamide (Koulouridi et al., 2020). Néanmoins, les études cliniques sur l'utilisation potentielle du microbiote comme biomarqueur dans la prédiction de la réponse aux traitements de chimiothérapies sont rares. Seule une étude a mis en évidence une association entre *Streptococcus mutans* et *Enterococcus casseliflavus* avec une réponse améliorée (Zhao et al., 2021). Concernant la radiothérapie, aucun impact direct du microbiote sur la réponse des patients n'a pu être déterminé à ce jour. Pour autant, l'utilisation de souris sauvages résistantes au traitement de radiothérapie a permis d'identifier des bactéries ou métabolites spécifiques,

potentiellement impliqués dans ce mécanisme. En effet, les animaux résistants possèdent un enrichissement d'*Enterococcaceae* et une faible densité de proprionate ainsi que des métabolites impliqués dans la voie du tryptophane (Guo et al., 2020a). Des études complémentaires sont nécessaires pour identifier avec précision les populations microbiennes concernées par la radiorésistance.

- Chirurgie

Le rôle du microbiote intestinal dans le résultat chirurgical a largement été démontré dans le cadre du CCR. Les fuites anastomotiques (AL : *Anastootic leak*) constituent la complication post-opératoire la plus mortelle (Stormark et al., 2020). Le rôle du microbiote dans la pathogénicité des AL à la suite d'une chirurgie est bien décrit (Koliarakis et al., 2020). Les bactéries mises en jeu seraient *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Shogan et al., 2015). Ces deux bactéries possèdent une activité collagénase et activent une metalloprotéinase (MMP-9), qui amène à l'effondrement de tissu et à la formation de AL (Shogan et al., 2015). Les infections et l'iléus post-opératoire sont deux autres complications qui peuvent arriver à la suite d'une résection chirurgicale du CCR. Cependant, une étude clinique récente a rapporté que la présence de *Faecalibacterium* dans la muqueuse des patients atteints de CCR pourrait être un marqueur prédictif d'un iléus post-opératoire (Jin et al., 2020). Concernant les infections au site opératoire, une étude clinique a identifié un enrichissement de *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* et *Enterococcus spp.* dans les fèces des patients présentant cette complication après une chirurgie (Ohigashi et al., 2013). Des études cliniques seront néanmoins nécessaires pour poursuivre les investigations et identifier une signature microbienne associée avec de forts risques de complications post-opératoires à la suite d'une chirurgie du CCR.

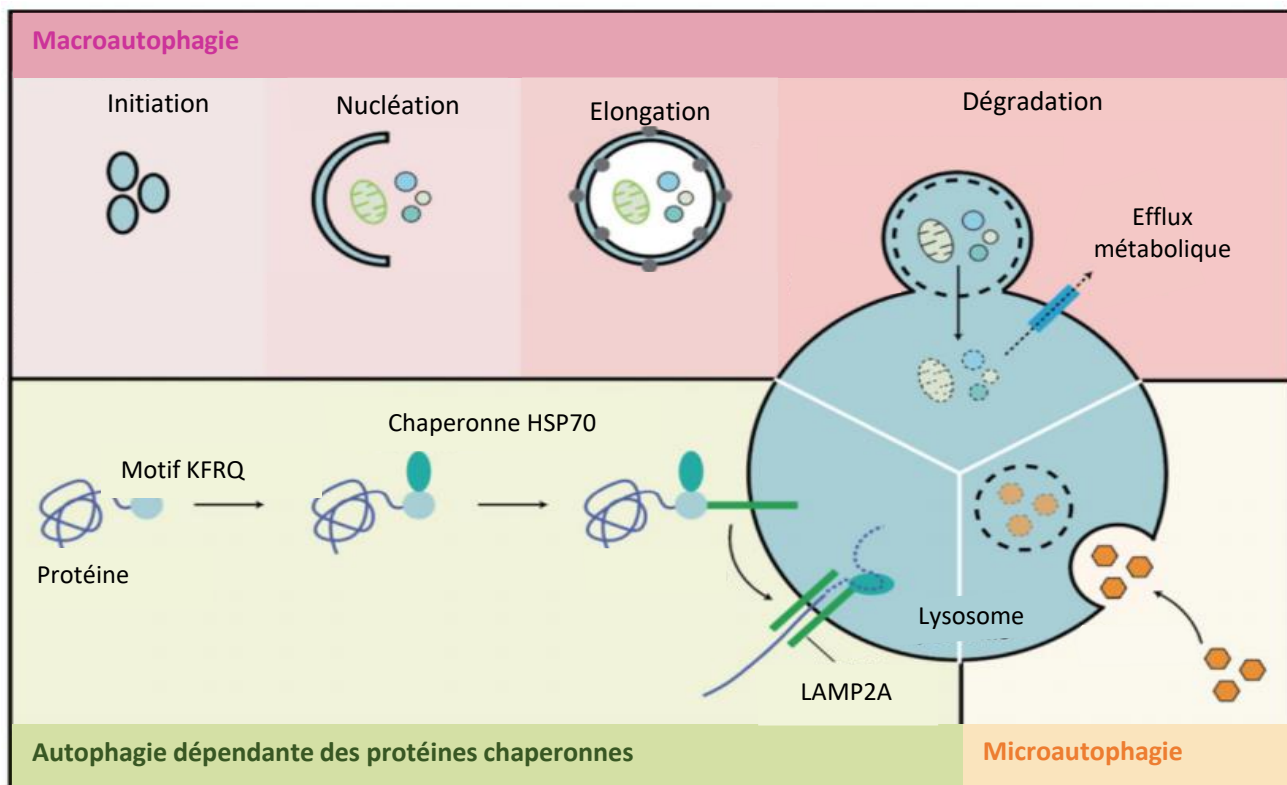


Figure 27 : Les différentes formes d'autophagie.

La **macro-autophagie** correspond à la séquestration d'une portion de cytoplasme dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome, qui va fusionner avec les lysosomes pour donner un compartiment de dégradation, l'autophagolysosome.

L'**autophagie dépendante des protéines chaperonnes** se caractérise par le transport actif de protéines possédant le motif penta-peptidique KFERZ dans les lysosomes par un complexe protéique composé des protéines LAMP-2 et HSP-70.

La **micro-autophagie** correspond à l'internalisation d'une portion de cytoplasme par invagination directe de la membrane des lysosomes.

(Modifiée d'après Ho et al., 2019)

3. L'autophagie

3.1. Généralités

Le terme autophagie est employé pour désigner le processus cellulaire par lequel le matériel intracellulaire est délivré au lysosome pour y être dégradé. Depuis plus de quinze ans, un grand intérêt est porté à l'autophagie avec un nombre conséquent d'articles publiés à son sujet et surtout l'attribution d'un prix Nobel de physiologie et médecine en 2016. Il a été décerné à Yoshinori Ohsumi pour la découverte et l'identification des gènes liés à l'autophagie (ATG) chez la levure dans les années 90 (Tsukada and Ohsumi, 1993).

Trois types d'autophagie sont à ce jour décrits chez les mammifères : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA : *Chaperone-mediated autophagy*) et la macro-autophagie (Galluzzi et al., 2017). Concernant la micro-autophagie, les substrats intracellulaires sont capturés à partir du cytoplasme *via* la protrusion ou l'invagination des membranes lysosomales. Pour la CMA, des protéines chaperonnes, telle que la protéine HSC70 (*Heat shock cognate 71 kDa protein*), reconnaissent sélectivement les substrats cibles contenant un motif consensus unique « KFREQ » et déclenchent leur linéarisation en vue d'être adressés au lysosome, grâce à la protéine membranaire lysosomale spécifique LAMP2A (*Lysosomal-associated membrane protein type 2A*). Enfin, au cours de la macro-autophagie, une membrane d'isolation séquestre une petite partie du cytoplasme pouvant contenir du matériel soluble et des organelles, pour former un autophagosome qui fusionnera avec le lysosome. Pour les trois types d'autophagie, une fois le matériel capturé par le lysosome, il sera dégradé et les produits finaux seront recyclés (Al-Bari, 2020) (**Figure 27**). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la macro-autophagie décrite en détail dans la partie suivante.

3.2. Mécanisme moléculaire de la macro-autophagie

La macro-autophagie, appelée autophagie dans la suite de ce manuscrit, est composée de 3 étapes majeures : (i) l'initiation, durant laquelle se met en place la membrane d'isolation, (ii) l'élongation de la membrane et (iii) la maturation de l'autophagosome avec la dégradation de son contenu par le lysosome (Abdul et al 2020) (**Figure 28**).

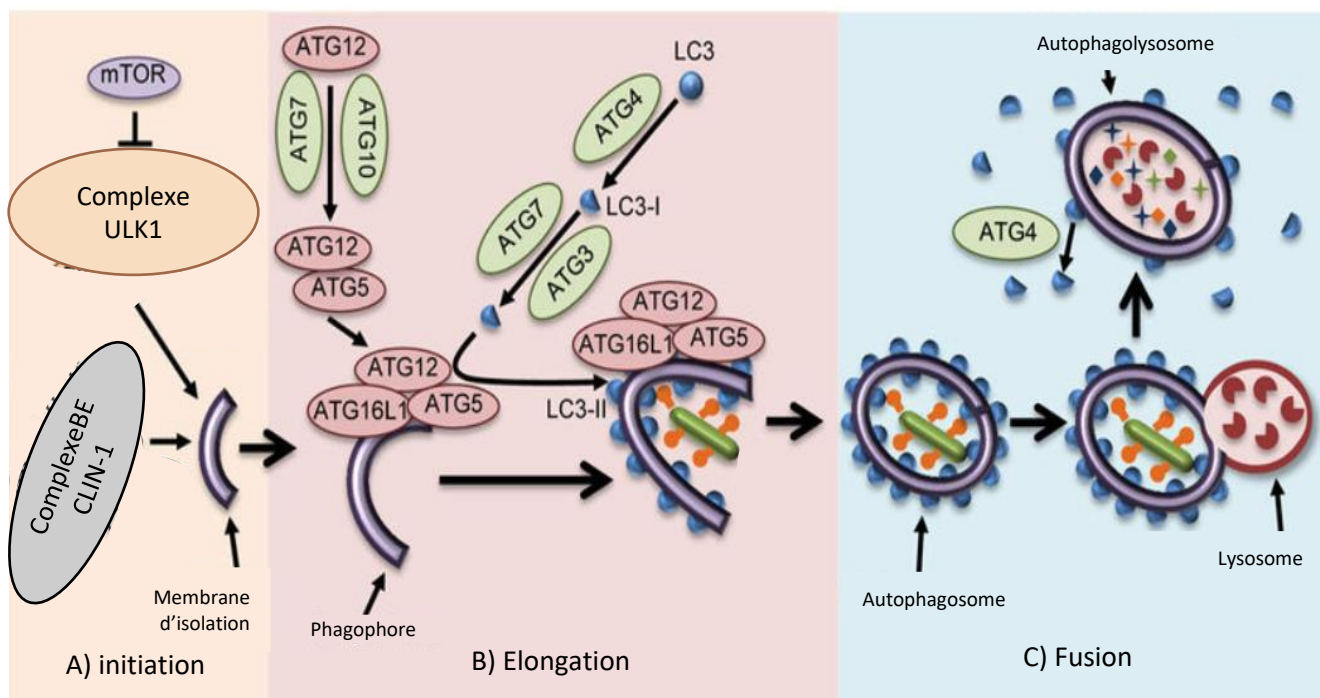


Figure 28 : Les étapes principales de la macro-autophagie.

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

(Modifiée d'après Kimmey et al., 2016)

3.2.1. L'initiation

L'initiation de l'autophagie nécessite l'activation du complexe ULK1 (*UNC kinase-51-like-kinase*) qui est composé de la protéine ULK1, FIP200 (*Focal adhesion kinase (FAK) family kinase-interacting protein 200 kD*), ATG13 et ATG101 (Hurley and Young, 2017). Les signaux activateurs de l'autophagie entraînent une autophosphorylation des protéines que composent le complexe, leur permettant ainsi de rejoindre la membrane du RE (*Réticulum endoplasmique*). L'interaction entre les protéines transmembranaires VMP1 (*Vacuole membrane protein 1*), situées sur la membrane du RE, et le complexe ULK1 serait à l'origine de la formation de la membrane d'isolation (Hurley and Young, 2017). Cette relocalisation permet le recrutement du complexe PI3K de classe III, plus communément appelé complexe BECLIN 1 qui est composé de la protéine BECLIN 1 (BECN1), d'une sous unité catalytique de type 3 (connue également comme VPS34 : *Vacuolar protein sorting*) et ATG14 (Backer, 2016).

La phosphorylation de BECN1 par ULK1 active la protéine VPS34, permettant ainsi la production locale de PI(3)P (*Phosphatidylinositol-3-phosphate*) et la formation d'une structure appelée omégasome, lieu de naissance de l'autophagosome. Cependant, l'origine des membranes d'isolation a longtemps été un mystère et source de débats (Hurley and Young, 2017). Plusieurs organelles telles que le RE, la mitochondrie, l'appareil de Golgi ou bien la membrane plasmique sont suspectées de servir comme membrane donneuse pour la formation et l'expansion de la membrane d'isolation. Le mécanisme exact de ce processus reste à ce jour ambigu et il est possible que toutes ces organelles soient impliquées (Wei et al., 2018). Néanmoins, des éléments incriminent fortement le RE ; puisque des connexions physiques avec l'omégasome sont observées (Biazik et al., 2015).

La membrane d'isolation, enrichie en PI(3)P, est reconnue par des protéines effectrices comme DFCP1 (*Double FYVE-containing protein 1*) et par le complexe WIPI (*WD repeat protein interacting with phosphoinositides*) et devient ainsi une plateforme pour l'accumulation des protéines nécessaires à l'élongation. En effet, la protéine WIPI2 permet le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 alors que WIPI1 et WIPI4 sont essentielles pour la lipitation de la protéine MAP1LC3 (*Microtubule-associated protein 1 light chain 3*) (Grimmel et al., 2015).

3.2.2. L'élongation

L'élongation de la membrane d'isolation est contrôlée par deux systèmes de conjugaison impliquant l'ubiquitination. Le premier est le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 et le second LC3 (*Light chain 3*) couplé avec un PE (*Phosphatidylethanolamine*) appelé LC3-PE ou LC3-II.

Une fois activée par ATG7 (*E1-like ubiquitine-conjugating enzyme*), la protéine ATG12 est transférée à ATG10 (*E2-like ubiquitine-conjugating enzyme*) avant de se lier de façon covalente à ATG5 (Yamaguchi et al., 2012). La conjugaison ATG12-ATG5 peut alors interagir avec ATG16L1 pour former une structure tétramérique. Le complexe ATG12 coordonne alors la formation de l'autophagosome avec l'insertion intramembranaire de LC3-II.

Le système de conjugaison LC3-II implique le clivage et la fixation de lipides à LC3. Au sein des cellules, la protéine LC3 est clivée par ATG4 pour constituer la forme cytoplasmique LC3-I. Elle sera ensuite activée par ATG7 et délivrée à une seconde *E2-like*, ATG3. LC3-I sera convertie en LC3-II associée à la membrane à travers une liaison covalente à un PE.

3.2.3. La maturation et la dégradation du contenu par le lysosome

La maturation de l'autophagosome requiert l'activité d'ATG4 pour dissocier le complexe LC3-II de la surface externe de l'autophagosome et éviter l'accumulation d'autophagosomes incomplets et non fermés dans la cellule. Le mécanisme impliqué dans la fermeture du phagophore s'apparenterait à une scission membranaire, puisque les faces externe et interne de la double membrane ne sont pas en contact lors de la fermeture (Knorr et al., 2015). Une fois fermé, l'autophagosome peut fusionner directement avec le lysosome pour donner un autophagolysosome ou bien avec un endosome pour donner une vacuole intermédiaire appelée amphisome, qui fusionne ensuite avec le lysosome pour former l'autophagolysosome.

Après la fusion avec le lysosome, les constituants de l'intra-autophagosome sont dégradés et les produits générés sont libérés dans le cytosol. La dégradation du contenu nécessite la participation d'hydrolases acides présentes au sein du lysosome, comme ; (i) les lipases, qui génèrent des acides gras à partir des lipides, (ii) des protéases, qui dégradent les protéines en peptides, (iii) les peptidases qui dégradent les peptides en acides aminés et (iv) les nucléases qui dégradent les acides nucléiques en nucléosides.

Ce phénomène permet la réactivation de la voie de signalisation mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) et la régénération du lysosome à partir de l'autophagolysosome, appelée la régénération autophagique du lysosome (ALR : *Autophagic lysosome reformation*) (Chen and Yu, 2018). Au cours de l'ALR, les structures tubulaires sont extrudées à partir de la membrane de l'autophagolysosome et plusieurs petites vésicules en sont générées : ce sont les protolysosomes. Initialement, les protolysosomes ont un pH neutre et sont convertis en lysosomes en acquérant de l'acidité et des protéines lysosomales. Les protolysosomes se détachent alors des autophagolysosomes et reconstituent le pool de lysosomes présents dans la cellule (Chen and Yu, 2018).

3.3. Autophagie et réponse aux bactéries intracellulaires : la xénophagie

Tous les pathogènes intracellulaires peuvent potentiellement être ciblés par la xénophagie et ainsi être détruits. Sa sélectivité dépend de leur reconnaissance par des récepteurs autophagiques. Cependant, certaines bactéries ont développé des mécanismes pour s'échapper et même contourner le processus autophagique pour leur propre bénéfice.

3.3.1. La reconnaissance des bactéries par la xénophagie

La séquestration des pathogènes par l'autophagosome requiert leur ubiquitination, une étape essentielle pour le recrutement des récepteurs autophagiques, comme SQSTM1/p62 (*Sequestosome 1*), NDP52 (*Nuclear dot protein 52*), NBR1 (*Neighbor of BRCA1 gene 1*), optineurine et TAXBP1 (*Tax1-binding protein 1*), et l'activation locale des protéines ATG (Kuo et al., 2018). Ces récepteurs contiennent à la fois un domaine de liaison à l'ubiquitine et une région d'interaction avec LC3 (LIR, *LC3-interacting region*) (Kirkin and Rogov, 2019). Le fonctionnement de ces récepteurs repose sur la kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*). Elle augmente l'affinité des récepteurs p62 et optineurine pour les protéines ubiquitines sur le substrat (Matsumoto et al., 2015; Richter et al., 2016). Concernant NDP52, le recrutement de TBK1 au récepteur est nécessaire pour l'activation de la xénophagie. En plus des ubiquitines, ce récepteur reconnaît les bactéries intracellulaires en se liant à la galectine-8 associée aux membranes des vacuoles endommagées contenant les bactéries. Il initie alors la xénophagie de par sa trimérisation aux complexes ULK1 et TBK1 (Ravenhill et al., 2019).

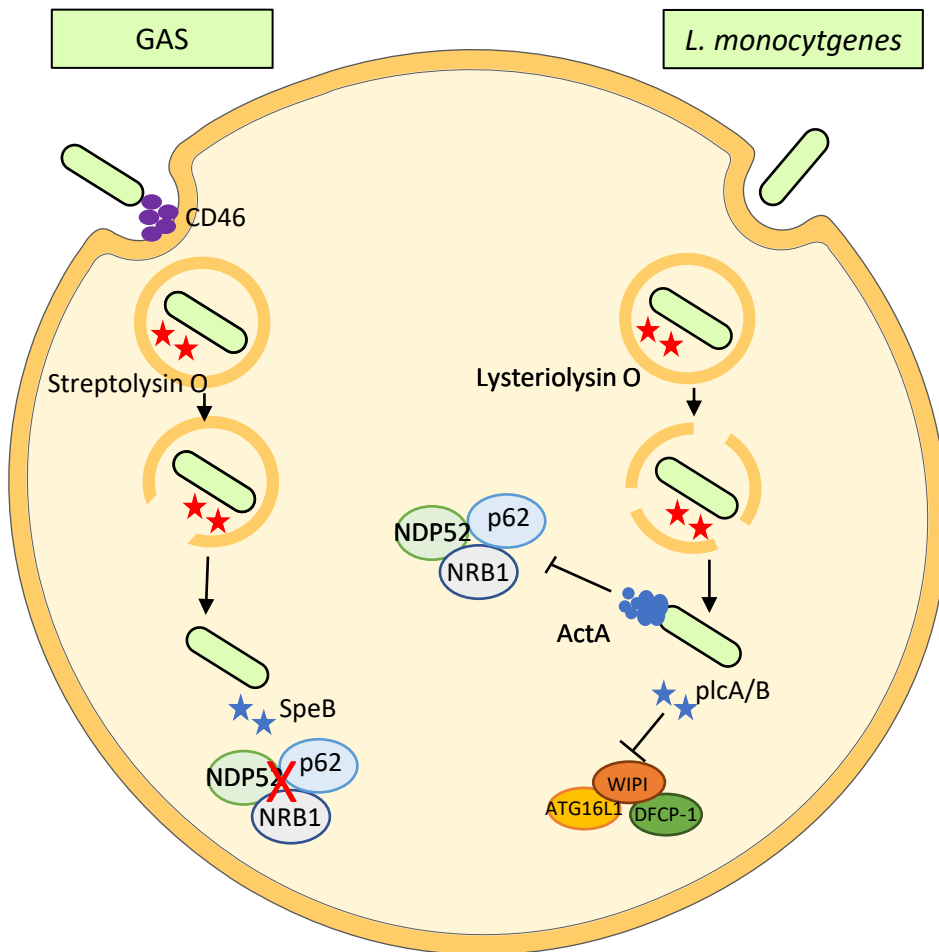


Figure 29 : Les bactéries qui échappent à la reconnaissance de l'autophagie.

- A) *Streptococcus de groupe A* : à la suite de l'activation de CD46 (*Complement regulatory protein*), GAS est dirigé au processus autophagique mais la sécrétion de streptolysin O lui permet d'échapper au phagosome. Une fois libre dans le cytosole, la sécrétion d'un second facteur de virulence, SpeB, permet la dégradation des récepteurs autophagiques comme p62, NDP52 et NRB1 et permet ainsi à la bactérie d'échapper à la reconnaissance autophagique.
- B) *Listeria monocytogenes*: ActA et la phospholipase (plc) A et B sont deux facteurs de virulence impliqués dans l'échappement de l'autophagie. Dans un premier temps, la listériolysine O permet à *Listeria* de s'échapper du phagosome. L'expression de ActA bloque ensuite le recrutement de p62 et NDP52 à la surface bactérienne. Enfin, l'expression de plcA/B bloque l'élongation du phagophore.

3.3.2. L'interaction entre les bactéries et la xénophagie

À la suite d'une invasion bactérienne, la xénophagie est induite afin d'éliminer les bactéries qui se trouvent libres dans le cytosol. Cependant, afin d'échapper au processus autophagique, les bactéries ont développé différentes stratégies pour (i) éviter d'être reconnues par les récepteurs autophagiques, (ii) inhiber la formation des autophagosomes et (iii) réduire les fonctions lysosomales. Certaines bactéries vont même au-delà, jusqu'à exploiter la machinerie autophagique pour leur propre réplication.

- Echappement de la reconnaissance par la machinerie autophagique

Les récepteurs autophagiques jouent un rôle important dans l'initiation de l'autophagie dans le contexte d'une réponse immunitaire innée. Pour contrer ce système, plusieurs bactéries sécrètent des effecteurs afin de ne pas être reconnues. Le premier exemple est celui de la bactérie intracellulaire, *Streptococcus* de Groupe A (GAS : *Group A Streptococcus*). Pour échapper à l'autophagie et se répliquer au sein de la cellule hôte, GAS sécrète un facteur de virulence SpeB qui dégrade protéolytiquement les récepteurs autophagiques tels que p62, NDP52 et NBR1, restreignant ainsi l'activité autophagique (Barnett et al., 2013). Pour ne pas être reconnue, *Listeria monocytogenes* adopte un autre subterfuge. Tout d'abord, cette bactérie est capable d'échapper au phagosome par la sécrétion de la listériolysine O, se retrouvant ainsi libre dans le cytoplasme (Petrišič et al., 2021). Néanmoins, pour survivre dans le cytoplasme, elle sécrète deux facteurs de virulence, ActA et InlK, qui lui permettent de recruter respectivement l'actine et la protéine vault majeure, afin de former un manteau protecteur lui permettant de se cacher et échapper ainsi au processus autophagique (Dortet et al., 2011; Yoshikawa et al., 2009). Pour finir, *Listeria monocytogenes* exprime la phospholipase C, qui prévient la formation de PI(3)P, et donc la formation de l'autophagosome (Mitchell et al., 2018) (**Figure 29**).

- Inhibition de l'autophagosome

Comme mentionné *supra*, l'autophagosome est une étape initiale de la xénophagie. Interférer avec ce processus fondamental permettrait aux bactéries de s'échapper et de se répliquer au sein de la cellule. La bactérie intracellulaire *Staphylococcus aureus*, en activant la voie MAPK, phosphoryle la protéine autophagique ATG5 (Neumann et al., 2016). Bien que le mécanisme précis de cette phosphorylation sur l'autophagie soit encore inconnu, la conséquence en est un

défaut de la maturation de l'autophagie *via* une inhibition de la fusion du lysosome avec l'autophagosome (Keil et al., 2013). Un autre paradigme bien étudié sur l'inhibition de la maturation autophagique est celui qui concerne *Legionella pneumophila*. A la suite d'une infection, cette bactérie sécrète une protéine effectrice RavZ par son système de sécrétion de type IV. Cette protéine interagit avec la membrane de l'autophagosome afin de délipider et déconjuguer LC3, par clivage du site de conjugaison pour prévenir toute possible liaison ultérieure de LC3 avec le PE (Yang et al., 2017). Le résultat est un arrêt du processus autophagique qui permet ainsi à la bactérie de proliférer.

- Altération de la fonction lysosomale

Les enzymes lysosomales sont essentielles pour éliminer les bactéries intracellulaires et nécessitent un pH approprié. Afin de survivre, *Helicobacter pylori* perturbe l'acidification lysosomale en agissant grâce à son facteur de virulence, VacA, sur le trafic endolysosomal (Capurro et al., 2019; Zhang et al., 2018a). D'autres bactéries intracellulaires agissent sur le lysosome, ce sont les UPEC (*Uropathogenic E. coli*). Leur stratégie pour échapper à la dégradation autophagique est de neutraliser le pH lysosomal et d'activer le canal calcique. Les ions calciques s'exportent alors du lysosome au cytosol, amenant à l'exocytose du lysosome et ainsi à l'expulsion de la bactérie (Miao et al., 2015).

- Utilisation de l'autophagosome comme niche de réplication

La double membrane de l'autophagosome est un refuge idéal pour la survie des bactéries intracellulaires. A titre d'exemple, les bactéries AIEC (*Adherent-invasive Escherichia coli*) survivent dans les neutrophiles en bloquant l'autophagie au stade de l'autophagolysosome (Chargui et al., 2012). Les UPEC exploitent également la machinerie autophagique pour leur persistance en détournant les protéines ATG16L1 et ATG7 en vue d'utiliser l'autophagosome comme niche de réplication (Wang et al., 2019). Enfin, *Staphylococcus aureus* est également capable de bloquer la maturation et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes afin de pouvoir se répliquer au sein de l'autophagosome. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus (Horn et al., 2018).

3.4. Autophagie et cancer

3.4.1. Le rôle bivalent de l'autophagie dans le développement cancéreux

Le rôle complexe et paradoxal de l'autophagie dans la modulation de la tumorigenèse est largement étudié. Le devenir des cellules tumorales et la part que joue l'autophagie dans ce processus dépendent largement du type de cancer, du stade ainsi que du contexte génétique (Singh et al., 2018). Du fait de son effet cytoprotecteur, l'autophagie limite les dommages à l'ADN et par conséquent le cancer. Cependant, au fur et à mesure que le cancer progresse, les propriétés de l'autophagie sont détournées par les cellules tumorales pour répondre aux exigences métaboliques nécessaires à leur survie ainsi qu'à leur prolifération.

- Le rôle anti-tumoral de l'autophagie

L'autophagie a communément été décrite comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Un défaut d'autophagie est associé avec une instabilité génomique et des transformations malignes. Par exemple, des souris *Apc^{Min/+}* présentant une délétion du gène *Atg16l1* dans les cellules épithéliales intestinales, développent moins des tumeurs colorectales que les souris *Apc^{Min/+}*, à la suite de l'infection par CoPEC (Lucas et al., 2020). *In vitro*, une inhibition de l'autophagie a été observée à la suite d'une infection par *Helicobacter pylori*, permettant à la bactérie de favoriser l'apparition de dommages à l'ADN ainsi que la tumorigenèse gastrique chez des souris C57BL/6 (Xie et al., 2020). Concernant les patients, une méta-analyse a montré une association significative entre l'expression de *BECN1* avec une survie globale ainsi qu'une survie sans récurrence chez les patientes atteintes du cancer des ovaires (Chen et al., 2020c). Une déficience de *BECN1* est observée dans 40 à 75% des cancers du sein et prostate, suggérant que *BECN1* agit comme un suppresseur de tumeur (Liang et al., 1999). Pour finir, une accumulation de p62 due à une inhibition de l'autophagie pourrait être la cause d'effets cytotoxiques, d'un stress oxydatif et de dommage à l'ADN. Ce phénomène est répertorié dans plusieurs cancers et associé avec un pronostic défavorable (Kim et al., 2019; Pölönen et al., 2019; Ruan et al., 2018). Tous ces éléments mettent en exergue le rôle primordial de l'autophagie comme un mécanisme suppresseur de tumeur.

- Le rôle pro-tumoral de l'autophagie

Dans les tumeurs déjà établies, l'autophagie répond aux exigences métaboliques élevées des cellules tumorales en constante prolifération. La dégradation des macromolécules par

L'autophagie est source d'énergie pour leur métabolisme. Par ailleurs, une mauvaise alimentation en oxygène induit l'autophagie de façon dépendante de HIF-1 α , ce qui contribue d'avantage à la survie tumorale (Singh et al., 2018). Ainsi, chez les souris *Apc^{Min/+}*, une déficience de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales entraîne une diminution du développement tumorale colique en comparaison des souris *Apc^{Min/+}* sauvages (Lucas et al., 2020). A ce jour, de nombreuses publications discriminent l'expression des gènes autophagiques comme valeur pronostique dans différents cancers. Dans le cancer colorectal, l'expression de 6 gènes autophagiques (*VAMP7* : *Vesicle associated membrane protein 7*, *DLC1*, *FKBP1B* : *FKBP prolyl isomerase 1B*, *PEA15* : *Proliferation and apoptosis adaptor protein 15*, *PEX14* : *Peroxisomal biogenesis factor 14* et *DNAJB1* : *DnaJ heat shock protein family member B1*) sont positivement corrélés avec un mauvais pronostic (Wang et al., 2021). Il en est de même pour le cancer du sein où une signature des gènes de l'autophagie a été décrite (Du et al., 2020). En effet, l'expression de 5 gènes autophagiques (*EIF4EBP1* : *Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*, *ATG4A*, *BAG1* : *BAG cochaperone 1*, *MAP1LC3A* and *SERPINA1* : *Serpin family A member 1*) est associée de manière significative avec un risque élevé des patientes à avoir survie globale amoindrie (Du et al., 2020).

3.4.2. L'implication de l'autophagie dans le développement cancéreux

L'initiation et la progression du cancer sont en lien avec différents changements moléculaires et biochimiques au sein des cellules. L'autophagie, dont le rôle dépend du contexte, est fortement associée avec ces mécanismes qui impliquent notamment : la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et la formation de métastases, ainsi que la mort cellulaire et la reprogrammation du métabolisme.

- Maintien de la stabilité génomique

La prolifération incontrôlée des cellules tumorales n'est pas seulement causée par leur autosuffisance en facteur de croissance mais plutôt par leur capacité à échapper à l'apoptose, après l'établissement de dommages à l'ADN et à la mise en place d'une instabilité génomique. Récemment, l'autophagie est apparue comme un processus influençant l'intégrité génomique en adoptant plusieurs mécanismes, comme le contrôle de la production de ROS, le recyclage des protéines impliquées dans le processus de réparation à l'ADN et la génération d'ATP et dNTP (Bu et al., 2020; Demirbag-Sarikaya et al., 2021). Des résultats montrent que l'autophagie

est nécessaire pour maintenir l'intégrité génomique en atténuant le stress métabolique dans le cancer du sein. Le moindre défaut du processus autophagique induit une augmentation des dommages à l'ADN, ainsi qu'une instabilité génomique amenant à la progression du cancer (Karantza-Wadsworth et al., 2007). Le CTP (*Camptothecin*) est une drogue anticancéreuse bien connue qui induit l'apoptose des cellules en instaurant des dommages à l'ADN. Cependant, l'autophagie exerce un rôle protecteur des cellules traitées au CTP et la combinaison de CTP avec un inhibiteur de l'autophagie pourrait être considérée comme une stratégie thérapeutique prometteuse (Chiu et al., 2018). Pour terminer, l'inhibition de l'autophagie, par la déficience de ATG5, augmente les dommages à l'ADN et la mort cellulaire en réponse aux agents cytotoxiques dans les lignées cellulaires issues du cancer du sein (Hwang et al., 2020). Ainsi l'autophagie apparaît comme un mécanisme important dans la maintenance de l'intégrité génomique.

- Inflammation

La déficience de l'autophagie entraîne l'activation de l'inflammasome, caractérisée par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Ce phénomène serait lié à l'accumulation de ROS dans les cellules déficientes de l'autophagie. Les ROS activent un médiateur de l'inflammasome, NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*), qui entraîne le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β maturée, sécrétée ensuite par la cellule. Les ROS sont capables d'activer d'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α et IL-6 (Biasizzo and Kopitar-Jerala, 2020).

Lors des étapes précoces de la tumorigenèse, la mise en place d'un stress hypoxique et métabolique conduit à l'apparition de signaux nécrotiques. La nécrose est caractérisée par une lyse cellulaire massive qui induit le relargage du contenu cytoplasmique. Les signaux nécrotiques sont des signaux majeurs d'induction de l'inflammation (Lee et al., 2018). En réponse à ce stress, l'autophagie est activée, afin de réduire la nécrose et l'inflammation, ayant pour conséquence le ralentissement du développement tumoral (Lee et al., 2018).

Enfin, une étude a montré qu'une déficience de l'autophagie entraîne une augmentation des niveaux d'expression des médiateurs de l'inflammation dans un modèle murin de lymphome (Zhu et al.).

- Maintien de la prolifération

Le maintien de la prolifération est une caractéristique clé des cellules tumorales. Les tumeurs ont un potentiel répliatif sans limite en échappant à l'arrêt du cycle cellulaire. Une délétion du suppresseur de tumeur *PTEN* ainsi qu'une activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR sont deux phénomènes répandus dans les cancers, qui peuvent être la cause d'une diminution de l'activité cytoprotectrice de l'autophagie ainsi qu'une prolifération incontrôlée (Zheng et al., 2019). Cependant, dans le cas d'une tumeur solide, le rôle de l'autophagie dans la modulation de la prolifération cellulaire est largement dépendant du contexte. Des hauts niveaux d'autophagie sont souvent observés dans les cancers avec des mutations activatrices de *KRAS* et *BRAF*. Ce processus cellulaire est essentiel pour le développement du cancer du pancréas, et l'inhibition de l'autophagie induit une régression de la progression tumorale (Piffoux et al., 2021). De façon similaire, une délétion d'*ATG7* dans des modèles du cancer du poumon qui présentent une mutation *BRAF* résulte en une régression tumorale (Sun et al., 2016). Concernant le cancer colorectal, une déficience de l'autophagie et de *Apc* dans les cellules épithéliales intestinales des souris entraîne une inhibition de l'initiation et du développement de la tumorigenèse colique comparativement aux souris présentant seulement une déficience de *Apc* (Lévy et al., 2015). Cependant, des résultats contradictoires existent. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, où l'utilisation de rapamycine, un inducteur de l'autophagie, induit un arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition de la prolifération cellulaire dépendante de mTOR (Chatterjee et al., 2015). Ainsi, l'autophagie joue bien un rôle dans la prolifération cellulaire mais ceci dépend du contexte.

- Maintien de l'angiogenèse

L'angiogenèse alimente en nutriments les cellules cancéreuses et favorise le développement tumoral, l'invasion ainsi que la formation de métastases. De par son rôle critique, les thérapies se sont beaucoup focalisées sur le développement de plusieurs inhibiteurs angiogéniques, tels que le bevacizumab qui agit sur la voie de signalisation VEGF (Meadows and Hurwitz, 2012). Cette molécule limite la prolifération des cellules endothéliales et induit l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, plus de 50% des tumeurs continuent à progresser et deviennent résistantes au traitement anti-angiogénique (Vredenburg et al., 2007). Les patients présentent alors un mauvais pronostic (Clark et al., 2012). Parce que les traitements anti-angiogéniques

ciblent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, le microenvironnement tumoral devient hypoxique. Toutefois, certaines cellules sont capables de surmonter ce stress et les études ont mis en évidence l'importance de l'autophagie dans ce mécanisme (Chandra et al., 2020). Le niveau de l'autophagie étant plus élevé, les cellules tumorales deviennent capables de survivre à un stress en oxygène et se rendent résistantes à une perte d'approvisionnement sanguin. Des études complémentaires montrent que le bevacizumab conduit à une augmentation de BECN1 et LC3 et donc à une augmentation de la formation d'autophagosome. Un traitement combinatoire avec un inhibiteur de l'autophagie, par exemple la chloroquine, révèle de meilleurs résultats sur le développement tumoral, l'apoptose et la prolifération cellulaire (Guo et al., 2013).

- Invasion tissulaire et formation de métastases

L'autophagie joue un rôle essentiel dans le processus métastatique même si les études restent à ce jour contradictoires. D'un côté, l'autophagie est rapportée comme un processus limitant la formation de métastases et de l'autre, comme le favorisant (Marsh et al., 2021). Des molécules impliquées dans le processus autophagique sont néanmoins augmentées durant la formation de métastases, comme c'est le cas pour LC3-II. Une accumulation de cette protéine est observée dans des stades tardifs du cancer du sein, ainsi que dans les ganglions mésentériques de ces patients en comparaison à ceux possédant des tumeurs plus précoces (Bortnik et al., 2020). L'inhibition de LC3-II et BECN1 entravent l'habilité des cellules tumorales à envahir les tissus alentours (Ren et al., 2019). L'autophagie favorise la sécrétion de facteurs pro-invasifs tels que IL-6, MMP2 (*Matrix metalloproteinase-2*) et les membres de la famille Wnt, suggérant que l'effet paracrine de l'autophagie est important pour la capacité invasive des cellules (Lock et al., 2014).

La TEM (*Transition épithélio-mésenchymateuse*) est un processus par lequel les cellules épithéliales acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses comme la perte de la polarité, un gain de motilité ou une forme fusiforme. L'autophagie favorise ou restreint l'habilité des cellules à subir la TEM. Par exemple, une déficience de ULK2 induit l'autophagie et favorise la TEM dans les cellules du cancer du poumon (Kim et al., 2016). Dans plusieurs études, l'autophagie joue un rôle dans le contrôle de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans le TEM. Une déficience pour les protéines ATG favorise l'accumulation de p62

et la stabilisation du facteur de transcription TWIST1 (*Twist Family BHLH Transcription Factor 1*) qui facilite l'instauration du phénotype TEM *in vitro* (Qiang et al., 2014). De la même façon dans le cancer du sein, l'activation de l'autophagie prévient la TEM en favorisant la dégradation de TWIST ainsi que SNAI1 (*Snail family transcriptional repressor 1*), un autre facteur de transcription impliqué dans la TEM (Lv et al., 2012). Ces résultats montrent l'existence d'une interconnexion entre l'autophagie, la TEM et l'invasion, ainsi que la migration des cellules tumorales.

Quand le processus d'invasion et de métastase se met en place, les cellules perdent le contact entre elles, se détachent de la matrice extracellulaire, subissent la transition épithélio-mésenchymateuse et deviennent mobiles. Lorsque les cellules commencent à se détacher, un mécanisme apoptotique, appelé anoïkose, est mis en place (Paoli et al., 2013). Pour contrer ce mécanisme, les cellules tumorales induisent l'autophagie qui leur instaure une résistance à l'anoïkose, augmentant ainsi leur pouvoir invasif et métastatique *via* la voie de signalisation TFG- β /SMAD3 (Fu et al., 2018; Li et al., 2013). Quand les cellules migrent vers des sites plus distants, les cellules sont dans un état de dormance jusqu'à ce qu'elles établissent des nouveaux contacts avec la matrice extracellulaire. A ce stade, l'autophagie permet leur survie mais les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus (Vera-Ramirez et al., 2018). La dormance des cellules tumorales est un obstacle pour les thérapies puisque dans cet état, elles échappent aux traitements, qui se focalisent principalement sur les cellules en prolifération (Talukdar et al., 2019). Afin de mieux comprendre comment la dormance peut être modulée, il est important d'étudier au préalable sa connexion avec l'autophagie.

- Mort cellulaire

L'autophagie et l'apoptose sont deux processus essentiels dans le développement, l'homéostasie cellulaire et l'oncogenèse. Cependant, la relation fonctionnelle entre l'autophagie et l'apoptose est complexe et bidirectionnelle, puisque ces deux processus possèdent des médiateurs ainsi que des modulateurs communs (Fairlie et al., 2020). Une inhibition de l'autophagie favorise l'apoptose des cellules tumorales par l'activation spécifique des voies de signalisation pro-apoptotiques. Par exemple, une déficience de ATG5 et ATG7 résulte en la mort des cellules issues du mélanome (Xie et al., 2013). Plus récemment, l'autophagie a été décrite comme agissant sur la sensibilité apoptotique des cellules aux

chimiothérapies. A la suite d'une inhibition de l'autophagie, l'augmentation de FOXO3a stimule la transcription des gènes pro-apoptotiques, comme BBC3 (*BCL2 binding component 3*), qui amène à restaurer la sensibilité apoptotique des cellules au traitement (Fitzwalter et al., 2018). Néanmoins, la chimiothérapie peut également induire une forme de mort cellulaire par l'autophagie. Ce type de mort résulte d'une activation excessive de l'autophagie et est indépendante des caspases, ce qui la distingue de l'apoptose (Denton and Kumar, 2019). Le glioblastome est connu pour son agressivité et sa résistance à l'apoptose. Les chimiothérapies préconisées qui impliquent le temozolomide, l'arsenic oxide ou le tamoxifene induisent l'autophagie mais pas l'apoptose et provoquent une mort cellulaire par l'autophagie qui amène à une régression tumorale (Kohli et al., 2013).

- Reprogrammation de métabolisme

Bien que l'autophagie fonctionne à un niveau basal dans des cellules normales, la plupart des cellules cancéreuses présentent une activité autophagique accrue, nécessaire pour répondre à la grande demande métabolique et permettre la survie des cellules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Raj et al., 2020). Une analyse du métabolisme, dans des cellules tumorales déficientes ou non pour l'autophagie, révèle que ce processus prévient la crise énergétique et maintient une réserve de nucléotides dans des conditions où l'apport en nutriment est limité (Guo et al., 2016). Dans un modèle de cancer du poumon, une déficience pour ATG7 réduit l'apport d'acides aminés, utilisés comme substrat aux mitochondries, et induit une oxydation excessive des acides gras qui épuise les réserves lipidiques et favorise ainsi la crise énergétique (Bhatt et al., 2019). C'est donc par le maintien des fonctions du métabolisme que l'autophagie favorise le développement tumoral, la survie des cellules cancéreuses et la création de métastases.

3.4.3. Autophagie et cellules immunitaires infiltrantes

3.4.3.1. L'autophagie dans les cellules tumorales et impact sur le microenvironnement immunitaire

Des études récentes suggèrent une potentielle implication de l'autophagie au sein des cellules tumorales sur la réponse immunitaire. Par exemple, un effet antitumoral est observé à la suite d'une déficience de l'autophagie dans les animaux immunocompétents mais pas immunodéficients (Yamamoto et al., 2020).

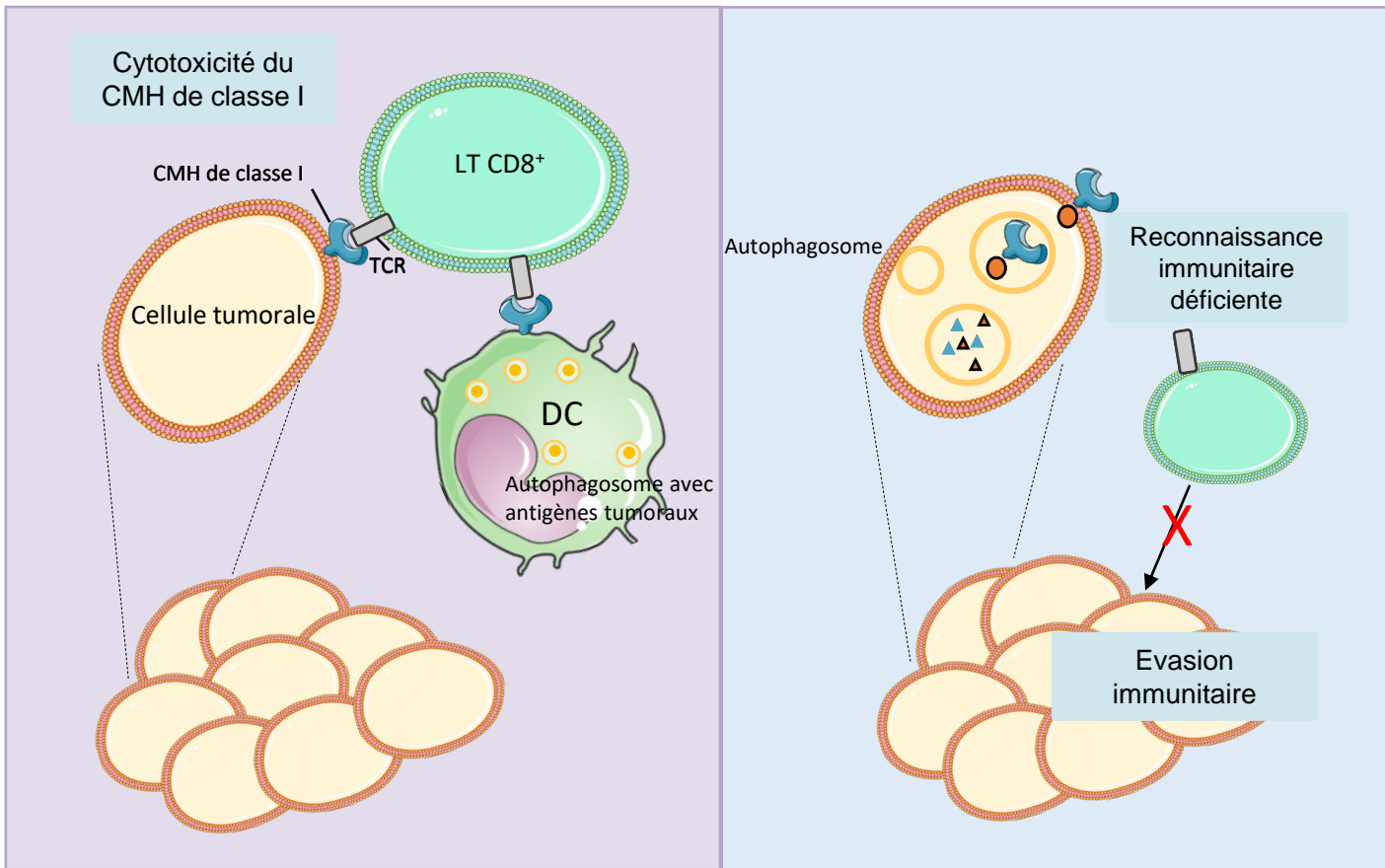


Figure 30 : Rôle de l'autophagie dans l'expression du CMH de classe I.

L'autophagie dans les cellules tumorales favorise la présentation antigénique avec les cellules dendritiques par une augmentation de la production d'autophagosomes, contenant des antigènes tumoraux. Les cellules dendritiques en retour activent les LT CD8⁺ qui exercent leur activité cytotoxique.

La protéine NBR1 (*Neighbour of BRCA1 gene 1 protein*) intervient dans la dégradation du CMH de classe I par le processus autophagique, qui amène à une réduction en surface de ce complexe dans les cellules cancéreuses du pancréas, abolissant leur reconnaissance par les LT cytotoxiques.

- Impact sur la présentation antigénique

Les molécules du CMH (*Complexe majeur d'histocompatibilité*) présentent les antigènes aux LT, amenant à l'initiation de la réponse immunitaire. Le CMH de classe I est exprimé au sein de toutes les cellulaires nucléées, alors que l'expression du CHM de classe II est limitée aux cellules professionnelles de présentation antigénique, telles que les cellules dendritiques.

Les gènes de l'autophagie sont surexprimés dans les cellules métastatiques du cancer du pancréas qui ne présentent pas de CMH de classe I (Pommier et al., 2018). Fait intéressant, l'autophagie favorise le développement du cancer du pancréas en jouant sur son métabolisme (Yang et al., 2014). Il est donc tout à fait probable que l'autophagie soit impliquée dans la dégradation du CMH de classe I dans les cellules cancéreuses. Pour conforter cette hypothèse, une étude a montré que l'autophagie redirige le CMH de classe I au lysosome *via* un récepteur de liaison à l'ubiquitine, NBR1 amenant à sa dégradation et empêchant alors toute reconnaissance par les LT (Yamamoto et al., 2020). Les cellules tumorales peuvent donc échapper à la surveillance immunitaire par la dégradation du CMH de classe I de façon dépendante de l'autophagie (Poillet-Perez et al., 2020; Yamamoto et al., 2020) (**Figure 30**).

- Impact sur le trafic des cellules immunitaires infiltrées

Des chimiokines spécifiques sont responsables du trafic des différentes cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral (Nagarsheth et al., 2017). L'autophagie peut intervenir dans la régulation des chimiokines au sein des cellules tumorales et ainsi être impliquée dans la migration des cellules immunitaires. Dans le cancer du poumon, une inactivation d'*ATG5* entraîne une expression accrue de CXCL5 ((*C-X-C*) *motif ligand 5*) une chimiokine qualifiée de pro-tumorale, responsable de la migration des MDSC (Rao et al., 2014). De la même façon, une déficience d'*ATG5* dans le cancer du pancréas favorise la sécrétion des chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL12 ((*C-X-C*) *motif ligand 1, 2, 12*), attractant d'autant plus les macrophages immunosuppresseurs au sein du microenvironnement tumoral (Görgülü et al., 2019). Cependant, dans le mélanome, l'inhibition de l'autophagie par délétion génétique ou pharmacologiquement induit l'expression de CCL5 (*C-C motif chemokine ligand 5*), qui résulte en une augmentation de NK infiltrés (Mgurditchian et al., 2017). Pour terminer, une invalidation de *Atg7* dans les cellules épithéliales intestinales chez les souris *Apc^{+/+}* entraîne une dérégulation des cytokines et chimiokines CX3CL1, CXCL9 et CXCL10 (Lévy et al., 2015). Ces

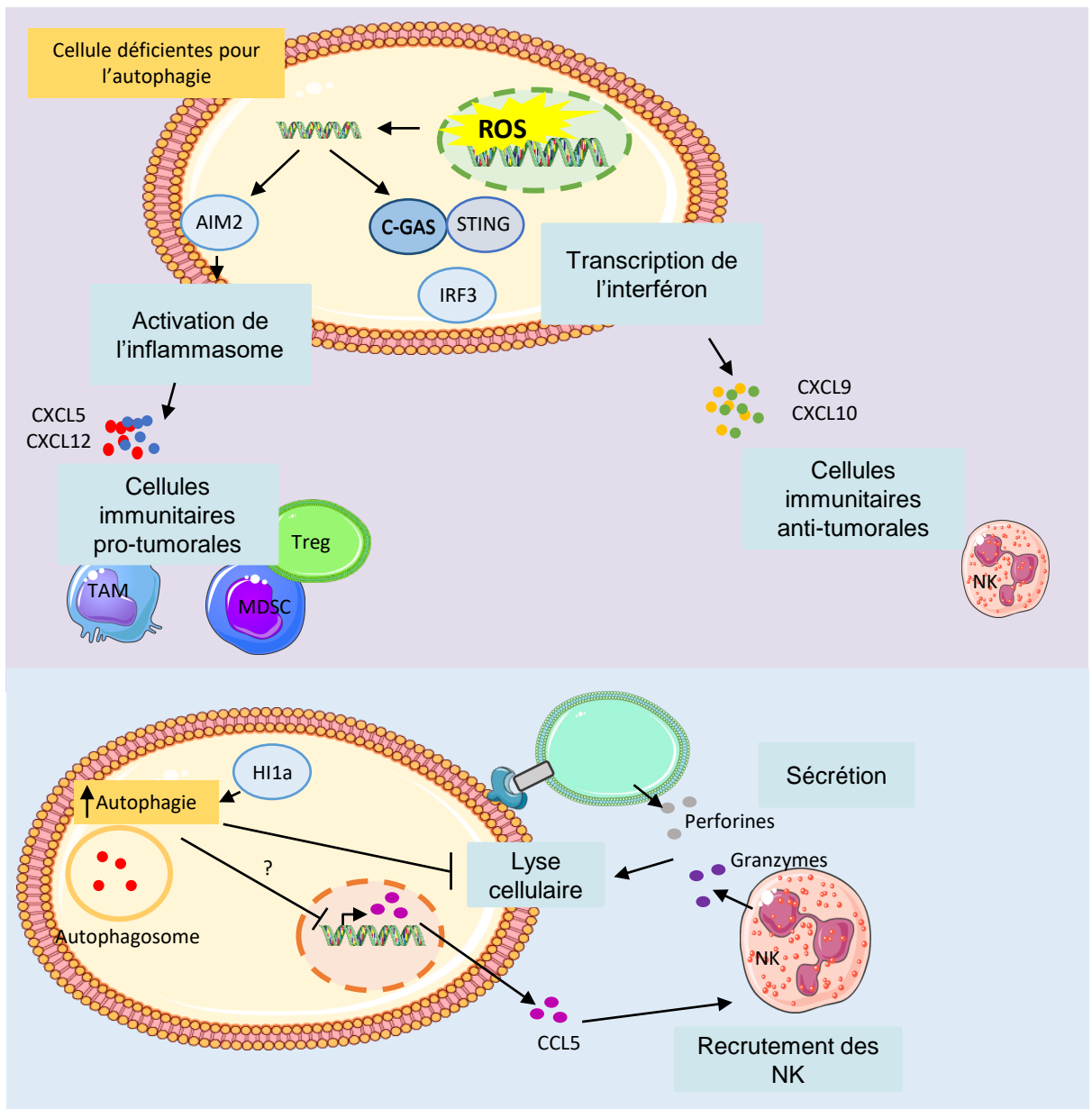


Figure 31 : Rôle de l'autophagie dans le trafic et la fonction des cellules immunitaires.

Rôle dans le trafic des cellules immunitaires : le blocage ou la déficience de l'autophagie entraîne une accumulation de ROS dans les cellules tumorales qui en retour provoque des dommages à ADN ainsi qu'aux mitochondries. Les protéines AIM2 (*Absent in melanoma 2*) repèrent l'ADN cytosolique, activent l'inflammasome et favorisent la tumorigenèse par le recrutement des cellules immunosuppressives. Le complexe cGAS (*GMP-AMP synthase*)-STING (*Stimulator of interferon genes*) peut également percevoir l'ADN cytosolique, stimuler la réponse de l'interféron de type I et favoriser l'immunité anti-tumorale par le recrutement des LT CD8⁺ et NK.

Rôle dans la fonction des cellules immunitaires : l'hypoxie induit l'autophagie dans les cellules tumorales grâce à HIF-1a (*Hypoxia-induced factor 1a*). Un niveau élevé d'autophagie induit la dégradation des granzymes B dans les cellules tumorales, sécrétées par les cellules LT CD8⁺ et NK, et bloque la fonction cytotoxique de ces cellules immunitaires. En même temps, l'autophagie inhibe l'expression de la chimiokine CCL5, qui a pour fonction de recruter les NK dans le micro-environnement tumoral.

dernières permettent d'attirer certaines populations de LT qui sont retrouvées chez les patients atteints de CCR qui présentent un bon pronostic (Mlecnik et al., 2010). Ces différents résultats suggèrent que l'autophagie pourrait jouer un rôle suppressif dans l'expression de chimiokines, aussi bien pro- qu'antitumorales, et affecter différenciellement la progression tumorale (**Figure 31**).

- Impact sur la fonction des NK et LT CD8⁺

Les cellules NK et LT CD8⁺ sont des cellules ayant des fonctions antitumorales. L'autophagie, induite par l'hypoxie, dégrade les granzymes B dérivées des cellules NK, ainsi que les cellules NK affaiblies par la lyse tumorale dans différents modèles murins. L'inhibition de l'autophagie restaure le niveau des granzymes, préserve la cytotoxicité des NK et prévient la progression tumorale (Baginska et al., 2013). Dans le cancer du poumon, l'autophagie désactive également la sensibilité des cellules tumorales à la fonction cytotoxique des CTL (*Cytotoxique T lymphocytes*) (Noman et al., 2011). Pour terminer, un criblage génomique à travers un panel de lignées cellulaires cancéreuses révèle que l'autophagie est un processus conservé, impliqué dans la résistance des tumeurs à la cytotoxicité des CTL et dans la sécrétion des cytokines effectrices IFN- γ et TNF. Ainsi, l'activation de l'autophagie dans les cellules tumorales peut être un mécanisme intrinsèque d'échappement immunitaire (Lawson et al., 2020).

3.4.3.2. Rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires infiltrées

Les cellules immunitaires infiltrées, comme les LT CD8⁺, LT régulateurs et les cellules myéloïdes présentatrices d'antigènes, affectent la progression tumorale et la réponse aux thérapies. De multiples stress cellulaires agissent sur le processus autophagique, dans les cellules immunitaires, qui façonne en retour leur survie, leur activation, leur différenciation ainsi que leur fonction (Clarke and Simon, 2019).

- Les LT effecteurs

L'autophagie est impliquée dans la régulation de **l'activation, la différenciation et la fonction effectrice** des LT. Après l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes, l'autophagie est induite dans les LT CD8⁺ permettant leur bonne activation (Paul et al., 2012). Une déficience de *PIK3C3* (*Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*), un élément clé dans l'induction

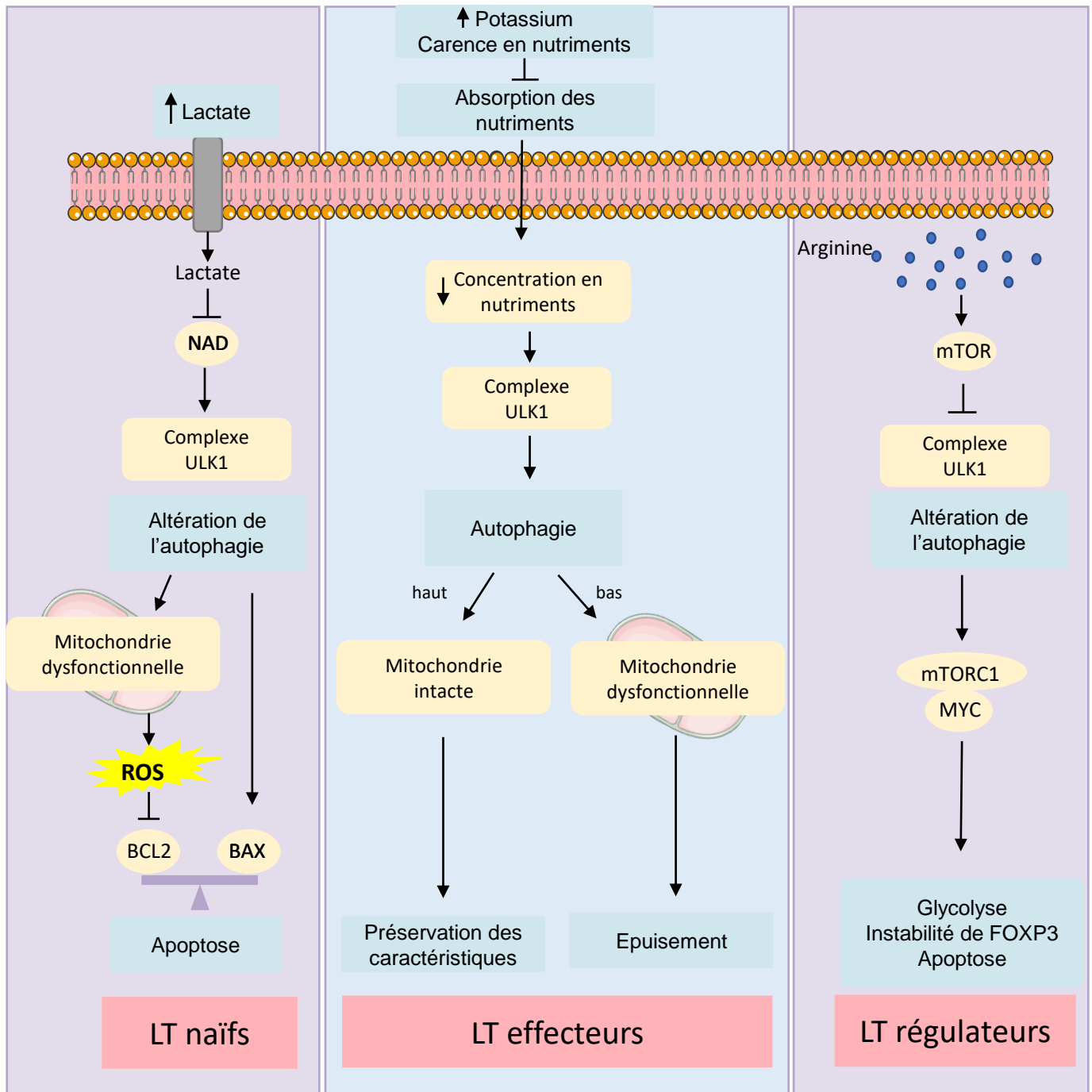


Figure 32 : Rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires au sein du micro-environnement tumoral.

Dans le TME, les LT dépendent de l'autophagie pour supporter leur survie et leur différenciation.

Dans les TN naïfs : Un niveau basal d'autophagie maintient leur quiescence et les protège de l'apoptose induite par les ROS. Une concentration augmentée en lactate au sein des tumeurs perturbe le processus autophagique des LT naïfs et altère la réponse anti-tumorale.

Dans les LT effecteurs : Un haut niveau de potassium ou une faible concentration en nutriments absorbés cause une restriction calorifique fonctionnelle qui induit l'autophagie à travers l'inhibition de mTORC1. L'autophagie est critique pour maintenir l'intégrité mitochondriale qui détermine la différenciation des LT effecteurs, à travers une reprogrammation métabolique.

Dans les LT régulateurs : Une forte concentration d'arginase au sein des LT régulateurs infiltrés maintient un haut niveau d'autophagie. La perte de l'autophagie dans ces cellules induit un changement métabolique, passant d'une phosphorylation oxydative à la glycolyse avec l'activation de mTORC1 et MYC amenant à l'instabilité de FOXP3 et à l'apoptose des cellules.

précoce de l'autophagie, entraîne une perturbation du métabolisme cellulaire dans les LT CD4⁺, qui échouent à se différencier en Th1. Ces altérations sont associées avec une réduction de l'activité mitochondriale juste après l'activation des lymphocytes (Yang et al., 2021). Pour finir, les LT CD8⁺ mémoires présents dans le foie ont un niveau basal d'autophagie supérieur à ceux circulants, ce qui permet de maintenir leur prolifération ainsi que leur fonction effectrice par la sécrétion de cytokines (Swadling et al., 2020).

L'autophagie agit également sur **le métabolisme, le contrôle du phénotype et l'apoptose** des LT. A la suite d'une stimulation antigénique, les LT subissent un changement métabolique passant d'une phosphorylation oxydative à une glycolyse afin de soutenir leur prolifération et leur fonction effectrice. Lors de la formation des LT mémoires, le métabolisme revient vers son premier mode de fonctionnement (Pearce and Pearce, 2013). Les premières spéculations impliquent l'autophagie comme un processus favorisant la β -oxydation et ainsi la génération des LT CD8⁺ mémoires (Khawar et al., 2019; Xu et al., 2014). Cependant, l'insuffisance métabolique présente dans le microenvironnement tumoral pourrait affecter l'activité cytotoxique des LT. Une accumulation de mitochondries non fonctionnelles dans le cytoplasme cellulaire, due au changement métabolique et à une autophagie altérée, est observée dans les mélanomes humains et murins. Les LT possèdent alors les caractéristiques fonctionnelles, transcriptionnelles et épigénétiques des LT épuisés, en phase terminale (Yu et al., 2020c). Des études ont mis en évidence, dans un modèle murin de cancer des ovaires, la présence d'une autophagie altérée dans les LT infiltrés aux tumeurs (Xia et al., 2017). Le lactate dérivé des tumeurs inhibe, en effet, l'expression de FIP200 et cause l'apoptose des LT par une perturbation de la balance pro et anti-apoptotique des membres de la famille de BCL-2, favorisant ainsi l'échappement tumoral (Xia et al., 2017).

L'autophagie est donc un processus important pour la survie, la différenciation ainsi que la fonction des LT. Cependant, quelques études vont à l'encontre des résultats précédemment décrits. Tout d'abord, une perte d'ATG5 dans les LT augmente le nombre de LT CD4⁺ infiltrés sécrétant de IL-9 (Rivera Vargas et al., 2017). Les LT CD8⁺ isolés des souris déficientes pour *Atg5* présentent un profond changement, passant d'un phénotype effecteur à un phénotype mémoire en comparaison au LT CD8⁺ des souris sauvages (DeVorkin et al., 2019). Il existe donc une balance dans laquelle le flux autophagique module l'immunité des LT et altère ainsi la réponse immunitaire tumorale (**Figure 32**).

L'activation spécifique des LT par les antigènes tumoraux est dépendant de la présentation antigénique. L'autophagie est impliquée dans **la régulation de l'apprêtement et la présentation des antigènes** (Münz, 2016). La présentation des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques nécessite une dégradation lysosomale *via* l'autophagie. Une déficience de *PIK3C3*, dans les cellules dendritiques, résulte en une altération de l'activité des LT cytotoxiques au sein des mélanomes et augmente le nombre de métastases pulmonaires par rapport aux souris contrôles (Parekh et al., 2017). Les cellules myéloïdes immunosuppressives, quant à elles, présentent un fort niveau d'autophagie chez les patients atteints de cancer qui peut être provoqué par l'hypoxie (Alissafi et al., 2018; Corzo et al., 2010). Une ablation de l'autophagie dans MDSC induit une expression élevée du CMH de classe II, une réduction de l'activité suppressive ainsi qu'un développement tumoral amoindri, dans un modèle murin de mélanome (Alissafi et al., 2018).

- LT régulateurs

Le processus autophagique est impliqué dans la différenciation des LT régulateurs (Delgoffe et al., 2009). Une déficience spécifique des gènes codant pour des composés de l'autophagie induit l'apoptose de ces cellules (Becher et al., 2018). D'un point de vue moléculaire, les LT régulateurs déficients pour l'autophagie, présentent une activation importante de la voie mTORC1-Myc ainsi qu'une activité glycolyse renforcée. Dans les mélanomes humains, une infiltration en LT régulateurs expriment une quantité plus importante d'arginases 2, qui dégradent l'arginine intracellulaire, atténuent l'activation de mTOR de façon dépendante de l'arginine et active donc l'autophagie (Lowe et al., 2019) (**Figure 32**).

- Macrophages

L'autophagie interagit avec l'activité de phagocytose ainsi qu'inflammatoire pour moduler la différenciation des macrophages et la sécrétion de cytokines dans un contexte d'infection (Germic et al., 2019). Cependant, peu de choses sont encore connues concernant l'interaction entre le microenvironnement tumoral, l'autophagie et le fonctionnement des TAM.

Une première étude montre que la protéine lysosomale LAMP2A (*Lysosome associated membrane protein type 2A*), un régulateur clé de l'autophagie, est surexprimée dans les TAM (*Tumor-associated macrophages*) mais pas dans les cellules tumorales et est associée avec un

mauvais pronostic dans le cancer du sein. Une déficience de LAMP2A prévient l'activation des TAM ainsi que le développement tumoral (Wang et al., 2019). Ce résultat suggère que l'autophagie pourrait contribuer à la différenciation des TAM ainsi qu'à leur activité pro-tumorale. Ce qui est le cas pour le carcinome hépatocellulaire, où l'autophagie est activée dans les TAM par la production de ROS, à travers l'induction de la voie TLR2/NOX2, induisant ainsi en phénotype M2 (Shiau et al., 2020). Une déficience en FIP200 résulte en une augmentation de ROS et à l'apoptose des TAM. Cibler l'autophagie dans les TAM pourrait alors altérer leur activité fonctionnelle et les encourager à adopter une fonction anti-tumorale.

Pour finir, la protéine TFEB (*Transcription factor EB*) est un régulateur clé de la biogénèse autophagique et lysosomale et est liée à la régulation des TAM. L'expression de TFEB inhibe la réponse inflammatoire ainsi que les transcrits associés avec les fonctions pro-tumorales des macrophages *in vitro* (Li et al., 2020). Dans le cancer du sein humain ainsi que murin, les TAM présentent une diminution de l'expression de TFEB. Lorsque ce dernier est déficient, une augmentation du développement tumoral et métastatique est observée. Ce résultat laisse penser que TFEB pourrait être un régulateur critique dans la fonction pro-tumorale des TAM et une cible thérapeutique pour le cancer du sein. Il serait néanmoins intéressant de déterminer si d'autres types de cancer présenteraient une altération de TFEB ou s'il s'agit d'une spécificité de ce cancer.

3.5. Rôle de l'autophagie dans le CCR

Dans le cadre du CCR, l'importance de l'autophagie est de plus en plus reconnue et présente des fonctions aussi bien pro- qu'anti-tumorales. Cependant, les mécanismes associés ne sont pas toujours bien compris puisque très peu d'études fonctionnelles ont été réalisées à ce jour.

Tout d'abord, une augmentation de LC3 est associée avec l'agressivité des tumeurs coliques (Zheng et al., 2012). Il en est de même pour ATG10 et ATG5 puisque leur surexpression est liée à l'invasion des tumeurs, l'apparition de métastases et à un taux de survie à 5 ans diminué (Hu et al., 2021; Jo et al., 2012). Une corrélation négative existe également entre l'expression de LC3-II ou p62 et le pronostic des patients atteints de CCR (Niklaus et al., 2017). Ces études mettent donc en évidence un rôle pro-tumoral de l'autophagie.

Néanmoins, alors que la protéine autophagique ATG5 est exprimée dans les cellules épithéliales du côlon, elle est absente dans 22% des carcinomes coliques. (An et al., 2011). Dans

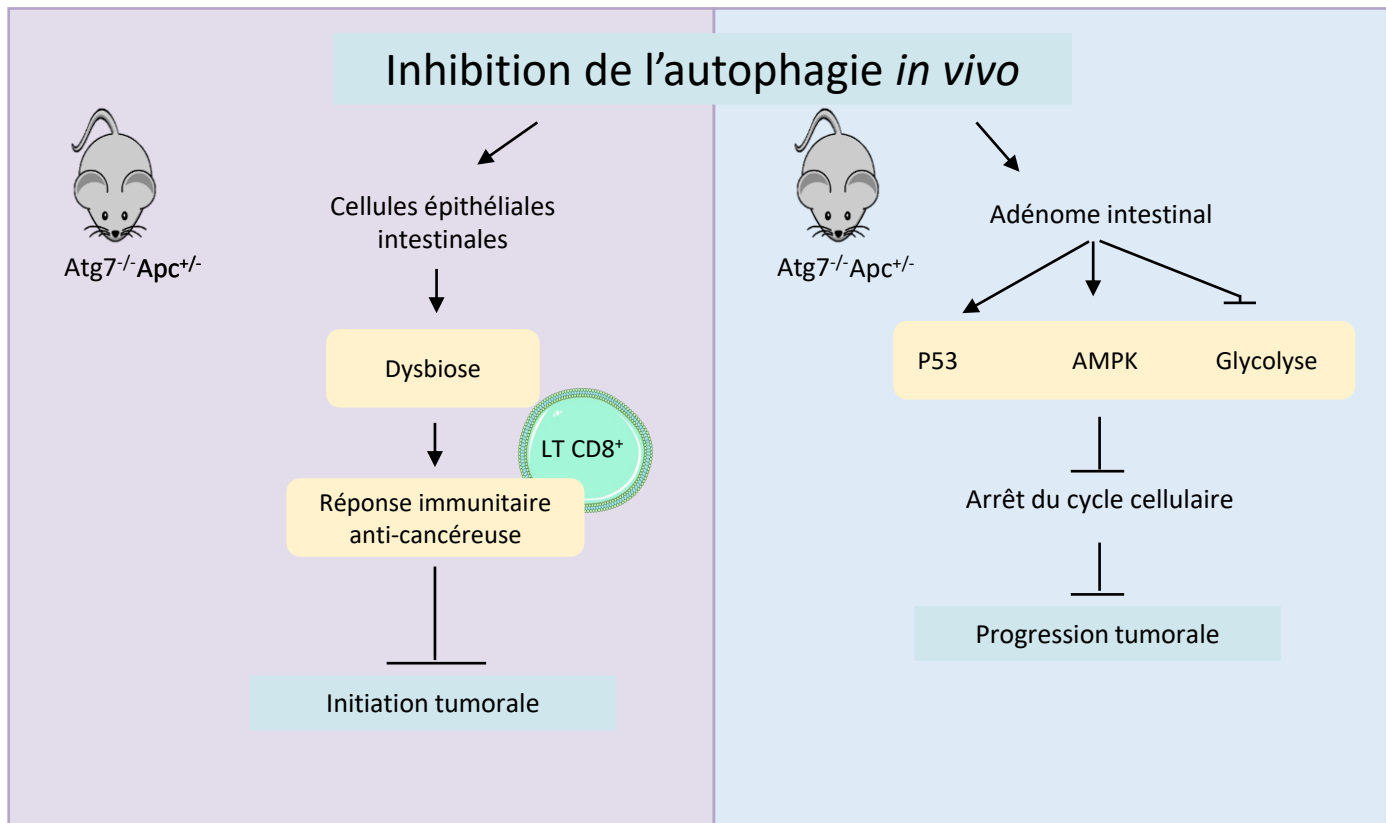


Figure 33 : Mécanismes pro-tumoraux de l'autophagie dans le CCR.

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

les CCR de phénotype MSI, 27% d'entre eux arborent au moins une mutation dans les gènes *ATG2B*, *ATG5* ou *ATG12* alors que le phénotype MSS, de meilleur pronostic, est enrichi en *ATG9* et *LAMP1* (Gil et al., 2020). Pour finir, 95% des tumeurs présentent une forte expression de *BECN1* qui est associée à un meilleur taux de survie des patients (Yang et al., 2015). Ces résultats laissent envisager que l'autophagie pourrait jouer un rôle suppresseur de tumeur et plus globalement résumer la complexité de l'autophagie dans le développement du CCR.

Une étude fonctionnelle *in vivo* a été réalisée chez des souris déficientes pour le gène *Apc* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales de manière inducible au tamoxifène (souris *VilCreERT2Apc^{lox/+}* ou *Apc^{+/-}*). Les auteurs ont montré que l'invalidation du gène *Atg7* spécifiquement au niveau des cellules épithéliales intestinales (souris *VilCreERT2Apc^{lox/+}Atg7^{lox/lox}* ou *Apc^{+/-}Atg7^{ΔCEI}*) permet à la fois d'inhiber l'initiation mais également la progression tumorale (Lévy et al., 2015). L'étude fonctionnelle a mis en évidence deux mécanismes différents selon le contexte (**figure 33**). L'inhibition de l'autophagie au stade précoce, au sein d'une cellule épithéliale encore saine, entraîne une perturbation de l'intégrité de l'épithélium intestinal avec des défauts au niveau des cellules sécrétrices (Paneth et Calciforme) et une augmentation de la perméabilité intestinale. Ces défauts entraînent la mise en place d'une dysbiose intestinale chez les souris *Apc^{+/-} Atg7^{ΔCEI}* caractérisée notamment par une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Proteobactéries* dans les fèces. Il est à noter que la muqueuse des souris *Apc^{+/-} Atg7^{ΔCEI}* présentait une diversité bactérienne plus importante que celle des souris *Apc^{+/-}*, et une augmentation de l'abondance en bactéries productrices du butyrate. Cette dysbiose intestinale était accompagnée par la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale caractérisée par une forte infiltration des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et Th1 au sein des tumeurs des souris *Apc^{+/-} Atg7^{ΔCEI}*, ce qui n'était pas observé chez les souris *Apc^{+/-}*. De plus, la production des cytokines CX3CL1, CXCL9 et CXCL10 est augmentée chez les souris *Apc^{+/-} Atg7^{ΔCEI}*. Cela met en évidence une réponse immunitaire antitumorale chez les souris déficientes pour l'autophagie. Au stade plus tardif du développement du CCR, la perte de l'autophagie est responsable d'un stress métabolique, de l'activation de l'AMPK et d'un arrêt du cycle cellulaire permettant ainsi de ralentir la progression tumorale (Lévy et al., 2015) (**Figure 33**).

A ce jour, seules quelques études ont établi un lien entre une infection par une bactérie, l'autophagie et le CCR. Une première étude met en exergue une corrélation négative entre

l'expression de BECN1 et la concentration de *F. nucleatum* dans les tumeurs coliques, suscitant le rôle potentiel de l'autophagie dans l'élimination de la bactérie (Haruki et al., 2020). Néanmoins, aucune autre association n'a pu être établie avec d'autres gènes de l'autophagie comme LC3 ou p62 et ceci dans les 724 CCR étudiés (Haruki et al., 2020). Une justification pourrait se trouver dans les caractéristiques différentes de ces trois marqueurs autophagiques. En effet BECN1, LC3 et p62 n'interviennent pas dans les mêmes étapes du processus autophagique. Il est donc possible que *F. nucleatum* pourrait être éliminé par la xénophagie ou par la phagocytose associé à LC3 (Haruki et al., 2020). L'élimination de la bactérie par l'autophagie n'est pas totale puisque *F. nucleatum* est détecté dans plus de 75% des tissus CCR métastatiques et 62% des ganglions mésentériques (Chen et al., 2020d). Comme mentionné précédemment, le processus métastatique est facilité par la transition épithélio-mésenchymateuse. L'exposition par *F. nucleatum* diminue l'expression du marqueur épithéliale, l'E-cadhérine et augmente le marqueur mésenchymal Vimentin, indiquant que la bactérie impulse la formation de métastases par TEM (Chen et al., 2020d). L'infection des souris *Apc^{Min/+}* par *F. nucleatum* induit la formation d'adénocarcinomes agressifs qui envahissent la couche musculaire. Cependant, un traitement à la chloroquine abolit ces effets aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* mettant en lumière l'implication de l'autophagie dans le processus métastatique. Pour terminer, une co-incubation de *F. nucleatum* avec des agents de chimiothérapie, l'oxaliplatine et le 5-fluorouracil, diminue les effets de ces drogues *via* une diminution de l'apoptose comparativement aux cellules non infectées. Ceci suggère que *F. nucleatum* favorise la chimiorésistance des cellules. Notons que la co-incubation de *F. nucleatum* avec la chloroquine restaure la sensibilité à l'apoptose (Yu et al., 2017). Ainsi, lorsque le stade du CCR est plus avancé, l'autophagie se révèle être un processus pro-tumoral favorisant la formation de métastases et la résistance aux drogues de chimiothérapie.

Une étude au sein de notre laboratoire s'est penchée sur le rôle de l'autophagie à la suite d'une infection par les CoPEC. L'autophagie se révèle être un processus important pour limiter les effets pro-carcinogène de ces bactéries. *In vitro*, une infection avec la souche CoPEC 11G5 isolée de patient induit l'autophagie ainsi que le système de réparation des dommages à l'ADN mais pas son mutant isogénique, incapable de produire la colibactine. Une déficience de l'autophagie est associée avec une augmentation de la multiplicité bactérienne, de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, des cassures double brin de l'ADN et une diminution des

Prédisposition de l'hôte au développement du CCR

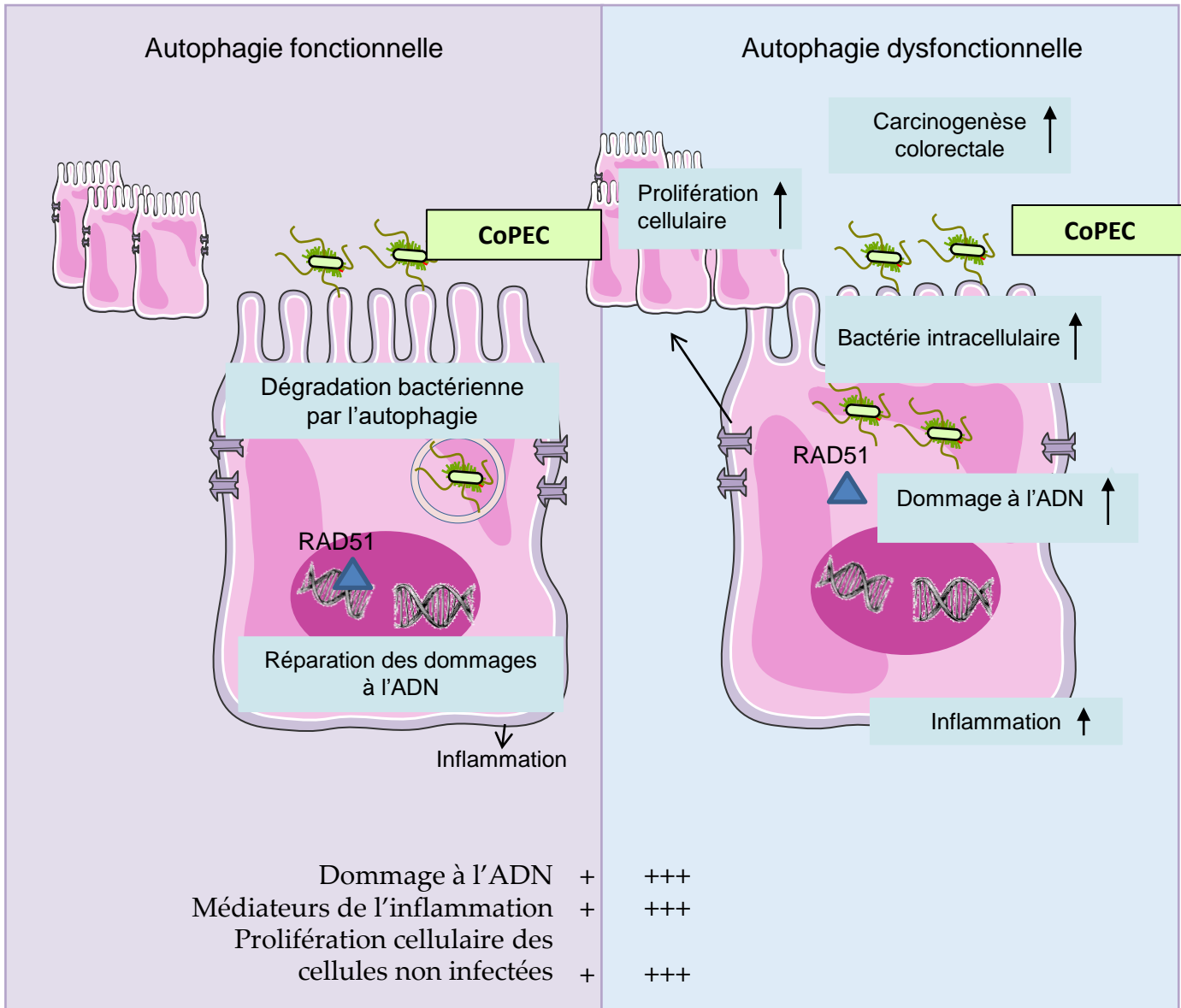


Figure 34 : Rôle de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales dans la carcinogenèse colorectale associée à la colonisation des CoPEC

Chez un hôte prédisposé au développement du CCR, à la suite d'une colonisation anormale par CoPEC. l'autophagie est activée pour protéger l'épithélium colique des dommages à l'ADN, *via* l'activation du système de réparation à l'ADN, pour réduire l'inflammation colique, ainsi que la prolifération cellulaire et, par conséquent, limiter le développement tumoral. Une autophagie dysfonctionnelle favorise la carcinogenèse colique, laquelle est associée à l'augmentation des dommages à l'ADN de l'épithélium colique, de l'inflammation colique et de la prolifération des cellules épithéliales coliques.

marqueurs de réparation de l'ADN. Ces résultats suggèrent que l'autophagie est nécessaire pour limiter les effets pro-carcinogènes de CoPEC et permettre l'activation du système de réparation de l'ADN. Un défaut d'autophagie augmente également la sénescence des cellules infectées avec la souche CoPEC 11G5, favorisant ainsi la prolifération des cellules non infectées. *In vivo*, les souris *Apc^{Min/+}* qui présentent une déficience de l'autophagie spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔCEI}* développent plus de tumeurs coliques avec un volume plus important que les souris *Apc^{Min/+}*, à la suite d'une infection par la 11G5. Une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, IL-6, TNF et CXCL1, une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et un accroissement des marqueurs de dommages à l'ADN ainsi que de la prolifération sont observés dans la muqueuse colique des souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔCEI}* comparativement aux souris *Apc^{Min/+}*, infectées avec la souche 11G5. Ainsi, l'autophagie induite par la CoPEC joue un rôle primordial pour limiter les effets pro-carcinogènes de la bactérie et, en conséquence, limiter le CCR (Lucas et al., 2020) (**Figure 34**).

3.6. L'autophagie comme cible thérapeutique du cancer

Les inhibiteurs de l'autophagie sont classifiés comme des inhibiteurs de stade précoce ciblant ULK1 ou VPS34 ou des inhibiteurs de stade tardif ciblant le lysosome. La CQ (*Chloroquine*) ou HCQ (*Hydroxychloroquine*) sont deux agents utilisés qui inhibent la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Au vu de l'autophagie sur la réponse immunitaire, son inhibition en combinaison avec d'autres thérapies a été prise en considération, afin d'augmenter l'efficacité de ces dernières. Par exemple, chez les patients atteints d'adénocarcinomes pancréatiques résécables, un traitement avec HCQ en combinaison avec les agents de chimiothérapie nab-paclitaxel et gemcitabine montre une augmentation des cellules immunitaires infiltrées, qui est un facteur de bon pronostic (Zeh et al., 2020). Pour augmenter le pouvoir inhibiteur du lysosome comme effet antitumoral, de nouveaux agents lysosomotropiques, tels que le Lys05 et DC661 sont en train d'être développés en utilisant la structure de base de la CQ (Ondrej et al., 2020; Rebecca et al., 2019). Ces drogues ciblent PPT1 (*palmitoy-protein thioesterase 1*) et manifestent de forts effets antitumoraux dans des études précliniques.

- Chimiothérapie

Dans le cancer, des flux autophagiques importants sont associés avec une réponse réduite aux chimiothérapies et une survie amoindrie des patients (Ma et al., 2011). Des études précliniques démontrent qu'une inhibition de l'autophagie surmonte la résistance aux chimiothérapies dans le cancer du poumon (Zou et al., 2013), de la thyroïde (Wang et al., 2017a) et du pancréas (Bryant et al., 2019). Les résultats de différentes études suggèrent que l'inhibition de l'autophagie devrait être en synergie avec l'inhibition de la voie de signalisation MAPK-ERK. Dans le cancer du pancréas, par exemple, une inhibition de MAPKK1 et 2 par le trametinib amène à l'activation de l'autophagie. Cependant, lorsque ce traitement est combiné avec un inhibiteur de l'autophagie, l'adénocarcinome présente une réduction de son développement aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Kinsey et al., 2019).

Toutefois, il existe d'autres mécanismes par lesquels l'autophagie est impliquée dans la résistance aux chimiothérapies. Par exemple, l'activation de l'autophagie par *Fusobacterium nucleatum* protège les cellules du cancer du côlon de l'apoptose induite par les chimiothérapie (Yu et al., 2017). De nouveaux essais cliniques seront nécessaires pour mieux comprendre le fonctionnement de l'autophagie dans la chimiorésistance.

- Radiation

L'autophagie joue un rôle critique dans la protection des cellules tumorales de la mort en réponse aux traitements de radiothérapie. Dans le cancer du sein, les radiations induisent l'expression des gènes autophagiques qui s'accompagne par l'accumulation d'autophagosomes. Une inhibition de courte durée de l'autophagie lors du traitement favorise la cytotoxicité de la radiothérapie dans les cellules cancéreuses résistantes (Apel et al., 2008). De façon similaire, l'hypoxie augmente la radiorésistance des cellules du cancer du poumon, en induisant l'autophagie qui régule à son tour à la production de ROS (Chen et al., 2017). Cibler l'autophagie pourrait alors potentiellement augmenter l'efficacité des radiothérapies. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie en combinaison avec les radiothérapies fait d'ailleurs l'objet d'essais cliniques chez les patients atteints de cancer.

- Immunothérapie

L'exploitation du système immunitaire est une approche prometteuse pour combattre le cancer. L'inhibition de l'autophagie pourrait impacter l'immunité systémique comme ce processus est impliqué dans le développement du système immunitaire (Clarke and Simon, 2019). Cependant, une inhibition systémique de l'autophagie par la CQ, ne modifie pas la fonction des LT, dans un modèle préclinique de mélanome et de cancer du sein. Cela suppose que le système immunitaire pourrait être tolérant à une inhibition de l'autophagie d'une certaine intensité (Starobinets et al., 2016). Néanmoins, comme l'autophagie régule la réponse immunitaire tumorale, cibler l'autophagie pourrait favoriser l'efficacité des immunothérapies et surmonter l'immunorésistance. Par exemple, la suppression de l'activité de VPS34 par l'utilisation d'inhibiteurs déclenche une augmentation de CCL5, CXCL10 et IFN- γ dans le micro-environnement tumoral qui entraîne une infiltration tumorale plus importante de cellules NK et T dans les modèles de mélanome et de cancer du côlon. Fait intéressant, l'inhibition de VPS34 supprime la résistance aux thérapies anti-P1 ou anti PDL1 dans ces modèles (Noman et al., 2020). Un traitement avec la CQ bloque la dégradation du CMH de classe I dépendante de l'autophagie. Lorsque ce traitement est en complément avec d'autres immunothérapies cela augmente la réponse immunitaire antitumorale dans un modèle murin du cancer du pancréas (Yamamoto et al., 2020). Comme une immunothérapie précoce, IL-2 est souvent utilisée pour traiter les patients atteints de cancer du rein ou mélanomes (Rosenberg, 2014). De hautes doses d'IL-2 montrent un effet antitumoral avec une vaste stimulation du système immunitaire. Cependant, le traitement d'IL-2 peut induire un syndrome autophagique systémique qui augmente les niveaux sériques d'IFN- γ , IL-6 et IL-18. L'ajout de CQ limite alors la toxicité et favorise l'efficacité de l'immunothérapie d'IL-2 dans des modèles murins de cancer du foie métastasé (Liang et al., 2012). Ainsi, cibler l'autophagie pourrait favoriser l'immunothérapie et des études cliniques utilisant HCQ en combinaison avec des immunothérapies sont actuellement en cours.

Travail expérimental

Contexte Scientifique

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus commun dans le monde et la seconde cause de mortalité liée au cancer. L'étiologie du CCR regroupe plusieurs facteurs, notamment, l'âge, la génétique, le mode de vie, le régime alimentaire, ainsi que les facteurs environnementaux. Une association entre l'inflammation intestinale, comme observée dans les maladies chroniques de l'intestin, et le risque de développer un CCR est bien connue et appelée CCR associé à l'inflammation chronique. L'évolution des tumeurs est fortement dépendante du micro-environnement tumoral dans lequel elles se développent. L'interaction complexe entre les cellules cancéreuses et la composante immunitaire du microenvironnement tumoral a été largement étudiée ces dernières années. Les cellules immunitaires infiltrantes comme les cellules myéloïdes suppressives, les macrophages associés aux tumeurs et les lymphocytes cytotoxiques sont des déterminants critiques du devenir cancéreux. Une association directe entre le pronostic des patients atteints de CCR et l'infiltrat immunitaire est d'ailleurs observée.

Le microbiote intestinal apparaît depuis quelques années comme un nouveau facteur favorisant le CCR. Plusieurs études ont mis en évidence une modification de la composition du microbiote associée à la muqueuse colique des patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles, avec une prévalence accrue des *Escherichia coli* producteurs de la colibactine, appelés CoPEC pour *Colibactin-producing E.coli*. Les CoPEC sont préférentiellement retrouvées chez les patients atteints d'un CCR de stade avancé (stade III/IV) par rapport à un stade précoce (stade I), suggérant une association entre une colonisation de CoPEC et le pronostic des patients. Des études fonctionnelles sur cellules eucaryotes ont montré que les CoPEC induisent la formation de ponts inter brins qui sont convertis en cassures doubles brin de l'ADN, lors de la réparation à l'ADN, ayant pour conséquence l'accumulation d'aberrations chromosomiques, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire. Les cellules infectées présentent un phénotype sécrétoire associé à la sénescence, avec la production de médiateurs pro-inflammatoires et facteurs de croissance qui, en retour,

stimulent la prolifération des cellules non infectées. *In vivo*, l'infection par les CoPEC favorise le développement tumoral dans différents modèles murins prédisposés au développement du CCR et affecte la composition du micro-environnement tumoral. Fait important, un lien direct entre une signature mutationnelle spécifique, causée par l'exposition des cellules épithéliales intestinales aux CoPEC, et des mutations activatrices du CCR a été déterminée. Si les propriétés génotoxiques et pro-tumorales des souches CoPEC sont bien décrites, ses capacités à initier le CCR ainsi que les mécanismes de défense de l'hôte contre l'infection par ces bactéries sont à ce jour peu connues. L'autophagie est un processus des cellules eucaryotes qui permet la dégradation d'éléments cytoplasmiques par le lysosome. Ce processus est fortement activé pour permettre l'adaptation des cellules en réponse à différents stress. Dans les cellules myéloïdes, l'autophagie est cruciale pour orchestrer la réponse immunitaire et joue un rôle important dans la destruction des bactéries intracellulaires, en diminuant la production d'espèces oxygénées réactives. L'autophagie est un contributeur bien connu du développement cancéreux et une signature des gènes de l'autophagie est fréquemment associée avec le pronostic des patients. Néanmoins, le mécanisme sous-jacent du rôle de l'autophagie dans le CCR ainsi que dans le micro-environnement tumoral associé est encore peu connu.

Une précédente étude au laboratoire a montré le rôle complexe de l'autophagie dans le CCR, par l'utilisation de souris génétiquement prédisposées *Apc^{Min/+}* qui ont été infectées ou non avec des CoPEC. En effet, dans une condition non infectée, l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales, appelées CEI, favorise la tumorigenèse colique. Cependant, à la suite de l'infection par les CoPEC, l'autophagie dans les CEI est nécessaire pour limiter les effets pro-tumoraux des CoPEC, diminuant ainsi le développement tumoral chez les souris *Apc^{Min/+}*.

Dans ce contexte, les objectifs majeurs de mon projet de thèse ont été : (i) d'examiner le rôle de l'autophagie au sein des CEI et des CoPEC dans l'induction de la carcinogenèse colique chez un modèle murin de CCR associé à l'inflammation chronique qui ne présentent pas de susceptibilité génétique ou d'utilisation d'agents carcinogènes et (ii) d'étudier le rôle de l'autophagie dans les cellules myéloïdes sur la carcinogenèse colorectale à la suite de l'infection par les CoPEC.

Etude 1

Résultats expérimentaux

A ce jour, toutes les études concernant les effets pro-carcinogènes de CoPEC ont été réalisées chez des modèles murins génétiquement susceptibles, comme *Apc^{Mim+}*, ou avec l'utilisation d'agents carcinogènes. Dans cette étude, nous avons testé l'habilité de CoPEC à induire la tumorigenèse colique dans un modèle murin d'inflammation chronique qui ne présente aucune susceptibilité génétique ou utilisation d'agent carcinogène. Nous avons également regardé quel serait l'impact d'une déficience de l'autophagie dans les CEI sur la tumorigenèse.

L'utilisation de souris sauvages (*Atg16l1^{flox/flox}*) ou déficientes pour l'autophagie dans les CEI (*Atg16l1^{ΔCEI}*), nous a permis d'examiner si l'infection par les CoPEC combinée avec une inflammation chronique pourrait induire la tumorigenèse colique. Les souris *Atg16l1^{flox/flox}* et *Atg16l1^{ΔCEI}* ont été infectées par gavage avec une souche CoPEC, isolée d'un patient CCR, ou son mutant incapable de produire la colibactine (11G5 Δ *clbQ*). Sept jours plus tard, les souris ont été soumises à 12 cycles de DSS (*Dextran sodium sulfate*). A la suite de l'infection par la souche 11G5, les souris *Atg16l1^{flox/flox}* et *Atg16l1^{ΔCEI}* affichaient une susceptibilité accrue au DSS, comparativement aux souris non infectées, représentée par un score clinique augmenté. Ce dernier a été déterminé à la fin de chaque cycle de DSS. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes infectés avec la 11G5 ou avec la 11G5 Δ *clbQ*. Par rapport aux souris sauvages, les souris *Atg16l1^{ΔCEI}* possédaient un score clinique accru à la suite d'une infection par la 11G5, ainsi que par la souche mutante. De plus, tout au long du traitement au DSS, une augmentation significative de la mortalité a été observée chez les souris *Atg16l1^{flox/flox}* et *Atg16l1^{ΔCEI}* infectées par rapport aux souris non infectées.

En outre, l'infection avec la souche 11G5 et non le mutant 11G5 Δ *clbQ* a induit la formation d'adénocarcinomes, ainsi que de carcinomes invasifs et ceci quel que soit le génotype des souris. L'infection avec la souche 11G5 est associée à une augmentation significative du score néoplasique comparativement avec l'infection par le mutant et la condition non infectée chez les souris *Atg16l1^{flox/flox}* et *Atg16l1^{ΔCEI}*. La déficience de l'autophagie dans les CEI a amplifié le score néoplasique lors de l'infection par la souche CoPEC. De plus, 70% des souris *Atg16l1^{ΔCEI}* infectées par la 11G5 ont développé des carcinomes coliques contre seulement 50% des souris *Atg16l1^{flox/flox}*. Le nombre de carcinomes invasifs est également augmenté chez les souris

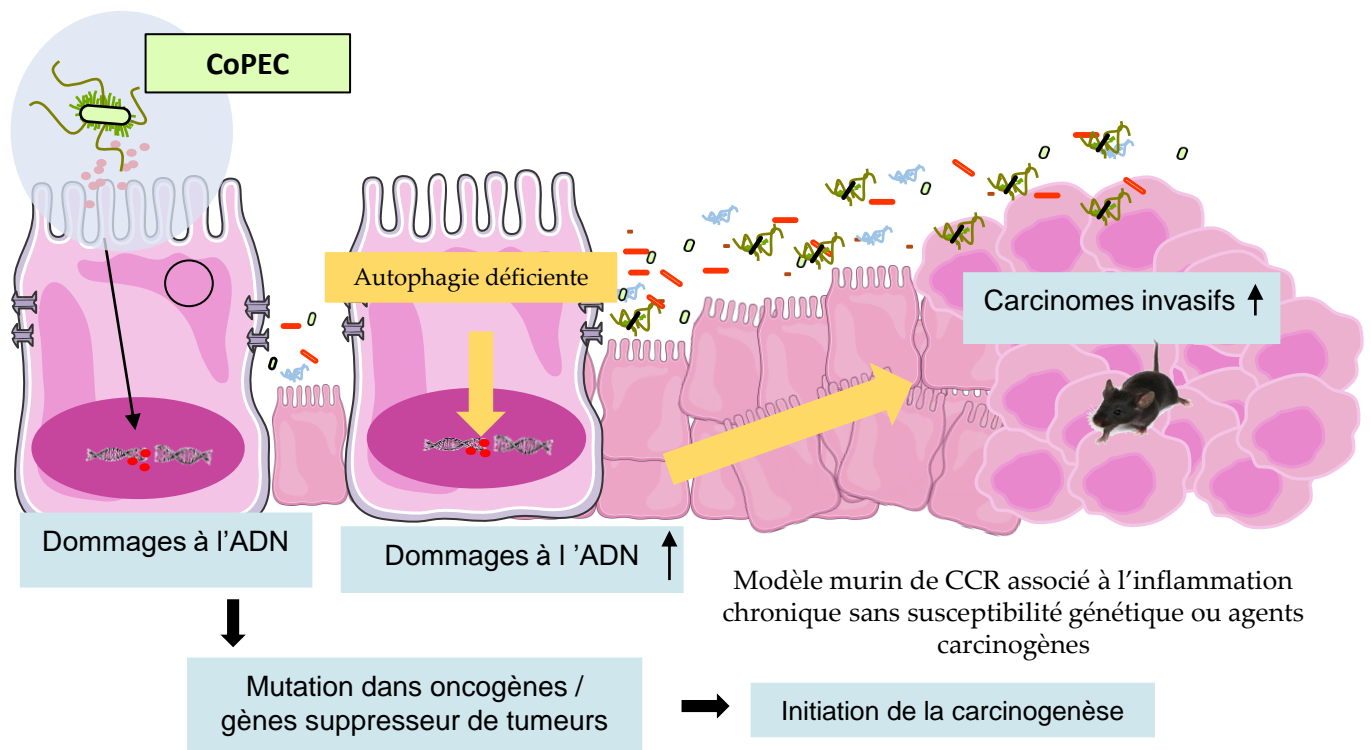


Figure 35 : Modèle proposé du rôle de CoPEC et de l'autophagie dans l'initiation du CCR associé à l'inflammation chronique




Dans un modèle murin associé à l'inflammation chronique qui ne présente pas de susceptibilité génétique ou utilisation d'agents carcinogènes, les CoPEC induisent des dommages à l'ADN, amenant probablement à des mutations dans des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs qui pourraient être responsables de l'initiation du CCR. L'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales permet de limiter les effets pro-carcinogènes de CoPEC. Une autophagie déficiente entraîne une augmentation des dommages à l'ADN responsable d'une augmentation de carcinomes invasifs.

Atg16l1^{ΔCEI} par rapport aux souris *Atg16l1^{fllox/fllox}* infectées par la 11G5. L'examen histologique a permis de mettre en évidence que l'infection avec la souche 11G5 et son mutant est liée avec une augmentation du score inflammatoire. Une déficience de l'autophagie a aggravé ce score chez les souris infectées avec la souche 11G5 et 11G5 Δ *clbQ*. Pour terminer, nous avons quantifié la phosphorylation H2AX (γ H2AX), utilisée pour détecter les cassures double brin de l'ADN lors d'une immunohistochimie. A la suite de l'infection par la 11G5, les souris *Atg16l1^{fllox/fllox}* présentaient une hausse de foyer γ H2AX par crypte comparativement à la condition non infectée ou infectée avec le mutant. Ce nombre est augmenté chez les souris déficientes pour l'autophagie mais seulement lors d'une infection par CoPEC.

L'ensemble des résultats obtenus montre pour la première fois un lien entre l'autophagie, CoPEC et le CCR par l'utilisation d'un modèle murin d'inflammation chronique. L'infection par CoPEC conduit à la formation de carcinomes invasifs de façon dépendante de la colibactine. Une déficience de l'autophagie dans les CEI favorise la tumorigenèse colique induite par CoPEC. Il est intéressant de relever que l'induction de la tumorigenèse chez un modèle murin d'inflammation chronique par les CoPEC et la déficience de l'autophagie est associée avec une augmentation des dommages à l'ADN (**Figure 35**).

Article

Colibactin-Producing *Escherichia coli* Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model

Laurène Salesse¹, Cécily Lucas¹, My Hanh Thi Hoang^{1,2}, Pierre Sauvanet^{1,3}, Alexandra Rezard¹, Philip Rosenstiel⁴, Christelle Damon-Soubeyrand⁵, Nicolas Barnich¹ , Catherine Godfraind^{1,6}, Guillaume Dalmasso¹  and Hang Thi Thu Nguyen^{1,*} 

- ¹ M2iSH, UMR 1071 Inserm, Université Clermont Auvergne, INRAE USC 2018, CRNH, 63001 Clermont-Ferrand, France; laurene.salesse@uca.fr (L.S.); cecily.lucas@uca.fr (C.L.); thi_my_hanh.hoang@uca.fr (M.H.T.H.); pierre.sauvanet@uca.fr (P.S.); alexandra.rezard@uca.fr (A.R.); nicolas.barnich@uca.fr (N.B.); cgodfraind@chu-clermontferrand.fr (C.G.); guillaume.dalmasso@uca.fr (G.D.)
- ² Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University (VNU), Hanoi 100000, Vietnam
- ³ Department of Digestive and Hepatobiliary Surgery, CHU Estaing, 63001 Clermont-Ferrand, France
- ⁴ Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University and University Hospital Schleswig-Holstein, 24148 Kiel, Germany; p.rosenstiel@muco.sa.de
- ⁵ GRd, CNRS UMR 6293 INSERM U110, Université Clermont Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France; christelle.soubeyrand-damon@uca.fr
- ⁶ Department of Pathology, CHU Gabriel Montpied, 63001 Clermont-Ferrand, France
- * Correspondence: hang.nguyen@uca.fr; Tel.: +33-473178381; Fax: +33-473178371



Citation: Salesse, L.; Lucas, C.; Hoang, M.H.T.; Sauvanet, P.;

Rezard, A.; Rosenstiel, P.; Damon-Soubeyrand, C.; Barnich, N.; Godfraind, C.; Dalmasso, G.; et al. Colibactin-Producing *Escherichia coli* Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model. *Cancers* **2021**, *13*, 2060. <https://doi.org/10.3390/cancers13092060>

Academic Editor: Yoshitaka Hippo

Received: 12 April 2021

Accepted: 21 April 2021

Published: 24 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Changes in the composition of the intestinal flora have been reported in patients with colorectal cancer, the second leading cause of cancer death in the world, with an increase in so-called "harmful" bacteria. Among these, *Escherichia coli* producing colibactin, a toxin that causes DNA damage, has attracted the interest of many research groups. Here, we showed that infection of wild-type mice with a colibactin-producing *E. coli* (CoPEC) strain, isolated from a patient with colorectal cancer, combined with chronic inflammation induced the formation of invasive colonic tumors, i.e., tumors that spread beyond epithelial layer and grow into surrounding tissues. We also showed that autophagy, a cell defense process, is necessary to inhibit the tumorigenesis induced by CoPEC. Thus, this work highlights the role of CoPEC as a driver of colorectal cancer development, and suggests that targeting autophagy could be a promising strategy to inhibit the protumoral effects of these bacteria.

Abstract: Background: *Escherichia coli* producing the genotoxin colibactin (CoPEC or colibactin-producing *E. coli*) abnormally colonize the colonic mucosa of colorectal cancer (CRC) patients. We previously showed that deficiency of autophagy in intestinal epithelial cells (IECs) enhances CoPEC-induced colorectal carcinogenesis in *Apc*^{Min/+} mice. Here, we tested if CoPEC trigger tumorigenesis in a mouse model lacking genetic susceptibility or the use of carcinogen. Methods: Mice with autophagy deficiency in IECs (*Atg16l1*^{ΔIEC}) or wild-type mice (*Atg16l1*^{fllox/fllox}) were infected with the CoPEC 11G5 strain or the mutant 11G5ΔclbQ incapable of producing colibactin and subjected to 12 cycles of DSS treatment to induce chronic colitis. Mouse colons were used for histological assessment, immunohistochemical and immunoblot analyses for DNA damage marker. Results: 11G5 or 11G5ΔclbQ infection increased clinical and histological inflammation scores, and these were further enhanced by IEC-specific autophagy deficiency. 11G5 infection, but not 11G5ΔclbQ infection, triggered the formation of invasive carcinomas, and this was further increased by autophagy deficiency. The increase in invasive carcinomas was correlated with enhanced DNA damage and independent of inflammation. Conclusions: CoPEC induce colorectal carcinogenesis in a CRC mouse model lacking genetic susceptibility and carcinogen. This work highlights the role of (i) CoPEC as a driver of CRC development, and (ii) autophagy in inhibiting the carcinogenic properties of CoPEC.

Keywords: colorectal cancer; microbiota; colibactin-producing *E. coli*; autophagy; toxin

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer around the world, with 1.85 million of new cases per year and the second leading cause of death by cancer with 880,000 recorded deaths worldwide [1]. The etiology of CRC is multifactorial, including age, genetics, lifestyle, diet, and environmental factors [2]. An association between chronic intestinal inflammation, as observed in inflammatory bowel disease, and an increased risk for CRC development has been reported and called by colitis-associated CRC [3].

The involvement of gut microbiota in CRC pathogenesis has received much attention during the past few years [2]. Metagenomic approaches have shown that in CRC patients, compared to healthy subjects, the gut microbiota has lower abundance of protective taxa and higher abundance of procarcinogenic taxa such as *Bacteroides*, *Escherichia* and *Fusobacterium* [4,5]. To support a role for the gut microbiota in colorectal carcinogenesis, studies using carcinogen-induced or genetically susceptible mouse models have been performed. One of the most common genetically susceptible mouse models of CRC is *Apc*^{Min/+} mice, which carry a loss-of-function germinal mutation in the *Apc* gene, leading to spontaneous formation of multiple adenomas in the intestine and the colon [6]. *Apc*^{Min/+} mice bearing microbiota develop more intestinal and colorectal tumors compared with germ-free *Apc*^{Min/+} mice [7]. Recently, it was shown that *Apc*^{Min/+} mice receiving the fecal samples from CRC patients develop increased number of intestinal adenomas and a more advanced tumor development compared with those receiving fecal samples from healthy subjects [8]. In a colitis-associated CRC mouse model chemically induced by azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS), antibiotic treatment significantly decreases the number, the size and the histological score of the colonic tumors [9]. Furthermore, transfer of fecal samples from patients with CRC enhances intestinal cell proliferation in germ-free mice and promotes tumor formation in conventional mice that were pre-treated with antibiotics and then with AOM [10].

Besides these findings showing a direct association between the gut microbiota and CRC development, increasing evidence has revealed the effects of bacteria-derived products on carcinogenesis. Among these, the carcinogenic compound colibactin, a polyketide-derived genotoxin produced by *Escherichia coli*, has attracted interest from researchers. Colibactin-producing *Escherichia coli* (CoPEC) have been shown to be more prevalent in the biopsies of CRC patients compared to control patients [11–14]. CoPEC are more frequently identified in CRC patients with tumor-node-metastasis (TNM) stage II and III/IV than in patients with TNM stage I, suggesting an association between CoPEC colonization and the poor prognostic factors for CRC [15]. In vitro and in vivo studies have demonstrated the carcinogenic properties of colibactin and the implication of CoPEC in colorectal carcinogenesis [2]. Colibactin induces DNA interstrand cross-links, that is converted into DNA double-strand breaks (DSBs) in mammalian cells during the repair response, leading to chromosomal aberrations and cell cycle arrest [16–18]. A recent study showed that colibactin alkylates DNA in vivo, generating DNA adducts in mammalian cells and in germ-free mice [19]. Importantly, a direct link between a distinct mutational signature caused by exposure of human intestinal epithelial cells (IECs) to CoPEC and known CRC driver mutations was shown [20].

Infection with CoPEC has been shown to promote colon tumorigenesis in mouse models of CRC, such as *Apc*^{Min/+} mice [15,21], AOM-treated *il10*^{-/-} mice [11], AOM/DSS-treated mice [22] or *Apc*^{Min/+}/*il10*^{-/-} mice [23]. Different mechanisms underlying the carcinogenic effects of CoPEC infection have been revealed. For example, following the formation of DNA DSBs, the cells infected with CoPEC undergo cell cycle arrest and display cellular senescence [22]. This phenotype is accompanied by the production of inflammatory mediators and growth factors, promoting the proliferation of uninfected

cells and tumorigenesis in CRC predisposed mice [22]. We recently showed that autophagy, a highly regulated stress responsive process that degrades potentially dangerous cytosolic components via the lysosomal pathway [24], is a key mechanism of host defense to CoPEC infection [21]. Indeed, autophagy in IECs is necessary to inhibit the genotoxic and protumoral properties of CoPEC, limiting CoPEC-induced colorectal carcinogenesis in *Apc^{Min/+}* mice [21].

So far, investigations of the protumoral effects of CoPEC have been performed in genetically susceptible mouse models of CRC, such as *Apc^{Min/+}* mice [15,21], or mouse models including the use of a carcinogen [11,22]. In the current study, we tested the ability of CoPEC to induce tumorigenesis in a mouse model with DSS-induced chronic inflammation which lacks genetic susceptibility or the use of a carcinogen, and examined the impact of IEC-specific autophagy deficiency on tumorigenesis in these models.

2. Results

2.1. CoPEC Infection Increases Clinical Score in a Mouse Model of Chronic DSS Treatment, Independently of Colibactin, and This Is Further Enhanced by Intestinal Autophagy Deficiency

Previous studies have shown that CoPEC infection promotes colon tumorigenesis in genetically susceptible or carcinogen-induced mouse models of CRC [2]. Here, we investigated whether CoPEC infection combined with chronic inflammation can enhance colon tumorigenesis in wild-type mice. The role of autophagy in this model was also investigated as we previously showed that autophagy in IECs is necessary to inhibit CoPEC-induced colon tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice [21]. For this, mice deficient for the autophagy-related gene *Atg16l1* specifically in IECs (*Atg16l1^{lox/lox}CreVillin* or *Atg16l1^{ΔIEC}*) or the wild-type mice (*Atg16l1^{lox/lox}*) were infected with the CoPEC 11G5 strain isolated from a CRC patient or a mutant strain that does not produce colibactin (11G5ΔclbQ) and were subjected to 12 cycles of DSS treatment (each cycle consisted of 1% of DSS in drinking water for 5 days followed by 14-day of regular water; Figure 1a).

Under 11G5 or 11G5ΔclbQ infection, *Atg16l1^{lox/lox}* or *Atg16l1^{ΔIEC}* mice displayed a higher susceptibility to DSS treatment, compared to uninfected mice (or + PBS groups, i.e., the mice were gavaged only with PBS), as shown by higher clinical disease score, determined at the end of each DSS treatment based on 3 parameters, including body weight loss, stool consistency, and the presence of occult blood in the stool (Figure 1b). No significant difference in clinical disease score to the chronic DSS treatment was observed between 11G5-infected and 11G5ΔclbQ-infected groups (Figure 1b). Compared to *Atg16l1^{lox/lox}* mice, *Atg16l1^{ΔIEC}* mice exhibited increased clinical disease score upon DSS treatment under both 11G5- or 11G5ΔclbQ-infected conditions (Figure 1b). We noticed that the clinical score of all groups tended to be increased after the 8th DSS treatment compared to the 4th DSS treatment, although the difference was not significant (Figure 1b). Furthermore, during the chronic DSS treatment, a significant increase in mortality was observed for 11G5- or 11G5ΔclbQ-infected *Atg16l1^{ΔIEC}* mice compared to + PBS groups (Figure 1c). Together, these data showed that CoPEC infection increases the susceptibility of mice to the chronic DSS treatment, independently of colibactin, and this was further enhanced by autophagy deficiency in IECs. Combination of autophagy deficiency in IECs and CoPEC infection enhances the mortality of mice compared to uninfected condition.

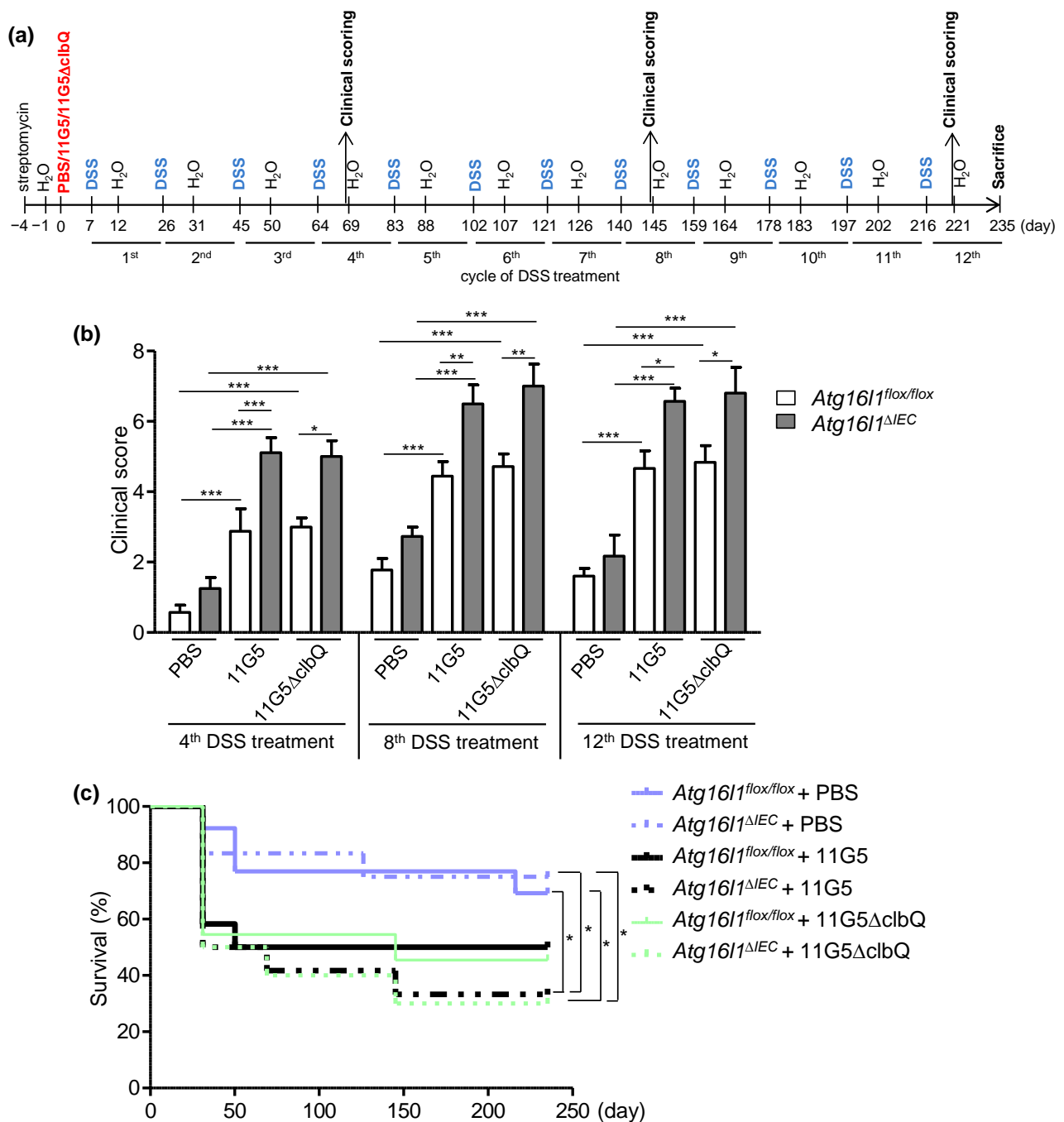


Figure 1. CoPEC infection increases the susceptibility of mice to the chronic DSS treatment independently of colibactin, and this is further enhanced by autophagy deficiency in IECs. **(a)** In vivo infection protocol. *Atg16l1^{flx/flx}* and *Atg16l1^{ΔIEC}* mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 h before being orally administered (day 0) with PBS or with 10⁹ colony-forming units of 11G5 bacteria or the mutant 11G5ΔclbQ. Seven days later, the mice were subjected to 12 cycles of DSS treatment, with each cycle consisted of 1% of DSS in drinking water for 5 days followed by 14-day of regular water. **(b)** Clinical activity score was determined based on the assessment of body weight loss, stool consistency, and the presence of occult blood in the stool after the 4th, 8th and 12th DSS treatment (after 5 days of treatment, just before the mice were given regular water). Results are means ± SEM. *N* = 10 mice/group for + PBS and 11G5-infected conditions; *N* = 6 mice/group for 11G5ΔclbQ-infected condition. **(c)** Survival of mice during the chronic DSS treatment. *Atg16l1^{flx/flx}* + PBS: *N* = 13; *Atg16l1^{ΔIEC}* + PBS: *N* = 12; *Atg16l1^{flx/flx}* + 11G5: *N* = 12; *Atg16l1^{ΔIEC}* + 11G5: *N* = 12; *Atg16l1^{flx/flx}* + 11G5ΔclbQ: *N* = 11; *Atg16l1^{ΔIEC}* + 11G5ΔclbQ: *N* = 10. * *p* < 0.05; ** *p* ≤ 0.01; *** *p* ≤ 0.001 by one-way Anova, followed by a post-test Bonferroni in **(b)** and Gehan-Breslow-Wilcoxon test in **(c)**.

2.2. CoPEC Infection Promotes Colon Tumorigenesis in a Mouse Model of Chronic DSS Treatment, and This Was Further Enhanced by Autophagy Deficiency in IECs

Importantly, infection with 11G5, but not the mutant 11G5 Δ clbQ, triggered the formation of adenocarcinomas as shown by representative images of the colons of mice at sacrifice (Figure 2) and histological examination (Figure 3). Histological examination revealed invasive carcinomas in 11G5-infected groups, but not in +PBS or 11G5 Δ clbQ-infected groups (Figure 3). Invasion of the glands through the muscularis mucosa into the submucosa was observed in both 11G5-infected *Atg16l1*^{fllox/fllox} and 11G5-infected *Atg16l1* ^{Δ IEC} mice (black arrows, Figure 3). Infection with 11G5 was associated with significantly increased neoplasia score, determined based on the criteria in Table 1, compared to +PBS and 11G5 Δ clbQ-infected conditions for both *Atg16l1*^{fllox/fllox} and *Atg16l1* ^{Δ IEC} mice (Figures 3 and 4a).

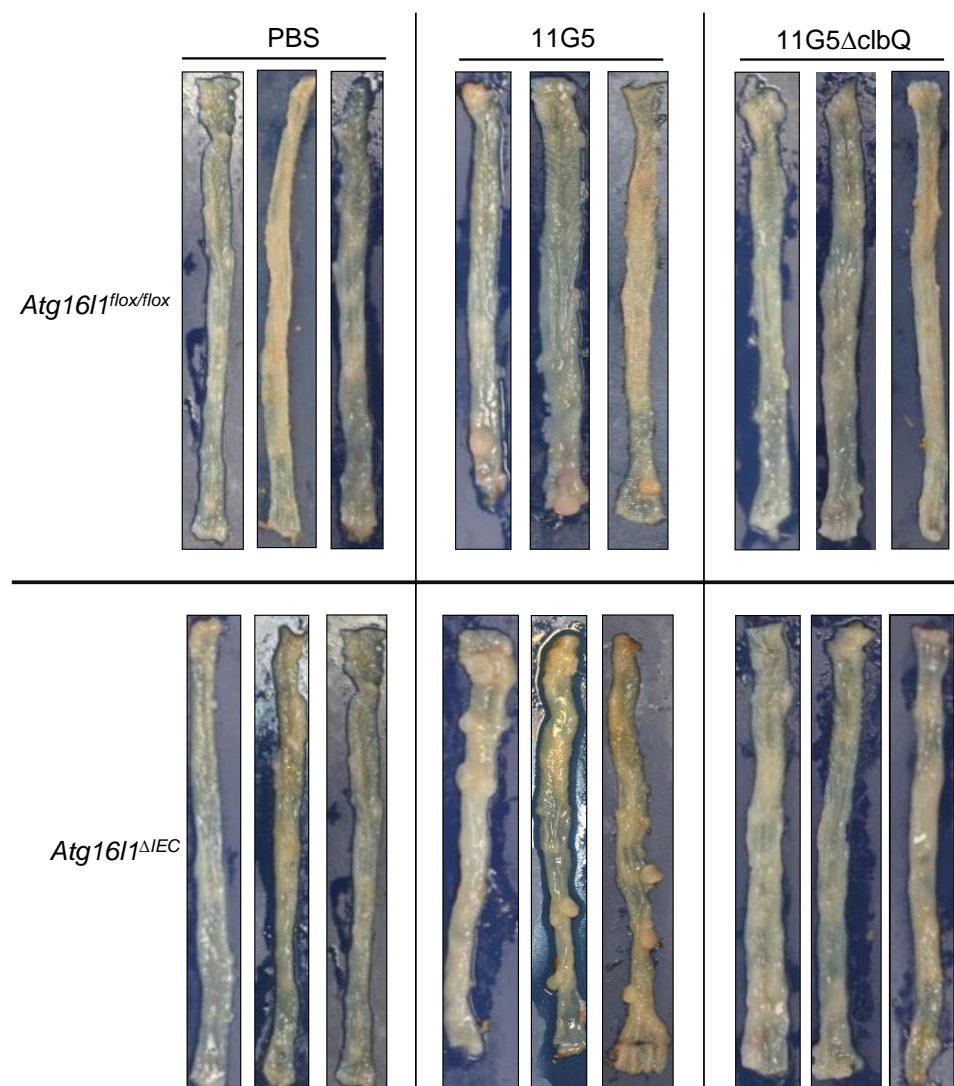


Figure 2. CoPEC infection induces colon tumorigenesis in a mouse model of chronic DSS treatment, and this is further enhanced by autophagy deficiency in IECs. *Atg16l1*^{fllox/fllox} and *Atg16l1* ^{Δ IEC} mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 h before being orally administered (day 0) with PBS or with 10^9 colony-forming units of 11G5 bacteria or the mutant 11G5 Δ clbQ. Seven days later, the mice were subjected to 12 cycles of DSS treatment. Representative photos of the colons taken at the sacrifice were shown. The images are representatives of $N = 10$ mice/group for +PBS and 11G5-infected conditions, and $N = 6$ mice/group for 11G5 Δ clbQ-infected condition.

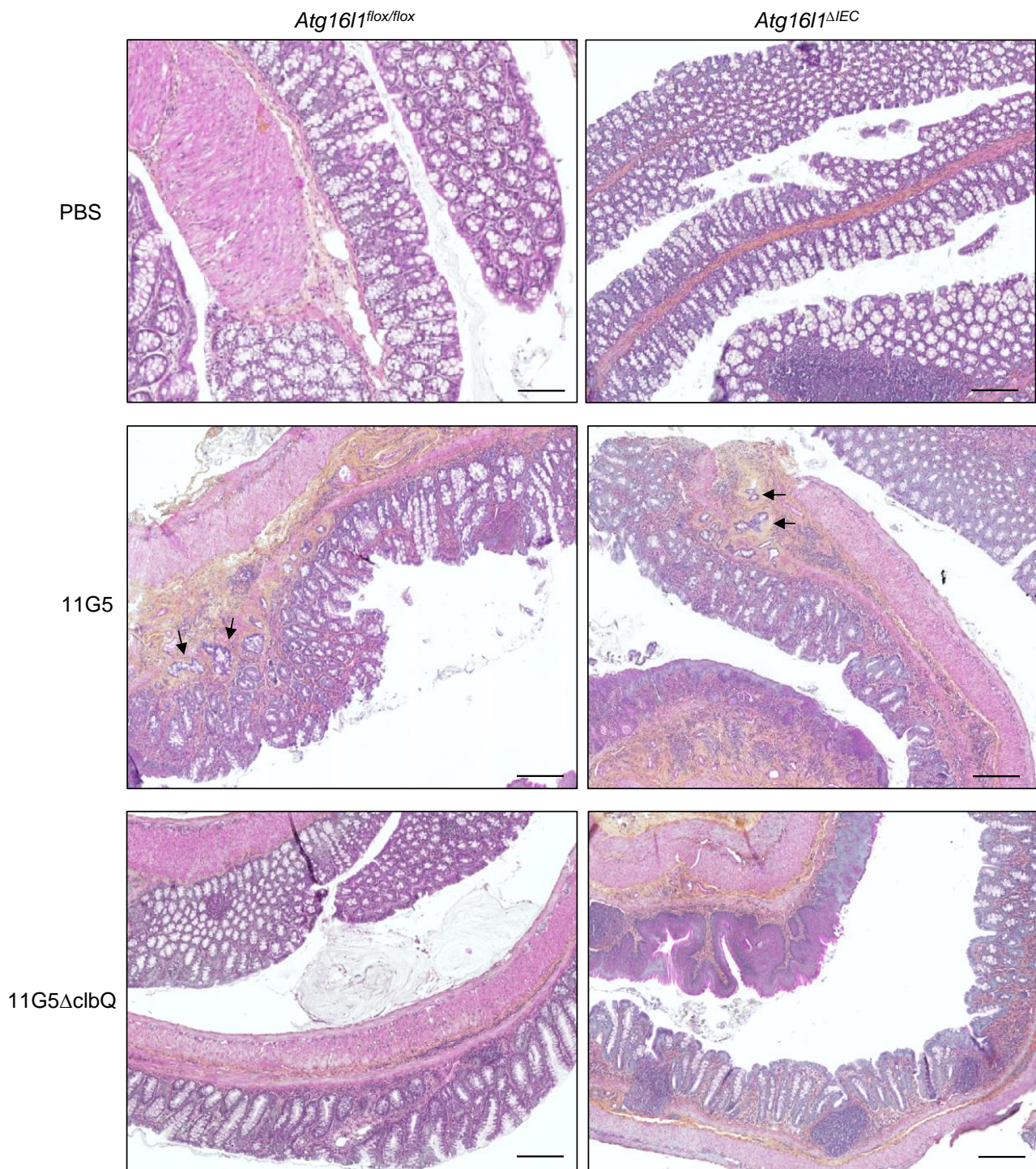


Figure 3. CoPEC infection triggers the formation of invasive adenocarcinomas in a mouse model of chronic DSS treatment, and this was further enhanced by autophagy deficiency in IECs. *Atg16l1^{fllox/fllox}* and *Atg16l1^{ΔIEC}* mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 h before being orally administered (day 0) with PBS or with 10^9 colony-forming units of 11G5 bacteria or the mutant 11G5ΔclbQ. Seven days later, the mice were subjected to 12 cycles of DSS treatment. Sections of the colons taken at the sacrifice were H&E-stained. The images are representatives of $N = 10$ mice/group for +PBS and 11G5-infected conditions, and $N = 6$ mice/group for 11G5ΔclbQ-infected condition. Black arrows show invasion of the glands through the muscularis mucosa. Bars = 200 μm .

Table 1. Neoplasia score. To determine the neoplasia score, the criteria in the following table were examined for each mouse, giving a score. This score was then multiplied by “1” if 0–50% of the tumors of the mouse were invasive carcinomas and “2” if 50–100% of the tumors of the mouse were invasive carcinomas. The final value is the neoplasia score.

Evaluation Criteria	Score
No cancer: Normal gland architecture	0
Low-grade dysplasia	1
Moderate dysplasia	2
High-grade dysplasia, carcinoma in situ	3
Invasive carcinoma	4

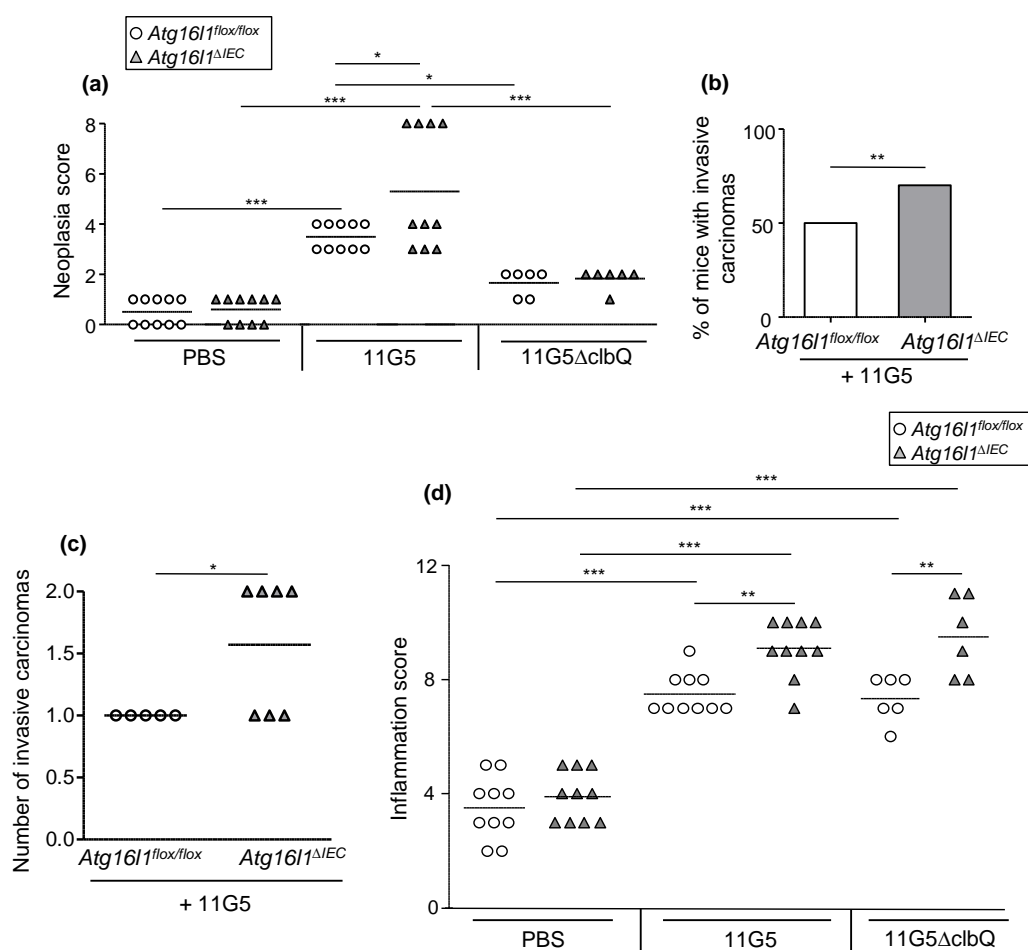


Figure 4. CoPEC infection induces colon tumorigenesis in a mouse model of CRC, independently of inflammation, and this was further enhanced by intestinal autophagy deficiency. *Atg16l1^{fllox/fllox}* and *Atg16l1^{ΔIEC}* mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 h before being orally administered (day 0) with PBS or with 10^9 colony-forming units of 11G5 bacteria or the mutant 11G5ΔclbQ. Neoplasia score (a), percentage of mice with invasive adenocarcinomas (b), number of invasive carcinomas (c) and inflammation score (d) were determined based on the histological evaluation of the colonic sections under blinded conditions by an expert pathologist. * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ by one-way Anova, followed by a post-test Bonferroni in (a,d), the Fisher exact test in (b), and two-way t test in (c). (a,c,d) Each symbol represents data from one mouse, lines at mean. (a,b,d) $N = 10$ mice/group for +PBS and 11G5-infected conditions, and $N = 6$ mice/group for 11G5ΔclbQ-infected condition. (c) *Atg16l1^{fllox/fllox}* + 11G5: $N = 5$; *Atg16l1^{ΔIEC}* + 11G5: $N = 7$.

Autophagy deficiency in IECs further enhanced neoplasia score in 11G5-infected mice, but not in 11G5 Δ clbQ-infected mice (Figures 3 and 4a). Furthermore, 70% of 11G5-infected *Atg16l1* Δ IEC mice surviving after the chronic DSS treatment developed carcinomas in the colon, whereas 50% of 11G5-infected *Atg16l1*^{fllox/fllox} mice developed these (** $p = 0.0059$; Figure 4b). The number of invasive carcinomas in 11G5-infected *Atg16l1* Δ IEC mice (1.571 ± 2.202) was also increased compared to that in 11G5-infected *Atg16l1*^{fllox/fllox} mice (1 ± 0) (* $p = 0.04$; Figure 4c).

Together, these data indicated that CoPEC infection induces colon tumorigenesis in a mouse model of chronic DSS treatment. Deficiency of autophagy in IECs led to increased number of 11G5-infected mice to develop invasive carcinomas and increased number of invasive carcinomas.

2.3. CoPEC Infection and Autophagy Deficiency in IECs Enhance Colonic Inflammation in Chronic DSS Treatment Independently of Colibactin

As inflammation is an important factor contributing to CRC development, we next examined intestinal inflammation in *Atg16l1*^{fllox/fllox} and *Atg16l1* Δ IEC mice. Histological examination showed that infection with 11G5 or 11G5 Δ clbQ was associated with enhanced histological inflammation score, determined based on the criteria in Table 2 (Figure 4d). Intestinal autophagy deficiency aggravated inflammation score in both 11G5-infected and 11G5 Δ clbQ-infected mice, but not in + PBS mice (Figure 4d). No difference in inflammation score were found between 11G5-infected and 11G5 Δ clbQ-infected groups (Figure 4d).

Table 2. Inflammation score.

Evaluation Criteria	Score
Crypt hyperplasia	0: Absent
	1: Mild
	2: Moderate
	3: Marked
Crypt architecture	0: Intact crypt
	1: Irregular crypt (non-parallel crypts, variable crypt diameters, bifurcation and branched crypts)
	2: Crypt loss
Ulceration	0: Absent
	1: Present
Loss of surface epithelium	0: Absent
	1: Focal
	2: Extended
Abscess	0: Absent
	1: Focal
	2: Extended
<i>Lamina propria</i> inflammation	0: No inflammation or rare inflammatory cells in the <i>lamina propria</i>
	1: Minimal, focal (increased inflammatory cells in the <i>lamina propria</i>)
	2: Moderate, mild extended (inflammatory cells extending into the submucosa)
	3: Transmural extension of the inflammatory infiltrate
Sub mucosa inflammation/edema	0: Absent
	1: Slight
	2: Moderate
	3: Severe

Together, these data indicated that CoPEC infection and autophagy deficiency in IECs enhance colonic inflammation independently of colibactin.

2.4. Autophagy Is Necessary to Limit CoPEC-Induced Colonic DNA Damage in the Mouse Model of Chronic DSS Treatment

We next investigated the role of colibactin and autophagy in CoPEC-induced DNA damage in the chronic DSS treatment. Quantification of H2AX phosphorylation (γ H2AX) foci as well as foci formed by other repair proteins, such as MRE11, 53BP1, RAD51, etc., has been used to detect DNA DSBs [25]. Here, we performed immunohistochemical staining to detect γ H2AX as this marker has been used in numerous important studies to show CoPEC-induced DNA damage [11,17,18,21,22]. We showed that 11G5-infected *Atg16l1^{flox/flox}* mice exhibited increased number of γ H2AX foci per colonic crypt compared to *Atg16l1^{flox/flox}* + PBS or 11G5 Δ clbQ-infected *Atg16l1^{flox/flox}* mice (Figure 5a,b). Importantly, the number of γ H2AX foci per colonic crypt was higher in 11G5-infected *Atg16l1^{\Delta}IEC* mice compared to 11G5-infected *Atg16l1^{flox/flox}* mice (Figure 5a,b).

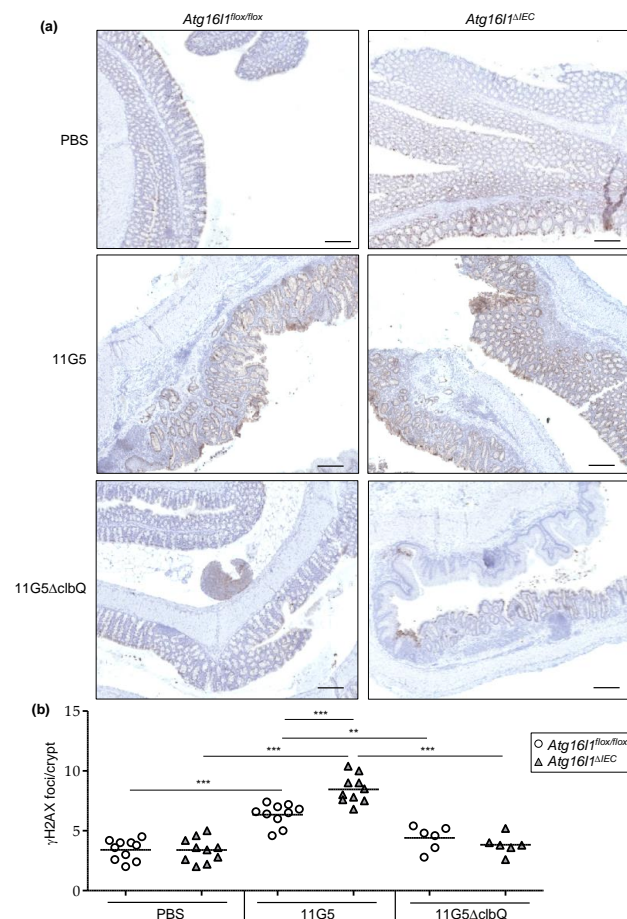


Figure 5. CoPEC infection increases marker of DNA damage in colonic crypt in a mouse model of chronic DSS treatment, and this was further enhanced by autophagy deficiency in IECs. *Atg16l1^{flox/flox}* and *Atg16l1^{\Delta}IEC* mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 h before being orally administered (day 0) with PBS or with 10^9 colony-forming units of 11G5 bacteria or the mutant 11G5 Δ clbQ. (a) Immunohistochemical staining for γ H2AX in mouse colonic sections. Bars = 200 μ m. (b) Quantification of γ H2AX foci number per crypt determined from 20 crypts/mouse, $N = 10$ mice/group for +PBS or 11G5-infected mice, $N = 6$ mice/group for 11G5 Δ clbQ-infected mice. Each symbol represents data from one mouse, lines at mean. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ by one-way ANOVA, followed by a post-test Bonferroni.

These results were further confirmed by western blot analysis, which showed increased level of γ H2AX in the colonic mucosa of 11G5-infected *Atg16l1^{fllox/fllox}* mice compared to *Atg16l1^{fllox/fllox}* + PBS or 11G5 Δ clbQ-infected *Atg16l1^{fllox/fllox}* mice (Figure 6a,b). Upon 11G5 infection, there was an increase in γ H2AX level in the colonic mucosa of *Atg16l1 Δ IEC* compared to *Atg16l1^{fllox/fllox}* mice (Figure 6a,b). Finally, autophagy status in the colonic mucosa from these mice was verified by western blot analysis for the levels of LC3-I (cytosolic form) and LC3-II (autophagosome-associated form and a marker of autophagy [26]) using the same lysates. As shown in Figure 6c,d, 11G5 infection resulted in increased LC3-II level, indicating autophagy activation, in the colonic mucosa of *Atg16l1^{fllox/fllox}* mice. This was consistent with our previous study showing the activation of autophagy in IECs upon infection with the CoPEC strains [21]. As expected, we did not detect LC3-II in *Atg16l1 Δ IEC* mice under both +PBS and 11G5-infected conditions (Figure 6c,d).

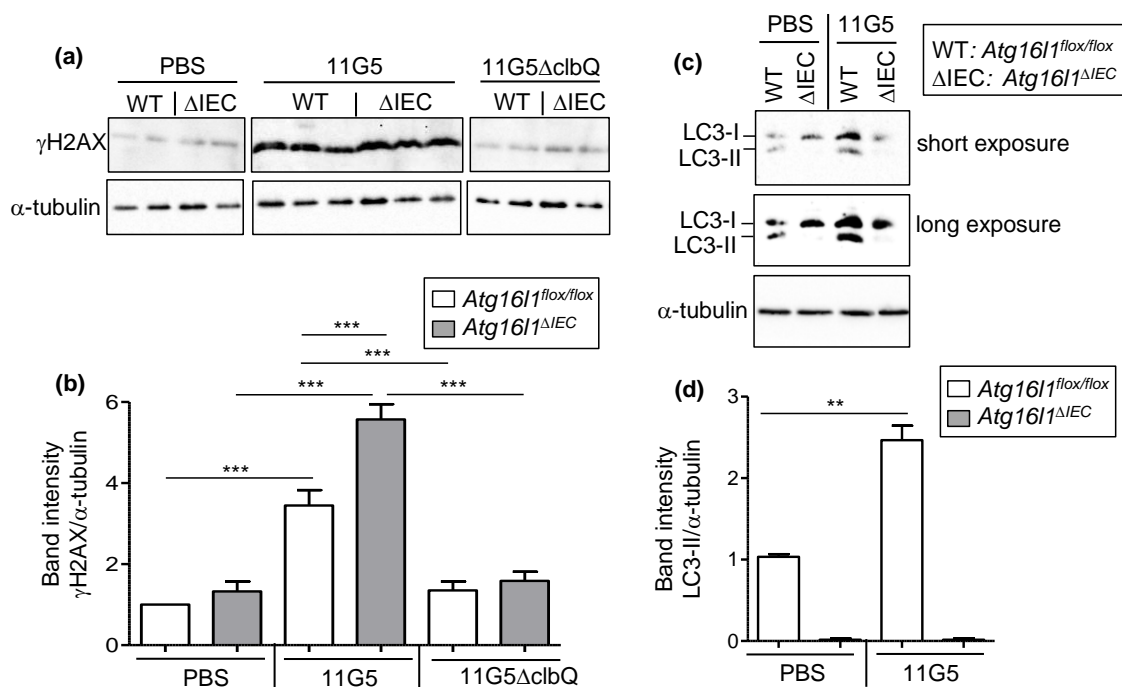


Figure 6. CoPEC infection increases the level of DNA damage marker in the colons of chronic DSS-treated mice, and this was further enhanced by intestinal autophagy deficiency. *Atg16l1^{fllox/fllox}* (WT) and *Atg16l1 Δ IEC* (Δ IEC) mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 h before being orally administered (day 0) with PBS or with 10^9 colony-forming units of 11G5 bacteria or the mutant 11G5 Δ clbQ. (a,c) Representative western blot analysis of γ H2AX (a) and LC3 (c) levels in the colonic mucosa. The uncropped Western blots have been shown in Figure S1. (b,d) Quantification of western blot band intensity from $N = 6$ /group. Results are means \pm SEM. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ by one-way ANOVA, followed by a post-test Bonferroni.

Together, these data indicated that CoPEC induce colonic DNA damage in the chronic DSS treatment via producing colibactin. Intestinal autophagy is essential to limit colibactin-induced DNA damage in this mouse model.

3. Discussion

Mutations in core autophagy-related genes are associated with numerous diseases, such as neurological disorders, inflammatory diseases or cancers [27]. Autophagy is well known to contribute to cancer development, and autophagy gene signature is frequently associated with patient prognosis [28–32]. Nevertheless, the mechanism underlying the role of autophagy in colorectal carcinogenesis is still unclear as autophagy can have both pro- and anti-tumoral functions. In this regard, we previously showed the complex role of autophagy in the colorectal carcinogenesis in *Apc^{Min/+}* mice under uninfected and CoPEC-

infected conditions [21]. Indeed, in *Apc^{Min/+}* mice, under uninfected condition, autophagy in IECs is necessary to promote colonic tumorigenesis, but upon CoPEC infection, this process limits CoPEC-induced tumorigenesis [21].

Concerning the CRC, no direct association between a specific bacterium and the cancer initiation has been described. Nevertheless, the role of autophagy in host defense against *Fusobacterium nucleatum*, a bacterium associated with colorectal carcinogenesis [2], has been investigated. It was shown that *F. nucleatum*, by targeting the TLR4-MYD88 innate immune signaling and specific microRNAs, activates autophagy to promote colorectal cancer resistance to chemotherapy [33]. Level of BECLIN 1, a key positive regulator of autophagy that initiates autophagosome formation, was recently shown to be inversely correlated with the quantity of *F. nucleatum* in colorectal tumors [34]. These findings suggest a role for autophagy in the elimination of *F. nucleatum* from the tumor microenvironment. Concerning CoPEC, which have shown great interest in CRC research [2], we recently showed that autophagy in IECs is necessary to inhibit the protumoral effects of CoPEC, suppressing colorectal carcinogenesis in CoPEC-infected *Apc^{Min/+}* mice [21]. So far, the protumoral effects of CoPEC have been shown in mouse models of CRC, which present either genetic susceptibility or the use of a carcinogen [11,15,21–23].

Here, we demonstrated, for the first time, a link between autophagy, CoPEC and CRC by using a chronic inflammation-associated mouse model. For this, a mouse model of long-term, chronic DSS treatment was employed. It has previously been shown that CoPEC infection does not induce tumorigenesis in wild-type and untreated mice [2]. The use of DSS has been usually used following a prior administration of the carcinogen AOM to induce colorectal tumorigenesis in mice, leading to the well-established AOM/DSS model of colitis-associated CRC [35]. In this study, to better define the implication of CoPEC in carcinogenesis, the use of AOM was replaced by CoPEC infection. We showed that CoPEC infection triggers the formation of invasive adenocarcinomas, and colibactin is required for this effect. IEC-specific autophagy deficiency leads to enhanced tumorigenesis induced by CoPEC infection in this model. Importantly, we showed that the induction of tumorigenesis in the mouse model of chronic DSS treatment by CoPEC infection and intestinal autophagy deficiency was associated with increased DNA damage in the colonic crypts. We previously showed that autophagy in IECs is necessary for the recruitment of the DNA repair protein, RAD51, to the sites of DNA DSBs, limiting colibactin-induced DNA damage [21]. Thus, autophagy deficiency in IECs may lead to the appearance of mutations in the genes implicated in carcinogenesis, enhancing the formation of adenomatous lesions. Our hypothesis is strongly supported by a recent publication showing a direct role of CoPEC in the occurrence of oncogenic mutations [20]. Indeed, the whole-genome sequencing of human intestinal organoids exposed to genotoxic CoPEC revealed a distinct mutational signature that was identical with the mutational signature detected in a subset of 5,876 human cancer genomes from two independent cohorts [20].

As a close relationship between inflammation and cancer has been shown, we then investigated whether inflammation is implicated in the induction of colon tumorigenesis by CoPEC infection and autophagy deficiency in IECs. Indeed, autophagy in IECs has been shown to inhibit intestinal inflammation [36]. Another study showed that mutant mice that inducibly express UVRAG, a tumor suppressor gene involved in autophagy process, display increased inflammatory response in colitis-associated cancer development and promote spontaneous tumorigenesis associated to age-related autophagy suppression [37]. Furthermore, *H. pylori* disrupts the autophagy pathway, promoting chronic inflammation and associated damages which favor *H. pylori*-mediated gastric tumorigenesis [38]. These results are in agreement with our previous study showing that autophagy deficiency in IECs enhances colon tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice infected with the CoPEC 11G5 strain, and this was associated with increased mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the nontumoral colonic mucosa [21]. In the current study, we showed that compared to the uninfected condition, 11G5 or 11G5 Δ clbQ infection increased clinical and histological inflammation scores. Furthermore, autophagy deficiency in IECs further

enhanced clinical and histological inflammation scores in 11G5- or 11G5 Δ clbQ-infected mice, but not in uninfected mice. This was not consistent with a previous study showing that autophagy deficiency in IECs leads to increased survival, clinical disease score and colon histopathology score in mice treated with 5% DSS for 6 days under uninfected condition [39]. However, this difference could be due to the difference in DSS concentration and the time of DSS treatment. No difference in clinical and histological inflammation score was observed between 11G5- and 11G5 Δ clbQ-infected conditions either in wild-type mice or mice with IEC-specific autophagy deficiency. This data was in agreement with other studies showing that CoPEC induce inflammation independently of colibactin [11,22]. Thus, these data showed that CoPEC infection and autophagy deficiency in IECs enhance colon tumorigenesis in the mouse model of chronic DSS treatment via inducing DNA damage and independently of inflammation.

In conclusion, our study showed that CoPEC exhibit their carcinogenic properties and induce the formation of invasive carcinomas in a mouse model that lacks genetic susceptibility and the use of a carcinogen. Thus, we propose that CoPEC infection combined with chronic DSS treatment could be used as a novel mouse model of CRC. We also investigated the mechanism by which autophagy in IECs inhibits CoPEC-induced colonic tumorigenesis in this mouse model, which is mediated via the inhibition of DNA damage in colonic crypts. Thus, our study importantly highlights the role of CoPEC in tumor initiation and how the host can counteract the oncogenic CoPEC through the activation of the autophagy machinery.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and Culture

The clinical CoPEC 11G5 strain isolated from a patient with CRC and its isogenic mutant 11G5 Δ clbQ, depleted for the *clbQ* gene in the *pks* island and unable to produce colibactin [21] were grown at 37 °C in Luria-Bertani medium overnight.

4.2. Animal Model and Infection of Mice

Mice deficient for *Atg16l1* specifically in IECs (*Atg16l1*^{flox/flox}*CreVillin* mice, hereafter termed *Atg16l1* ^{Δ IEC}) and their littermates *Atg16l1*^{flox/flox} were housed in specific pathogen-free conditions. Mice were uninfected or infected with the 11G5 strain or the mutant 11G5 Δ clbQ as previously described [21]. Briefly, mice were given streptomycin (2.5 g/L) dissolved in drinking water during 3 days, and then received regular water during 24 h before infection. Each mouse was orally administrated by gavage with 10⁹ bacteria in 200 μ L of PBS or with 200 μ L of PBS alone (+PBS or uninfected condition). Seven days later, mice were subjected to 12 cycles of DSS treatment, with each cycle consisted of 1% (*w/v*) of DSS (36–50 kDa; MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) in drinking water for 5 days followed by 14-day of regular water to allow the recovery.

After 12 cycles of DSS treatment, mice were sacrificed. The colon was cut lengthwise, one part was swiss-rolled, fixed in buffered 10% formalin and embedded in paraffin, and another part was frozen at –80 °C for protein extraction.

4.3. Ethical Statement

Mice were housed in the specific pathogen-free animal facility at the University of Clermont Auvergne. Mice were fed standard chow ad libitum, had free access to sterile water, and were subjected to 12 h light/12 h dark cycles. Animal protocols were in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the University of Clermont Auvergne and were approved by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFIS#11254).

4.4. Clinical Activity Score

Clinical activity score as determined based on assessment of body weight loss, stool consistency, and the presence of occult/gross blood in the stool by a guaiac test (Hemocult

Sensa; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) after each DSS treatment for each mouse. Body weight change was scored as follows: 0, no change; 1, 1–5% weight loss; 2, 5–10% weight loss; 3, 10–18% weight loss; 4, >18% weight loss. Stool character was scored as follows: 0, normal, well-formed pellets; 1, soft without pellets; 2, diarrhea. Occult blood was scored as follows: 0, no blood; 1, positive hemocult (Beckman Coulter); 2, gross bleeding. These scores were added to generate a clinical activity score ranging from 0 to 8.

4.5. Hematoxylin and Eosine Staining and Histological Examination

Mouse colons were embedded in paraffin and cut into 5- μ m sections with a microtome, and colonic sections were H&E-stained. The histological evaluation (inflammation score and neoplasia score) of the colonic sections was performed under blinded conditions by an expert pathologist according to the criteria described in Tables 1 and 2.

4.6. Immunohistochemical Staining

The sections were deparaffined in Histoclear for 15 min (2 times), rehydrated in ethanol diminishing gradient (100%, 96%, 75% and water: 1 min each) and unmasked in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH 9) during 20 min at 95 °C. The sections were incubated with blocking buffer (1% bovin serum albumin in PBS) for 1 h at room temperature and then with anti-phospho-H2AX (dilution 1/500, #9718, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) overnight at 4 °C. After several washes with PBS, the sections were incubated with the corresponding secondary antibody coupled with peroxidase (dilution 1/500, #111-065-003, Jackson ImmunoResearch, Ely, Cambridgeshire, United Kingdom) for 2 h at room temperature. Revelation was performed using 3,3'-Diaminobenzidine (#SK-4800, NovaRED, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The sections were counterstained with Mayer hematoxylin (Diapath, Martinengo (BG) Italy) for 10 sec, rinsed under running water, dehydrated and mounted in Eukitt mounting solution. The microscopic images were acquired using the Scanner Zeiss Axioscan Z1 (Zeiss, Jena, Germany) and analysed using ZEN 2 software.

4.7. Protein Extraction and Western Blot

Extraction of proteins from mouse colonic mucosa and Western blot analysis were performed as previously described [40,41]. The primary antibodies used were anti-LC3 (#L8918, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), anti-phospho-H2AX (#2577, Cell Signaling) and anti- α -tubulin (#2144, Cell Signaling). The secondary antibody used was HRP-conjugated anti-rabbit (#7074, Cell Signaling). Blots were detected using the Enhanced Chemiluminescence Detection kit (RPN2108, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and revealed using the ChemiDoc™ XRS System (BioRad, Hercules, CA, USA).

4.8. Statistical Analysis

Statistical analyses between 2 or several groups were performed using the Student *t* test (Mann–Whitney if not parametric) or analysis of variance (ANOVA) followed by a post-test Bonferroni correction (Kruskal–Wallis if not parametric), respectively, with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A *P* value less than 0.05 was considered as significant.

5. Conclusions

The current study showed that colibactin-producing *E. coli* induce the formation of invasive carcinomas in a chronic inflammation-associated mouse model that lacks genetic susceptibility or the use of a carcinogen, and this is further enhanced by autophagy deficiency in intestinal epithelial cells. Thus, our study importantly highlights (i) the role of CoPEC in the initiation of colorectal tumorigenesis, and (ii) autophagy as a key mechanism of host defense against the carcinogenic properties of CoPEC.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13092060/s1>, Figure S1: The uncropped Western blots.

Author Contributions: L.S., C.L., M.H.T.H., P.S. and A.R. performed the experiments. C.D.-S. is responsible of immunohistochemical staining. C.G. performed histologic examination. P.R. supported materials. G.D. and N.B. critically revised the manuscript for important intellectual content. H.T.T.N. developed experimental concepts and designs, performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale; UMR1071), INRAE (Institut national de recherche en agriculture, alimentation et environnement; USC 2018), the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program “Investissements d’Avenir” (16-IDEX-0001 I-SITE CAP 20–25) (to Hang Nguyen), the European Union FP7 People Marie Curie International Incoming Fellowship (to Hang Nguyen) and the DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) ExC Precision Medicine in Chronic Inflammation and the CRC1182 project C2 (to Philip Rosenstiel).

Institutional Review Board Statement: Animal protocols were in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the University of Clermont Auvergne and were approved by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFIS#11254).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank the CICS platform (Centre Imagerie Cellulaire Santé, Université Clermont Auvergne) for assistance with tissue preparation and Anipath histology platform, GReD, CNRS UMR 6293 INSERM U110, Université Clermont Auvergne for the help with immunohistochemical staining. We would like to thank Mme. Mireille Dalmaso for food preparation and Mme. Sandra Lebeau for the help with animal care.

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

Abbreviations

Atg16l1^{ΔIEC} mice: mice deficient for *Atg16l1* specifically in intestinal epithelial cells; AOM: azoxymethane; CoPEC: colibactin-producing *Escherichia coli*; CRC: colorectal cancer; DSB: double-strand break; DSS: dextran sodium sulfate; IECs: intestinal epithelial cells; IL: interleukin; PBS: phosphate-buffered saline; pks: polyketide synthase; TNM: tumor-node-metastasis.

References

1. Mattiuzzi, C.; Sanchis-Gomar, F.; Lippi, G. Concise Update on Colorectal Cancer Epidemiology. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, [CrossRef]
2. Lucas, C.; Barnich, N.; Nguyen, H.T.T. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1310. [CrossRef]
3. Grivennikov, S.I. Inflammation and Colorectal Cancer: Colitis-Associated Neoplasia. *Semin. Immunopathol.* **2013**, *35*, 229–244. [CrossRef]
4. Thomas, A.M.; Manghi, P.; Asnicar, F.; Pasolli, E.; Armanini, F.; Zolfo, M.; Beghini, F.; Manara, S.; Karcher, N.; Pozzi, C.; et al. Metagenomic Analysis of Colorectal Cancer Datasets Identifies Cross-Cohort Microbial Diagnostic Signatures and a Link with Choline Degradation. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 667–678. [CrossRef]
5. Wirbel, J.; Pyl, P.T.; Kartal, E.; Zych, K.; Kashani, A.; Milanese, A.; Fleck, J.S.; Voigt, A.Y.; Palleja, A.; Ponnudurai, R.; et al. Meta-Analysis of Fecal Metagenomes Reveals Global Microbial Signatures That Are Specific for Colorectal Cancer. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 679–689. [CrossRef]
6. Moser, A.R.; Pitot, H.C.; Dove, W.F. A Dominant Mutation That Predisposes to Multiple Intestinal Neoplasia in the Mouse. *Science* **1990**, *247*, 322–324. [CrossRef] [PubMed]
7. Li, Y.; Kundu, P.; Seow, S.W.; de Matos, C.T.; Aronsson, L.; Chin, K.C.; Kärre, K.; Pettersson, S.; Greicius, G. Gut Microbiota Accelerate Tumor Growth via C-Jun and STAT3 Phosphorylation in APC Min/+ Mice. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1231–1238. [CrossRef]
8. Li, L.; Li, X.; Zhong, W.; Yang, M.; Xu, M.; Sun, Y.; Ma, J.; Liu, T.; Song, X.; Dong, W.; et al. Gut Microbiota from Colorectal Cancer Patients Enhances the Progression of Intestinal Adenoma in Apcmin/+ Mice. *EBioMedicine* **2019**, *48*, 301–315. [CrossRef] [PubMed]

9. Lee, J.G.; Eun, C.S.; Jo, S.V.; Lee, A.; Park, C.H.; Han, D.S. The Impact of Gut Microbiota Manipulation with Antibiotics on Colon Tumorigenesis in a Murine Model. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0226907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. 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. Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 1621–1633e6. [[CrossRef](#)]
11. Arthur, J.C.; Perez-Chanona, E.; Mühlbauer, M.; Tomkovich, S.; Uronis, J.M.; Fan, T.-J.; Campbell, B.J.; Abujamel, T.; Dogan, B.; Rogers, A.B.; et al. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* **2012**, *338*, 120–123. [[CrossRef](#)]
12. Buc, E.; Dubois, D.; Sauvanet, P.; Raisch, J.; Delmas, J.; Darfeuille-Michaud, A.; Pezet, D.; Bonnet, R. High Prevalence of Mucosa-Associated E. Coli Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dejea, C.M.; Fathi, P.; Craig, J.M.; Boleij, A.; Taddese, R.; Geis, A.L.; Wu, X.; DeStefano Shields, C.E.; Hechenbleikner, E.M.; Huso, D.L.; et al. Patients with Familial Adenomatous Polyposis Harbor Colonic Biofilms Containing Tumorigenic Bacteria. *Science* **2018**, *359*, 592–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Iyadorai, T.; Mariappan, V.; Vellamy, K.M.; Wanyiri, J.W.; Roslani, A.C.; Lee, G.K.; Sears, C.; Vadivelu, J. Prevalence and Association of Pks+ Escherichia Coli with Colorectal Cancer in Patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bonnet, M.; Buc, E.; Sauvanet, P.; Darcha, C.; Dubois, D.; Pereira, B.; Déchelotte, P.; Bonnet, R.; Pezet, D.; Darfeuille-Michaud, A. Colonization of the Human Gut by E. Coli and Colorectal Cancer Risk. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 859–867. [[CrossRef](#)]
16. Bossuet-Greif, N.; Vignard, J.; Taieb, F.; Mirey, G.; Dubois, D.; Petit, C.; Oswald, E.; Nougayrède, J.-P. The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *mBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
17. Cuevas-Ramos, G.; Petit, C.R.; Marcq, I.; Boury, M.; Oswald, E.; Nougayrède, J.-P. Escherichia Coli Induces DNA Damage in Vivo and Triggers Genomic Instability in Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11537–11542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Nougayrède, J.-P.; Homburg, S.; Taieb, F.; Boury, M.; Brzuszkiewicz, E.; Gottschalk, G.; Buchrieser, C.; Hacker, J.; Dobrindt, U.; Oswald, E. Escherichia Coli Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* **2006**, *313*, 848–851. [[CrossRef](#)]
19. Wilson, M.R.; Jiang, Y.; Villalta, P.W.; Stornetta, A.; Boudreau, P.D.; Carrá, A.; Brennan, C.A.; Chun, E.; Ngo, L.; Samson, L.D.; et al. The Human Gut Bacterial Genotoxin Colibactin Alkylates DNA. *Science* **2019**, *363*. [[CrossRef](#)]
20. Pleguezuelos-Manzano, C.; Puschhof, J.; Huber, A.R.; van Hoeck, A.; Wood, H.M.; Nomburg, J.; Gurjao, C.; Manders, F.; Dalmasso, G.; Stege, P.B.; et al. Mutational Signature in Colorectal Cancer Caused by Genotoxic Pks+ E. Coli. *Nature* **2020**. [[CrossRef](#)]
21. Lucas, C.; Salesse, L.; Thi Hoang, M.H.; Bonnet, M.; Sauvanet, P.; Larabi, A.; Godfraind, C.; Gagnière, J.; Pezet, D.; Rosenstiel, P.; et al. Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing Escherichia Coli in ApcMin/+ Mice. *Gastroenterology* **2020**. [[CrossRef](#)]
22. Cougnoux, A.; Dalmasso, G.; Martinez, R.; Buc, E.; Delmas, J.; Gibold, L.; Sauvanet, P.; Darcha, C.; Déchelotte, P.; Bonnet, M.; et al. Bacterial Genotoxin Colibactin Promotes Colon Tumour Growth by Inducing a Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Gut* **2014**, *63*, 1932–1942. [[CrossRef](#)]
23. Tomkovich, S.; Yang, Y.; Winglee, K.; Gauthier, J.; Mühlbauer, M.; Sun, X.; Mohamadzadeh, M.; Liu, X.; Martin, P.; Wang, G.P.; et al. Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2620–2632. [[CrossRef](#)]
24. Levine, B.; Kroemer, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* **2019**, *176*, 11–42. [[CrossRef](#)]
25. Rothkamm, K.; Barnard, S.; Moquet, J.; Ellender, M.; Rana, Z.; Burdak-Rothkamm, S. DNA Damage Foci: Meaning and Significance. *Environ. Mol. Mutagen.* **2015**, *56*, 491–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Klionsky, D.J.; Abdel-Aziz, A.K.; Abdelfatah, S.; Abdellatif, M.; Abdoli, A.; Abel, S.; Abeliovich, H.; Abildgaard, M.H.; Abudu, Y.P.; Acevedo-Arozena, A.; et al. Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (4th Edition). *Autophagy* **2021**, *17*, 1–382. [[CrossRef](#)]
27. Zhao, Y.G.; Zhang, H. Core Autophagy Genes and Human Diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *61*, 117–125. [[CrossRef](#)]
28. Hu, D.; Jiang, L.; Luo, S.; Zhao, X.; Hu, H.; Zhao, G.; Tang, W. Development of an Autophagy-Related Gene Expression Signature for Prognosis Prediction in Prostate Cancer Patients. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Huang, Z.; Liu, J.; Luo, L.; Sheng, P.; Wang, B.; Zhang, J.; Peng, S.-S. Genome-Wide Identification of a Novel Autophagy-Related Signature for Colorectal Cancer. *Dose Response* **2019**, *17*, 1559325819894179. [[CrossRef](#)]
30. Liu, Y.; Wu, L.; Ao, H.; Zhao, M.; Leng, X.; Liu, M.; Ma, J.; Zhu, J. Prognostic Implications of Autophagy-Associated Gene Signatures in Non-Small Cell Lung Cancer. *Ageing (Albany NY)* **2019**, *11*, 11440–11462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Wang, S.-S.; Chen, G.; Li, S.-H.; Pang, J.-S.; Cai, K.-T.; Yan, H.-B.; Huang, Z.-G.; He, R.-Q. Identification and Validation of an Individualized Autophagy-Clinical Prognostic Index in Bladder Cancer Patients. *Onco Targets Ther* **2019**, *12*, 3695–3712. [[CrossRef](#)]
32. Yue, P.; Zhu, C.; Gao, Y.; Li, Y.; Wang, Q.; Zhang, K.; Gao, S.; Shi, Y.; Wu, Y.; Wang, B.; et al. Development of an Autophagy-Related Signature in Pancreatic Adenocarcinoma. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *126*, 110080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yu, T.; Guo, F.; Yu, Y.; Sun, T.; Ma, D.; Han, J.; Qian, Y.; Kryczek, I.; Sun, D.; Nagarsheth, N.; et al. Fusobacterium Nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* **2017**, *170*, 548–563.e16. [[CrossRef](#)]

34. Haruki, K.; Kosumi, K.; Hamada, T.; Twombly, T.S.; Väyrynen, J.P.; Kim, S.A.; Masugi, Y.; Qian, Z.R.; Mima, K.; Baba, Y.; et al. Association of Autophagy Status with Amount of *Fusobacterium Nucleatum* in Colorectal Cancer. *J. Pathol.* **2020**, *250*, 397–408. [[CrossRef](#)]
35. Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Yamada, Y.; Sugie, S.; Mori, H. A Novel Inflammation-Related Mouse Colon Carcinogenesis Model Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate. *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 965–973. [[CrossRef](#)]
36. Larabi, A.; Barnich, N.; Nguyen, H.T.T. New Insights into the Interplay between Autophagy, Gut Microbiota and Inflammatory Responses in IBD. *Autophagy* **2019**, *16*, 38–51. [[CrossRef](#)]
37. Quach, C.; Song, Y.; Guo, H.; Li, S.; Maazi, H.; Fung, M.; Sands, N.; O’Connell, D.; Restrepo-Vassalli, S.; Chai, B.; et al. A Truncating Mutation in the Autophagy Gene UVRAG Drives Inflammation and Tumorigenesis in Mice. *Nat. Commun.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
38. Cao, Y.; Luo, Y.; Zou, J.; Ouyang, J.; Cai, Z.; Zeng, X.; Ling, H.; Zeng, T. Autophagy and Its Role in Gastric Cancer. *Clin. Chim. Acta* **2019**, *489*, 10–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Matsuzawa-Ishimoto, Y.; Shono, Y.; Gomez, L.E.; Hubbard-Lucey, V.M.; Cammer, M.; Neil, J.; Dewan, M.Z.; Lieberman, S.R.; Lazrak, A.; Marinis, J.M.; et al. Autophagy Protein ATG16L1 Prevents Necroptosis in the Intestinal Epithelium. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 3687–3705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Bretin, A.; Carrière, J.; Dalmaso, G.; Bergougnoux, A.; B’chir, W.; Maurin, A.-C.; Müller, S.; Seibold, F.; Barnich, N.; Bruhat, A.; et al. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/EIF2 α -ATF4 Pathway Triggers Autophagy Response to Crohn Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia Coli* Infection. *Autophagy* **2016**, *12*, 770–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Nguyen, H.T.T.; Dalmaso, G.; Müller, S.; Carrière, J.; Seibold, F.; Darfeuille-Michaud, A. Crohn’s Disease-Associated Adherent Invasive *Escherichia Coli* Modulate Levels of MicroRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 508–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Etude 2

Résultats expérimentaux

Dans une précédente étude, nous avons montré le rôle important de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales sur l'inhibition de la carcinogenèse colorectale induite par les CoPEC (Lucas et al., 2020). Les cellules myéloïdes (MC) jouant un rôle important dans le micro-environnement tumoral, nous avons examiné l'implication de l'autophagie dans ces cellules sur la carcinogenèse colorectale grâce à un modèle murin prédisposé au développement du CCR, le modèle *Apc^{Min/+}*. Ce modèle murin développe spontanément des adénomes coliques induits par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *Apc*. C'est le modèle le plus utilisé et le plus pertinent dans la recherche sur le CCR, puisqu'il mime le développement du CCR décrit chez l'homme selon la « séquence adénome-cancer » où la mutation du gène *APC* intervient à un stade précoce.

Les souris *Apc^{Min/+}* invalidées pour le gène de l'autophagie *Atg16l1* spécifiquement dans les MC (*Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}*) et les souris contrôles (*Apc^{Min/+}*) ont été infectées par gavage avec du PBS (non infectées) ou avec la souche CoPEC 11G5 ou avec la souche mutante 11G5 Δ *clbQ*. Tout d'abord, nous avons pu observer que dès le jour 50 post-infection, les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* et *Apc^{Min/+}* infectées par la souche 11G5 ont perdu davantage de poids en comparaison aux souris infectées avec la souche mutante 11G5 Δ *clbQ*. Cependant, aucune différence significative dans la perte a été observé entre les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* et *Apc^{Min/+}* à la suite de l'infection par la souche 11G5. Concernant la colonisation intestinale, aucune différence significative a été observée entre le nombre de 11G5 et de 11G5 Δ *clbQ* chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* vs *Apc^{Min/+}*.

De plus, nous avons établi que la déficience de l'autophagie dans les MC chez les souris *Apc^{Min/+}* entraîne une augmentation du volume des tumeurs, induite par la souche 11G5 mais pas par la souche 11G5 Δ *clbQ*, par rapport aux souris sauvages infectées. Cependant, aucune différence dans le nombre de tumeurs n'a été observée entre ces groupes. Ce résultat est confirmé par l'analyse histologique qui a révélé la présence d'adénocarcinomes plus larges, avec une augmentation de cellules immunitaires inflammatoires infiltrées dans les tumeurs des souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* vs *Apc^{Min/+}*, infectées avec la 11G5.

Nous avons ensuite exploré les mécanismes par lesquels la déficience spécifique de l'autophagie dans les MC entraîne une augmentation du volume tumoral chez les souris *Apc^{Min/+}*. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'inflammation, puisque cette dernière prédispose au développement cancéreux et favorise la tumorigenèse. Nous avons constaté que l'infection par la souche 11G5 accentue l'expression des ARNm de l'IL-1 β , IL-6, TNF- α et KC dans la muqueuse colique saine des souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* vs *Apc^{Min/+}*.

L'analyse de l'expression des gènes de l'immunité au sein de la muqueuse a révélé que l'infection par la souche 11G5 diminue la concentration des cellules T CD8⁺ et les cellules T helper Th1 alors qu'elle augmente celle des cellules T régulateurs chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* vs *Apc^{Min/+}*. Ce résultat suppose que la déficience spécifique de l'autophagie dans les MC pourrait amener à une dérégulation de la réponse immunitaire des cellules T induite par CoPEC.

Bien que la déficience spécifique de l'autophagie dans les MC n'ait pas eu d'impact sur l'apparition des dommages à l'ADN provoqués par les CoPEC, la prolifération des cellules épithéliales intestinales et des cellules tumorales est augmentée chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* comparativement aux souris *Apc^{Min/+}* infectées. Ces données suggèrent que l'augmentation de la prolifération des cellules coliques durant l'infection par la souche 11G5 chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* pourrait contribuer au développement de la tumorigenèse colorectale.

Comme les macrophages sont les cellules immunitaires infiltrées aux tumeurs les plus abondantes et qui favorisent les processus clés de la progression tumorale, nous avons regardé le rôle de l'autophagie dans ces cellules en réponse à l'infection par les CoPEC. Tout d'abord, nous avons examiné l'état d'activation de l'autophagie dans les macrophages humains THP-1 après l'infection avec différentes souches cliniques de CoPEC. Nous avons constaté une augmentation du niveau de LC3-II suite à l'infection avec les souches CoPEC ou avec les souches cliniques d'*E.coli* ne portant pas l'îlot pks, en comparaison avec la condition non infectée. De ce fait, les CoPEC induisent une activation de l'autophagie indépendamment de la présence de l'îlot pks. Cette analyse a été confirmée par l'utilisation de cellules THP-1 et de macrophages dérivés des cellules de la moelle osseuse (BMDM : *Bone marrow-derived*

macrophages) issus des souris *Atg16l1^{ΔMC}* et les souris sauvages, infectés par la souche 11G5, son mutant 11G5 Δ *clbQ* et la souche 11G5 transcomplémentée.

Parce que l'autophagie est un processus clé utilisé pour éliminer les bactéries intracellulaires, nous avons vérifié le nombre intracellulaire de la 11G5, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires associée. Nous avons constaté que le nombre intracellulaire de la 11G5, de la 11G5 Δ *clbQ* et de la 11G5 transcomplémentée reste similaire. Toutefois, il est supérieur à celui de la souche non pathogénique d'*E.coli* K12 C600, dans les THP-1. De plus, le nombre intracellulaire de la souche 11G5, 11G5 Δ *clbQ* ou de la 11G5 transcomplémentée dans les BMDM déficients pour l'autophagie est augmenté comparativement au nombre retrouvé dans les BMDM sauvages. Ces résultats indiquent que l'autophagie dépendante de ATG16L1 est nécessaire pour éliminer les CoPEC intracellulaires.

Par ailleurs, l'infection des BMDM sauvages avec la souche 11G5 entraîne une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (KC, IL-6, TNF- α , KC) par rapport à la condition non infectée ou infectée avec la souche MG1655. Ce résultat est indépendant de la présence de l'îlot pks, puisque la concentration en cytokines est similaire à celle retrouvée à la suite de l'infection avec la souche mutante. Il convient de souligner que la déficience de l'autophagie entraîne une augmentation plus importante de cytokines pro-inflammatoires que celles observées chez les BMDM sauvages. Cette analyse laisse penser que les CoPEC induisent la production de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages indépendamment de l'îlot pks et qu'une autophagie fonctionnelle est nécessaire pour limiter cet effet. Concernant la sécrétion de l'IL-1 β , aucune différence entre l'infection par la souche 11G5 et 11G5 Δ *clbQ* n'a été observée dans les BMDM issus des souris sauvages. De manière intéressante, dans les BMDM issus des souris *Atg16l1^{ΔMC}* le niveau de sécrétion de l'IL-1 β est augmenté suite à l'infection par la souche 11G5 ou par la souche transcomplémentée par rapport à l'infection par la souche mutante. Ainsi, la sécrétion de l'IL-1 β est partiellement dépendante de la présence de l'îlot pks quand l'autophagie est déficiente.

Pour finir, les espèces oxygénées réactives (ROS : *Reactive oxygen species*), qui sont produites par les cellules tumorales mais aussi par les cellules qui composent le microenvironnement tumoral, sont d'importants contributeurs de la carcinogénèse. Nous avons montré que l'induction des ROS dans les macrophages THP-1 est significativement augmentée suite à

Prédisposition de l'hôte au développement du CCR

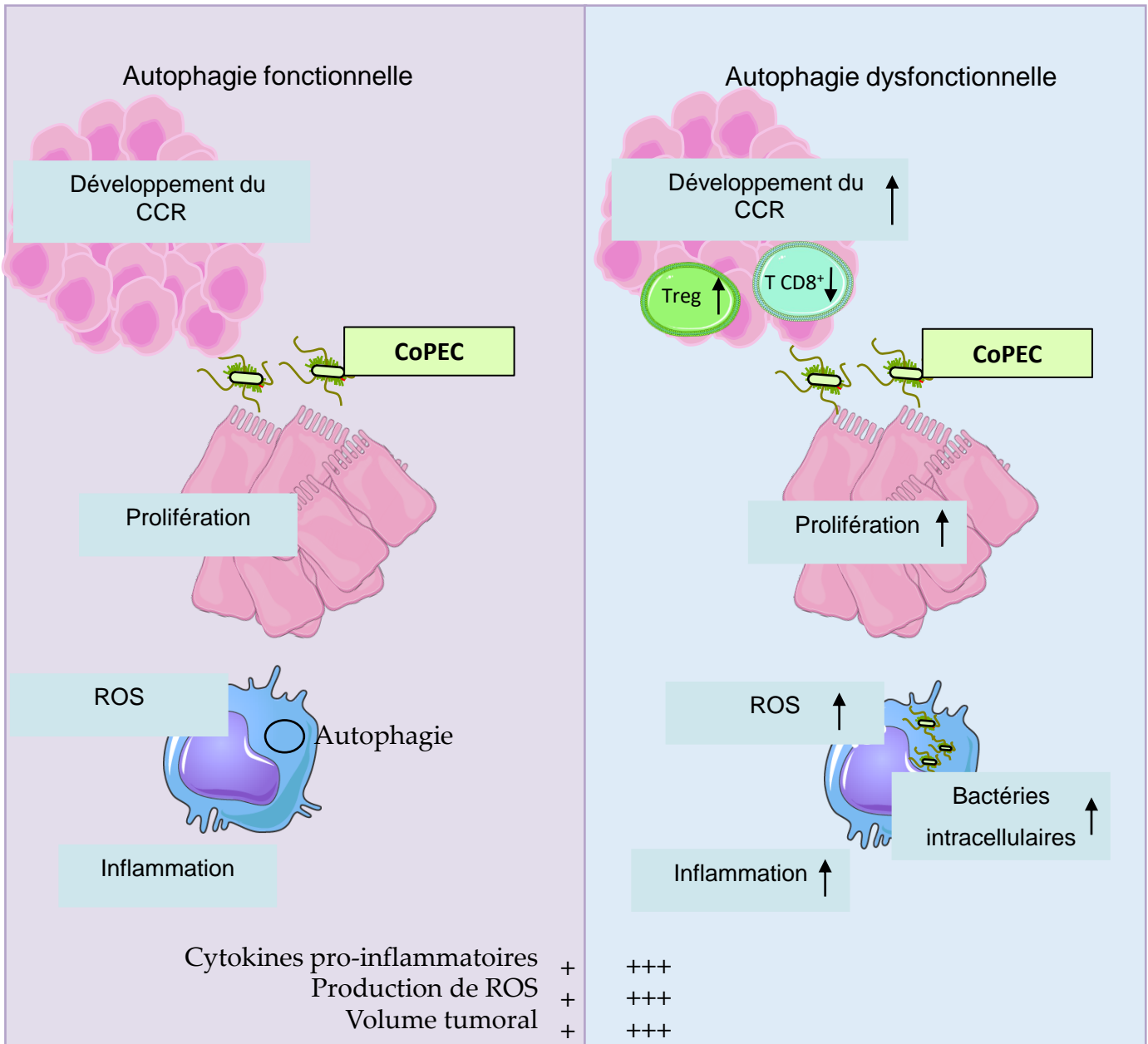


Figure 36 : Modèle proposé du rôle de l'autophagie dans les cellules myéloïdes dans la carcinogenèse colorectale associée à la colonisation des CoPEC

Dans un modèle murin de CCR, à la suite d'une colonisation anormale par les CoPEC, l'autophagie au sein des cellules myéloïdes est activée pour réduire la multiplication bactérienne, l'inflammation, la production de ROS ainsi que la prolifération des cellules tumorales et, par conséquent, limiter le développement tumoral. Une autophagie dysfonctionnelle favorise la carcinogenèse colorectale. Elle est associée à l'augmentation des bactéries intracellulaires, à la production de cytokines pro-inflammatoires et à la production de ROS par les macrophages amenant à l'accélération de la prolifération des cellules tumorales coliques. Ceci est associé à l'augmentation de l'expression des gènes liés à la réponse des cellules Treg et à la diminution de l'expression des gènes liés à la réponse des cellules T CD8⁺.

l'infection avec la souche 11G5 comparativement aux cellules non infectées ou infectées avec la souche commensale MG1655 ou avec le mutant 11G5 Δ *clbQ*. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de BMDM sauvages. Il est intéressant de noter que la déficience de l'autophagie augmente la production de ROS par les BMDM. Afin de valider ce résultat *in vivo*, nous avons mesuré le niveau du 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), un produit issu de la peroxydation des lipides considérée comme un biomarqueur du stress oxydatif, dans les coupes de côlon par analyse immunohistochimique. Nous avons relevé une augmentation de zone positive pour le 4-HNE dans le colon des souris *Apc^{Min/+}* infectées avec la 11G5 par rapport aux souris non infectées. De plus, la déficience spécifique de l'autophagie dans les MC augmente d'autant plus le niveau du 4-HNE chez les souris infectées avec la 11G5.

En conclusion, nos résultats indiquent que l'inhibition de l'autophagie dans les cellules myéloïdes induit une augmentation du volume tumoral chez les souris *Apc^{Min/+}* infectées avec la 11G5. Ceci est associé avec une augmentation de la production de ROS par les macrophages, une dérégulation de la réponse immunitaire des cellules T et une augmentation de la prolifération des cellules coliques (**Figure 36**).

Autophagy in myeloid cells is necessary to inhibit colorectal tumor growth in *Apc*^{Min/+} mice infected with colibactin-producing *Escherichia coli*

Laurène Salesse¹, Pierre Sauvanet^{1,2}, Philip Rosenstiel³, Nicolas Barnich¹, Catherine Godfraind^{1,4}, Guillaume Dalmasso¹, Hang Thi Thu Nguyen^{1,*}.

¹M2iSH, UMR 1071 Inserm, Université Clermont Auvergne, INRAE USC 2018, CRNH, Clermont-Ferrand 63001, France.

²Department of Digestive and Hepatobiliary Surgery, CHU Clermont-Ferrand, France.

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

⁴Department of Pathology, CHU Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France.

*Correspondence: hang.nguyen@uca.fr; Tel.: (+33)473178381; Fax: (+33)473178371.

Abstract: Backgrounds and Aims: *Escherichia coli* producing the genotoxin colibactin, designated as colibactin-producing *E. coli* (CoPEC), abnormally colonize the colonic mucosa of colorectal cancer (CRC) patients. We previously showed that autophagy in intestinal epithelial cells (IECs) is an important mechanism to limit CoPEC-induced colorectal carcinogenesis in *Apc^{Min/+}* mice *via* inhibiting DNA damage. As myeloid cells (MC) are an important component of the tumor microenvironment, we investigated the role of autophagy in these cells in tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice under CoPEC infection. **Methods:** Human macrophages THP-1 or bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from mice with MC-specific autophagy deficiency (*Atg16l1^{ΔMC}*) or control wild-type mice (*Atg16l1^{flx/flx}*) were infected with a clinical CoPEC strain, 11G5, or a mutant strain that does not produce colibactin (11G5ΔclbQ). *Apc^{Min/+}* mice with MC-specific autophagy deficiency (*Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}*) and the control mice (*Apc^{Min/+}/Atg16l1^{flx/flx}*, called by *Apc^{Min/+}*) were infected with 11G5 or 11G5ΔclbQ. Colonic tissues were collected from mice and analyzed for tumor size and number and by histology, immunoblot, and qRT-PCR analyses for markers of autophagy, DNA damage, cell proliferation, and inflammation. **Results:** MC-specific autophagy deficiency led to an increase in the volume, but not the number, of colonic tumors in *Apc^{Min/+}* mice under infection with 11G5, but not with 11G5ΔclbQ. This was accompanied with increased pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA expression levels, dysregulated expression of immune-related genes related to infiltrating T cell response and increased colonic cell proliferation. No difference in colonic DNA damage between *Apc^{Min/+}* and *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* mice under uninfected or 11G5-infected condition was observed. Colonization of mouse colon by 11G5 or 11G5ΔclbQ in *Apc^{Min/+}* and *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* mice was not significantly different. In BMDMs, autophagy deficiency led to increased intracellular 11G5 number and enhanced 11G5-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production (IL-6, KC, TNF-α), but this effect was also observed for 11G5ΔclbQ infection. Compared to uninfected and 11G5ΔclbQ-infected condition, 11G5 infection led to increased ROS production and secreted IL-1β levels by BMDMs, and this was further enhanced by autophagy deficiency. **Conclusion:** Autophagy in MCs is necessary to inhibit the colonic tumor growth in a mouse model of CRC infected with CoPEC. The preliminary data suggest that this could be mediated *via* the inhibition of CoPEC-induced production of ROS, which are important regulator of IL-1β secretion and T cells response in tumor microenvironment.

Keywords: colorectal cancer; microbiota; colibactin-producing *E. coli*; autophagy; toxin.

Abbreviations: Apc, Adenomatous polyposis coli; AOM, azoxymethane; ATG, autophagy-related; *Atg16l1*^{ΔMC} mice, mice deficient for *Atg16l1* specifically in myeloid cells; CoPEC, colibactin-producing *Escherichia coli*; CRC, colorectal cancer; DSB, double-strand break; DSS, dextran sodium sulfate; IBD, inflammatory bowel diseases; IECs, intestinal epithelial cells; IL, interleukin; MC, myeloid cell; PBS, phosphate-buffered saline; pks, polyketide synthase; TNM, tumor-node-metastasis.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the second leading cause of death by cancer worldwide¹. The etiology of CRC is highly complex and involves both genetic and environmental factors². Indeed, only a small proportion of CRC are genetically predisposed, and approximately 70-90% of CRC are sporadic or non-inherited. Environmental factors, such as western dietary habits, physical inactivity, smoking, and heavy alcohol consumption have been identified as risk factors for sporadic CRC. Some diseases including obesity, diabetes type 2 and inflammatory bowel diseases (IBD) have been also associated with increased risk to develop CRC².

Among environmental risk factors, the intestinal microbiota has emerged as an important contributor in CRC initiation, progression, and metastasis³. Advances in microbiome profiling have revealed gut dysbiosis in CRC patients compared to healthy controls. In particular, putatively pro-carcinogenic bacteria, including *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gallolyticus* and *Peptostreptococcus spp.* have been detected in CRC tumor tissue with a higher relative abundance, whereas those with potentially protective properties, including *Roseburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* and *Bifidobacterium* are reduced⁴

To support the involvement of intestinal microbiota in colorectal carcinogenesis, functional studies using susceptible mouse models of CRC have been performed. It has been shown that germ-free *Apc*^{Min/+} mice develop less intestinal and colorectal tumors compared with *Apc*^{Min/+} mice bearing microbiota³. *Apc*^{Min/+} mice transplanted with a fecal microbiota from CRC patients develop more intestinal adenomas than those receiving microbiota from healthy controls⁵.

Besides these findings, many researches have focuses on the role of specific bacterial species in colorectal carcinogenesis. In particular, *Escherichia coli* strains harboring the polyketide synthase (pks) pathogenicity island, which encodes the genotoxin colibactin, have been shown to induce deleterious effect in eukaryotic cells, including DNA double-strand breaks (DSBs), chromosomal instability, cell cycle arrest and a senescence-associated secretory phenotype, thus promoting proliferation of adjacent uninfected cells *via* inflammatory mediators and growth factors¹. CoPEC have been shown to be more prevalent in the biopsies of CRC patients compared to control patients^{6,7,8,9}. Infection with CoPEC promote colon tumorigenesis in mouse models of CRC, such as *Apc*^{Min/+} mice^{10,11}, AOM-treated *il10*^{-/-} mice⁷, AOM/DSS-treated mice¹² or *Apc*^{Min/+}/*il10*^{-/-} mice¹³. Importantly, a

direct link between a distinct mutational signature caused by exposure of human intestinal epithelial cells (IECs) to CoPEC and known CRC driver mutations was shown¹⁴.

We recently showed that autophagy, an evolutionarily conserved intracellular process that degrades potentially dangerous cytosolic components and invading pathogens *via* the lysosomal pathway¹⁵, is a key mechanism of host defense to CoPEC infection¹⁰. Autophagy plays a pivotal role in intestinal homeostasis maintenance, gut ecology regulation, appropriate intestinal immune responses and anti-microbial protection¹⁵. Indeed, autophagy in IECs is necessary to inhibit the genotoxic and protumoral properties of CoPEC, limiting the number and the volume of colorectal tumors in CoPEC-infected *Apc^{Min/+}* mice¹⁰. Furthermore, we showed that CoPEC trigger the formation of invasive carcinomas in a mouse model lacking genetic susceptibility and the use of a carcinogen, and this is further increased by intestinal autophagy deficiency¹⁰. In this mouse model, we also showed the mechanism underlying the carcinogenic effect of CoPEC, which is mediated *via* the CoPEC-induced DNA damage, and autophagy in IECs is necessary to inhibit this¹⁰. This, in turn, could lead to gene mutations that are required for CRC initiation. This work importantly highlighted the role of CoPEC as a driver of CRC development, and autophagy in inhibiting the carcinogenic properties of CoPEC.

The tumor microenvironment plays a critical role in cancer development and progression. Indeed, the complex interplay between cancer cells and the immune components of tumor microenvironment has been extensively investigated in the past few decades. Tumor-infiltrating immune cells including myeloid-derived suppressor cells (MDSC), tumor-associated macrophages, and cytotoxic lymphocytes are critical determinants of cancer outcomes¹⁶. Autophagy in myeloid cells (MCs) is crucial in orchestrating mucosal immune responses. In particular, in these cells, autophagy has been shown to play an important role in intracellular bacterial killing, in diminishing reactive oxygen species (ROS) production¹⁵. Autophagy in MCs is also a key regulator of inflammasomes, influencing secretion of the inflammasome-associated cytokines IL-1 β and IL-18¹⁵.

Yet, the contribution of autophagy in MCs to colorectal carcinogenesis in the context of CoPEC infection is unknown. Here, we examined the role of MC-specific autophagy in colorectal tumorigenesis under uninfected and CoPEC-infected conditions using *Apc^{Min/+}* mice having deficiency of the autophagy-related gene *Atg161l* in MCs.

Materials and Methods

Bacterial strains

The clinical *E. coli* strains isolated from CRC patients⁹, the nonpathogenic *E. coli* K12 C600 strain, the commensal *E. coli* MG1655 or HS strains, the 11G5 Δ clbQ mutant, which is the isogenic mutant of the 11G5 strain depleted for the *clbQ* gene in the *pks* island and unable to produce colibactin, the transcomplemented strain 11G5 Δ clbQ+clbQ were used. Bacteria were grown at 37° in Luria-Bertani (LB) medium overnight.

Animal model and infection

Mice with MC-specific knock-out of *Atg16l1* (hereafter called *Atg16l1*^{ΔMC}) were generated by crossing mice bearing a loxP site flanked exon 1 of the *Atg16l1* gene (*Atg16l1*^{fllox/fllox} mice¹⁷) with mice expressing the Cre recombinase gene under control of the lysozyme 2 promoter (LysM)¹⁸. *Atg16l1*^{ΔMC} mice and their control littermates *Atg16l1*^{fllox/fllox} were crossed with C57BL/6J-*Apc*^{Min/+} mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) to generate *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{fllox/fllox} and *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} mice. All the mice were housed in specific pathogen-free conditions. Mice were uninfected (+PBS) or infected with the 11G5 strain or the mutant 11G5 Δ clbQ as previously described¹⁰. Briefly, mice were given streptomycin at 2.5 g/L dissolved in drinking water during 3 days and then received regular water for 24 h. Each mouse was orally administered by gavage with 10⁹ bacteria in 200 μ L PBS or with 200 μ L PBS (uninfected condition). Body weight was determined daily. Feces harvested at different days post-infection were weighed, crushed in 500 μ L of PBS and spread on LB agar supplemented with antibiotics to select bacteria: 11G5 bacteria were selected on LB agar supplemented with ampicillin 50 μ g/ml and kanamycin 50 μ g/mL; 11G5 Δ clbQ bacteria were selected on LB agar supplemented with ampicillin 50 μ g/ml, kanamycin 50 μ g/mL and spectinomycin 100 μ g/ml. After 24h at 37°C, the CFU (colony-forming unit) of bacteria were counted and normalized to gram of feces.

Mice were sacrificed 65 days after infection. On the day of sacrifice, colonic tumor number and tumor volume ($[\text{width}^2 \times \text{length}]/2$) were determined with a dissecting microscope. One part of the colons was then swiss-rolled and fixed in buffered 10% formalin and embedded in paraffin, and the other part was frozen at -80°C for RNA and protein extraction.

Cell culture

The human monocyte cell line THP-1 was maintained in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C in the culture medium RPMI containing 50% fetal bovine serum (FBS) and 1% glutamine. THP-1 monocytes were differentiated in macrophages by an 18h treatment with 20 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA). Primary bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were extracted from tibia and femur from *Atg16l1^{flox/flox}* and *Atg16l1^{ΔMC}* mice. Cells were grown in complete medium containing RPMI (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine, 1% HEPES, 0.1% β-mercaptoethanol and 1% penicillin/streptomycin, and L929 cell-conditioned medium 20%. After 3 days of culture, fresh complete medium was added to the growing macrophages. On day 7, cells were washed and seeded in complete medium without antibiotics and incubated for 24h before bacterial infection.

Transfection of siRNA

Scramble siRNA (Ambion, AM4611) and ATG16L1 siRNA (Dharmacon, L-021033-01) were used. THP-1 cells were transfected with vehicle or 70 nM of specific siRNA using Lipofectamin 2000 (Invitrogen) and Opti-MEM I reduced serum (Invitrogen, 319885062). After 6h, the cells were washed and incubated with culture medium during 48 h post transfection. To evaluate knock-down efficiency, total protein was extracted from transfected THP-1 macrophages and was analyzed by western blot.

Macrophage survival assay

The ability of bacteria to survive and replicate within the macrophages were determined by the gentamycin protection assay. THP-1 macrophages and BMDMs were infected with 11G5, 11G5ΔclbQ or the transcomplemented 11G5 strain at a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria per macrophage in the culture medium without antibiotics. After 10 minutes of centrifugation at 1000 g and a 10 minutes of incubation at 37° and 5% CO₂, the infected macrophages were washed three times with PBS and incubated in the culture media containing 100 μg/ml of gentamicin for 40 minutes. After three washes, fresh culture media containing 50 μg/mL of gentamicin was added for 4h period. To determine the number of intracellular bacteria, the cells were washed three times with PBS, lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water, diluted and plated onto LB agar plates. After 24h at 37°C, the CFU bacteria were counted.

Whenever indicated, THP-1 macrophages were treated with 40 µg/mL of rapamycin together with infection, and rapamycin was kept together with the cells until lysis.

Analysis of reactive oxygen species (ROS) induction

After 3 or 6h post-infection, the induction of reactive oxygen species (ROS) by infected THP-1 macrophages and BMDMs were analyzed as described before¹⁹. Briefly, after three washes with FBS-free cell culture medium, the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) probe (Sigma) was added at 150 µM final concentration in FBS-free cell culture medium during 30 minutes at 37°C. After three washes with PBS/Ca²⁺Mg²⁺, the fluorescence was measured at 522 nm using the Fluoroskan fluorescent microplate reader (Labsystem) after an excitation at 485 nm.

Western blot analysis

Protein extraction were prepared by using lysis buffer (25 mM Tris pH 7.5; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 1% NP-40; 10% glycerol; 15 mM NaCl; 10 µl/mL sodium orthovanadate; 1 mM PMSF). Proteins were separated on SDS/PAGE gels, transferred to a nitrocellulose membrane, saturated for 1h in PBS containing 0.1% Tween-20 and 5% BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-LC3 (#L8918, Sigma-Aldrich), anti-ATG16L1 (#8089S, Cell signaling) and anti-β-actin (#4970 Cell signaling). After several washes with PBS containing 0.1% Tween-20, the membranes were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (#7074, Cell signaling). Blots were detected using the Enhanced Chemiluminescence Detection kit (Amersham Bioscience) and revealed using the ChemiDOc™ XRS System (Biorad).

Total RNA extraction, cDNA synthesis and qRT-PCR

Total RNAs were extracted from mouse colonic mucosa samples using RNeasy kit (Qiagen), and were reversely transcribed using the SensiFast™ cDNA Synthesis Kit (Bioline) according to the manufacturer's instruction. qRT-PCR was performed using 4 µl of cDNA, SYBR Green Master Mix (Biorad) and 200 nM of specific primers (**Table S1**) using a thermocycler (Biorad) according to the following program : 95°C-30 sec followed by 40 cycles of (90°C-5 sec and 60°C-30 sec). 18S was used as internal control. Fold-induction was calculated using the *Ct* method as follow: $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{target gene}}} - C_{t_{\text{housekeeping gene}}})_{\text{test condition}} - (C_{t_{\text{target gene}}} - C_{t_{\text{housekeeping gene}}})_{\text{normalized condition}}$, and the final data were derived from $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

The amount of KC, TNF- α , IL-1 β or IL6 secreted in the supernatants from cell culture was determined by ELISA (R&D systems) according to the manufacturer's instructions.

Hematoxylin and Eosine staining and histological examination

Mouse colons were embedded in paraffin and cut into 5- μ m sections with a microtome, and colonic sections were H&E-stained. The histological evaluation of the colonic sections was performed under blinded conditions by an expert pathologist.

Immunohistochemical staining

The colonic sections were deparaffined in HistoClear for 15 minutes (2 times), rehydrated in ethanol diminishing gradient (100%, 96%, 75% and water : 1 min each) and unmasked in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-Base, 1mM EDTA, pH 9) during 20 minutes at 95°C. The sections were incubated with blocking buffer (1% bovin serum albumin in PBS) for 1h at room temperature and then with anti-phospho-H2AX (dilution 1/500, #9718, Cell signaling), anti-Ki67 (#12202S, 1/500, Cell Signaling), anti-4 HNE (1/600, #HNE 13-M, Alpha Diagnostic) overnight at 4°C. After several washes with PBS, the sections were incubated with the corresponding secondary antibody coupled with peroxidase (dilution 1/500, #111-065-003, Jackson Immunoresearch) for 2h at room temperature. Revelation was performed using 3,3'-Diaminobenzidine (#SK-4800, NovaRED, Vector Laboratories). The sections were counterstained with Mayer hematoxylin for 10 sec, rinsed under running water, dehydrated and mounted in Eukitt mounting solution. The microscopic images were acquired using the Scanner Zeiss Axioscan Z1 (Zeiss) and analyzed using ZEN 2 software.

Ethical statement

Animal protocols were in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the University of Clermont Auvergne and were approved by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFIS #11254).

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses between 2 or several groups were performed with the Student t test (Mann-Whitney if not parametric) or analysis of variance (ANOVA) followed by a posttest Bonferroni correction

(Kruskal-Wallis if not parametric), respectively, with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Myeloid cell-specific autophagy deficiency leads to an increase in the volume of colonic tumors in *Apc*^{Min/+} mice.

In the previous study, we showed the important role of autophagy in IECs in inhibition of colorectal carcinogenesis induced by CoPEC infection¹⁰. As MCs play an important role in tumor microenvironment, here, we investigated the role of autophagy in these cells in colorectal carcinogenesis in the context of CoPEC infection. For this, we generated a mouse model with MC-specific knock-out of *Atg16l1* (hereafter called *Atg16l1*^{ΔMC}) by crossing mice bearing a loxP site flanked exon 1 of the *Atg16l1* gene (*Atg16l1*^{lox/lox})¹⁷ with mice expressing the Cre recombinase gene under control of the lysozyme 2 promoter (LysM)¹⁸. These mice and their littermate controls (*Atg16l1*^{lox/lox} mice) were crossed with the *Apc*^{Min/+} mice, a mostly used mouse model of CRC. The generated mice *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} and their littermate controls (*Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{lox/lox} hereafter termed *Apc*^{Min/+} mice) were orally administered phosphate-buffered saline (PBS) (uninfected) or the CoPEC 11G5 strain isolated from a CRC patient or a mutant strain that does not produce colibactin (11G5ΔclbQ).

As shown in **Figure 1A**, mice started to lose weight from day 50 after administration. 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice lost more body weight compared to uninfected or 11G5ΔclbQ-infected *Apc*^{Min/+} mice. No significant difference in body weight was observed between the 11G5-infected *Apc*^{Min/+} and 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} mice (**Figure 1A**). Furthermore, we examined the impact of MC-specific autophagy deficiency on the colonization of the gastrointestinal tract by the 11G5 and 11G5ΔclbQ bacteria. For this, we analyzed the number of 11G5 bacteria in the feces of each mouse at different days post-infection. No significant difference in the number of 11G5 or 11G5ΔclbQ bacteria in *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} mice compared to *Apc*^{Min/+} mice was observed at different days post-infection (**Figure 1B**). Similarly, at the day of sacrifice, the number of 11G5 or 11G5ΔclbQ bacteria associated with the colon of *Apc*^{Min/+} and *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} mice was similar (**Figure 1C**). For the same mouse genotype, no significant difference between the colonization of 11G5 and 11G5ΔclbQ bacteria was observed (**Figure 1B, C**). This suggests that MC-specific autophagy deficiency did not increase CoPEC colonization of the colon.

Shortening of the colon, a macroscopic parameter of tumor development was also examined. As shown in **Figure 1D**, there was no significant difference in colon length between *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} and *Apc*^{Min/+} groups under uninfected condition or infected with 11G5 or 11G5ΔclbQ bacteria.

Under uninfected or 11G5 Δ clbQ-infected condition, the number and the volume of colonic tumors were not different between $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ and $Apc^{Min/+}$ mice (**Figure 2A, B**). Infection with the CoPEC 11G5 strain led to increases in the number and volume of tumors in $Apc^{Min/+}$ mice (**Figure 2A-C**). Under 11G5-infected condition, no difference in tumor number was observed between $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ and $Apc^{Min/+}$ mice. However, compared to $Apc^{Min/+}$ + 11G5 mice, $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ + 11G5 mice exhibited increased tumor volume (**Figure 2A-C**). This was not observed under infection with the mutant 11G5 Δ clbQ (**Figure 2A, B**). The representative photos of the colons of each group are shown in **Figure 2C**. Histologic examination consistently showed larger adenocarcinomas in $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ vs $Apc^{Min/+}$ mice after 11G5 infection (**Figure 2D**). Of note, we have just finished the experiments with the mutant 11G5 Δ clbQ, thus for this condition, we have only data for tumor volume and number determined by a dissecting microscope. No further analysis using tissue samples (immunohistochemical staining, qRT-PCR and western blot) has been performed.

Myeloid cell-specific autophagy deficiency leads to dysregulated immune response in the colon of $Apc^{Min/+}$ mice.

We next investigated the mechanisms by which MC-specific autophagy deficiency leads to increased tumor volume in $Apc^{Min/+}$ mice. As inflammation predisposes to the development of cancer and promotes tumorigenesis, we analyzed levels of the mRNAs coding for the proinflammatory cytokines (IL1- β , IL-6 and TNF- α) and chemokine (KC) in the nontumoral colonic mucosa of different mouse groups. Under the uninfected condition, mRNA expression levels IL-1 β , IL-6 and TNF- α were not significantly different between $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ and $Apc^{Min/+}$ mice, whereas mRNA level of KC was increased in $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ vs $Apc^{Min/+}$ mice (**Figure 3A**). Under 11G5-infected condition, an increase in IL1- β , IL-6, TNF- α and KC mRNA expression levels was observed in $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ vs $Apc^{Min/+}$ mice (**Figure 3A**).

Furthermore, we analyzed expression of immune-related genes related to infiltrating T cell response which plays a crucial role in tumorigenesis. The expression of genes associated with cytotoxic CD8⁺ T cells (CD2, CD3 γ , CD8 α), T helper Th1 cells (IFN γ) and Treg cells (FOXP3, CTLA4) were analyzed. The preliminary results showed that mRNA expression level of CD2, CD3 γ , CD8 α and IFN γ were decreased, whereas that of FOXP3 and CTLA4 was increased, in $Apc^{Min/+}/Atg16l1^{\Delta MC}$ vs $Apc^{Min/+}$ mice under 11G5 infected condition

(**Figure 3B**). This suggested that MC-specific autophagy deficiency may lead to dysregulated T-cell immune response.

Myeloid cell-specific autophagy deficiency does not affect 11G5-induced colonic DNA damage in *Apc*^{Min/+} mice.

As we have shown that induction of DNA damage is one of the mechanisms underlying the pro-carcinogenic properties of CoPEC in mouse models^{10,20}, we verified whether MC-specific autophagy deficiency affected 11G5-induced colonic DNA damage in *Apc*^{Min/+} mice. Immunohistochemical staining for γ H2AX, a marker of DNA double-strand breaks, showed an increase in the number of γ H2AX foci per crypt in the colonic mucosa of *Apc*^{Min/+} mice upon 11G5 infection (**Figure 4**), which was consistent with our previous study¹⁰. There was no significant difference in the number of γ H2AX foci per crypt between 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* ^{Δ MC} vs 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice. This result suggests that MC-specific autophagy deficiency does not affect 11G5-induced colonic DNA damage in *Apc*^{Min/+} mice. Thus, the increase in tumor volume in *Apc*^{Min/+} mice with MC-specific autophagy deficiency is not due to the increase in DNA damage.

Myeloid cell-specific autophagy deficiency leads to increased colonic cell proliferation in 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice.

The effect of MC-specific autophagy deficiency on colonic epithelial cell proliferation was next examined. qRT-PCR analysis showed that mRNA expression level of cyclin D1, which is involved in regulating cell cycle progression, in the colonic mucosa was not different between uninfected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* ^{Δ MC} and *Apc*^{Min/+} mice (**Figure 5A**). Infection with 11G5 increased cyclin D1 mRNA expression in the colonic mucosa of *Apc*^{Min/+} mice (**Figure 5A**), which was in agreement with our previous publication¹⁰. Interestingly, cyclin D1 mRNA expression was increased in 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* ^{Δ MC} mice vs 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice (**Figure 5A**).

These results were confirmed by immunohistochemical staining of Ki67, a marker of cell proliferation. The number of Ki67-positive cells in the nontumoral colonic mucosa was not different between uninfected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* ^{Δ MC} and *Apc*^{Min/+} mice, but after 11G5 infection, this was increased in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* ^{Δ MC} vs *Apc*^{Min/+} mice (**Figure 5B, C**). Importantly, the proliferation of tumor cells was also increased in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* ^{Δ MC} vs *Apc*^{Min/+} mice after 11G5 infection, although this was not different between uninfected groups

(**Figure 5D, E**). Together, these results show that MC-specific autophagy deficiency leads to increased proliferation of colonic epithelial cells during 11G5 infection in *Apc^{Min/+}* mice, which could contribute to the progression of colonic tumors.

CoPEC infection induces autophagy in macrophages independently of the pks island

As macrophages are one of the predominant tumor-infiltrating immune cells supporting key processes in tumor progression, we next investigated the role of autophagy in these cells in response to CoPEC infection.

First, we investigated whether autophagy is activated in human THP-1 macrophages after infection with different clinical CoPEC strains by analyzing the levels of LC3-I (cytosolic form) and LC3-II (autophagosome-associated form) by Western blot. Compared with the uninfected condition, infection with CoPEC strains or with the clinical *E. coli* strains that do not carry the pks island, designated as *E. coli/pks-*, resulted in increased LC3-II level, indicating autophagy activation (**Figure 6A, B**). Infection with the non-pathogenic commensal *E. coli* MG1655 or HS strain also led to an increase in LC3-II level, although this was lower compared to CoPEC or *E. coli/pks-* infection (**Figure 6A, B**).

To confirm the implication of the pks island in autophagy activation, THP-1 macrophages were infected with the 11G5 strain or its mutant 11G5 Δ clbQ or the transcomplemented 11G5 strain. As expected, infection with 11G5, or 11G5 Δ clbQ or the transcomplemented strain led to increased LC3-II level compared to uninfected condition or infection with the commensal *E. coli* MG1655 or HS strain at 4 (**Figure 6C, D**) and 8 h post-infection (**Figure 6E, F**).

To confirm these data, we used the bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from in *Atg16l1^{ΔMC}* vs control wild-type (*Atg16l1^{fllox:fllox}*) mice. **Figure 6I and J** shows that infection of BMDMs from control wild-type mice with 11G5, 11G5 Δ clbQ or the transcomplemented 11G5 strain led to increased LC3-II levels compared to the uninfected condition or infection with the non-pathogenic MG1655 strain (**Figure 6I, J**). As expected, LC3-II was not observed in BMDMs from *Atg16l1^{ΔMC}* mice neither in uninfected nor infected condition (**Figure 6I, J**).

Together, these results suggest that autophagy is activated in macrophages upon CoPEC infection independently of the pks island.

Autophagy is necessary to limit the intracellular CoPEC number in macrophages

Because autophagy is a key process to eliminate intracellular bacteria, we sought to check intracellular 11G5 number in autophagy-defective macrophages. As shown in **Figure 7A**, the number of intracellular 11G5, 11G5 Δ clbQ or the transcomplemented strain in THP-1 was similar under untreated condition and was higher than that of the non-pathogenic *E. coli* K12 C600 strain. Treatment of THP-1 macrophages with 40 μ g/mL of rapamycin, an inducer of autophagy, decreased the number of intracellular 11G5, 11G5 Δ clbQ and the transcomplemented strain to similar levels (**Figure 7A**). Reversely, transfection of THP-1 with *ATG16L1* siRNA increased the intracellular number of 11G5, 11G5 Δ clbQ or the transcomplemented strain (**Figure 7B**). These data indicate that ATG16L1-dependent autophagy is necessary to eliminate intracellular CoPEC independently of pks presence.

These results were confirmed using BMDMs. The number of intracellular 11G5, 11G5 Δ clbQ and the transcomplemented strain in BMDMs from *Atg16l1* ^{Δ MC} mice was higher compared to that in BMDMs from control wild-type mice (**Figure 7C**). No significant difference in intracellular number of 11G5, 11G5 Δ clbQ and the transcomplemented strain was observed in both BMDMs from wild-type and *Atg16l1* ^{Δ MC} mice (**Figure 7C**).

Autophagy is necessary to limit CoPEC-induced inflammation in macrophages

Infection of BMDMs from wild-type mice with the CoPEC 11G5 strain led to increased secreted levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α and the chemokine KC, compared to uninfected or MG1655-infected condition, at 6h post-infection (**Figure 8**). Importantly, the levels of these cytokines and chemokines were higher in BMDMs from *Atg16l1* ^{Δ MC} mice compared to that from wild-type mice under infection with 11G5, 11G5 Δ clbQ or the transcomplemented strain (**Figure 8**). This indicates that a functional autophagy is necessary to inhibit CoPEC-induced production of pro-inflammatory cytokines and chemokines by macrophages.

For IL-6, TNF- α and KC, their secreted levels were not different between 11G5-infected and 11G5 Δ clbQ-infected condition in both BMDMs from wild-type or *Atg16l1* ^{Δ MC} mice (**Figure 8A-C**). For secreted IL-1 β level, there was no significant difference between 11G5- and 11G5 Δ clbQ-infected condition in BMDMs from wild-type mice (**Figure 8D**). Interestingly, in BMDMs from *Atg16l1* ^{Δ MC} mice, secreted IL-1 β level was increased upon infection with 11G5 or the transcomplemented strain compared to 11G5 Δ clbQ infection (**Figure 8D**). This indicates that in macrophages, CoPEC-induced IL-6, TNF- α and KC

secretion is not dependent of the pks island, whereas CoPEC-induced IL-1 β secretion is partly dependent on the presence of the pks island when autophagy is deficient.

Autophagy is necessary to limit CoPEC-induced production of ROS in macrophages

Reactive oxygen species (ROS), which are produced by tumor cells but also cellular components that make up the tumor microenvironment (TME), are an important player in carcinogenesis. We previously showed that CoPEC induce ROS induction in IECs, and this is dependent on the presence of the pks island¹⁹. Here, we examined CoPEC-induced ROS production by macrophages using the H2DCF-DA fluorescent probe. **Figure 9A and B** shows that the induction of ROS in THP-1 macrophages was significantly increased after 3 or 6h infection with the wild-type 11G5 strain compared with uninfected cells or cells infected with the commensal MG1655 strain or the mutant 11G5 Δ clbQ. This result was confirmed using BMDMs from control wild-type mice. In wild-type BMDMs, ROS production determined at 3 or 6h post 11G5 infection was increased compared to uninfected condition or infection with the MG1655 strain or the mutant 11G5 Δ clbQ (**Figure 9C, D**). Importantly, deficiency of autophagy enhanced 11G5-induced ROS production by BMDMs (**Figure 9B**). Together, these data show that CoPEC induce ROS production by macrophages, and that this is limited by functional autophagy.

Indeed, elevated levels of ROS serve as a marker for oxidative stress and are associated with lipid peroxidation and imbalance of the redox system. Just as ROS are inevitable by-products of oxidative stress, so are secondary intermediates such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA)²¹. Thus, to validate the in vitro data, we measured the level of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a product of lipid peroxidation and has been considered a biomarker of oxidative stress, in colonic sections by immunohistochemical analysis²¹. Our preliminary data showed almost no 4-HNE staining in the colonic mucosa of uninfected mice (**Figure 10**). In 11G5-infected mice, increased 4-HNE-positive area in the colonic sections was observed. This experiment has just been performed with 4 lames per group. More samples should be used for the quantification of 4-HNE-positive area.

Discussion

Autophagy is an important regulator of both innate and adaptive immune responses, and can have a pro- or anti-tumoral context-dependent role in carcinogenesis²². We previously showed that autophagy in IECs suppresses colonic tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice in normal conditions but promotes colorectal carcinogenesis under CoPEC-infected condition¹⁰. As MCs are an important component of tumor microenvironment, we investigated the role of MC-specific autophagy in colorectal carcinogenesis in a CoPEC infected condition. We showed that MC-specific autophagy deficiency led to increase in volume, but not the number, of colonic tumors in *Apc^{Min/+}* mice under CoPEC-infected condition. This was accompanied with increased pro-inflammatory cytokine production, dysregulated expression of immune-related genes related to infiltrating T cell response and increased colonic cell proliferation.

In previous studies, we showed that autophagy deficiency in IECs enhances both number and volume of colonic tumors in CoPEC-infected *Apc^{Min/+}* mice¹⁰ and induce the formation of invasive carcinomas in a chronic inflammation-associated mouse model²⁰. One of the mechanisms underlying the protumorigenic effect of CoPEC infection and IEC-specific autophagy deficiency is induction of DNA damage, which could be implicated in the initiation of tumorigenesis.

In contrast, we showed here that MC-specific autophagy deficiency does not affect colonic DNA damage in CoPEC-infected *Apc^{Min/+}* mice, and this could explain the no change in tumor number in *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* vs *Apc^{Min/+}* mice under CoPEC-infected condition. However, we showed that MC-specific autophagy deficiency increases colonic epithelial cell proliferation under 11G5-infected condition. Thus, MC-specific autophagy deficiency contributes to tumor progression rather than tumor initiation.

In an effort to investigate the mechanism underlying the enhanced tumor growth in CoPEC-infected *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* mice, we isolated BMDMs from *Atg16l1^{ΔMC}* and control wild-type mice as macrophages are one of the predominant tumor-infiltrating immune cells supporting key processes in tumor progression. We found that although autophagy deficiency led to increased intracellular 11G5 number in BMDMs, this effect was also observed for infection with the mutant 11G5ΔclbQ. In particular, the intracellular numbers of 11G5 and 11G5ΔclbQ were not significantly different either in BMDMs from *Atg16l1^{ΔMC}* mice or from wild-type mice. In vivo, the colonization of mouse colon by 11G5 or 11G5ΔclbQ was also similar. This suggests that the increase in tumor size in 11G5-infected *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* vs 11G5ΔclbQ-infected *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* mice was not due to increased bacterial colonization in the colon.

As inflammation has been associated with enhanced tumorigenesis²³, we analyzed levels of the mRNAs coding for the proinflammatory cytokines IL1- β , IL-6 and TNF- α and chemokine KC in the colonic mucosa. We found that the pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA expression levels were increased in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* Δ ^{MC} vs *Apc*^{Min/+} mice under 11G5-infected condition. *In vitro*, we found that 11G5 infection increased secreted levels of IL1- β , IL-6, TNF- α and KC in BMDMs, and this was further enhanced by autophagy deficiency. Interestingly, among them, only the secreted level of IL1- β was increased in 11G5-infected compared to 11G5 Δ clbQ-infected condition, in both BMDMs from *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* Δ ^{MC} vs *Apc*^{Min/+} mice. Since the *in vivo* experiment with the 11G5 Δ clbQ-infected condition has just been performed, we have not yet analyzed the pro-inflammatory cytokine expression levels in the mouse colonic mucosa. If the *in vivo* data are consistent with the *in vitro* data, meaning that the amount of secreted IL1- β in the colonic mucosa is increased in 11G5-infected vs 11G5 Δ clbQ-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* Δ ^{MC} mice, this could be one of the mechanisms underlying the enhanced tumor growth in 11G5-infected vs 11G5 Δ clbQ-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611* Δ ^{MC} mice. Indeed, a role for IL-1 β in cancer has been shown²⁴. Once secreted, IL-1 β can target several cell types by binding to IL-1R (IL-1 receptor), leading to activation of the downstream signaling pathways. Among them, the downstream activation of p38/JNK and NF- κ B leads to the transcription of target genes involved in several biological processes, depending on the cell type stimulated by IL-1 β ²⁴. Thus, IL-1 β has been implicated in angiogenesis, cancer cell proliferation, migration, and metastasis. Concerning CRC, it has been shown that in human colon cancer cells, IL-1 β upregulate miR-181a expression, which is responsible for phosphatase and tensin homolog (PTEN) repression and cell proliferation induction²⁵. Macrophage-derived IL-1 β has been shown to stimulate Wnt signaling and growth of colon cancer cells *via* inactivation of glycogen synthase kinase (GSK)3 β ²⁶.

The activation of inflammasomes, specifically the most fully characterized inflammasome—the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor containing pyrin domain 3 (NLRP3) inflammasome, is required for the activation of Caspase 1 responsible to cleave pro-IL-1 β into mature IL-1 β ²⁷. Previous studies showed that dysfunctional autophagy leads to abnormal inflammasome activation, which is associated with increased Caspase 1 activity, elevated IL-1 β and IL-18 production and higher susceptibility to experimental intestinal inflammation in mice¹⁵. Accumulation of ROS, which is a major trigger of inflammasome activation²⁷, is also limited by autophagy *via* elimination

of dysfunctional mitochondria. Macrophages depleted in the autophagy gene *Map1lc3b* (microtubule-associated protein 1 light chain 3B) exhibit dysfunctional mitochondria, associated with increased ROS production, leading to enhanced IL-1 β and IL-18 secretion in response to LPS²⁸.

These studies together make us pay special attention to the increase in ROS production by BMDMs upon 11G5 infection vs 11G5 Δ clbQ infection. ROS plays an essential role in regulation of proliferative, apoptotic and metabolic pathways and are important signaling molecules in cancer¹⁶. The physiopathological effects of ROS can be dependent on their levels. In particular, high levels of ROS can cause damage to tissues and cell death, but low levels of ROS can have a proliferative effect. Thus, tumor promotion through ROS occurs when ROS reach super-physiological or cytostatic levels while avoiding levels conducive to cell death¹⁶. In carcinogenesis, ROS can be produced by tumor cells and cellular components of the tumor microenvironment (TME). One of the mechanisms by which ROS promote tumor progression is through immune cell suppression. A study showed that high levels of ROS in the TME inhibit proliferation of T cells, which play a pivotal role in the anti-tumor immune response, helping to promote colorectal cancer cell growth²⁹. Furthermore, a study demonstrated that macrophage-derived ROS induce regulatory T-cells (Tregs)³⁰, which are present in the TME and provide a source of immunosuppression by decreasing tumor reactive cytotoxic T-cell immunity. This suggests that ROS derived from macrophages can have an immunosuppressive effect.

Interestingly, our preliminary data showed that the expression of genes associated with the antitumoral cytotoxic CD8⁺ T cells (CD2, CD3 γ , CD8 α) was decreased, whereas that of genes associated with the immunosuppressive Tregs (FOXP3, CTLA4) was increased, in *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1* ^{Δ MC} vs *Apc*^{Min/+} mice under CoPEC-infected condition. Expression of other genes related to cytotoxic CD8⁺ T cells (CD2, CD3 γ , CD8 α , CD8 β , IL-15, ZAP70, GZMA, GZM β , GZM κ , PRF1), as well as to other T cell populations playing an important role in tumor immune response [Th1 cells (STAT1, IRF1, IFN γ , TBX21, IL-12R β 1), Treg cells (FOXP3, CTLA4, TGF β 1), Th17 cells (IL-17R β , IL-23 α , RORC, IRF4, CCL20, CCR6, STAT3)] also need to be examined. Furthermore, IFN- γ levels was decreased in *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1* ^{Δ MC} vs *Apc*^{Min/+} mice under CoPEC-infected condition. IFN-driven responses were recently described as having an important role in promoting antitumor immunity. Thus, expression of IFN-responsive genes should be analyzed by microarray analysis and qRT-PCR.

Together, from these results, we can hypothesize that CoPEC induce ROS production in macrophages dependently of the pks island, and MC-specific autophagy deficiency further increases ROS accumulation up to a level that it can (i) activate inflammasome, leading to increased secreted IL-1 β level and (2) result in dysregulated T cell response in TME. These in turn lead to enhanced colonic epithelial cell proliferation and tumor cell growth, as observed in 11G5-infected *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* vs 11G5 Δ clbQ-infected *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* or uninfected mice. However, further investigations are needed to confirm this hypothesis. Firstly, inflammasome activation needs to be examined by analyzing (i) the levels of pro-IL-1 β and mature IL-1 β by western blot and (ii) the cleavage of Caspase 1 into activating p10 and p20 subunits, which can be detected by western blot or ELISA. Interestingly, our preliminary results showed that in human THP-1 macrophages, 11G5 infection induces increased Caspase 1/p10 subunit levels, analyzed by western blot, compared to uninfected or 11G5 Δ clbQ condition. Secondly, inflammasome activation also leads to increased IL-18 secretion, thus secreted IL8 level in the mouse groups needs to be determined. Finally, it is of importance to isolate immune cells from the colonic mucosa and tumor-infiltrating immune cells to assess particular T cell populations by flow cytometry using specific markers.

Our hypothesis is supported by other studies showing that several bacteria potentially induce a tumorigenic state through production of ROS. For example, *Enterococcus faecalis*, a commensal strain of bacteria, can produce large amounts of extracellular superoxide that is converted to H₂O₂ which can damage eukaryotic cell DNA³¹. Pathogenic *Bacteroides fragilis* produces its toxin, which upregulates bacterial polyamine catabolism pathways, generating ROS that can cause DNA damage and lead to tumor formation in the colon³². In these studies, ROS is produced by tumor cells. The role of ROS in TME, which comprises of different immune cell population, is more complex. Thus, to understand how ROS fully affect the TME, more research will be needed to explore the role bacterial species- and cell-specific ROS in tumor development.

Beyond these results, all that left to be done is to demonstrate the direct link between CoPEC-induced ROS production and inflammasome activation, together with the associated IL-1 β and IL-18 secretion, T cell response and tumorigenesis. For this, we can block ROS generation in 11G5- or 11G5 Δ clbQ-infected *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* and *Apc^{Min/+}* mice by ROS inhibitors [(for example, butylated hydroxyanisole (BHA)], and characterize inflammasome activation, the immune response as well as tumorigenesis under this condition. A previous study showed that continuous BHA treatment (mice were given chow diet supplemented with

7.5 g/kg BHA) is not toxic to mice, and mice did not show any developmental abnormalities or diseases including cancer for up to 2 years. Thus, we can apply this treatment for our model.

In conclusion, our results indicate that the inhibition of autophagy in myeloid cells leads to increased tumor volume in *Apc^{Min/+}* mice under the 11G5-infected condition, and this is associated with increased ROS production and IL1- β secretion by macrophages and potential dysregulated T cell response.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68:394–424.
2. Lucas C, Barnich N, Nguyen HTT. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18:E1310.
3. Li Y, Kundu P, Seow SW, de Matos CT, Aronsson L, Chin KC, Kärre K, Pettersson S, Greicius G. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC^{Min/+} mice. *Carcinogenesis* 2012; 33:1231–8.
4. Janney A, Powrie F, Mann EH. Host-microbiota maladaptation in colorectal cancer. *Nature* 2020; 585:509–17.
5. Wong SH, Zhao L, Zhang X, Nakatsu G, Han J, Xu W, Xiao X, Kwong TNY, Tsoi H, Wu WKK, 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.
6. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, Wu X, DeStefano Shields CE, Hechenbleikner EM, Huso DL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 2018; 359:592–7.
7. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012; 338:120–3.
8. Iyadorai T, Mariappan V, Vellasamy KM, Wanyiri JW, Roslani AC, Lee GK, Sears C, Vadivelu J. Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. *PLoS One* 2020; 15:e0228217.
9. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, Raisch J, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Pezet D, Bonnet R. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One* 2013; 8:e56964.
10. Lucas C, Salesse L, Hoang MHT, Bonnet M, Sauvanet P, Larabi A, Godfraind C, Gagnière J, Pezet D, Rosenstiel P, et al. Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing *Escherichia coli* in Apc^{Min/+} Mice. *Gastroenterology* 2020; 158:1373–88.
11. 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; 20:859–67.
12. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, Sauvanet P, Darcha C, Déchelotte P, Bonnet M, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 2014; 63:1932–42.

13. Tomkovich S, Yang Y, Winglee K, Gauthier J, Mühlbauer M, Sun X, Mohamadzadeh M, Liu X, Martin P, Wang GP, et al. Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res* 2017; 77:2620–32.
14. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A, van Hoeck A, Wood HM, Nomburg J, Gurjao C, Manders F, Dalmaso G, Stege PB, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* 2020; 580:269–73.
15. Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy* 2020; 16:38–51.
16. Weinberg F, Ramnath N, Nagrath D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers (Basel)* 2019; 11:E1191.
17. Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, Ko H-J, Böck J, Martinez-Naves E, Glickman JN, Tschurtschenthaler M, Hartwig J, Hosomi S, et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 2013; 503:272–6.
18. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 1999; 8:265–77.
19. Gagnière J, Bonnin V, Jarrousse A-S, Cardamone E, Agus A, Uhrhammer N, Sauvanet P, Déchelotte P, Barnich N, Bonnet R, et al. Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin Sci (Lond)* 2017; 131:471–85.
20. Salesse L, Lucas C, Hoang MHT, Sauvanet P, Rezard A, Rosenstiel P, Damon-Soubeyrand C, Barnich N, Godfraind C, Dalmaso G, et al. Colibactin-Producing *Escherichia coli* Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model. *Cancers (Basel)* 2021; 13:2060.
21. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 311:C537–43.
22. Gerada C, Ryan KM. Autophagy, the innate immune response and cancer. *Mol Oncol* 2020; 14:1913–29.
23. Long AG, Lundsmith ET, Hamilton KE. Inflammation and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017; 13:341–51.
24. Rébé C, Ghiringhelli F. Interleukin-1 β and Cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12:1791.
25. Hai Ping P, Feng Bo T, Li L, Nan Hui Y, Hong Z. IL-1 β /NF- κ β signaling promotes colorectal cancer cell growth through miR-181a/PTEN axis. *Arch Biochem Biophys* 2016; 604:20–6.
26. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene* 2009; 28:3892–902.
27. Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li P-L. Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector? *Antioxid Redox Signal* 2015; 22:1111–29.

28. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011; 12:222–30.
29. 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. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. *J Transl Med* 2015; 13:1–12.
30. Kraaij MD, Savage NDL, van der Kooij SW, Koekkoek K, Wang J, van den Berg JM, Ottenhoff THM, Kuijpers TW, Holmdahl R, van Kooten C, et al. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:17686–91.
31. Huycke MM, Abrams V, Moore DR. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 2002; 23:529–36.
32. Goodwin AC, Shields CED, Wu S, Huso DL, Wu X, Murray-Stewart TR, Hacker-Prietz A, Rabizadeh S, Woster PM, Sears CL, et al. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *PNAS* 2011; 108:15354–9.

Figure legends

Figure 1: Myeloid cell-specific autophagy deficiency does not enhance CoPEC colonization of the colon and susceptibility to infection

Apc^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} and control (*Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{fllox/fllox}, hereafter call by *Apc*^{Min/+}) mice were treated with streptomycin for 3 days, then received H₂O for 24h. The mice were orally administered (day 0) with PBS or with 10⁹ 11G5 or 11G5ΔclbQ bacteria. Mice were sacrificed at day 65 post-administration. (A) Body weight of each mouse at different time points was determined, and presented as percentage of body weight of the same mouse at day 0, defined as 100%. Data are means ± SEM. ^a*P* < 0.05 vs *Apc*^{Min/+} + PBS; ^b*P* < 0.05 vs *Apc*^{Min/+} + 11G5ΔclbQ; ^c*P* < 0.05 vs *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} + PBS; ^d*P* < 0.05 vs *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} + 11G5ΔclbQ. (B) The number of 11G5 and 11G5ΔclbQ bacteria in mouse feces at different days post-infection was determined and normalized to gram of feces. (C) The number of 11G5 and 11G5ΔclbQ bacteria associated to the colon was determined at day of sacrifice and normalized to gram of colon. (D) The length of the mouse colon was measure at the day of sacrifice.

Figure 2: Myeloid cell-specific autophagy deficiency leads to an increase in the volume of colonic tumors in *Apc*^{Min/+} mice.

Apc^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} and *Apc*^{Min/+} mice were orally administered with PBS or with 10⁹ 11G5 or 11G5ΔclbQ bacteria, and sacrificed at day 65 post-administration. (A) The number of colorectal tumors was determined using a binocular loupe. (B) Volume of all tumors of all mice is presented. Statistical analysis was performed using one-way Anova test followed by Bonferroni post-test. **P* < 0.05; ***P* ≤ 0.01; ****P* ≤ 0.001. (C) Representative photos of the colon taken at day of sacrifice. (D) Histological examination using H&E-stained mouse colonic sections.

Figure 3: Myeloid cell-specific autophagy deficiency leads to dysregulated immune response in the colon of *Apc*^{Min/+} mice.

Apc^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} and *Apc*^{Min/+} mice were orally administered with PBS or with 10⁹ 11G5 bacteria, and sacrificed at day 65 post-administration. (A) Levels of the mRNAs coding for the proinflammatory cytokines (IL1-β, IL-6 and TNF-α) and chemokine (KC) in the colonic mucosa were quantified by qRT-PCR. (B) The expression of genes associated with cytotoxic CD8⁺ T cells (CD2, CD3γ, CD8α), T helper Th1 cells (IFNγ) and Treg cells (FOXP3,

CTLA4) were quantified by qRT-PCR. Data are means \pm SEM from N=8/group and are representatives of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using (A) Kruskal-Wallis test and (B) unpaired, two-tailed Student's t-test. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 4: Myeloid cell-specific autophagy deficiency does not affect 11G5-induced colonic DNA damage in *Apc*^{Min/+} mice.

Apc^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} and *Apc*^{Min/+} mice were orally administered with PBS or with 10⁹ 11G5 bacteria, and sacrificed at day 65 post-administration. (A) Immunohistochemical staining for γ H2AX in the nontumoral colonic mucosa. (B) Quantification of γ H2AX foci number/crypt determined from 40 crypts/mouse and 6 mice/group. Values represent means \pm SEM. Statistical analysis was performed using one-way Anova test followed by Bonferroni post-test. *** $P \leq 0.001$.

Figure 5: Myeloid cell-specific autophagy deficiency leads to increased colonic cell proliferation in *Apc*^{Min/+} mice under 11G5-infected condition.

Apc^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔMC} and *Apc*^{Min/+} mice were orally administered with PBS or with 10⁹ 11G5 bacteria, and sacrificed at day 65 post-administration. (A) *Cyclin D1* mRNA level in the nontumoral colonic mucosa was quantified by qRT-PCR. Data are means \pm SEM from N=8/group. (B) Immunohistochemical staining for Ki67 in the nontumoral colonic mucosa and (C) quantification of γ H2AX foci number/crypt determined from 40 crypts/mouse and 6 mice/group. (D) Ki67 immunohistochemical staining of colonic tumors and (E) quantification of Ki67⁺ number/mm² of tumor determined from 6 mice/group. Values represent means \pm SEM. Statistical analysis was performed using one-way Anova test followed by Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 6: CoPEC infection induces autophagy in macrophages independently of the pks island

Human THP-1 macrophages (A-F) and BMDMs prepared from wild-type (*Atg16l1*^{fllox/fllox}) and *Atg16l1*^{ΔMC} mice (I, J) were uninfected or infected with the non-pathogenic *E. coli* strains (K12 MG1655 and commensal HS) or with clinical *E. coli*/pks- and CoPEC strains for 4h. Cells were also infected with the CoPEC 11G5 strain or its isogenic mutant 11G5 Δ clbQ, or the transcomplemented 11G5 strain. Representative Western blot analysis (A, C, E, I) and

quantification of LC3-II/ β -actin band intensity from 3 independent blots (**B, D, F, J**). (* $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$) vs uninfected condition; (# $P < 0.05$; ## $P \leq 0.01$) vs *E. coli* HS-infected condition; (§ $P < 0.05$; §§ $P \leq 0.01$) vs MG1655-infected condition. Values represent means \pm SEM. Statistical analysis was performed using one-way Anova test followed by Bonferroni post-test.

Figure 7: Autophagy is necessary to limit the intracellular CoPEC number in macrophages

THP-1 macrophages (**A, B**) and BMDMs prepared from wild-type and *Atg16l1*^{ΔMC} mice (**C**) were infected with the non-pathogenic K12 C600 strain, 11G5, 11G5ΔclbQ or the transcomplemented 11G5 strain at a MOI of 100 bacteria per macrophage. After 10 minutes of centrifugation at 1000 g and a 10 minutes of incubation at 37° and 5% CO₂, the infected macrophages were washed three times with PBS and incubated in the culture media containing 100 μ g/ml of gentamicin for 40 minutes. After three washes, fresh culture media containing 50 μ g/mL of gentamicin was added for 8h period. To determine the number of intracellular bacteria, the cells were lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water and plated onto LB agar plates. After 24h at 37°C, the CFU bacteria were counted. (**A**) Rapamycin 40 μ g/mL or vehicle (DMSO) were added together with infection, and kept together with the cells until lysis. (**B**) Cells were transfected with 70 nM of control siRNA or *ATG16L1* siRNA for 2 days before infection. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ Values represent means \pm SEM. Statistical analysis was performed using one-way Anova test followed by Bonferroni post-test.

Figure 8: Autophagy is necessary to limit CoPEC-induced production of pro-inflammatory cytokines and chemokines in macrophages

BMDMs prepared from wild-type and *Atg16l1*^{ΔMC} mice were infected with MG1655, 11G5, 11G5ΔclbQ or the transcomplemented 11G5 strain at a MOI of 100 bacteria per macrophage. After 10 minutes of centrifugation at 1000 g and a 10 minutes of incubation at 37° and 5% CO₂, the infected macrophages were washed three times with PBS and incubated in the culture media containing 100 μ g/ml of gentamicin for 40 minutes. After three washes, fresh culture media containing 50 μ g/mL of gentamicin was added for 8h period. Secreted I IL-6, IL-1 β , TNF- α and KC levels in cell culture supernatant were quantified by ELISA. (* $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$) vs uninfected condition; (# $P < 0.05$; ## $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$) vs MG1655-infected condition; § $P < 0.05$; §§ $P \leq 0.01$; §§§ $P \leq 0.01$. Values represent means \pm

SEM. Statistical analysis was performed using one-way Anova test followed by Bonferroni post-test.

Figure 9: Autophagy is necessary to limit CoPEC-induced production of ROS in macrophages

THP-1 macrophages (A, B) and BMDMs prepared from wild-type and *Atg16l1^{ΔMC}* mice (C, D) were infected with the MG1655, 11G5, 11G5ΔclbQ or the transcomplemented 11G5 strain at a MOI of 100 bacteria per macrophage. After 3 or 6h post-infection, the induction of ROS were analyzed using the H2DCF-DA probe at 150 μM final concentration during 30 minutes at 37°C. After three washes with PBS/Ca²⁺Mg²⁺, the fluorescence was measured at 522 nm using the Fluoroskan fluorescent microplate reader after an excitation at 485 nm. (**P* < 0.05; ***P* ≤ 0.01; ****P* ≤ 0.001) vs uninfected condition; (#*P* < 0.05; ##*P* ≤ 0.01, *P* ≤ 0.001) vs MG1655-infected condition; \$*P* < 0.05; \$\$*P* ≤ 0.01; \$\$\$*P* ≤ 0.01. Values represent means ± SEM. Statistical analysis was performed using one-way Anova test followed by Bonferroni post-test.

Figure 10: Myeloid cell-specific autophagy deficiency increases CoPEC-induced oxidative stress in the colon

Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC} and *Apc^{Min/+}* mice were orally administered with PBS or with 10⁹ 11G5 bacteria, and sacrificed at day 65 post-administration. Immunohistochemical staining for 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) in the nontumoral colonic mucosa.

Figure 1

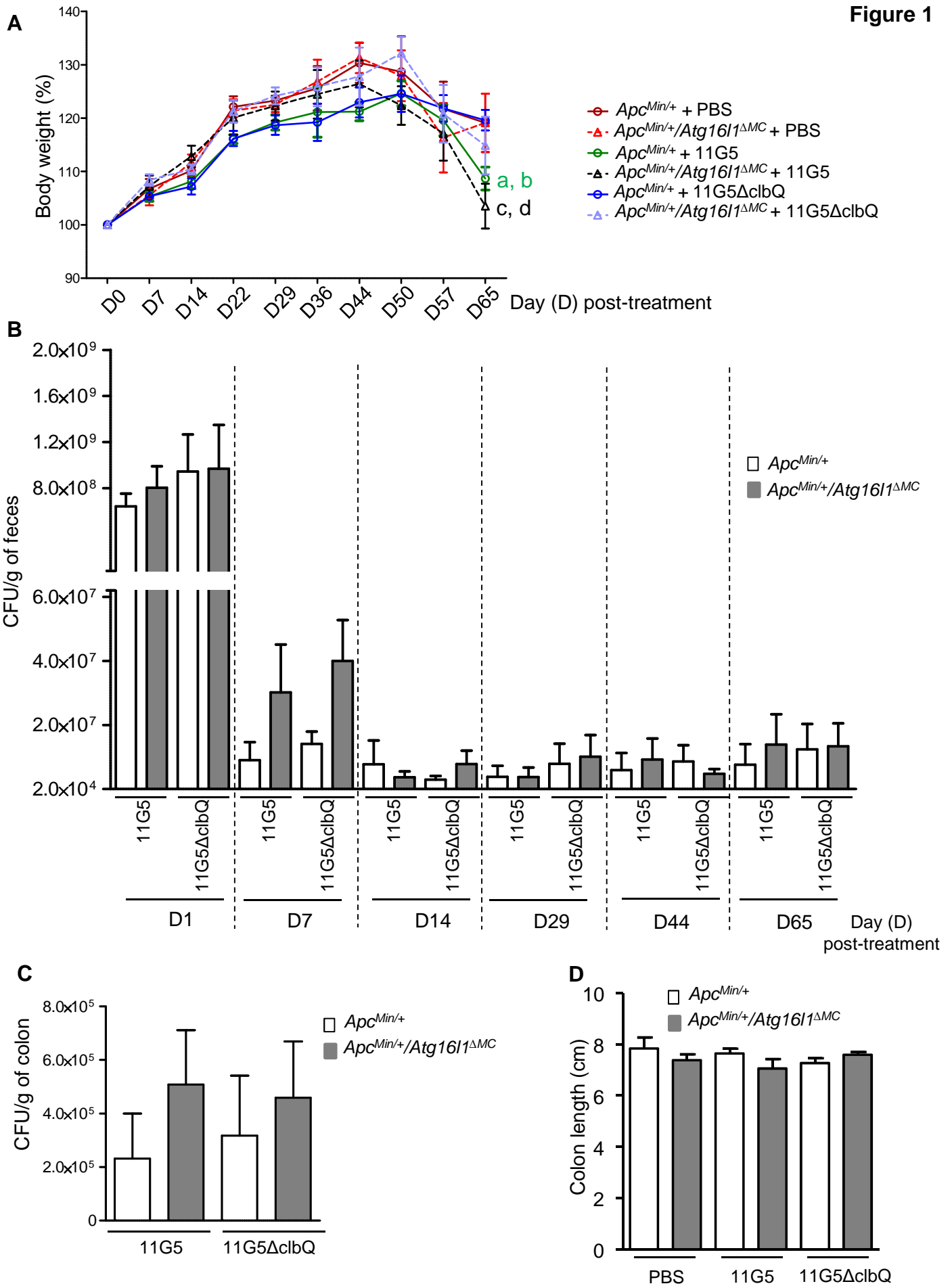


Figure 3

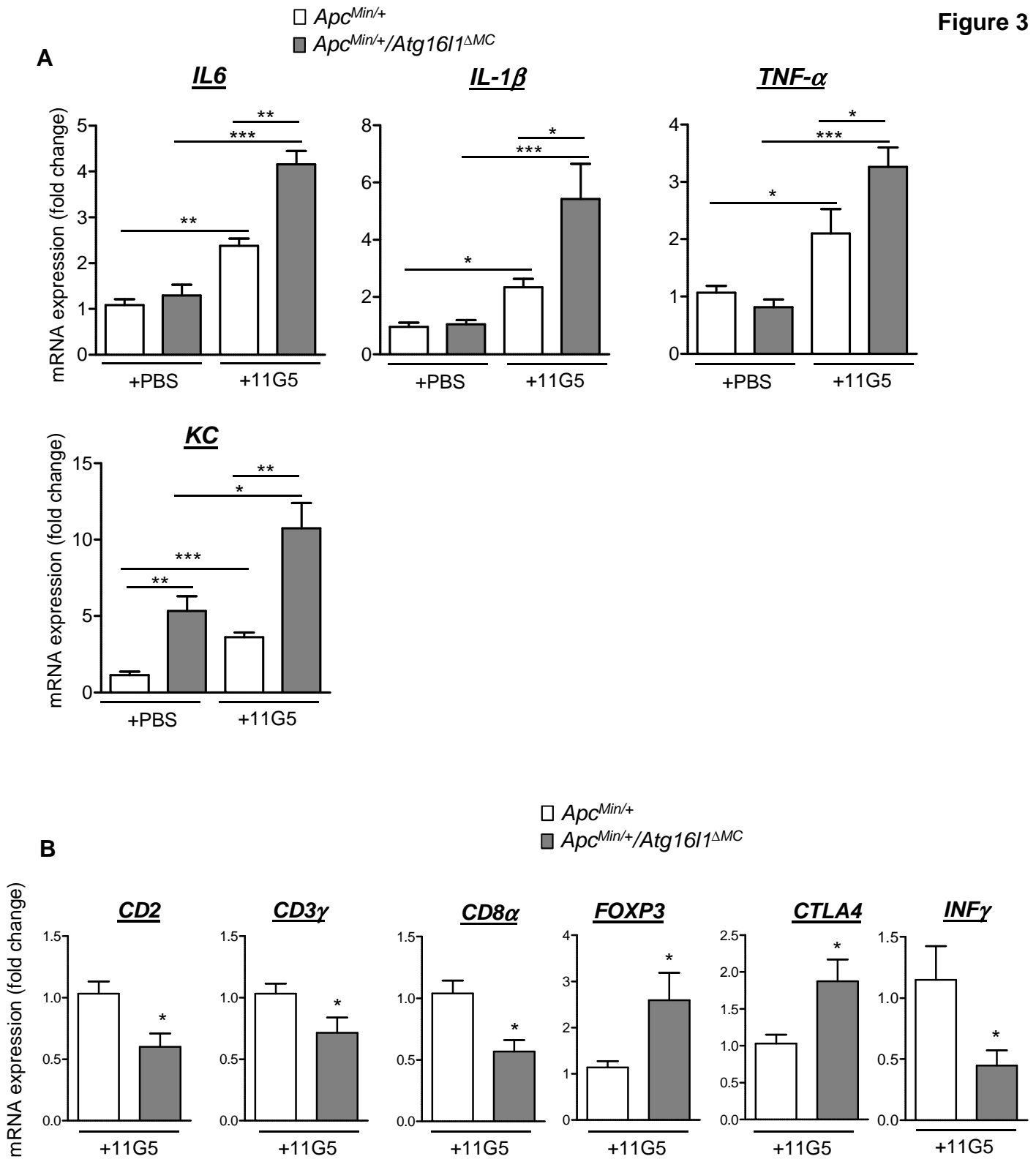


Figure 4

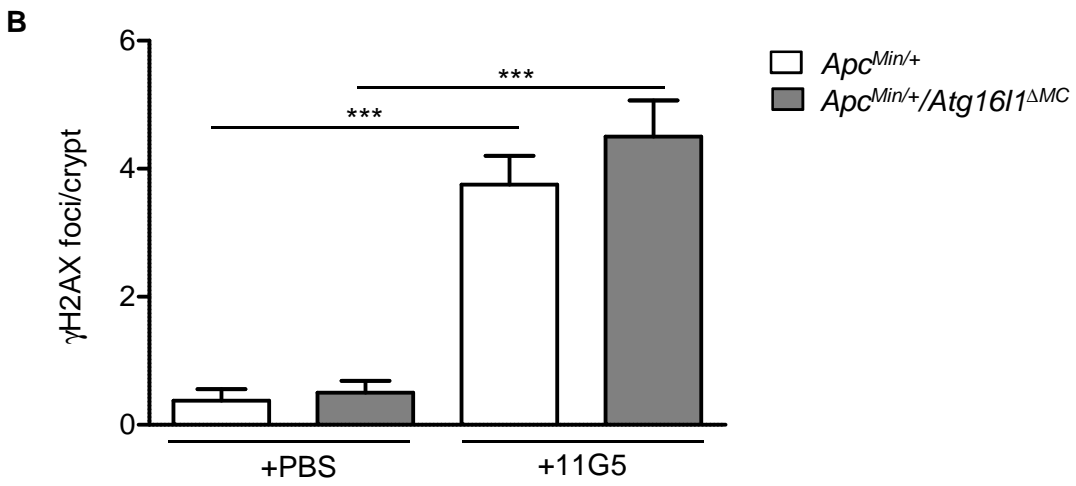
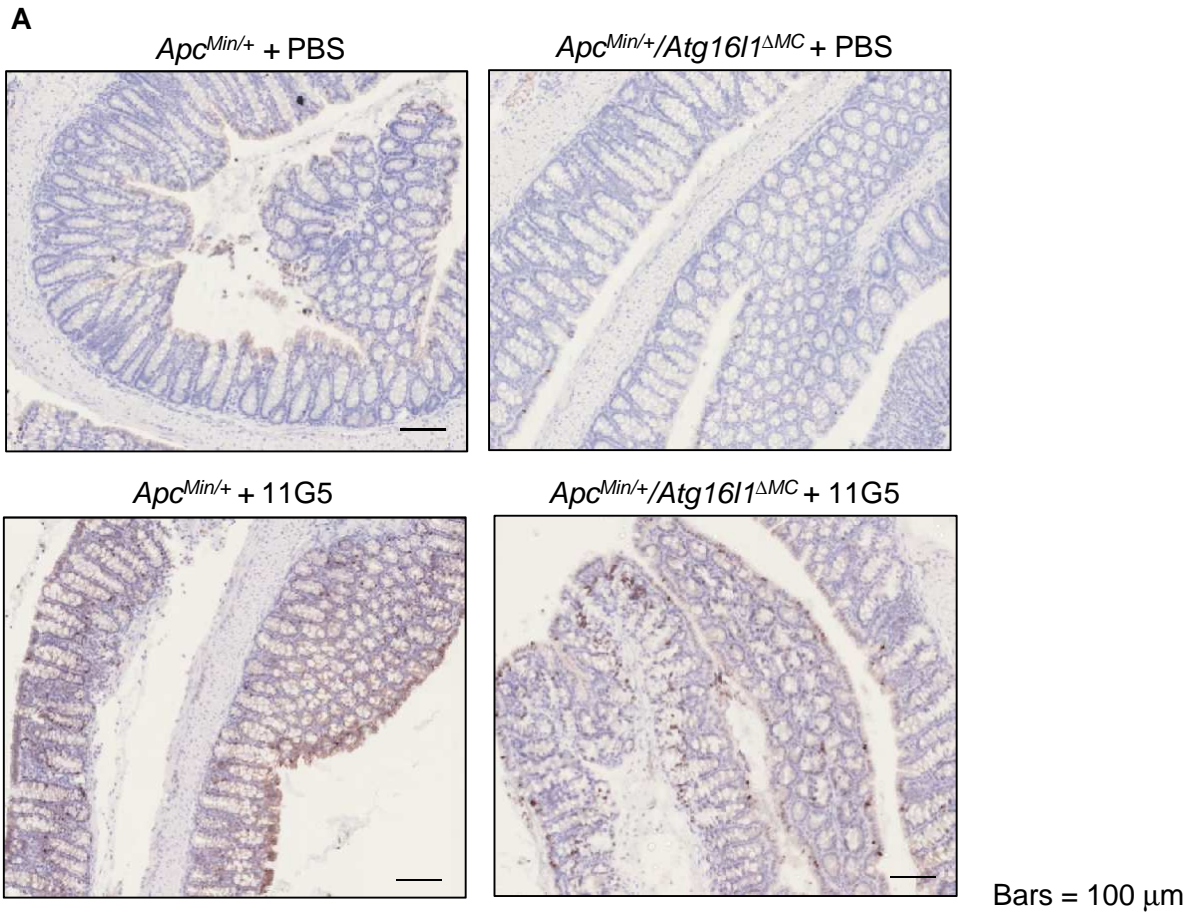


Figure 5

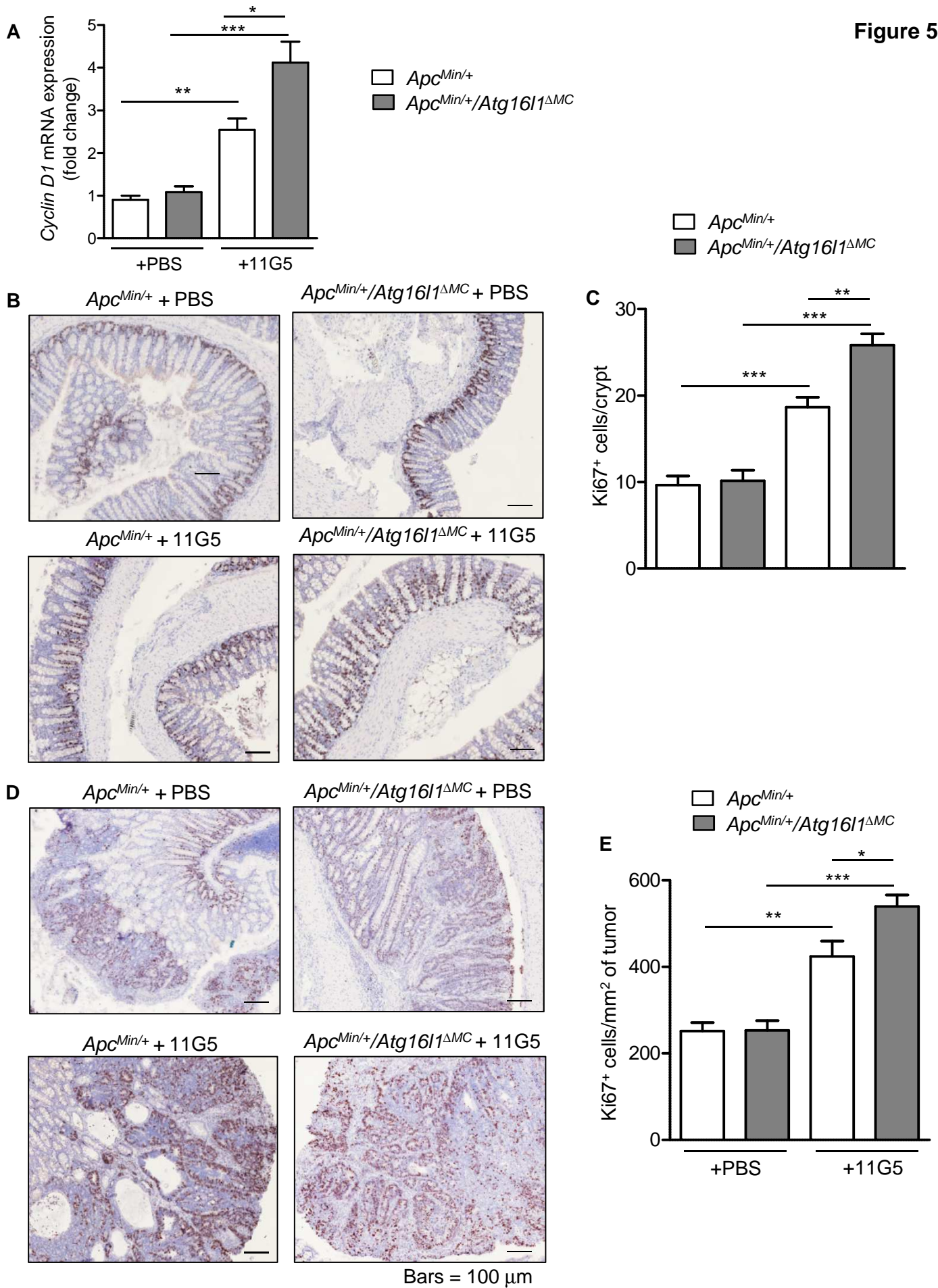


Figure 6

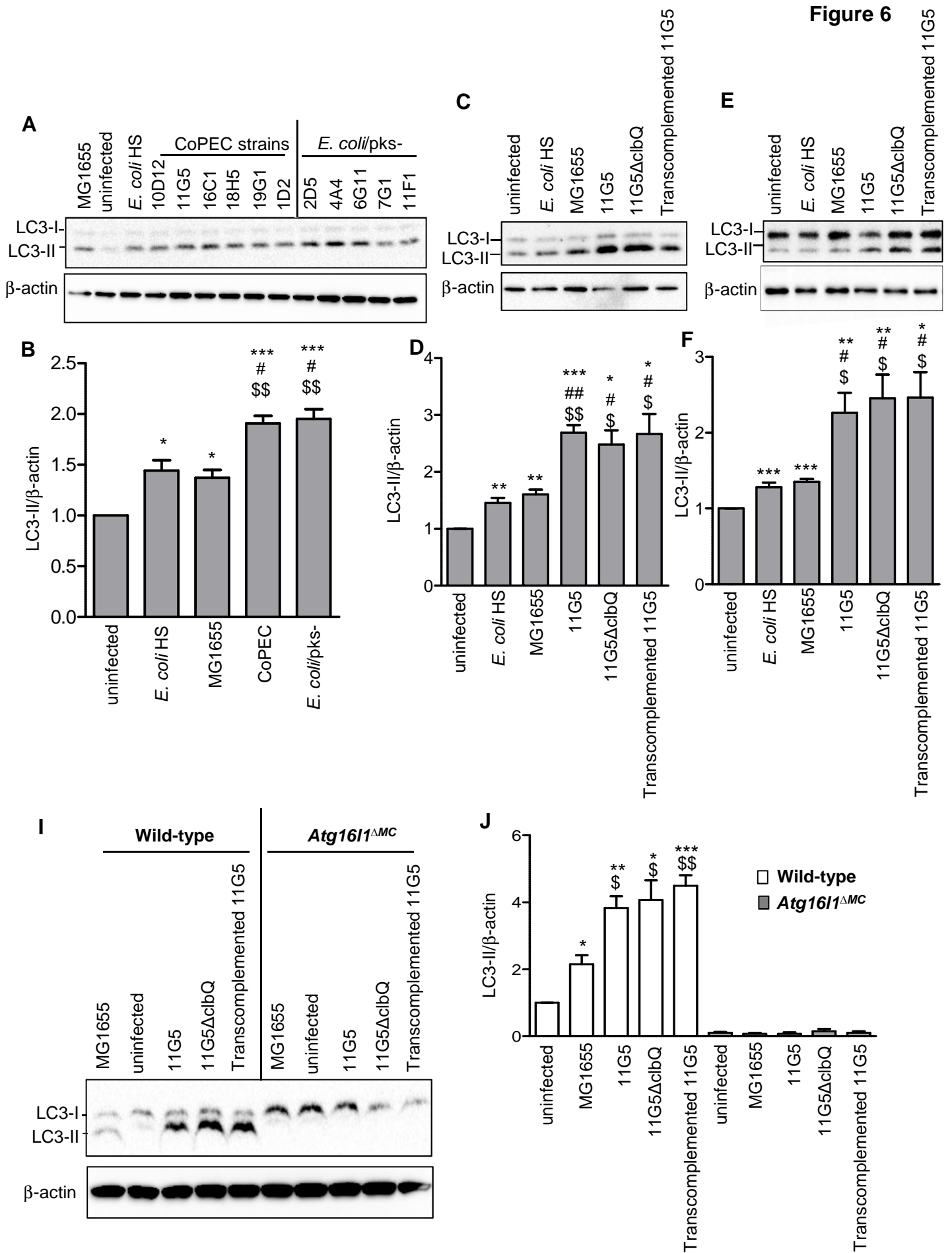


Figure 7

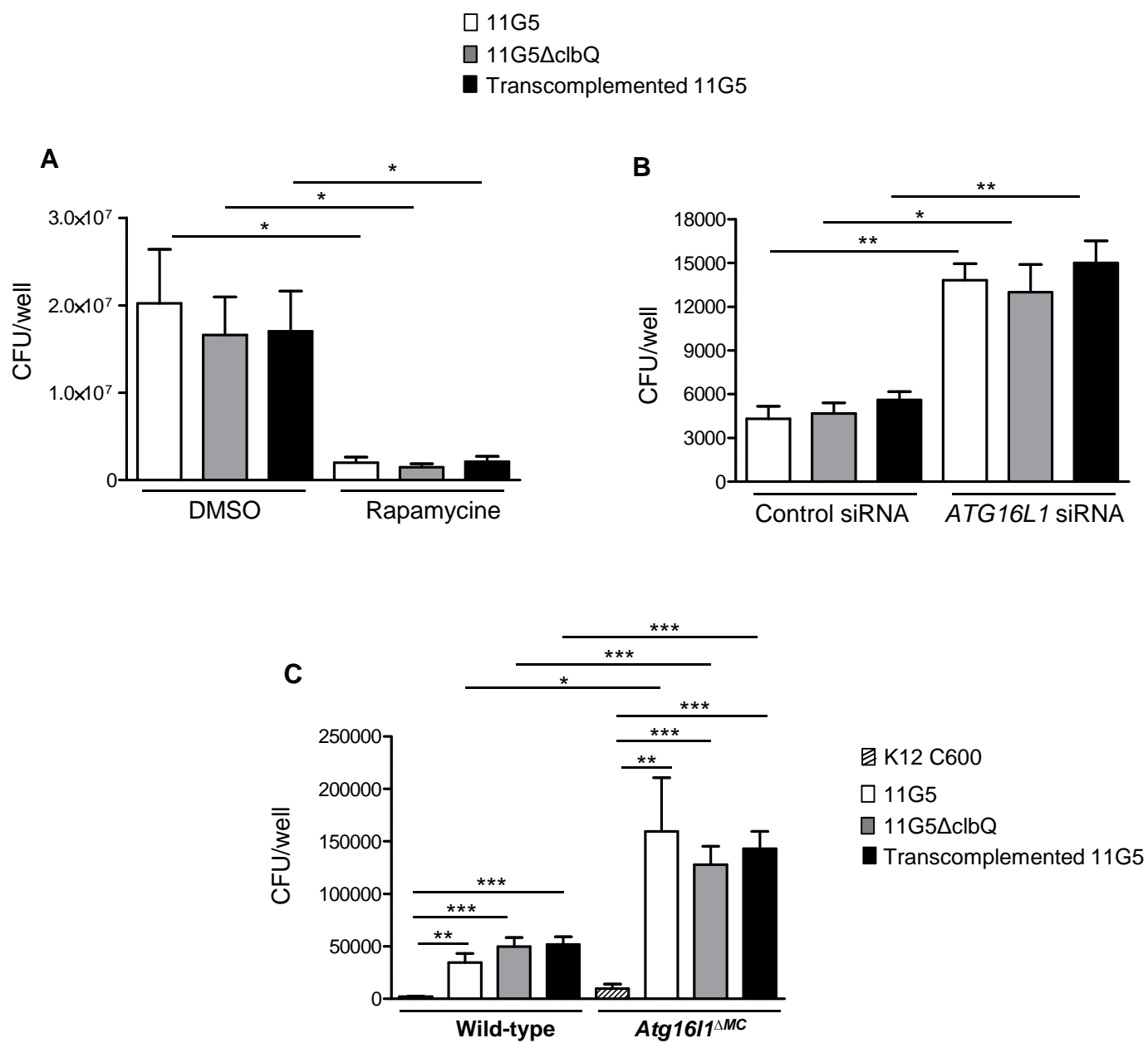


Figure 8

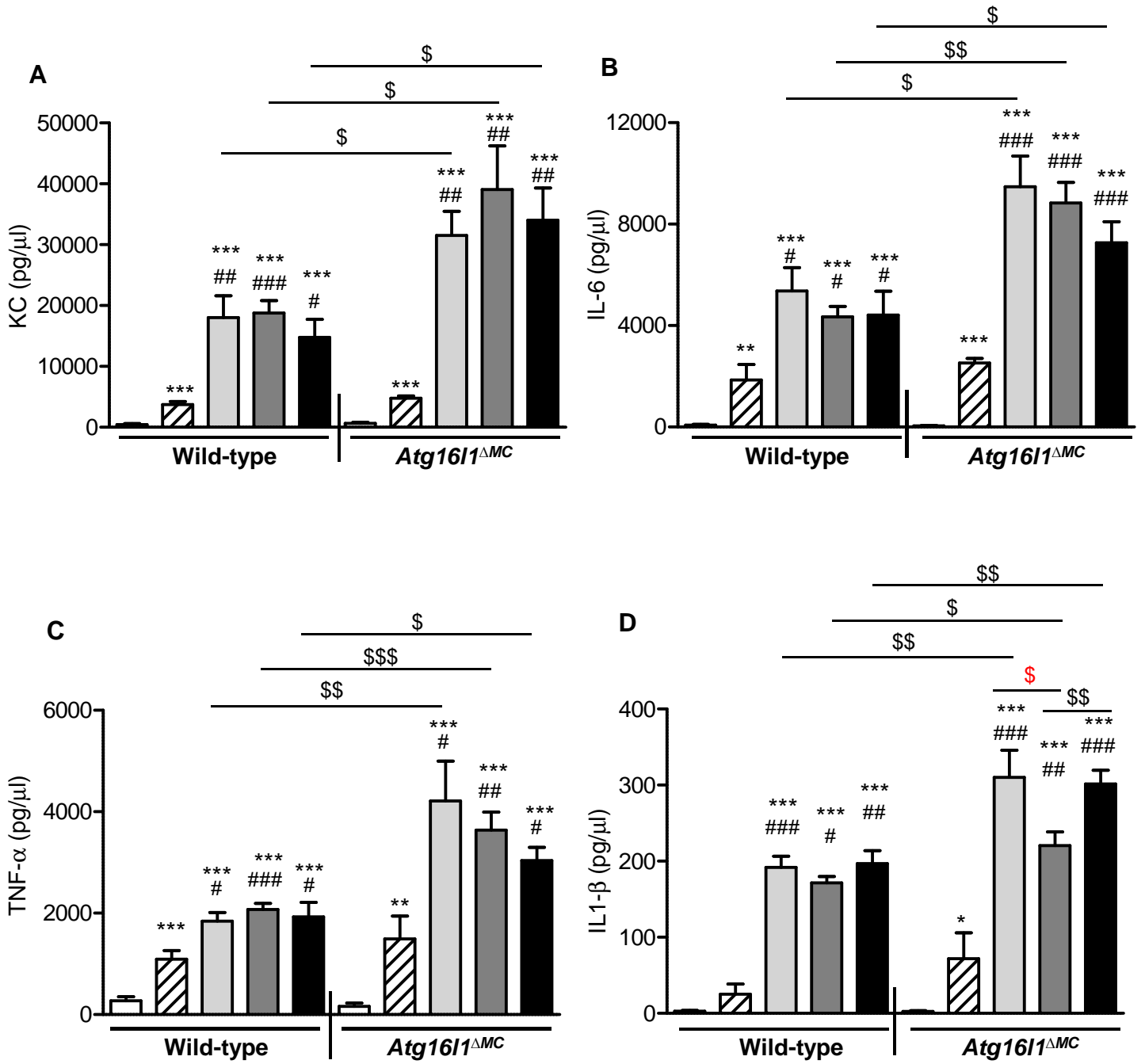
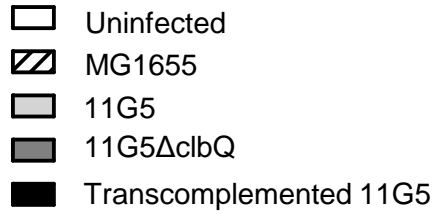


Figure 9

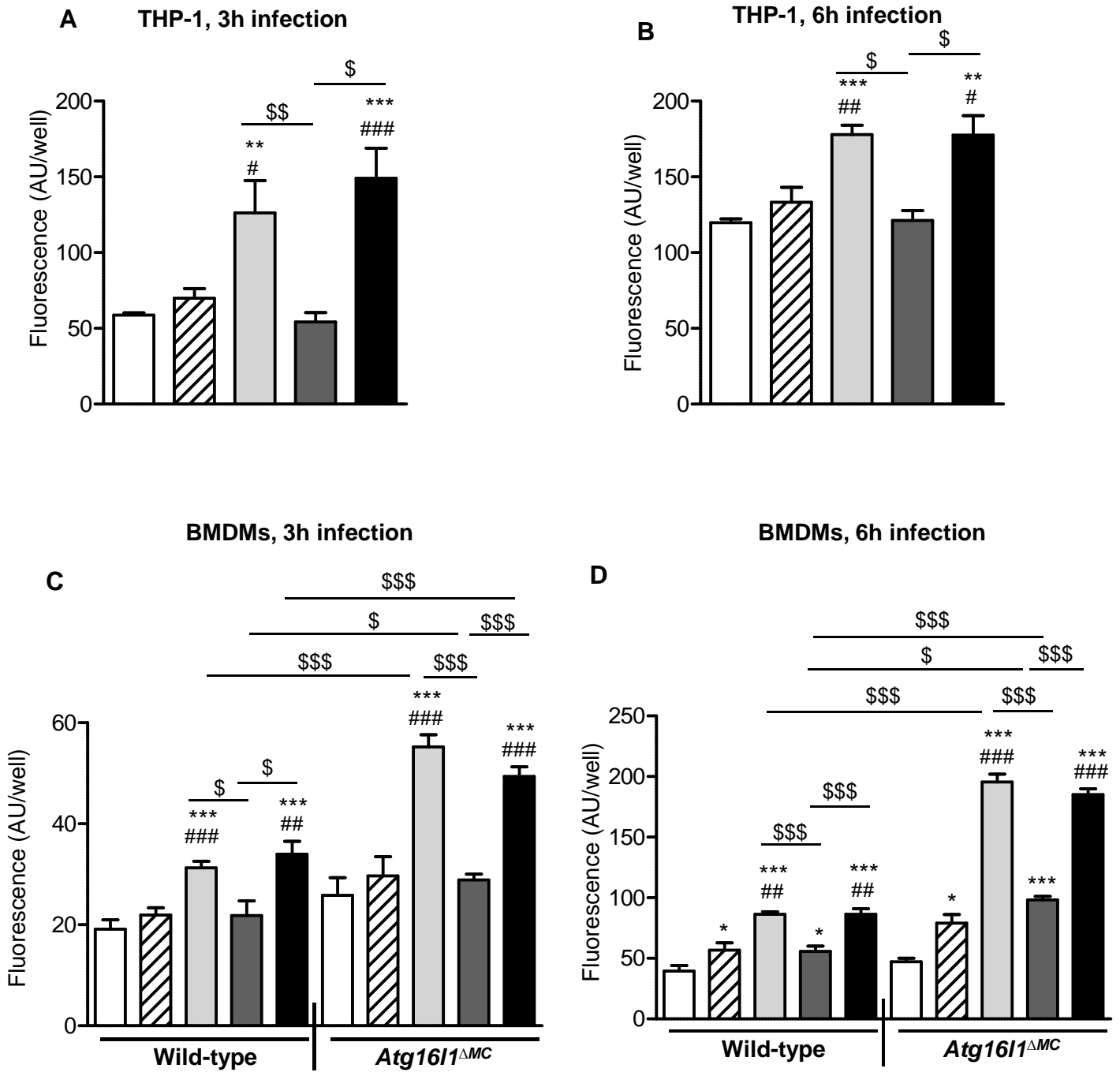
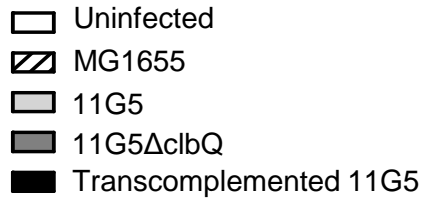
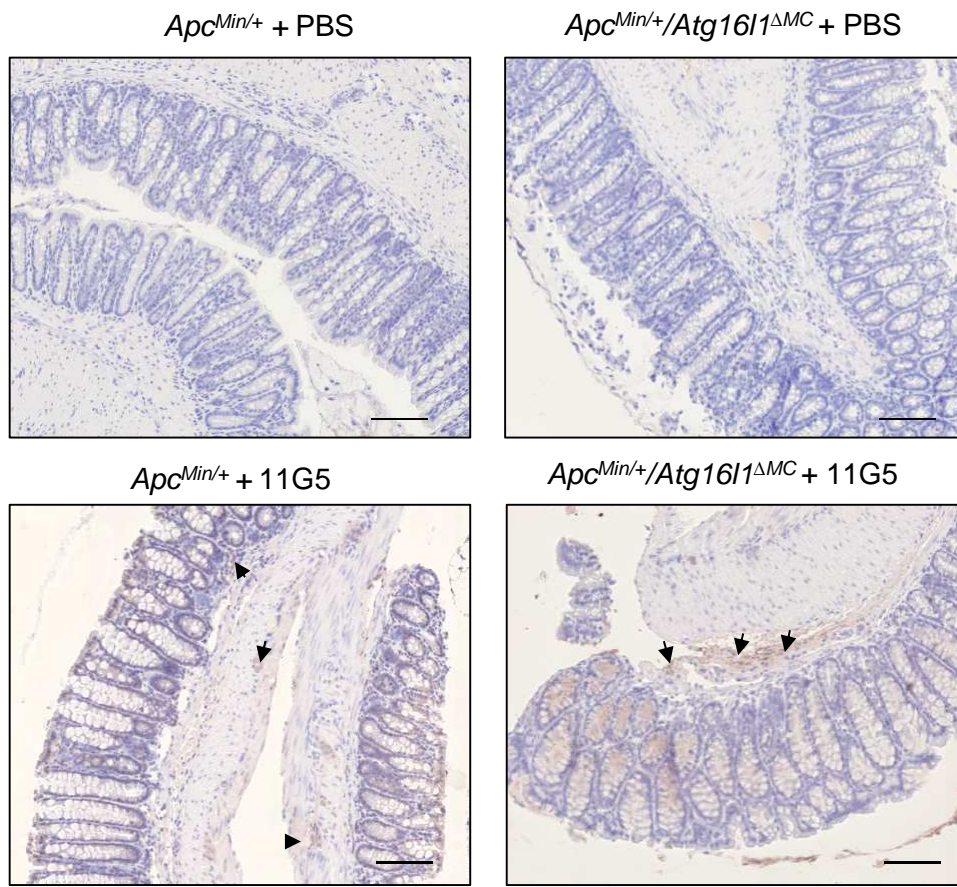


Figure 10



Bars = 100 μ m

Table S1: Primers for qRT-PCR.

Primer	Sequence (5' -3')
<i>18S</i> -For <i>18S</i> -Rev	CCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGT CGCCGGTCCAAGAATTTACCTCT
<i>Cyclin D1</i> -For <i>Cyclin D1</i> -Rev	CAGACGTTTCCAGAACCAGATTC CCCTCCAATAGCAGCGAAAAC
<i>Il-6</i> -For <i>Il-6</i> -Rev	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT TTGCCATTGCACAACCTCTTTT
<i>Tnf-α</i> -For <i>Tnf-α</i> -Rev	AGGCTGCCCCGACTACGT GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAA
<i>Kc</i> -For <i>Kc</i> -Rev	TTGTGCGAAAAGAAGTGCAG TACAAACACAGCCTCCCACA
<i>Il-1β</i> -For <i>Il-1β</i> -Rev	TCGCTCAGGGTCACAAGAAA' CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC
<i>CD2</i> -For <i>CD2</i> -Rev	TGTATGGCACAAATGGGATG CAGTGGATCATGGGCTTT
<i>CD3γ</i> -For <i>CD3γ</i> -Rev	TGCTCTTGCTGTATATCATTGC AACAGAGTCTGCTTGCTAAGC
<i>CD8α</i> -For <i>CD8β</i> -Rev	TGCTGTCCTTGATCATCACTCT ACTAGCGGCCTGGGACAT
<i>FOXP3</i> -For <i>FOXP3</i> -Rev	ACCACACTTCATGCATCAGC ATCATGGCTGGGTTGTCC
<i>CTLA4</i> -For <i>CTLA4</i> -Rev	TCACTGCTGTTTCTTTGAGCA GGCTGAAATTGCTTTTCACAT
<i>IFN-γ</i> -For <i>IFN-γ</i> -Rev	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTA

For, forward; Rev, reverse.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

1. Implication de l'autophagie au sein des cellules épithéliales intestinale dans la réponse de l'hôte suite à l'infection par des CoPEC

1.1. Etude du rôle de l'autophagie et des CoPEC dans l'initiation de la tumorigenèse colorectale

Bien que plusieurs espèces bactériennes soient associées au développement du CCR, aucune d'entre elles n'est définie comme en étant responsable. Il a été montré que les CoPEC, en induisant des dommages à l'ADN, favorisent l'apparition de mutations dans les proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs comme *TP53* (Dziubańska-Kusibab et al., 2020; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020). De plus, de précédentes études ont mis en évidence que les CoPEC ne sont pas seulement présents dans les tumeurs de patients atteints de CCR mais également dans la muqueuse saine (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013). Ces données suggèrent donc que les CoPEC seraient susceptibles de jouer un rôle dans l'initiation du CCR. Cependant, de précédentes études montrent que l'infection par ces bactéries n'induit pas de tumorigenèse colique chez des souris sauvages ou non traitées (Lucas et al., 2017). Notre hypothèse est que les CoPEC, associés à des facteurs de risque, pourraient être à l'origine de lésions adénomateuses coliques. L'inflammation chronique est bien connue comme étant l'un de ces facteurs de risque dans l'étiologie du CCR (Zhou et al., 2019). Ainsi, pour étudier l'implication potentielle des CoPEC dans l'initiation du CRC, nous avons utilisé un modèle murin associé à l'inflammation chronique mais sans la présence d'un agent carcinogène ou d'une susceptibilité génétique. Nous avons précédemment exposé que l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales (CEI) est un mécanisme essentiel dans la défense de l'hôte pour inhiber la tumorigenèse colique causée par des CoPEC chez les souris *Apc^{Min/+}* génétiquement prédisposées au développement du CRC (Lucas et al., 2020). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons observé que l'infection par les CoPEC provoque la formation d'adénocarcinomes coliques invasifs, favorisée par la déficience de l'autophagie chez ce modèle murin. L'un des mécanismes à l'origine du développement du CCR dans ce modèle murin associé à l'inflammation chronique pourrait être la formation de dommages à l'ADN, qui est augmentée par la déficience de l'autophagie.

Une étude précédente a dévoilé la présence des CoPEC chez 40% des patients atteints de MICI (*Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*) (Arthur et al., 2012). Il serait intéressant d'associer la colonisation de la muqueuse colique par des CoPEC avec le devenir de ces patients. Pour ce faire, nous profiterons de l'accès à la cohorte de patients atteints de maladie de Crohn présente au laboratoire (groupe REMIND). La présence des CoPEC sera déterminée par l'isolement des souches d'*E.coli* et la présence de l'îlot *pks* sera détectée par PCR. Ces patients seront suivis et l'apparition de cancer sera observée par un examen endoscopique régulier.

Une alimentation occidentale, c'est-à-dire riche en gras et en sucre et pauvre en fibres, est fortement liée au développement du CCR (Barbirou et al., 2020). En effet, une récente étude a examiné l'impact d'un tel régime sur la carcinogenèse colique dans un modèle de colite induite préalablement traité avec un agent carcinogène, l'AOM (Benninghoff et al., 2020). Les souris nourries avec un régime occidental présentent une colite plus sévère et prolongée que celles ayant reçu une alimentation standard, ce qui a pour conséquence une augmentation de la tumorigenèse colorectale (Benninghoff et al., 2020). De plus, une étude préliminaire au laboratoire a montré qu'à la suite de 14 semaines de traitement avec un régime occidental, les souris développaient une inflammation intestinale supérieure à celle ayant été nourries avec un régime conventionnel. Une déficience de l'autophagie dans les CEI aggrave cette inflammation et entraîne une susceptibilité accrue aux bactéries AIEC associées à la maladie de Crohn.

Ainsi notre hypothèse réside en ce que les CoPEC, associés à des facteurs de risque du CCR, tels qu'un régime occidental, pourraient favoriser l'apparition de lésions adénomateuses. Pour tester cette hypothèse, nous infecterons les souris sauvages et déficientes pour l'autophagie dans les CEI avec des CoPEC. Puis les souris seront traitées avec un régime occidental (Agus et al., 2016). La formation de lésions adénomateuses sera examinée par une colonoscopie disponible au laboratoire à différents temps post-infection.

1.2. Mécanisme de régulation de l'autophagie dans les CEI par une infection par des CoPEC

Une récente étude a montré un lien étroit entre l'autophagie, les CoPEC et le CCR (Lucas et al., 2020). Les patients atteints de CCR et colonisés par les CoPEC possèdent une expression

Tableau 1 : Liste des microARN dérégulés chez les patients atteints de CCR et colonisés par les CoPEC

hsa-miR-937-5p	down
hsa-miR-1910-5p	up
hsa-miR-1273g-3p	up
hsa-miR-4726-3p	up
hsa-miR-1470	up
hsa-miR-4512	up
hsa-miR-6722-3p	down
hsa-miR-4728-5p	up
hsa-miR-6850-3p	up
hsa-miR-636	up
hsa-miR-6819-5p	down
hsa-miR-3651	up
hsa-miR-6869-5p	down
hsa-miR-4665-3p	up
hsa-miR-3620-3p	up
hsa-miR-200a-5p	up
hsa-miR-6775-3p	up
hsa-miR-6132	up
hsa-miR-1273e	down
hsa-miR-6756-5p	down
hsa-miR-371b-5p	down
hsa-miR-939-5p	down
hsa-miR-6815-3p	up
hsa-miR-4436b-5p	up
hsa-miR-4785	up

plus élevée de transcrits codants pour des protéines de l'autophagie, au sein de la muqueuse colique saine, en comparaison avec les patients non colonisés par cette bactérie (Lucas et al., 2020). Des résultats similaires ont été observés *in vitro* à la suite de l'infection des cellules HCT116 avec les CoPEC (Lucas et al., 2020). Parmi les transcrits surexprimés sont notamment présents : *ATG9A*, *ATG2A*, *MAPLC3*, *BECN1*, *ATG12* et *ATG7* (Lucas et al., 2020). Ces résultats suggèrent que les CoPEC sont capables de moduler le processus autophagique. Il a été observé que certains gènes de l'autophagie peuvent être régulés par des miARN. De plus, une étude précédente menée par le laboratoire a montré qu'à la suite de l'infection des CEI par les bactéries AIEC (*Escherichia coli* adhérents et invasifs), associées à la maladie de Crohn, les niveaux d'expression de miR-103A et miR-30C sont augmentés. Ces deux microARN inhibent respectivement l'expression de *ATG16L1* et *ATG5*, conduisant à une autophagie défectueuse et à une répllication intracellulaire anormale des bactéries AIEC (Nguyen et al., 2014). Dans le cadre du CCR, l'infection par des *Fusobacterium nucleatum* amène à une diminution de miR-18a* et miR-4802, entraînant l'activation de l'autophagie et l'instauration d'une chimiorésistance permettant à la bactérie de prospérer (Yu et al., 2017).

Ainsi, nous examinerons si l'infection par des CoPEC pourrait moduler les niveaux des microARN, régulant ainsi l'expression des gènes de l'autophagie. Nous avons analysé par une puce miARN le profil des microARN au sein de la muqueuse colique des patients atteints de CCR ayant une colonisation par les CoPEC (9 patients CoPEC+) et les patients qui n'en ont pas (7 patients CoPEC-). Les résultats ont mis en lumière une diminution de 6 miARN et une augmentation de 9 miARN chez les patients CoPEC+ par rapport aux patients CoPEC- (**Tableau 1**). Parmi les microARN dérégulés chez les patients CoPEC+, l'analyse *in silico* nous a permis de montrer que 12 miARN pourraient cibler les transcrits codants pour les protéines autophagiques. Pour augmenter la stringence de la prédiction, nous avons sélectionné uniquement les miARN qui sont prédits par au moins 2 algorithmes. En particulier, miR-6756-5p a été prédit par 3 algorithmes pour cibler le transcrit *ATG9A* (**Tableau 2**). Ce résultat suggère que la colonisation par des CoPEC pourrait moduler le processus autophagique *via* ces microARN.

Nous proposons de vérifier le niveau de ces miARN par qRT-PCR dans les lignées cellulaires de CCR, par exemple les cellules HT-29 et HCT-116, à la suite de l'infection par des CoPEC. Il serait également intéressant de regarder si cette altération est dépendante ou non de la

Tableau 2 : Liste des transcrits, codant pour des protéines de l'autophagie, ciblés par les microARN qui sont retrouvés augmentés (rouge) et diminués (vert) chez les patients CoPEC+ en comparaison des CoPEC-

	TargetScanVert	miRBD	miRTABASE
hsa-miR-1910-5p	ATG10	X	X
	ATG7	X	X
	ATG7	X	X
	MAP1LC3	X	X
hsa-miR-200a-5p	ATG10	X	X
	ATG4D	X	X
hsa-miR-675-3p	ATG9A	X	X
	ULK1	X	X
hsa-miR-6132	ATG16L1	X	X
	ATG2B	X	X
hsa-miR-6815-3p	ATG2A	X	X
	ATG5	X	X
hsa-miR-443b-5p	ATG9A	X	X
	ULK1	X	X
hsa-miR-6726-3p	ATG9A	X	X
	ATG4A	X	X
hsa-miR-6869-5p	ATG13	X	X
	ATG9A	X	X
hsa-miR-6756-5p	ULK1	X	X
	MAP1LC3A	X	X
hsa-miR-371b-5p	ATG3	X	X
	ATG12	X	X
ULK2	X	X	

	TargetScanVert	miRBD	miRTABASE
hsa-miR-6722-3p	ATG9A	X	X
	ATG4A	X	X
hsa-miR-6869-5p	ATG13	X	X
	ATG9A	X	X
hsa-miR-6756-5p	ULK1	X	X
	MAP1LC3A	X	X
hsa-miR-371b-5p	ATG3	X	X
	ATG12	X	X
ULK2	X	X	

5' 76..AGCCUGGCUUUAUAGGACUGA..84	5' 403..GECUUGACCCUACACCCUGCA..410
UCGCCGUCCGUCUCUGACC	
5' 66..CUCGACGCCAGAC-AGAGUCC..72	3' 68ACCGGGGGGGU--GGAGAGU
UCCGCGUCCGUGGUGGUGACC	
5' 233..UGGCGUCUUAUAGACUGGGA..240	5' 612..AUCUUCMAACACUCCACCC..618
ACCGCGUUCUCCUUGGACACA	3' UCGGGUGGAGUCCGGGUGGA
5' 367..GAGUGGUGGUAUACAGACA..374	
ACCGCGCGUCGUCGUGUGU	5' 232..CUCUUAACCCUCCCCACCC..236
5' 684..UGUGUUCUUAUUAUAGUAUA..691	
AGUUACGAGGAGGUGUUCUAC	3' UCGGGUGGAGUCCGGGUGGA
5' 240..CCGCGACCCUACAGGCCU..246	
GACCGGUCUUCU--GGCCGGA	
5' 47..AUGAGGACCGUCUCCUCC..53	5' 306..CACUUUACCUACCCUCCAA..312
ACUUAUGGGGUGGAGACA	3' ACUUAUGGGGUGGAGACA
5' 36..CCCCGUCUCCGACCCUGCA..43	5' 109..GAUCGUGUGGACCCUCC..115
ACUUAUGGGGUGGAGACA	3' ACUUAUGGGGUGGAGACA
5' 882..UGGUCUUAUAGUCA--AGAAGCCU..888	
GACCCACAGUCUUCUUGU	
5' 411..CUGAAAAGAGACAGAAACA..418	
GACCCACAGUCUUCUUGU	
5' 403..GUCCAGUCUGAAGAGGAA..410	
CGUCCCGCCGUCACUUG	
5' 572..AAUUAAGUCUAAAGUUGAA..579	
CGUCCCGCCGUCACUUG	

présence de la colibactine et, pour cela, les mutants incapables de produire la colibactine seront utilisés. Si ces résultats sont confirmés, la transfection d'anti-miARN ou de miARN mimic pourra nous permettre de caractériser l'impact de ces miARN sur le processus autophagique, la survie intracellulaire de la bactérie ainsi que les effets pro-tumoraux des CoPEC. A cette fin, à la suite de la transfection et de l'infection par les CoPEC, nous analyserons l'accumulation de différents marqueurs de l'autophagie (LC3, p62) et γ H2AX, un marqueur de dommages à l'ADN, par Western blot ou un marquage immunofluorescent. Par l'analyse ELISA, nous regarderons la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires à partir du surnageant des cellules infectées. Enfin, un test de survie nous permettra d'analyser la capacité des CoPEC à se multiplier au sein des cellules.

1.3. Etude de l'implication de l'autophagie et d'une colonisation par des CoPEC dans la modulation de microbiote intestinal

L'implication du microbiote intestinal sur la carcinogenèse colorectale a été mise en évidence chez des souris déficientes pour le gène *Apc* spécifiquement dans les CEI de manière inducible au tamoxifène (souris *VilCreER^{T2}Apc^{lox/+}* ou *Apc^{+/-}*) et déficientes pour le gène *Atg7* uniquement dans les CEI (souris *VilCreER^{T2}Apc^{lox/+} Atg7^{lox/lox}* ou *Apc^{+/-} Atg7^{ΔCEI}*) (Lévy et al., 2015). Cette étude a montré que la déficience de l'autophagie entraîne la mise en place d'une dysbiose intestinale, qui est à l'origine d'une réponse immunitaire antitumorale, chez les souris *Apc^{+/-} Atg7^{ΔCEI}*. Ceci ayant pour conséquence, un développement tumoral ralenti chez les souris *Apc^{+/-} Atg7^{ΔCEI}* en comparaison des souris *Apc^{+/-}* (Lévy et al., 2015).

Nous avons également mis en évidence une diminution de la tumorigenèse colorectale chez les souris *Apc^{Min/+} Atg16l1^{ΔCEI}* par rapport aux souris contrôles (Lucas et al., 2020). Cependant, à la suite d'une infection par la souche CoPEC 11G5, les souris *Apc^{Min/+} Atg16l1^{ΔCEI}* développent un nombre et un volume tumoral plus importants que les souris *Apc^{Min/+}* (Lucas et al., 2020). Afin d'étudier l'implication du microbiote intestinal dans les effets observés, les tumeurs et muqueuses saines ont été préalablement extraites et soumises à un séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. Un résultat préliminaire montre qu'à la suite de l'infection par CoPEC, la diversité du microbiote associé aux tumeurs chez les souris *Apc^{Min/+}* varie en comparaison des souris *Apc^{Min/+}* non infectées. Cependant cette variabilité est d'autant plus

Tableau 3 : Liste des antibiotiques utilisés pour la transfert de flore

	mg/mL
Vancomycine	2,5
Néomycine	5
Augmentin	5
Cefotaxime	5
Cloxacilline	5
Métronidazole	50
Amphotéricine	0,5

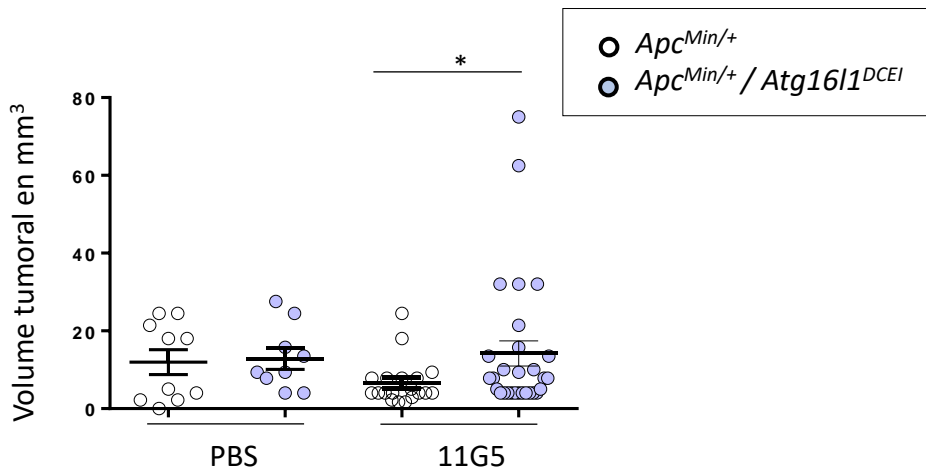


Tableau 37 : Les effets du transfert de microbiote associé à la muqueuse colique des souris *Apc^{Min/+} / Atg16l1^{ΔCEI}* et des souris contrôles sur la tumorigenèse colorectale des souris *Apc^{Min/+}*

Les souris *Apc^{Min/+}* ou *Apc^{Min/+} / Atg16l1^{ΔCEI}* ont été traitées avec de la streptomycine durant 3 jours (jour-4) et ont reçu de l'eau (jour-1) durant 24h. Les souris ont été gavées (jour 0) avec du PBS ou avec 10⁹ unités-colonies de la souche 11G5 et ont été euthanasiées à 65 jour post-infection. Le microbiote associé à la muqueuse colique a été gavé aux souris *Apc^{Min/+}* qui ont été préalablement traitées pendant 15 jours avec un cocktail d'antibiotiques. Le graphique représente le volume tumoral déterminé au jour du sacrifice. Les données sont représentées par la moyenne ± l'erreur à la moyenne (les souris *Apc^{Min/+}* + PBS : n=4, les souris *Apc^{Min/+} / Atg16l1^{ΔCEI}* + PBS : n=5, les souris *Apc^{Min/+}* + 11G5 : n=4 et les souris *Apc^{Min/+} / Atg16l1^{DCEI}* + 11G5 n=8). L'analyse statistique a été effectuée par l'utilisation de l'ANOVA à 1 facteur suivi du test de Bonferroni. *P<.05.

marquée lorsqu'est associée, en plus de l'infection par les CoPEC, à une déficience de l'autophagie dans les CEI.

Afin de déterminer si cette dysbiose contribue à l'augmentation de la tumorigenèse colorectale chez les souris *Apc^{Min/+} Atg16l1^{ΔCEI}* infectées par la souche 11G5, nous avons réalisé un transfert du microbiote associé à la muqueuse colique des souris *Apc^{Min/+} Atg16l1^{ΔCEI}* et des souris contrôles, infectées ou non par la souche CoPEC 11G5 (donneuses), aux souris *Apc^{Min/+}* (receveuses). Pour cela, les souris receveuses ont été traitées par gavage durant 15 jours avec 100 μL d'une solution d'antibiotiques pour supprimer leur microbiote intestinal (**Tableau 3**). Malheureusement, lors de cette première expérience, un nombre conséquent de souris a dû être euthanasié durant la période du traitement antibiotique. Cependant, même avec un nombre faible de souris, nous avons observé une augmentation significative du volume tumoral chez les souris receveuses ayant reçu les échantillons des souris infectées par la 11G5 *Apc^{Min/+} Atg16l1^{ΔCEI}* vs *Apc^{Min/+}* (**Figure 37**). Cependant aucune différence n'a été relatée dans la condition non infectée (**Figure 37**). Bien que cette expérimentation soit à améliorer, les résultats préliminaires suggèrent que la déficience de l'autophagie dans les CEI associée aux CoPEC participerait à la formation d'une dysbiose impliquée dans la carcinogenèse colorectale.

A la suite de ces travaux, il serait intéressant d'identifier les populations bactériennes qui composent la dysbiose observée chez les souris *Apc^{Min/+} Atg16l1^{ΔCEI}* infectées par la souche 11G5. Pour ce faire, les données de séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S à partir des tumeurs colorectales seront plus amplement analysées et nous évaluerons la présence absolue et relative des genres bactériens présents.

Par la suite, nous isolerons des espèces bactériennes qui sont retrouvées augmentées chez les souris *Apc^{Min/+} Atg16l1^{ΔCEI}* infectées, et nous testerons leur capacité pro-carcinogène *in vitro*. Pour ce faire, nous inhiberons l'autophagie par transfection dans des lignées cellulaires de CCR avec des siARN dirigés contre les transcrits codant pour des protéines autophagiques et nous infecterons ces cellules avec les bactéries isolées. Nous regarderons l'habilité des bactéries à induire la prolifération des cellules par l'analyse en Western blot d'un marqueur de prolifération CYCLIN D1. Puis, par analyse ELISA, nous regarderons leur état inflammatoire à partir du surnageant des cellules infectées. Enfin, nous évaluerons la capacité des bactéries à se multiplier au sein des cellules en réalisant un test d'invasion. Si les effets pro-

carcinogènes sont validés *in vitro*, il sera possible de tester ces espèces *in vivo*, dans un modèle murin axénique ou gnotobiotique prédisposé au développement du CCR.

Les bactéries retrouvées diminuées chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ACEI}* infectées pourraient être considérées comme des bactéries dites « bénéfiques » ayant un rôle protecteur dans la carcinogenèse colorectale. Leur activité sur l'autophagie ainsi que sur la réponse de l'hôte à la suite de l'infection par les CoPEC (dommages à l'ADN, sénescence, inflammation, prolifération) sera étudiée *in vitro* et *in vivo*.

2. Implication de l'autophagie au sein des cellules myéloïdes dans la réponse de l'hôte à la suite de l'infection par des CoPEC

2.1. Caractérisation du rôle de l'autophagie dans les cellules myéloïdes dans la composition du microenvironnement tumoral à la suite d'une infection par les CoPEC

Puisque les cellules myéloïdes (MC : *Myeloid cells*) sont des contributeurs importants du microenvironnement tumoral, nous avons examiné le rôle de l'autophagie au sein des MC dans la carcinogenèse colorectale dans le cadre d'une infection par les CoPEC. Nous avons établi que la déficience spécifique de l'autophagie au sein des MC augmente le volume mais pas le nombre des tumeurs coliques chez les souris *Apc^{Min/+}* suite à l'infection par les CoPEC. Ceci est accompagné par une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires, une dérégulation de l'expression des gènes liés à la réponse des cellules T et une augmentation de la prolifération des cellules tumorales.

Nous avons voulu ensuite explorer le mécanisme sous-jacent de l'augmentation de la taille des tumeurs colorectales chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* infectées par les CoPEC. Comme les macrophages sont des cellules immunitaires infiltrantes prédominantes et favorisent les processus clés de la progression tumorale, nous avons isolés les BMDM (Bone marrow-derived macrophages) issus des souris *Atg16l1^{ΔMC}* et des souris sauvages. Bien que la déficience de l'autophagie entraîne une augmentation du nombre intracellulaire de la bactérie CoPEC 11G5 et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, ces effets sont indépendants de la présence de l'îlot pks puisqu'ils ont été aussi observés lors de l'infection par le mutant 11G5 Δ *clbQ*. Cependant, nous avons montré que la sécrétion de l'IL-

1 β est partiellement dépendante de la présence de l'îlot pks quand l'autophagie est déficiente. *In vivo*, la colonisation colique de la 11G5 ou 11G5 Δ *clbQ* sont similaires. Cependant, comme les expérimentations utilisant le mutant 11G5 Δ *clbQ* ont été réalisées que très récemment, nous n'avons pas encore analysé les données issues des souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* et des souris *Apc^{Min/+}* infectées avec la 11G5 Δ *clbQ*.

De manière intéressante, nous avons observé une augmentation de la production des ROS par les BMDM issus des souris *Atg16l1 Δ MC* suite à l'infection par les CoPEC comparativement à l'infection par le mutant 11G5 Δ *clbQ*. Dans la carcinogenèse, un des mécanismes par lesquels les ROS favorisent la progression tumorale est la suppression des cellules immunitaires. Une étude a relevé qu'un niveau important de ROS au sein du micro-environnement tumoral inhibe la prolifération des cellules T, lesquelles jouent un rôle central dans la réponse antitumorale, favorisant la progression de la carcinogenèse colorectale. De plus, une étude a montré que les ROS produits par les macrophages induisent les Tregs, une source d'immunosuppression, diminuant ainsi l'immunité des cellules T cytotoxiques infiltrées.

Nos résultats préliminaires montrent que l'expression des gènes associés à la réponse T CD8⁺ cytotoxique (CD2, CD3 γ , CD8 α) est diminuée alors que celle associée aux cellules Treg immunosuppressives (FOXP3, CTLA4) est augmentée chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* vs *Apc^{Min/+}* infectées avec la souche 11G5. Ce résultat suggère que la composition du micro-environnement tumoral favoriserait la progression tumorale chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* infectées avec les CoPEC. Cependant, l'expression d'autres gènes associés aux cellules T CD8⁺ cytotoxiques (CD8 β , IL-15, ZAP70, GZMA, GZM β , GZM κ , PRF1) ainsi que d'autres populations des cellules T jouant un rôle important dans la réponse immunitaire tumorale [(cellules Th1 (STAT1, IRF1, IFN- γ , TBX21, IL-12R β 1), les cellules Treg (FOXP3, CTLA4, TGF- β 1), les cellules Th17 (IL-17R β , IL-23 α , RORC, IRF4, CCL20, CCR6, STAT3)] ont besoin d'être examinées. De plus, le niveau d'IFN- γ , connu pour favoriser l'immunité antitumorale, est diminué chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* vs *Apc^{Min/+}* infectées avec la souche 11G5. Ainsi l'expression des gènes associés à la réponse de l'IFN- γ seront analysés par qRT-PCR ou puce à ARN. Les cellules immunitaires seront également isolées à partir de la muqueuse saine et des tumeurs pour caractériser les populations des cellules T ainsi que d'autres cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, cellules NK, lymphocytes B) par l'analyse de cytométrie en flux en utilisant des marqueurs spécifiques.

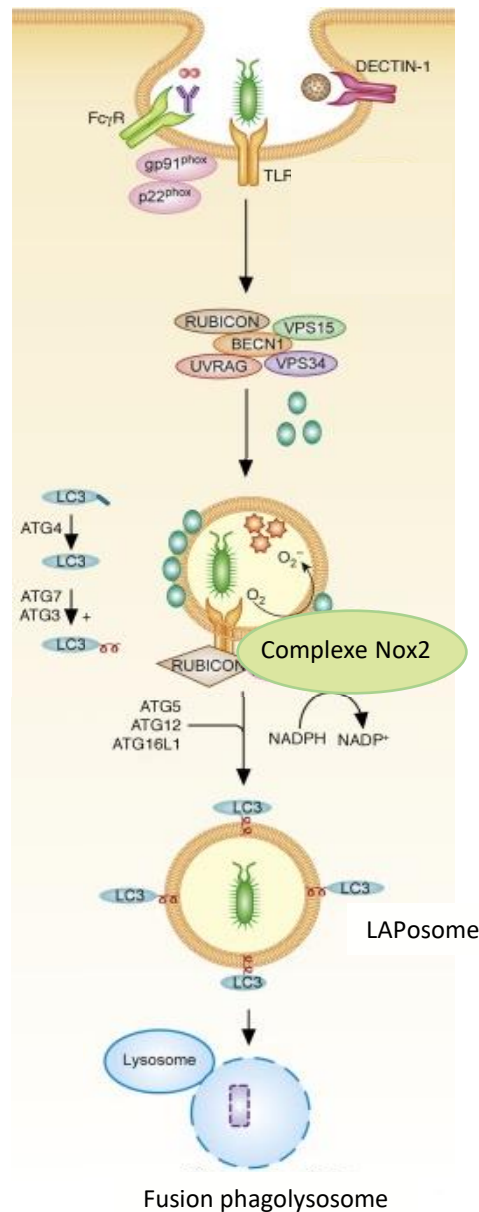


Figure 38 : La voie LAP

La voie LAP est initiée par la phagocytose des récepteurs de surface comme TLR2, DECTIN-1, Fc γ R et TIM4 lors de la reconnaissance des bactéries. Cela amène au recrutement et à l'assemblage du complexe NOX2 (*NADPH oxydase*) qui est stabilisé par RUBICON. RUBICON est aussi composé du complexe PI3K (RUBICON BECN1, VPS15 et VPS34) qui génère du PI3P. Le PI3P se lie à la sous unité p40^{phox} du complexe NOX2. La génération de ROS par la NADPH oxydase amène au recrutement de la machinerie permettant la conjugaison de LC3 à la membrane du phagosome. La protéine LC3 est associée à son PE et décore la membrane du LAPosome qui fusionne ensuite avec le lysosome pour donner un phagolysosome.

(D'après Upadhyay et al 2019)

Nous souhaitons également démontrer un lien direct entre les ROS produits par les CoPEC, la réponse T et la progression de la carcinogenèse colorectale chez les souris *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* vs *Apc^{Min/+}*. Pour cela, nous bloquerons la génération de ROS par des inhibiteurs, comme le BHA (*Butylated hydroxyanisole*) et nous caractériserons la réponse immunitaire ainsi que la tumorigenèse chez les souris infectées par les CoPEC. Une précédente étude a montré que le traitement continu de BHA dans la nourriture des souris à hauteur de 7,5 g de BHA/kg n'est pas toxique pour les souris et qu'elles ne développent ni anomalies ni maladies particulières dans les deux années qui suivent (Zhang et al., 2013). Nous pouvons ainsi utiliser ce traitement dans notre modèle.

2.2. Autophagie ou LC3-associated phagocytosis

Dans notre seconde étude, nous avons exposé une augmentation de LC3-II, à la suite de l'infection par les CoPEC, au sein des macrophages humains THP-1 et des BMDM (*Bone marrow-derived macrophages*). Ainsi, nous avons pu suggérer que le mécanisme mis en jeu à la suite de l'infection est l'autophagie. Cependant, une forme d'autophagie non décrite dans ce manuscrit existe, appelé autophagie non canonique ou LAP (*Lc3-associated phagocytosis*) (**Figure 38**).

Contrairement à l'autophagie, qui est un processus présent dans toutes les cellules eucaryotes, la voie LAP est cantonnée aux cellules douées de phagocytose comme les macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et les cellules épithéliales. Caractérisée par la conjugaison de LC3 à la membrane du phagosome, la voie LAP utilise une portion de la machinerie autophagique. Cependant, la manipulation de la voie LAP *in vivo* altère l'activation immunitaire et la réponse inflammatoire sans affecter l'autophagie conventionnelle (Heckmann and Green, 2019).

La voie LAP est initiée par la reconnaissance de l'élément à dégrader grâce à des récepteurs membranaires spécifiques, tels que les TLR (*Toll-like receptor*). Ceci amène au remodelage du cytosquelette qui permet l'internalisation du cargo emprisonné au sein d'un phagosome, vésicule à simple membrane. Du PI3P est produit à la membrane du LAPosome par le complexe PI3KCIII (*PI3-kinase de classe III*) constitué de BECN1, UVRAG, RUBICON et de la kinase PI3K ainsi que de sa sous unité régulatrice 4. Par la suite, NOX2 (*Complexe NADPH oxydase 2*) est recruté au phagosome et produit au sein de ses derniers des ROS. Ceux-ci sont à

l'origine du recrutement de deux systèmes de conjugaison impliqués dans l'autophagie : ATG12 -ATG5-ATG16L1 et LC3-II. Le LAPosome fusionne ensuite avec le lysosome et le matériel séquestré est dégradé. Bien que la plupart des protéines qui interviennent dans le processus autophagique et dans la voie LAP soient identiques, ATG14L1 et le complexe ULK1 signalent l'activation du processus autophagique alors que NOX2 est associée à la voie LAP.

Tout comme l'autophagie, la voie LAP est impliquée dans le contrôle des bactéries intracellulaires. En effet, à la suite d'une infection par les *Listeria monocytogenes*, la voie LAP est activée au sein des macrophages pour permettre l'élimination des bactéries (Gluschko et al., 2018; Mitchell et al., 2018). Il en est de même pour les *Streptococcus pneumoniae* qui sont associés avec des phagosomes de façon dépendante de NOX2, RUBICON mais pas de ULK1, FIP200 ou ATG14L1 (Inomata et al., 2020).

Ainsi, nous caractériserons l'implication de la voie LAP à la suite de l'infection par les CoPEC au sein des macrophages. Pour cela, les THP-1 ou BMDM seront infectés par la souche 11G5 couplée à de la GFP (*Green fluorescent protein*). Par l'analyse d'immunofluorescence, nous localiserons la bactérie et l'associerons avec des protéines spécifiques de la voie LAP, comme NOX2. A l'aide de siARN dirigés contre le transcrite codant pour ATG14L1, FIP200 ou ULK1 - protéines impliquées dans l'autophagie mais pas dans LAP - nous analyserons l'accumulation de LC3-II par Western blot à la suite de l'infection par les CoPEC. Si l'infection par les CoPEC induit une accumulation de LC3-II indépendamment d'ATG14L1, FIP200 ou ULK1, la voie LAP pourrait être activée et responsable de l'accumulation de LC3-II à la suite de l'infection par les CoPEC. Pour finir, par microscopie électronique en transmission, nous regarderons si les CoPEC sont présentes au sein de vacuoles composées d'une simple membrane, caractéristique de la voie LAP, ou d'une double membrane, propre au processus autophagique. Si la voie LAP est impliquée, nous mesurerons l'impact de son inhibition sur la survie intracellulaire des CoPEC. Dans ce but, nous utiliserons des siARN dirigés contre le transcrite de la NADPH et effectuerons un test de survie au sein des macrophages THP-1 et BMDM.

Ces travaux permettront de préciser les mécanismes impliqués dans le contrôle des effets pro-carcinogènes des CoPEC.

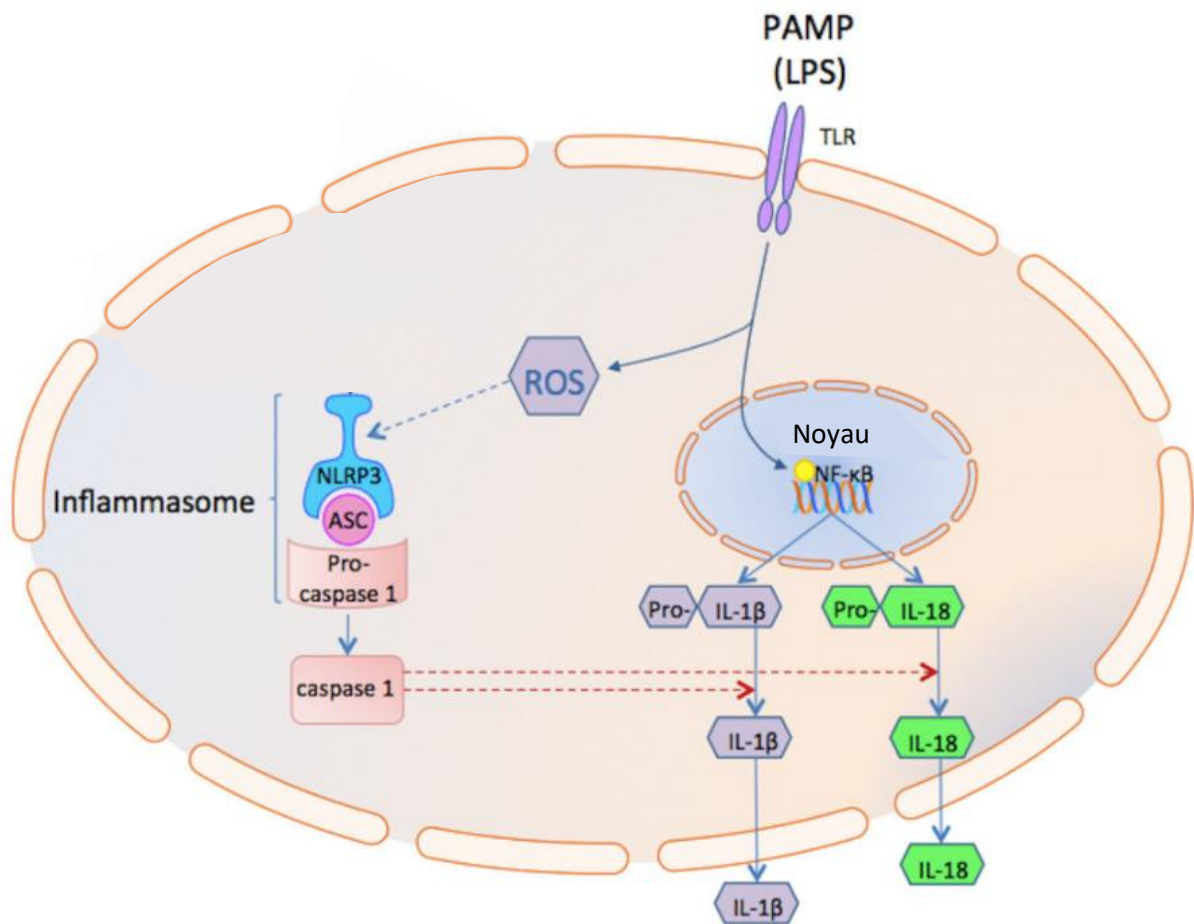


Tableau 39 : L'inflammasome NLRP3

La reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*), tel que le LPS, par les TLR, induit l'expression de NF-κB qui en retour intervient dans la synthèse des ARN messagers de l'IL-1β et IL-18. Les TLR en agissant sur la production de ROS activent l'inflammasome NLRP3. Ce complexe est défini par l'oligomérisation de la protéine ASC (*Apoptosis-associated speck like protein*) et de la pro-caspase-1, amenant à l'activation de la caspase-1. Cette dernière permet la conversion de la pro-IL-1β en IL-1β active et de la pro-IL-18 en IL-18 active. Ces deux cytokines activées sont alors sécrétée par la cellules.

2.3. Etude du rôle de l'autophagie et des CoPEC dans la polarisation macrophagique et le développement du CCR

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM : *Tumor-associated macrophages*) sont capables de se différencier en macrophages de phénotype M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire) en réponse à diverses stimulations présentes au sein du microenvironnement tumoral (Cassetta and Pollard, 2020). Comme les TAM représentent la composante principale du système immunitaire inné au sein du micro-environnement tumoral, le devenir des tumeurs est fortement impacté par leur polarisation différentielle.

A ce jour, le rôle de l'autophagie dans la polarisation macrophagique est peu connu. Cependant, une étude récente incrimine la stabilisation de la protéine NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) dans la polarisation macrophagique en phénotype M2 (Liu et al., 2020a). En étant stabilisée, NLRP3 interagit avec IRF4 (*Facteur 4 régulateur de l'interferon*), empêchant sa dégradation dépendante de p62 par l'autophagie et induisant le phénotype M2 (Liu et al., 2020a). *A contrario*, dans le phénotype M1, l'autophagie est initiée à la suite de l'induction de l'inflammasome NLRP3 pour limiter son activation et la production de ROS (**Figure 39**) (Liu et al., 2020a). Dans le cadre du cancer du sein, l'inhibition de l'autophagie augmente la production de ROS au sein des macrophages, entraînant une augmentation de l'activité de l'inflammasome NLRP3 et la polarisation en phénotype M1 (Cotzomi-Ortega et al., 2021; Kim et al., 2020a).

Afin de caractériser le rôle de l'autophagie et des CoPEC dans la polarisation macrophagique, nous nous pencherons sur différents marqueurs exprimés par les THP-1 et BMDM à la suite de l'infection. Les macrophages de phénotype M1 sont caractérisés par une production de iNOS (*Nitrique synthase*), TNF- α et du marqueur de surface CD86. A l'inverse, les macrophages de phénotype M2 présentent une production d'arginase 1, d'IL-10 et du marqueur de surface CD206. Tous ces éléments peuvent être analysés par Western blot, immunofluorescence et cytométrie en flux (iNOS, arginase-1, CD86, CD206) ainsi que par les analyses ELISA et qRT-PCR (TNF- α , IL-10). Il serait également intéressant de caractériser quelle population de macrophages est associée aux tumeurs chez les souris *Apc^{Min/+}* et *Apc^{Min/+}/Atg16l1 Δ MC* infectées par les CoPEC. Pour cela, nous extrairons les cellules immunitaires infiltrées aux tumeurs et à

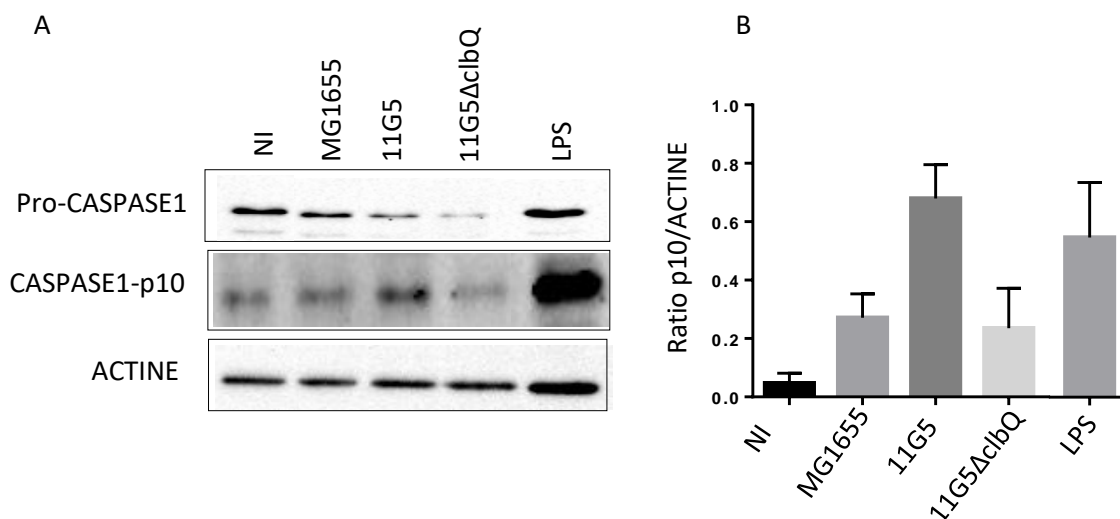


Tableau 40 : L'infection par les CoPEC semble induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains THP-1

Les macrophages THP-1 ont été infectés à MOI 100 par la souche MG1655, la 11G5 et le mutant durant 8h. Le contrôle positif a été réalisé en infectant les THP-1 avec du LPS (*Lipopolysaccharide*) pendant 14h. (A) Un Western blot représentatif en utilisant le lysat cellulaire et (B) la quantification de l'intensité des bandes à partir de 2 blots indépendants. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'erreur à la moyenne.

l'aide de différents marqueurs, nous analyserons leur densité par différentes techniques : cytométrie en flux, immunohistochimie ou immunofluorescence à partir des coupes de côlon.

Le rôle de l'autophagie dans ce processus pourra être défini par l'utilisation de BMDM issus de souris *Atg16l1^{ΔMC}* ou par l'utilisation de siARN dirigés contre les transcrits codants pour des protéines autophagiques dans les THP-1. A la suite d'une déficience de l'autophagie, la production élevée de ROS induits par les CoPEC favoriserait la formation et l'activation de l'inflammasome NLRP3, acteur majeur de l'inflammation macrophagique (Kim et al., 2020a). L'inflammasome NLRP3 joue un rôle dans la carcinogenèse colique et est notamment lié à la transition épithélio-mésenchymateuse et la progression du CCR (Marandi et al., 2021). Dans notre étude, il serait alors important non seulement d'analyser la polarisation macrophagique mais également l'état d'activation de l'inflammasome NLRP3. Pour ce faire, nous analyserons par l'immunoprécipitation suivis de Western blot l'interaction entre la protéine NLRP3 et ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), révélatrice de la formation de ce complexe. Son activation pourra être détectée par l'analyse de niveau de la CASPASE 1 clivée et la sécrétion de l'IL-1 β et IL-18. En effet, CASPASE-1 est clivée par le complexe NLRP3-ASC en sous-unités activatrices p10 et p20 qui sont sécrétées par la cellule. L'analyse par ELISA permettra de détecter ces deux sous-unités ainsi que la sécrétion de ces deux cytokines. Cette technique pourra être employée en utilisant le surnageant des cellules macrophagiques THP-1 et BMDM déficients ou non pour l'autophagie et infectés par les CoPEC. Les sous-unités CASPASE1-p10 and p20 pourraient également être détectées par Western blot.

De manière intéressante, nos résultats préliminaires ont montré que l'infection avec la souche 11G5 induit une augmentation de la sous-unité CASPASE1-p10 comparativement à la condition non infectée ou infectée avec la souche MG1655 et avec le mutant 11G5 $\Delta clbQ$ (**Figure 40**). Ce premier résultat nous laisse penser que les CoPEC seraient capables d'induire l'inflammasome NLRP3 de façon dépendante de l'îlot pks. Afin de regarder l'implication de l'autophagie dans ce processus, nous infecterons les BMDM sauvages et déficients pour l'autophagie avec les souches précédemment décrites. Nous espérons observer une augmentation de CASPASE1-p10, révélatrice de l'activation de l'inflammasome NLRP3, à la suite de l'infection par la 11G5 dans les BMDM issus de souris *Atg16l1^{ΔMC}* vs les BMDM sauvages. De plus, pour confirmer l'implication de la colibactine nous espérons également

observer une augmentation de CASPASE1-p10 dans les BMDM déficients pour l'autophagie et infectés par la souche 11G5 en comparaison avec l'infection par le mutant 11G5 Δ *clbQ*.

Dans la Figure 8D de la deuxième étude, nous avons observé une augmentation de la sécrétion de l'IL-1 β par les BMDM issus des souris *Atg16l1* ^{Δ MC} à la suite de l'infection par la 11G5, par rapport aux conditions non infectée ou infectée par le mutant 11G5 Δ *clbQ* (**Figure 8D**).

L'IL-1 β joue un rôle conséquent dans la progression des cancers. En effet, cette cytokine est d'abord associée à un mauvais pronostic dans le mélanome, le cancer du côlon, du poumon, du sein et du cancer de la tête et du cou (Rébé and Ghiringhelli, 2020). En ce qui concerne le CCR, il a été montré que l'IL-1 β induit une augmentation de l'expression de miR-181a dans les cellules issues du cancer colorectal, qui est responsable de la répression de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) et de l'induction de la prolifération (Hai Ping et al., 2016). Un effet similaire de l'IL-1 β dans la prolifération des cellules issues du cancer du côlon a été identifié *via* l'inactivation de GSK-3 β (*Glycogen synthase kinase*), amenant à l'activation de la voie Wnt et de la croissance tumorale (Kaler et al., 2009). Une fois sécrétée, l'IL-1 β peut cibler différents types cellulaires par le récepteur de l'IL-1 (IL-1R) - qui appartient à la superfamille des TLR/IL-1R - activant en aval les voies de signalisation. L'une de ces voies est celle de p38/JNK et NF- κ B, laquelle amène à la transcription des gènes cibles impliqués dans différents processus biologiques, suivant le type cellulaire qui a été stimulé par l'IL-1 β . Cette augmentation de la sécrétion de l'IL-1 β par les macrophages déficients en autophagie et infectés par la 11G5 *vs* infectés par le mutant pourrait être l'un des mécanismes sous-jacents de l'augmentation de la prolifération des CEI dans les cellules tumorales des souris *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1* ^{Δ MC} *vs* *Apc*^{Min/+}.

Comme mentionné précédemment, l'activation de l'inflammasome NLRP3 ne conduit pas seulement à la sécrétion de l'IL-1 β mais aussi de la sécrétion de l'IL-18. Ainsi pour confirmer notre hypothèse de l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la croissance tumorale, nous mesurerons le taux de sécrétion de l'IL-18 par l'analyse ELISA.

2.4. Etude du rôle de l'autophagie dans les cellules dendritiques à la suite de l'infection par les CoPEC

Notre étude concernant les cellules myéloïdes s'est intéressée plus particulièrement à la réponse inflammatoire macrophagique à la suite de l'infection par les CoPEC. Cependant,

dans notre modèle murin *Atg16l1^{ΔMC}*, l'autophagie n'est pas seulement déficiente dans les macrophages mais également dans les DC (*Dendritic cell*). Ces dernières régulent l'immunité innée et adaptative et expriment une myriade de PRR (*Pathogen recognition receptor*) qui contribuent à leur capacité à moduler rapidement la réponse immunitaire. Les antigènes produits à la suite d'une dégradation de pathogènes par le processus autophagique sont présentés par le CMH de classe II aux cellules T, permettant d'induire une réponse immunitaire adaptative (Oh and Lee, 2019). Une étude a montré que l'infection des DC par les AIEC associés à la maladie de Crohn active l'autophagie, qui contribue à l'élimination des bactéries intracellulaires et à la génération du CMH de classe II spécifique de la réponse immunitaire des LT CD4⁺ (Cooney et al., 2010).

Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de l'infection par les CoPEC et la déficience de l'autophagie sur la fonction des DC, qui par la présentation antigénique, moduleraient la réponse immunitaire adaptative. Pour ce faire, les DC seront dérivés à partir des cellules de la moelle osseuse des souris *Atg16l1^{flox/flox}* et *Atg16l1^{ΔMCs}* pour générer des BMDC (*Bone marrow-derived dendritic cells*). Après avoir infecté les BMDC avec les CoPEC, nous regarderons la quantité de CMH de classe II à la surface des cellules, par l'analyse en cytométrie en flux de H2-DR (l'équivalent chez l'homme de HLA : *Human leukocyte antigen DR*). *In vivo*, après extraction des cellules dendritiques présentes dans les tumeurs colorectales des souris *Apc^{Min/+}* et *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔMC}* infectées ou non par les CoPEC, nous regarderons par analyse en cytométrie en flux la quantité de DC qui expriment H2-DR à leur surface.

Pour finir, nous évaluerons la capacité des cellules dendritiques exposées aux CoPEC et/ou déficientes pour l'autophagie à induire la prolifération des LT CD4⁺. Après avoir isolé les LT CD4⁺ par cytométrie en flux à partir du sang, les lymphocytes seront mis en coculture avec les BMDC durant deux heures. Les DC auront au préalable été infectées avec les CoPEC. Puis, pour évaluer la prolifération des LT, ces derniers seront mis en contact avec un fluorochrome de prolifération cellulaire. Brièvement, le colorant se lie aux protéines cellulaires contenant des acides aminés primaires et, lorsque les cellules se divisent, il est réparti équitablement entre les cellules filles. La génération de cellules filles peut être mesurées comme une réduction de moitié consécutive de l'intensité de la fluorescence du colorant par cytomètre en flux (Quah et al., 2007).

3. Impact de l'induction de l'autophagie sur la carcinogenèse colorectale induite par les CoPEC

L'ensemble de ce travail de thèse montre que l'autophagie est un mécanisme essentiel de la défense de l'hôte, permettant de limiter les effets pro-carcinogènes des CoPEC. Nous souhaiterions évaluer l'impact de la modulation de l'autophagie sur le contrôle de l'infection par les CoPEC. Pour cela, nous utiliserons un agent pharmacologique, la rapamycine qui est un inducteur de l'autophagie largement utilisé dans les études *in vitro* et *in vivo*. Une étude récente a montré qu'un traitement à la rapamycine diminue le nombre de tumeurs coliques dans le modèle murin *Apc^{Min/+}* (Parihar et al., 2021).

Dans un premier temps, les CEI ou les macrophages THP-1 seront infectés par les CoPEC en présence ou absence de la rapamycine à 40 µg/mL (Bretin et al., 2016). Nous examinerons l'impact de ce traitement sur la production de ROS, les dommages à l'ADN, la senescence et le phénotype sécrétoire associé, ainsi que la production des cytokines et chimiokine inflammatoires (Lucas et al., 2020). *In vivo*, dès l'âge de 4 semaines, les souris *Apc^{Min/+}* seront nourries avec un régime contenant 42 ppm (*parts per million*) de rapamycine encapsulée, qui prodiguera une dose de 6,72 mg de rapamycine/kg du poids corporel/jour ou avec un régime contrôle qui comprendra des capsules vides (Johnson et al., 2015). Les souris seront ensuite infectées par les CoPEC puis le développement tumoral sera suivi par une colonoscopie. Les effets du traitement sur la carcinogenèse colorectale seront ensuite évalués. Les souris vont être sacrifiées à différents temps post-infections, et le nombre ainsi que la volume tumoral vont être déterminés. A partir des coupes de côlon, nous réaliserons un score histologique comme précédemment décrit (Lucas et al., 2020). Nous analyserons ensuite les effets pro-carcinogènes de CoPEC, tels que les dommages à l'ADN et la prolifération cellulaire, grâce à des analyses par l'immunohistochimie pour détecter respectivement les marqueurs γ H2AX et Ki67. Nous observerons également l'état inflammatoire en réalisant des qRT-PCR à partir de tumeurs et de la muqueuse saine. Les populations de cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral seront déterminés par l'analyse de cytométrie en flux ou par marquage immunofluorescent.

Cependant, l'utilisation de la rapamycine dans cette étude servira seulement de preuve de concept. En effet, des résultats ont montré que son utilisation amène à des effets qui sont

indépendants de l'autophagie tels que des effets immunosuppresseurs (Galluzzi et al., 2017). Pour autant, si nous montrons que la rapamycine permet de limiter le développement tumoral à la suite de l'infection par les CoPEC, des stratégies personnalisées pour moduler spécifiquement l'autophagie pourraient être envisagées et développées pour les patients qui présentent une colonisation par les CoPEC. De nouvelles stratégies vectorisées ou des interventions alimentaires basées sur des compléments alimentaires tels que les polyphénols végétaux ayant la capacité d'induire l'autophagie pourraient être considérés.

Conclusion générale

Conclusion générale

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de l'autophagie pour limiter les effets pro-carcinogènes des CoPEC. En premier lieu, nous avons montré *in vivo* que l'autophagie au sein des cellules épithéliales intestinales est nécessaire pour diminuer les dommages à l'ADN et la formation de cancers invasifs induits par les CoPEC, dans un modèle murin de CCR associé à l'inflammation chronique et ne présentant pas de susceptibilité génétique ou l'utilisation d'agents carcinogènes. Dans notre seconde étude, nous avons mis en évidence que l'autophagie au sein des cellules myéloïdes est nécessaire pour limiter l'accroissement tumoral dans le modèle murin *Apc^{Min/+}*, à la suite de l'infection par les CoPEC. L'étude du mécanisme qui en découle a révélé que l'autophagie permet de limiter la prolifération cellulaire, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la production de ROS et de moduler la réponse immune associée à l'infiltration des cellules T.

De nouvelles stratégies visant à moduler spécifiquement l'autophagie notamment par l'utilisation de thérapies vectorisées ou de nutriments, tels que les polyphénols végétaux ayant la capacité d'induire l'autophagie, pourraient être envisagées pour les patients présentant une colonisation par les souches CoPEC.

Valorisation scientifique

PRIX SCIENTIFIQUE

2020 Premier prix - 500 euros – « Club Francophone de l'autophagie »

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications :

1. Larabi, A., Salesse, L., Cordonnier, C., Etienne-Mesmin, L., Barnich, N., Dalmaso, G., and Nguyen, H.T.T. (2020). "Differential miRNA-Gene Expression in M Cells in Response to Crohn's Disease-Associated AIEC". *Microorganisms* 8.
2. Lucas, C., Salesse, L., Thi Hoang, M.H., Bonnet, M., Sauvanet, P., Larabi, A., Godfraind, C., Gagnière, J., Pezet, D., Rosenstiel, P., et al. (2020). "Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing Escherichia coli in ApcMin/+ Mice". *Gastroenterology*.
3. Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., Damon-Soubeyrand, C., Barnich, N., Godfraind, C., Dalmaso, G., et al. (2021). "Colibactin-Producing Escherichia coli Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model". *Cancers (Basel)* 13, 2060.

Manuscrit en préparation :

Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., Damon-Soubeyrand, C., Barnich, N., Godfraind, C., Dalmaso, G., et al. (2021). "Autophagy in myéloïde cells is necessary to inhibit colonic tumor growth in mouse models of colorectal cancer".

Présentations à des congrès nationaux et internationaux :

1. "Colibactin-Producing Escherichia coli Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model" Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., Damon-Soubeyrand, C., Barnich, N., Godfraind, C., Dalmaso, G., et al. – United European Gastroenterology – 2021 - Présentation orale.
2. "Colibactin-Producing Escherichia coli Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model" Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., Damon-Soubeyrand, C., Barnich, N., Godfraind, C., Dalmaso, G., et al. – Club Francophone de l'Autophagie– 2021 - Présentation orale.
3. "Colibactin-Producing Escherichia coli Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model" Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., Damon-Soubeyrand, C., Barnich, N., Godfraind, C., Dalmaso, G., et al. – Digestive Disease Week – 2021 - Présentation orale.

Bibliographie

- Abed, J., Emgård, J.E.M., Zamir, G., Faroja, M., Almogy, G., Grenov, A., Sol, A., Naor, R., Pikarsky, E., Atlan, K.A., et al. (2016). Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe* 20, 215–225.
- Advani, S.M., Advani, P., DeSantis, S.M., Brown, D., VonVille, H.M., Lam, M., Loree, J.M., Mehrvarz Sarshekeh, A., Bressler, J., Lopez, D.S., et al. (2018). Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Transl Oncol* 11, 1188–1201.
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., et al. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep* 6, 19032.
- 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.
- Ahmadi, A., Najafi, M., Farhood, B., and Mortezaee, K. (2019). Transforming growth factor- β signaling: Tumorigenesis and targeting for cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology* 234, 12173–12187.
- Aitchison, A., Hakkaart, C., Day, R.C., Morrin, H.R., Frizelle, F.A., and Keenan, J.I. (2020). APC Mutations Are Not Confined to Hotspot Regions in Early-Onset Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 12, 3829.
- 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 APC(Min/+) mice. *Cancer Immunol Immunother* 63, 807–819.
- Akhurst, R.J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11, 790–811.
- Al-Bari, M.A.A. (2020). A current view of molecular dissection in autophagy machinery. *J Physiol Biochem* 76, 357–372.
- Alissafi, T., Hatzioannou, A., Mintzas, K., Barouni, R.M., Banos, A., Sormendi, S., Polyzos, A., Xilouri, M., Wielockx, B., Gogas, H., et al. (2018). Autophagy orchestrates the regulatory program of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 128, 3840–3852.
- 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.
- Allen, J., Hao, S., Sears, C.L., and Timp, W. (2019). Epigenetic Changes Induced by *Bacteroides fragilis* Toxin. *Infect Immun* 87, e00447-18.
- de Almeida, C.V., Taddei, A., and Amedei, A. (2018). The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol* 11, 1756284818783606.
- Al-Zalabani, A.H. (2020). Cancer incidence attributable to tobacco smoking in GCC countries in 2018. *Tob Induc Dis* 18.
- An, C.H., Kim, M.S., Yoo, N.J., Park, S.W., and Lee, S.H. (2011). Mutational and expressional analyses of ATG5, an autophagy-related gene, in gastrointestinal cancers. *Pathol. Res. Pract.* 207, 433–437.
- Anitei, M.-G., Zeitoun, G., Mlecnik, B., Marliot, F., Haicheur, N., Tudosí, A.-M., Kirilovsky, A., Lagorce, C., Bindea, G., Ferariu, D., et al. (2014). Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin Cancer Res* 20, 1891–1899.
- Aoki, M., and Fujishita, T. (2017). Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. In *Viruses, Genes, and Cancer*, E. Hunter, and K. Bister, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 153–189.
- Apel, A., Herr, I., Schwarz, H., Rodemann, H.P., and Mayer, A. (2008). Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res* 68, 1485–1494.
- Armand, L., Andriamihaja, M., Gellenoncourt, S., Bitane, V., Lan, A., and Blachier, F. (2019). In vitro impact of amino acid-derived bacterial metabolites on colonocyte mitochondrial activity, oxidative stress response and DNA integrity. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1863, 1292–1301.

- 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.
- Auvray, F., Perrat, A., Arimizu, Y., Chagneau, C.V., Bossuet-Greif, N., Massip, C., Brugère, H., Nougayrède, J.-P., Hayashi, T., Branchu, P., et al. (2021). Insights into the acquisition of the pks island and production of colibactin in the *Escherichia coli* population. *Microb Genom* 7.
- Aymeric, L., Donnadieu, F., Mulet, C., du Merle, L., Nigro, G., Saffarian, A., Bérard, M., Poyart, C., Robine, S., Regnault, B., et al. (2018). Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E283–E291.
- Backer, J.M. (2016). The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. *Biochem J* 473, 2251–2271.
- Baginska, J., Viry, E., Berchem, G., Poli, A., Noman, M.Z., van Moer, K., Medves, S., Zimmer, J., Oudin, A., Niclou, S.P., et al. (2013). Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17450–17455.
- Bahrami, A., Khazaei, M., Hasanzadeh, M., ShahidSales, S., Joudi Mashhad, M., Farazestanian, M., Sadeghnia, H.R., Rezayi, M., Maftouh, M., Hassanian, S.M., et al. (2018). Therapeutic Potential of Targeting PI3K/AKT Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *Journal of Cellular Biochemistry* 119, 2460–2469.
- Barbirou, M., Woldu, H.G., Sghaier, I., Bedoui, S.A., Mokrani, A., Aami, R., Mezlini, A., Yacoubi-Loueslati, B., Tonellato, P.J., and Bouhaouala-Zahar, B. (2020). Western influenced lifestyle and Kv2.1 association as predicted biomarkers for Tunisian colorectal cancer. *BMC Cancer* 20, 1086.
- Barnett, T.C., Liebl, D., Seymour, L.M., Gillen, C.M., Lim, J.Y., Larock, C.N., Davies, M.R., Schulz, B.L., Nizet, V., Teasdale, R.D., et al. (2013). The globally disseminated MIT1 clone of group A *Streptococcus* evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14, 675–682.
- Baruch, E.N., Youngster, I., Ben-Betzalel, G., Ortenberg, R., Lahat, A., Katz, L., Adler, K., Dick-Necula, D., Raskin, S., Bloch, N., et al. (2021). Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science* 371, 602–609.
- Becher, J., Simula, L., Volpe, E., Procaccini, C., La Rocca, C., D'Acunzo, P., Cianfanelli, V., Strappazzon, F., Caruana, I., Nazio, F., et al. (2018). AMBRA1 Controls Regulatory T-Cell Differentiation and Homeostasis Upstream of the FOXO3-FOXP3 Axis. *Dev Cell* 47, 592–607.e6.
- 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.
- Benninghoff, A.D., Hintze, K.J., Monsanto, S.P., Rodriguez, D.M., Hunter, A.H., Phatak, S., Pestka, J.J., Wettore, A.J.V., and Ward, R.E. (2020). Consumption of the Total Western Diet Promotes Colitis and Inflammation-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients* 12, E544.
- 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.
- Berry, R.S., Xiong, M.-J., Greenbaum, A., Mortaji, P., Nofchissey, R.A., Schultz, F., Martinez, C., Luo, L., Morris, K.T., and Hanson, J.A. (2017). High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. *PLoS One* 12, e0188799.
- Bhatt, V., Khayati, K., Hu, Z.S., Lee, A., Kamran, W., Su, X., and Guo, J.Y. (2019). Autophagy modulates lipid metabolism to maintain metabolic flexibility for Lkb1-deficient Kras-driven lung tumorigenesis. *Genes Dev* 33, 150–165.
- Biasizzo, M., and Kopitar-Jerala, N. (2020). Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Front Immunol* 11, 591803.
- Biazik, J., Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2015). Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy* 11, 439–451.

- Blatter, R., Tschupp, B., Aretz, S., Bernstein, I., Colas, C., Evans, D.G., Genuardi, M., Hes, F.J., Hüneburg, R., Järvinen, H., et al. (2020). Disease expression in juvenile polyposis syndrome: a retrospective survey on a cohort of 221 European patients and comparison with a literature-derived cohort of 473 SMAD4/BMPR1A pathogenic variant carriers. *Genet Med* 22, 1524–1532.
- 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.
- Borowsky, J., Haruki, K., Lau, M.C., Dias Costa, A., Väyrynen, J.P., Ugai, T., Arima, K., da Silva, A., Felt, K.D., Zhao, M., et al. (2021). Association of *Fusobacterium nucleatum* with Specific T-cell Subsets in the Colorectal Carcinoma Microenvironment. *Clin Cancer Res* 27, 2816–2826.
- Bortnik, S., Tessier-Cloutier, B., Leung, S., Xu, J., Asleh, K., Burugu, S., Magrill, J., Greening, K., Derakhshan, F., Yip, S., et al. (2020). Differential expression and prognostic relevance of autophagy-related markers ATG4B, GABARAP, and LC3B in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 183, 525–547.
- Botteri, E., Borroni, E., Sloan, E.K., Bagnardi, V., Bosetti, C., Peveri, G., Santucci, C., Specchia, C., van den Brandt, P., Gallus, S., et al. (2020). Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 115, 1940–1949.
- Bouaoun, L., Sonkin, D., Ardin, M., Hollstein, M., Byrnes, G., Zavadil, J., and Olivier, M. (2016). TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Human Mutation* 37, 865–876.
- Boyer, L., Travaglione, S., Falzano, L., Gauthier, N.C., Popoff, M.R., Lemichez, E., Fiorentini, C., and Fabbri, A. (2004). Rac GTPase instructs nuclear factor-kappaB activation by conveying the SCF complex and IκBα to the ruffling membranes. *Mol Biol Cell* 15, 1124–1133.
- Brenner, H., and Chen, H. (2017). Fecal occult blood versus DNA testing: indirect comparison in a colorectal cancer screening population. *Clin Epidemiol* 9, 377–384.
- Bretin, A., Carrière, J., Dalmasso, G., Bergougnoux, A., B'chir, W., Maurin, A.-C., Müller, S., Seibold, F., Barnich, N., Bruhat, A., et al. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2α-ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy* 12, 770–783.
- Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5, 641–654.
- Bryant, K.L., Stalneck, C.A., Zeitouni, D., Klomp, J.E., Peng, S., Tikunov, A.P., Gunda, V., Pierobon, M., Waters, A.M., George, S.D., et al. (2019). Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nat Med* 25, 628–640.
- Bu, W., Hao, X., Yang, T., Wang, J., Liu, Q., Zhang, X., Li, X., Gong, Y., and Shao, C. (2020). Autophagy Contributes to the Maintenance of Genomic Integrity by Reducing Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2020, 2015920.
- 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.
- Bujanda, L., and Herreros-Villanueva, M. (2017). Pancreatic Cancer in Lynch Syndrome Patients. *J Cancer* 8, 3667–3674.
- 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.
- Butt, J., Jenab, M., Werner, J., Fedirko, V., Weiderpass, E., Dahm, C.C., Tjønneland, A., Olsen, A., Boutron-Ruault, M.-C., Rothwell, J.A., et al. (2021). Association of Pre-diagnostic Antibody Responses to *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* Toxin Proteins with Colorectal Cancer in a European Cohort. *Gut Microbes* 13, 1–14.
- Cao, Y., Deng, S., Yan, L., Gu, J., Yang, J., Yang, M., Liu, L., and Cai, K. (2021a). A nomogram based on pretreatment levels of serum bilirubin and total bile acid levels predicts survival in colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 21, 85.
- Cao, Y., Wang, Z., Yan, Y., Ji, L., He, J., Xuan, B., Shen, C., Ma, Y., Jiang, S., Ma, D., et al. (2021b). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Promotes Intestinal Inflammation and Malignancy by Inhibiting Exosome-Packaged miR-149-3p. *Gastroenterology*.

- Capurro, M.I., Greenfield, L.K., Prashar, A., Xia, S., Abdullah, M., Wong, H., Zhong, X.Z., Bertaux-Skeirik, N., Chakrabarti, J., Siddiqui, I., et al. (2019). VacA generates a protective intracellular reservoir for *Helicobacter pylori* that is eliminated by activation of the lysosomal calcium channel TRPML1. *Nat Microbiol* 4, 1411–1423.
- Carr, S., and Kasi, A. (2020). Familial Adenomatous Polyposis. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Cassetta, L., and Pollard, J.W. (2020). Tumor-associated macrophages. *Curr Biol* 30, R246–R248.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R.A., et al. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 22, 299–306.
- Ceppek, 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 α E β 7 integrin. *Nature* 372, 190–193.
- Chagneau, C.V., Garcie, C., Bossuet-Greif, N., Tronnet, S., Brachmann, A.O., Piel, J., Nougayrède, J.-P., Martin, P., and Oswald, E. (2019). The Polyamine Spermidine Modulates the Production of the Bacterial Genotoxin Colibactin. *MSphere* 4, e00414-19.
- Chandra, A., Rick, J., Yagnik, G., and Aghi, M.K. (2020). Autophagy as a mechanism for anti-angiogenic therapy resistance. *Seminars in Cancer Biology* 66, 75–88.
- Chang, J., Tian, J., Yang, Y., Zhong, R., Li, J., Zhai, K., Ke, J., Lou, J., Chen, W., Zhu, B., et al. (2018). A Rare Missense Variant in TCF7L2 Associates with Colorectal Cancer Risk by Interacting with a GWAS-Identified Regulatory Variant in the MYC Enhancer. *Cancer Res* 78, 5164–5172.
- Chargui, A., Cesaro, A., Mimouna, S., Fareh, M., Brest, P., Naquet, P., Darfeuille-Michaud, A., Hébuterne, X., Mograbi, B., Vouret-Craviari, V., et al. (2012). Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One* 7, e51727.
- Chatterjee, A., Mukhopadhyay, S., Tung, K., Patel, D., and Foster, D.A. (2015). Rapamycin-induced G1 cell cycle arrest employs both TGF- β and Rb pathways. *Cancer Lett* 360, 134–140.
- Chen, Y., and Yu, L. (2018). Development of Research into Autophagic Lysosome Reformation. *Mol Cells* 41, 45–49.
- Chen, D., Jin, D., Huang, S., Wu, J., Xu, M., Liu, T., Dong, W., Liu, X., Wang, S., Zhong, W., et al. (2020a). *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota. *Cancer Lett* 469, 456–467.
- Chen, E.X., Jonker, D.J., Kennecke, H.F., Berry, S.R., Couture, F., Ahmad, C.E., Goffin, J.R., Kavan, P., Harb, M., Colwell, B., et al. (2019a). CCTG CO.26 trial: A phase II randomized study of durvalumab (D) plus tremelimumab (T) and best supportive care (BSC) versus BSC alone in patients (pts) with advanced refractory colorectal carcinoma (rCRC). *Journal of Clinical Oncology*.
- Chen, S., Yue, T., Huang, Z., Zhu, J., Bu, D., Wang, X., Pan, Y., Liu, Y., and Wang, P. (2019b). Inhibition of hydrogen sulfide synthesis reverses acquired resistance to 5-FU through miR-215-5p-EREG/TYMS axis in colon cancer cells. *Cancer Lett* 466, 49–60.
- Chen, S., Su, T., Zhang, Y., Lee, A., He, J., Ge, Q., Wang, L., Si, J., Zhuo, W., and Wang, L. (2020b). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer metastasis by modulating KRT7-AS/KRT7. *Gut Microbes* 11, 511–525.
- Chen, X., Wang, P., Guo, F., Wang, X., Wang, J., Xu, J., Yuan, D., Zhang, J., and Shao, C. (2017). Autophagy enhanced the radioresistance of non-small cell lung cancer by regulating ROS level under hypoxia condition. *Int J Radiat Biol* 93, 764–770.
- Chen, X., Sun, Y., Wang, B., and Wang, H. (2020c). Prognostic significance of autophagy-related genes Beclin1 and LC3 in ovarian cancer: a meta-analysis. *J Int Med Res* 48, 300060520968299.
- Chen, Y., Chen, Y., Zhang, J., Cao, P., Su, W., Deng, Y., Zhan, N., Fu, X., Huang, Y., and Dong, W. (2020d). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Metastasis in Colorectal Cancer by Activating Autophagy Signaling via the Upregulation of CARD3 Expression. *Theranostics* 10, 323–339.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 11, 445–456.

- Chiu, Y.-H., Hsu, S.-H., Hsu, H.-W., Huang, K.-C., Liu, W., Wu, C.-Y., Huang, W.-P., Chen, J.Y.-F., Chen, B.-H., and Chiu, C.-C. (2018). Human non-small cell lung cancer cells can be sensitized to camptothecin by modulating autophagy. *Int J Oncol* 53, 1967–1979.
- Chung, I.-C., OuYang, C.-N., Yuan, S.-N., Lin, H.-C., Huang, K.-Y., Wu, P.-S., Liu, C.-Y., Tsai, K.-J., Loi, L.-K., Chen, Y.-J., et al. (2019). Pretreatment with a Heat-Killed Probiotic Modulates the NLRP3 Inflammasome and Attenuates Colitis-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients* 11, E516.
- 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.
- Clark, A.J., Lamborn, K.R., Butowski, N.A., Chang, S.M., Prados, M.D., Clarke, J.L., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Berger, M.S., and Aghi, M.K. (2012). Neurosurgical management and prognosis of patients with glioblastoma that progresses during bevacizumab treatment. *Neurosurgery* 70, 361–370.
- Clarke, A.J., and Simon, A.K. (2019). Autophagy in the renewal, differentiation and homeostasis of immune cells. *Nat Rev Immunol* 19, 170–183.
- Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154, 274–284.
- Cloyd, J.M., Chun, Y.S., Ikoma, N., Vauthey, J.N., Aloia, T.A., Cuddy, A., Rodriguez-Bigas, M.A., and Nancy You, Y. (2018). Clinical and Genetic Implications of DNA Mismatch Repair Deficiency in Biliary Tract Cancers Associated with Lynch Syndrome. *J Gastrointest Cancer* 49, 93–96.
- Conteduca, V., Sansonno, D., Russi, S., and Dammacco, F. (2013). Precancerous colorectal lesions (Review). *International Journal of Oncology* 43, 973–984.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J.P., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 16, 90–97.
- Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.-I., Cheng, P., Cho, H.-I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., et al. (2010). HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 207, 2439–2453.
- Costigan, D.C., and Dong, F. (2020). The extended spectrum of RAS-MAPK pathway mutations in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 59, 152–159.
- Cotzomi-Ortega, I., Nieto-Yañez, O., Juárez-Avelar, I., Rojas-Sanchez, G., Montes-Alvarado, J.B., Reyes-Leyva, J., Aguilar-Alonso, P., Rodriguez-Sosa, M., and Maycotte, P. (2021). Autophagy inhibition in breast cancer cells induces ROS-mediated MIF expression and M1 macrophage polarization. *Cellular Signalling* 86, 110075.
- Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., et al. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 63, 1932–1942.
- 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* 67, 1984–1994.
- 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.
- Cui, G., Yuan, A., Goll, R., and Florholmen, J. (2012). IL-17A in the tumor microenvironment of the human colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Scand J Gastroenterol* 47, 1304–1312.
- 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 Almeida, C.V., Lulli, M., di Pilato, V., Schiavone, N., Russo, E., Nannini, G., Baldi, S., Borrelli, R., Bartolucci, G., Menicatti, M., et al. (2019). Differential Responses of Colorectal Cancer Cell Lines to *Enterococcus faecalis*' Strains Isolated from Healthy Donors and Colorectal Cancer Patients. *J Clin Med* 8, E388.
- De Rycke, J., Comtet, E., Chalareng, C., Boury, M., Tasca, C., and Milon, A. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from rabbit elicits actin stress fibers and focal adhesions in HeLa epithelial cells, cytopathic effects that are linked to an analog of the locus of enterocyte effacement. *Infect Immun* 65, 2555–2563.
- Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., DeStefano Shields, C.E., Hechenbleikner, E.M., Huso, D.L., et al. (2018). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 359, 592–597.
- Delgoffe, G.M., Kole, T.P., Zheng, Y., Zarek, P.E., Matthews, K.L., Xiao, B., Worley, P.F., Kozma, S.C., and Powell, J.D. (2009). The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 30, 832–844.
- DEMİRBAĞ-SARIKAYA, S., ÇAKIR, H., GÖZÜAÇIK, D., and AKKOÇ, Y. (2021). Crosstalk between autophagy and DNA repair systems. *Turk J Biol* 45, 235–252.
- Deng, J., and Galipeau, J. (2014). B cells for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 3, e955702.
- Denton, D., and Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ* 26, 605–616.
- DeVorkin, L., Pavey, N., Carleton, G., Comber, A., Ho, C., Lim, J., McNamara, E., Huang, H., Kim, P., Zacharias, L.G., et al. (2019). Autophagy Regulation of Metabolism Is Required for CD8+ T Cell Anti-tumor Immunity. *Cell Rep* 27, 502-513.e5.
- Diao, X.-Y., Peng, T., Kong, F.-G., Huang, J.-G., Han, S., Shang, Y.-S., and Liu, H. (2020). Alcohol consumption promotes colorectal cancer by altering intestinal permeability. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24, 9370–9377.
- Díaz-Basabe, A., Burrello, C., Lattanzi, G., Botti, F., Carrara, A., Cassinotti, E., Caprioli, F., and Facciotti, F. (2021). Human intestinal and circulating invariant Natural Killer T cells are cytotoxic against colorectal cancer cells via the perforin-granzyme pathway. *Mol Oncol*.
- Djenidi, F., Adam, J., Goubar, A., Durgeau, A., Meurice, G., de Montpréville, V., Validire, P., Besse, B., and Mami-Chouaib, F. (2015). CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol* 194, 3475–3486.
- Dohlman, A.B., Arguijo Mendoza, D., Ding, S., Gao, M., Dressman, H., Iliev, I.D., Lipkin, S.M., and Shen, X. (2021). The cancer microbiome atlas: a pan-cancer comparative analysis to distinguish tissue-resident microbiota from contaminants. *Cell Host Microbe* 29, 281-298.e5.
- Dortet, L., Mostowy, S., Samba-Louaka, A., Louaka, A.S., Gouin, E., Nahori, M.-A., Wiemer, E.A.C., Dussurget, O., and Cossart, P. (2011). Recruitment of the major vault protein by InlK: a *Listeria monocytogenes* strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathog* 7, e1002168.
- Doulabi, H., Rastin, M., Shabahangh, H., Maddah, G., Abdollahi, A., Nosratabadi, R., Esmaili, 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. *Biomed Pharmacother* 103, 1101–1106.
- Du, J.-X., Chen, C., Luo, Y.-H., Cai, J.-L., Cai, C.-Z., Xu, J., Ni, X.-J., and Zhu, W. (2020). Establishment and validation of a novel autophagy-related gene signature for patients with breast cancer. *Gene* 762, 144974.
- Dumitrescu, R.G. (2018). Alcohol-Induced Epigenetic Changes in Cancer. In *Cancer Epigenetics for Precision Medicine: Methods and Protocols*, R.G. Dumitrescu, and M. Verma, eds. (New York, NY: Springer), pp. 157–172.
- Dunne, M.R., Phelan, J.J., Michielsen, A.J., Maguire, A.A., Dunne, C., Martin, P., Noonan, S., Tosetto, M., Geraghty, R., Fennelly, D., et al. (2020). Characterising the prognostic potential of HLA-DR during colorectal cancer development. *Cancer Immunol Immunother* 69, 1577–1588.
- Dziubańska-Kusibab, P.J., Berger, H., Battistini, F., Bouwman, B.A.M., Iftekhar, A., Katainen, R., Cajuso, T., Crosetto, N., Orozco, M., Aaltonen, L.A., et al. (2020). Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat Med* 26, 1063–1069.

- Eaden, J., Abrams, K., and Mayberry, J. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535.
- Elmenier, F.M., Lasheen, D.S., and Abouzid, K.A.M. (2019). Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) inhibitors as new weapon to combat cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry* 183, 111718.
- 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 Res* 65, 3998–4004.
- 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.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Rosadi, F., Ballan, G., Maroccia, Z., Giambenedetti, M., Guidotti, M., Ødum, N., Krejsgaard, T., and Fiorentini, C. (2020). The *Escherichia coli* protein toxin cytotoxic necrotizing factor 1 induces epithelial mesenchymal transition. *Cell Microbiol* 22, e13138.
- Fairlie, W.D., Tran, S., and Lee, E.F. (2020). Crosstalk between apoptosis and autophagy signaling pathways. *Int Rev Cell Mol Biol* 352, 115–158.
- Fais, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., and Dalmasso, G. (2018). Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins (Basel)* 10.
- Falzano, L., Filippini, P., Travaglione, S., Miraglia, A.G., Fabbri, A., and Fiorentini, C. (2006). *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Blocks Cell Cycle G2/M Transition in Uroepithelial Cells. *Infect Immun* 74, 3765–3772.
- Fardini, Y., Wang, X., Témoins, S., Nithianantham, S., Lee, D., Shoham, M., and Han, Y.W. (2011). *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular-endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol* 82, 1468–1480.
- Fearon, E.R., 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.
- Fernández-Villa, T., Álvarez-Álvarez, L., Rubín-García, M., Obón-Santacana, M., and Moreno, V. (2020). The role of dietary patterns in colorectal cancer: a 2019 update. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 14, 281–290.
- Ferrone, C., and Dranoff, G. (2010). Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol* 28, 4045–4051.
- Fingleton, B., Carter, K.J., and Matrisian, L.M. (2007). Loss of functional Fas ligand enhances intestinal tumorigenesis in the Min mouse model. *Cancer Res* 67, 4800–4806.
- Finn, O.J. (2008). Cancer immunology. *N Engl J Med* 358, 2704–2715.
- Fiorentini, C., Arancia, G., Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F.M., and Donelli, G. (1988). Cytoskeletal changes induced in HEp-2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of *Escherichia coli*. *Toxicon* 26, 1047–1056.
- Fiorentini, C., Fabbri, A., Matarrese, P., Falzano, L., Boquet, P., and Malorni, W. (1997). Hinderance of apoptosis and phagocytic behaviour induced by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: two related activities in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 341–346.
- Fitzwalter, B.E., Towers, C.G., Sullivan, K.D., Andrysik, Z., Hoh, M., Ludwig, M., O'Prey, J., Ryan, K.M., Espinosa, J.M., Morgan, M.J., et al. (2018). Autophagy Inhibition Mediates Apoptosis Sensitization in Cancer Therapy by Relieving FOXO3a Turnover. *Dev Cell* 44, 555-565.e3.
- Flanagan, L., Schmid, J., Ebert, M., Soucek, P., Kunicka, T., Liska, V., Bruha, J., Neary, P., Dezeewu, N., Tommasino, M., et al. (2014). *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 1381–1390.
- Flemer, B., Lynch, D.B., Brown, J.M.R., Jeffery, I.B., Ryan, F.J., Claesson, M.J., O'Riordain, M., Shanahan, F., and O'Toole, P.W. (2017). Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut* 66, 633–643.

- 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.
- Forsell, 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.
- Fu, X.-T., Shi, Y.-H., Zhou, J., Peng, Y.-F., Liu, W.-R., Shi, G.-M., Gao, Q., Wang, X.-Y., Song, K., Fan, J., et al. (2018). MicroRNA-30a suppresses autophagy-mediated anoikis resistance and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 412, 108–117.
- Fujimoto, H., Saito, Y., Ohuchida, K., Kawakami, E., Fujiki, S., Watanabe, T., Ono, R., Kaneko, A., Takagi, S., Najima, Y., et al. (2018). Deregulated Mucosal Immune Surveillance through Gut-Associated Regulatory T Cells and PD-1+ T Cells in Human Colorectal Cancer. *J Immunol* 200, 3291–3303.
- 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., 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. *Clinical Science* 131, 471–485.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 36, 1811–1836.
- 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.
- Ganz, T. (2000). Paneth cells—guardians of the gut cell hatchery. *Nat Immunol* 1, 99–100.
- Gao, R., Wang, Z., Li, H., Cao, Z., Gao, Z., Chen, H., Zhang, X., Pan, D., Yang, R., Zhong, H., et al. (2020). Gut microbiota dysbiosis signature is associated with the colorectal carcinogenesis sequence and improves the diagnosis of colorectal lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 35, 2109–2121.
- Garcia-Carbonero, N., Martinez-Useros, J., Li, W., Orta, A., Perez, N., Carames, C., Hernandez, T., Moreno, I., Serrano, G., and Garcia-Foncillas, J. (2020). KRAS and BRAF Mutations as Prognostic and Predictive Biomarkers for Standard Chemotherapy Response in Metastatic Colorectal Cancer: A Single Institutional Study. *Cells* 9.
- Garcia-Larsen, V., Morton, V., Norat, T., Moreira, A., Potts, J.F., Reeves, T., and Bakolis, I. (2019). Dietary patterns derived from principal component analysis (PCA) and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition* 73, 366–386.
- Ge, Z., Feng, Y., Ge, L., Parry, N., Muthupalani, S., and Fox, J.G. (2017). *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin promotes intestinal carcinogenesis in 129Rag2-deficient mice. *Cell Microbiol* 19.
- Ge, Z., Feng, Y., Sheh, A., Muthupalani, S., Gong, G., Chawanthayatham, S., Essigmann, J.M., and Fox, J.G. (2019). Mutagenicity of *Helicobacter hepaticus* infection in the lower bowel mucosa of 129/SvEv Rag2-/- Il10-/- gpt delta mice is influenced by sex. *Int J Cancer* 145, 1042–1054.
- Geiger, R., Rieckmann, J.C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., et al. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* 167, 829–842.e13.
- Geng, H.-W., Yin, F.-Y., Zhang, Z.-F., Gong, X., and Yang, Y. (2021). Butyrate Suppresses Glucose Metabolism of Colorectal Cancer Cells via GPR109a-AKT Signaling Pathway and Enhances Chemotherapy. *Front Mol Biosci* 8, 634874.
- Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S., and Simon, H.-U. (2019). Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ* 26, 715–727.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 467, 967–971.
- Giese, M.A., Hind, L.E., and Huttenlocher, A. (2019). Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood* 133, 2159–2167.

- Gil, J., Karpiński, P., and Sasiadek, M.M. (2020). Transcriptomic Profiling for the Autophagy Pathway in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 21, 7101.
- Gluschko, A., Herb, M., Wiegmann, K., Krut, O., Neiss, W.F., Utermöhlen, O., Krönke, M., and Schramm, M. (2018). The β 2 Integrin Mac-1 Induces Protective LC3-Associated Phagocytosis of *Listeria monocytogenes*. *Cell Host Microbe* 23, 324-337.e5.
- 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* 359, 97–103.
- Görgülü, K., Diakopoulos, K.N., Ai, J., Schoeps, B., Kabacaoglu, D., Karpathaki, A.-F., Ciecieski, K.J., Kaya-Aksoy, E., Ruess, D.A., Berninger, A., et al. (2019). Levels of the Autophagy-Related 5 Protein Affect Progression and Metastasis of Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology* 156, 203-217.e20.
- Grimmel, M., Backhaus, C., and Proikas-Cezanne, T. (2015). WIPI-Mediated Autophagy and Longevity. *Cells* 4, 202–217.
- Grivnikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.-Y., Osterreicher, 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.
- Grothey, A., Tabernero, J., Arnold, D., Gramont, A.D., Ducreux, M.P., O'Dwyer, P.J., Cutsem, E.V., Bosanac, I., Srock, S., Mancao, C., et al. (2018). Fluoropyrimidine (FP) + bevacizumab (BEV) + atezolizumab vs FP/BEV in BRAFwt metastatic colorectal cancer (mCRC): Findings from Cohort 2 of MODUL – a multicentre, randomized trial of biomarker-driven maintenance treatment following first-line induction therapy. *Annals of Oncology* 29, viii714–viii715.
- Guerra, L., Cortes-Bratti, X., Guidi, R., and Frisan, T. (2011). The Biology of the Cytolethal Distending Toxins. *Toxins (Basel)* 3, 172–190.
- Guo, H., Chou, W.-C., Lai, Y., Liang, K., Tam, J.W., Brickey, W.J., Chen, L., Montgomery, N.D., Li, X., Bohannon, L.M., et al. (2020a). Multi-omics analyses of radiation survivors identify radioprotective microbes and metabolites. *Science* 370, eaay9097.
- Guo, J.Y., Teng, X., Laddha, S.V., Ma, S., Van Nostrand, S.C., Yang, Y., Khor, S., Chan, C.S., Rabinowitz, J.D., and White, E. (2016). Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev* 30, 1704–1717.
- Guo, P., Tian, Z., Kong, X., Yang, L., Shan, X., Dong, B., Ding, X., Jing, X., Jiang, C., Jiang, N., et al. (2020b). FadA promotes DNA damage and progression of *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal cancer through up-regulation of chk2. *J Exp Clin Cancer Res* 39, 202.
- Guo, X.-L., Li, D., Sun, K., Wang, J., Liu, Y., Song, J.-R., Zhao, Q.-D., Zhang, S.-S., Deng, W.-J., Zhao, X., et al. (2013). Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of bevacizumab in hepatocarcinoma. *J Mol Med (Berl)* 91, 473–483.
- Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., and Hu, L.-L. (2020c). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* 19, 1997–2007.
- Gur, C., Ibrahim, Y., Isaacson, B., Yamin, R., Abed, J., Gamliel, M., Enk, J., Bar-On, Y., Stanietsky-Kaynan, N., Copenhagen-Glazer, S., et al. (2015). Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 42, 344–355.
- Haghi, F., Goli, E., Mirzaei, B., and Zeighami, H. (2019). The association between fecal enterotoxigenic *B. fragilis* with colorectal cancer. *BMC Cancer* 19, 879.
- Hai Ping, P., Feng Bo, T., Li, L., Nan Hui, Y., and Hong, Z. (2016). IL-1 β /NF-kb signaling promotes colorectal cancer cell growth through miR-181a/PTEN axis. *Arch Biochem Biophys* 604, 20–26.
- Halazun, K.J., Aldoori, A., Malik, H.Z., Al-Mukhtar, A., Prasad, K.R., Toogood, G.J., and Lodge, J.P.A. (2008). Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival following hepatic resection for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 34, 55–60.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509–514.

- Ham-Karim, H.A., Ebili, H.O., Bradshaw, K., Richman, S.D., Fadhil, W., Domingo, E., Tomlinson, I., and Ilyas, M. (2019). Targeted next generation sequencing reveals a common genetic pathway for colorectal cancers with chromosomal instability and those with microsatellite and chromosome stability. *Pathology - Research and Practice* 215, 152445.
- Haruki, K., Kosumi, K., Hamada, T., Twombly, T.S., Väyrynen, J.P., Kim, S.A., Masugi, Y., Qian, Z.R., Mima, K., Baba, Y., et al. (2020). Association of autophagy status with amount of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer. *The Journal of Pathology* 250, 397–408.
- Heckmann, B.L., and Green, D.R. (2019). LC3-associated phagocytosis at a glance. *J Cell Sci* 132, jcs222984.
- Hernandez, P., Gronke, K., and Diefenbach, A. (2018). A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *Eur J Immunol* 48, 15–31.
- Hidaka, A., Harrison, T.A., Cao, Y., Sakoda, L.C., Barfield, R., Giannakis, M., Song, M., Phipps, A.I., Figueiredo, J.C., Zaidi, S.H., et al. (2020). Intake of Dietary Fruit, Vegetables, and Fiber and Risk of Colorectal Cancer According to Molecular Subtypes: A Pooled Analysis of 9 Studies. *Cancer Res* 80, 4578–4590.
- Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 496–510.
- Hodskinson, M.R., Bolner, A., Sato, K., Kamimae-Lanning, A.N., Rooijers, K., Witte, M., Mahesh, M., Silhan, J., Petek, M., Williams, D.M., et al. (2020). Alcohol-derived DNA crosslinks are repaired by two distinct mechanisms. *Nature* 579, 603–608.
- Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., and Fraunholz, M. (2018). Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *International Journal of Medical Microbiology* 308, 607–624.
- Hu, W., Sun, R., Chen, L., Zheng, X., and Jiang, J. (2019). Prognostic significance of resident CD103+CD8+T cells in human colorectal cancer tissues. *Acta Histochem* 121, 657–663.
- Hu, W.-H., Yang, W.-C., Liu, P.-F., Liu, T.-T., Morgan, P., Tsai, W.-L., Pan, H.-W., Lee, C.-H., and Shu, C.-W. (2021). Clinicopathological Association of Autophagy Related 5 Protein with Prognosis of Colorectal Cancer. *Diagnostics (Basel)* 11, 782.
- Huangfu, S.-C., Zhang, W.-B., Zhang, H.-R., Li, Y., Zhang, Y.-R., Nie, J.-L., Chu, X.-D., Chen, C.-S., Jiang, H.-P., and Pan, J.-H. (2021). Clinicopathological and prognostic significance of *Fusobacterium nucleatum* infection in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Cancer* 12, 1583–1591.
- Humphries, A., and Wright, N.A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 8, 415–424.
- Hurley, J.H., and Young, L.N. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem* 86, 225–244.
- Hwang, J.R., Kim, W.Y., Cho, Y.-J., Ryu, J.-Y., Choi, J.-J., Jeong, S.Y., Kim, M.-S., Kim, J.H., Paik, E.S., Lee, Y.-Y., et al. (2020). Chloroquine reverses chemoresistance via upregulation of p21WAF1/CIP1 and autophagy inhibition in ovarian cancer. *Cell Death Dis* 11, 1034.
- Iftekhhar, A., Berger, H., Bouznad, N., Heuberger, J., Boccellato, F., Dobrindt, U., Hermeking, H., Sigal, M., and Meyer, T.F. (2021). Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing *E. coli* transform primary colon epithelial cells. *Nat Commun* 12, 1003.
- Imperiale, T.F., Ransohoff, D.F., Itzkowitz, S.H., Levin, T.R., Lavin, P., Lidgard, G.P., Ahlquist, D.A., and Berger, B.M. (2014). Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N. Engl. J. Med.* 370, 1287–1297.
- Inagaki, K., Kunisho, S., Takigawa, H., Yuge, R., Oka, S., Tanaka, S., Shimamoto, F., Chayama, K., and Kitadai, Y. (2021). Role of tumor-associated macrophages at the invasive front in human colorectal cancer progression. *Cancer Sci* 112, 2692–2704.
- Inomata, M., Xu, S., Chandra, P., Meydani, S.N., Takemura, G., Philips, J.A., and Leong, J.M. (2020). Macrophage LC3-associated phagocytosis is an immune defense against *Streptococcus pneumoniae* that diminishes with host aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 33561–33569.
- 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. *Korean J Pathol* 47, 443–451.
- 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.

- Jin, Y., Geng, R., Liu, Y., Liu, L., Jin, X., Zhao, F., Feng, J., and Wei, Y. (2020). Prediction of Postoperative Ileus in Patients With Colorectal Cancer by Preoperative Gut Microbiota. *Front Oncol* 10, 526009.
- 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 (Reading)* 157, 1851–1875.
- Jo, Y.K., Kim, S.C., Park, I.J., Park, S.J., Jin, D.-H., Hong, S.-W., Cho, D.-H., and Kim, J.C. (2012). Increased Expression of ATG10 in Colorectal Cancer Is Associated with Lymphovascular Invasion and Lymph Node Metastasis. *PLoS One* 7.
- Jobin, G., Rodriguez-Suarez, R., and Betito, K. (2017). Association Between Natural Killer Cell Activity and Colorectal Cancer in High-Risk Subjects Undergoing Colonoscopy. *Gastroenterology* 153, 980–987.
- Johnson, W.M., and Lior, H. (1988). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb Pathog* 4, 103–113.
- Johnson, S.C., Yanos, M.E., Bitto, A., Castanza, A., Gagnidze, A., Gonzalez, B., Gupta, K., Hui, J., Jarvie, C., Johnson, B.M., et al. (2015). Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Front Genet* 6, 247.
- Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., and Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 17, 111–130.
- Kaler, P., Augenlicht, L., and Klampfer, L. (2009). Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene* 28, 3892–3902.
- Kameyama, H., Nagahashi, M., Shimada, Y., Tajima, Y., Ichikawa, H., Nakano, M., Sakata, J., Kobayashi, T., Narayanan, S., Takabe, K., et al. (2018). Genomic characterization of colitis-associated colorectal cancer. *World J Surg Oncol* 16.
- Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 21, 1621–1635.
- Keil, E., Höcker, R., Schuster, M., Essmann, F., Ueffing, N., Hoffman, B., Liebermann, D.A., Pfeiffer, K., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2013). Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45β-MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy. *Cell Death Differ* 20, 321–332.
- Kettunen, H.L., Kettunen, A.S.L., and Rautonen, N.E. (2003). Intestinal immune responses in wild-type and *Apcmin/+* mouse, a model for colon cancer. *Cancer Res* 63, 5136–5142.
- Kharlampieva, D., Manuvera, V., Podgorny, O., Grafskaja, E., Kovalchuk, S., Pobeguts, O., Altukhov, I., Govorun, V., and Lazarev, V. (2015). Recombinant fragilysin isoforms cause E-cadherin cleavage of intact cells and do not cleave isolated E-cadherin. *Microbial Pathogenesis* 83–84, 47–56.
- Khawar, M.B., Gao, H., and Li, W. (2019). Autophagy and Lipid Metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1206, 359–374.
- Kim, B.-R., Kim, B.-J., Kook, Y.-H., and Kim, B.-J. (2020a). Mycobacterium abscessus infection leads to enhanced production of type 1 interferon and NLRP3 inflammasome activation in murine macrophages via mitochondrial oxidative stress. *PLoS Pathog* 16, e1008294.
- Kim, J., Braun, D., Ukaegbu, C., Dhingra, T.G., Kastrinos, F., Parmigiani, G., Syngal, S., and Yurgelun, M.B. (2020b). Clinical Factors Associated With Gastric Cancer in Individuals With Lynch Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 18, 830–837.e1.
- Kim, J.S., Bae, G.E., Kim, K.-H., Lee, S.-I., Chung, C., Lee, D., Lee, T.H., Kwon, I.S., and Yeo, M.-K. (2019). Prognostic Significance of LC3B and p62/SQSTM1 Expression in Gastric Adenocarcinoma. *Anticancer Res* 39, 6711–6722.
- Kim, Y.H., Baek, S.H., Kim, E.K., Ha, J.M., Jin, S.Y., Lee, H.S., Ha, H.K., Song, S.H., Kim, S.J., Shin, H.K., et al. (2016). Uncoordinated 51-like kinase 2 signaling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in A549 lung cancer cells. *FEBS Lett* 590, 1365–1374.
- Kinsey, C.G., Camolotto, S.A., Boespflug, A.M., Guillen, K.P., Foth, M., Truong, A., Schuman, S.S., Shea, J.E., Seipp, M.T., Yap, J.T., et al. (2019). Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nat Med* 25, 620–627.

- Kirkin, V., and Rogov, V.V. (2019). A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Molecular Cell* 76, 268–285.
- Knorr, R.L., Lipowsky, R., and Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy* 11, 2134–2137.
- 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- κ B-Dependent Pathway, Leading to Modulation of Apoptosis. *Infect Immun* 84, 2541–2554.
- Koh, J., Kim, S., Kim, M.-Y., Go, H., Jeon, Y.K., and Chung, D.H. (2017). Prognostic implications of intratumoral CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes in pulmonary squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8, 13762–13769.
- Kohli, L., Kaza, N., Coric, T., Byer, S.J., Brossier, N.M., Klocke, B.J., Bjornsti, M.-A., Carroll, S.L., and Roth, K.A. (2013). 4-Hydroxytamoxifen induces autophagic death through K-Ras degradation. *Cancer Res* 73, 4395–4405.
- Koliarakis, I., Athanasakis, E., Sgantzios, M., Mariolis-Sapsakos, T., Xynos, E., Chrysos, E., Souglakos, J., and Tsiaoussis, J. (2020). Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer Surgery. *Cancers (Basel)* 12, E3011.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485–517.
- 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.
- Koulouridi, A., Messaritakis, I., Gouvas, N., Tsiaoussis, J., and Souglakos, J. (2020). Immunotherapy in Solid Tumors and Gut Microbiota: The Correlation-A Special Reference to Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 13, E43.
- Krijgsman, D., Roelands, J., Andersen, M.N., Wieringa, C.H.L.A., Tollenaar, R.A.E.M., Hendrickx, W., Bedognetti, D., Hokland, M., and Kuppen, P.J.K. (2020). Expression of NK cell receptor ligands in primary colorectal cancer tissue in relation to the phenotype of circulating NK- and NKT cells, and clinical outcome. *Molecular Immunology* 128, 205–218.
- Kuo, C.-J., Hansen, M., and Troemel, E. (2018). Autophagy and innate immunity: Insights from invertebrate model organisms. *Autophagy* 14, 233–242.
- Kurt, M., and Yumuk, Z. (2021). Diagnostic accuracy of *Fusobacterium nucleatum* IgA and IgG ELISA test in colorectal cancer. *Sci Rep* 11, 1608.
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014, 149185.
- Lavoie, S., Chun, E., Bae, S., Brennan, C.A., Comeau, C.A.G., Lang, J.K., Michaud, M., Hoveyda, H.R., Fraser, G.L., Fuller, M.H., et al. (2020). Expression of Free Fatty Acid Receptor 2 by Dendritic Cells Prevents Their Expression of Interleukin 27 and Is Required for Maintenance of Mucosal Barrier and Immune Response Against Colorectal Tumors in Mice. *Gastroenterology* 158, 1359-1372.e9.
- Lawson, K.A., Sousa, C.M., Zhang, X., Kim, E., Akthar, R., Caumanns, J.J., Yao, Y., Mikolajewicz, N., Ross, C., Brown, K.R., et al. (2020). Functional genomic landscape of cancer-intrinsic evasion of killing by T cells. *Nature* 586, 120–126.
- Lazarova, D.L., Chiaro, C., and Bordonaro, M. (2014). Butyrate induced changes in Wnt-signaling specific gene expression in colorectal cancer cells. *BMC Res Notes* 7, 226.
- 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. *N Engl J Med* 372, 2509–2520.
- Le Gall, G., Guttula, K., Kellingray, L., Tett, A.J., Ten Hoopen, R., Kemsley, E.K., Savva, G.M., Ibrahim, A., and Narbad, A. (2018). Metabolite quantification of faecal extracts from colorectal cancer patients and healthy controls. *Oncotarget* 9, 33278–33289.
- Lee, J., Lee, K.S., Kim, H., Jeong, H., Choi, M.-J., Yoo, H.-W., Han, T.-H., and Lee, H. (2020). The relationship between metabolic syndrome and the incidence of colorectal cancer. *Environ Health Prev Med* 25.

- Lee, J.A., Yoo, S.-Y., Oh, H.J., Jeong, S., Cho, N.-Y., Kang, G.H., and Kim, J.H. (2021). Differential immune microenvironmental features of microsatellite-unstable colorectal cancers according to *Fusobacterium nucleatum* status. *Cancer Immunol Immunother* 70, 47–59.
- Lee, S.Y., Ju, M.K., Jeon, H.M., Jeong, E.K., Lee, Y.J., Kim, C.H., Park, H.G., Han, S.I., and Kang, H.S. (2018). Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 3537471.
- Lee-Six, H., Olafsson, S., Ellis, P., Osborne, R.J., Sanders, M.A., Moore, L., Georgakopoulos, N., Torrente, F., Noorani, A., Goddard, M., et al. (2019). The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells. *Nature* 574, 532–537.
- Levine, A.J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature Reviews Cancer* 20, 471–480.
- Lévy, J., Cacheux, W., Bara, M.A., L'Hermitte, A., Lepage, P., Fraudeau, M., Trentesaux, C., Lemarchand, J., Durand, A., Crain, A.-M., et al. (2015). Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nat. Cell Biol.* 17, 1062–1073.
- Li, D., and Cao, W. (2016). Bile acid receptor TGR5, NADPH Oxidase NOX5-S and CREB Mediate Bile Acid-Induced DNA Damage In Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells. *Sci Rep* 6, 31538.
- Li, J., Yang, B., Zhou, Q., Wu, Y., Shang, D., Guo, Y., Song, Z., Zheng, Q., and Xiong, J. (2013). Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis* 34, 1343–1351.
- Li, L., Tang, P., Li, S., Qin, X., Yang, H., Wu, C., and Liu, Y. (2017). Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med Oncol* 34, 180.
- 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, Y., Hodge, J., Liu, Q., Wang, J., Wang, Y., Evans, T.D., Altomare, D., Yao, Y., Murphy, E.A., Razani, B., et al. (2020). TFEB is a master regulator of tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Immunother Cancer* 8, e000543.
- 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. *Sci Rep* 8, 9453.
- Liang, T.-J., Wang, H.-X., Zheng, Y.-Y., Cao, Y.-Q., Wu, X., Zhou, X., and Dong, S.-X. (2017). APC hypermethylation for early diagnosis of colorectal cancer: a meta-analysis and literature review. *Oncotarget* 8, 46468–46479.
- Liang, X., De Vera, M.E., Buchser, W.J., Romo de Vivar Chavez, A., Loughran, P., Beer Stolz, D., Basse, P., Wang, T., Van Houten, B., Zeh, H.J., et al. (2012). Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression. *Cancer Res* 72, 2791–2801.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1*. *Nature* 402, 672–676.
- Liao, X., Morikawa, T., Lochhead, P., Imamura, Y., Kuchiba, A., Yamauchi, M., Nosho, K., Qian, Z.R., Nishihara, R., Meyerhardt, J.A., et al. (2012). Prognostic Role of PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Cohort Study and Literature Review. *Clin Cancer Res* 18, 2257–2268.
- Liebl, M.C., and Hofmann, T.G. (2021). The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 13, 2125.
- Lin, Q., Ren, L., Jian, M., Xu, P., Li, J., Zheng, P., Feng, Q., Yang, L., Ji, M., Wei, Y., et al. (2019a). The mechanism of the premetastatic niche facilitating colorectal cancer liver metastasis generated from myeloid-derived suppressor cells induced by the S1PR1–STAT3 signaling pathway. *Cell Death Dis* 10, 1–18.
- Lin, T.-C., Chien, W.-C., Hu, J.-M., Tzeng, N.-S., Chung, C.-H., Pu, T.-W., Hsiao, C.-W., and Chen, C.-Y. (2020). Risk of colorectal cancer in patients with alcoholism: A nationwide, population-based nested case-control study. *PLoS One* 15, e0232740.
- Lin, Y., Xu, J., Su, H., Zhong, W., Yuan, Y., Yu, Z., Fang, Y., Zhou, H., Li, C., and Huang, K. (2015). Interleukin-17 is a favorable prognostic marker for colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 17, 50–56.
- Lin, Y., Ma, C., Liu, C., Wang, Z., Yang, J., Liu, X., Shen, Z., and Wu, R. (2016). NMR-based fecal metabolomics fingerprinting as predictors of earlier diagnosis in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* 7, 29454–29464.

- Lin, Y., Ma, C., Bezabeh, T., Wang, Z., Liang, J., Huang, Y., Zhao, J., Liu, X., Ye, W., Tang, W., et al. (2019b). ¹H NMR-based metabolomics reveal overlapping discriminatory metabolites and metabolic pathway disturbances between colorectal tumor tissues and fecal samples. *Int J Cancer* *145*, 1679–1689.
- Ling, Z.-A., Zhang, L.-J., Ye, Z.-H., Dang, Y.-W., Chen, G., Li, R.-L., and Zeng, J.-J. (2018). Immunohistochemical distribution of FOXP3+ regulatory T cells in colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol* *11*, 1841–1854.
- Little, D.H.W., Onizuka, K.M., and Khan, K.J. (2019). Referral for Colonoscopy in Patients with Streptococcus bovis Bacteremia and the Association with Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps: A Quality Assurance Study. *Gastrointestinal Disorders* *1*, 385–390.
- Liu, L., Dong, W., Wang, S., Zhang, Y., Liu, T., Xie, R., Wang, B., and Cao, H. (2018). Deoxycholic acid disrupts the intestinal mucosal barrier and promotes intestinal tumorigenesis. *Food Funct* *9*, 5588–5597.
- Liu, T., Wang, L., Liang, P., Wang, X., Liu, Y., Cai, J., She, Y., Wang, D., Wang, Z., Guo, Z., et al. (2020a). USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy. *Cell Mol Immunol*.
- Liu, Z., Xie, Y., Xiong, Y., Liu, S., Qiu, C., Zhu, Z., Mao, H., Yu, M., and Wang, X. (2020b). TLR 7/8 agonist reverses oxaliplatin resistance in colorectal cancer via directing the myeloid-derived suppressor cells to tumoricidal M1-macrophages. *Cancer Lett* *469*, 173–185.
- Lock, R., Kenific, C.M., Leidal, A.M., Salas, E., and Debnath, J. (2014). Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discov* *4*, 466–479.
- Loddenkemper, C., Schernus, M., Noutsias, M., Stein, H., Thiel, E., and Nagorsen, D. (2006). In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J Transl Med* *4*, 52.
- Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S. (2013). Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol* *31*, 10.1146/annurev-immunol-020711-075005.
- Long, S., Yang, Y., Shen, C., Wang, Y., Deng, A., Qin, Q., and Qiao, L. (2020). Metaproteomics characterizes human gut microbiome function in colorectal cancer. *NPJ Biofilms Microbiomes* *6*.
- Long, X., Wong, C.C., Tong, L., Chu, E.S.H., Ho Szeto, C., Go, M.Y.Y., Coker, O.O., Chan, A.W.H., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., et al. (2019). Peptostreptococcus anaerobius promotes colorectal carcinogenesis and modulates tumour immunity. *Nat Microbiol* *4*, 2319–2330.
- Lopès, A., Billard, E., Casse, A.H., Villéger, R., Veziat, J., Roche, G., Carrier, G., Sauvanet, P., Briat, A., Pagès, F., et al. (2020). Colibactin-positive Escherichia coli induce a procarcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*.
- Lowe, M.M., Boothby, I., Clancy, S., Ahn, R.S., Liao, W., Nguyen, D.N., Schumann, K., Marson, A., Mahuron, K.M., Kingsbury, G.A., et al. (2019). Regulatory T cells use arginase 2 to enhance their metabolic fitness in tissues. *JCI Insight* *4*, 129756.
- Lu, L., Pan, K., Zheng, H.-X., Li, J.-J., Qiu, H.-J., Zhao, J.-J., Weng, D.-S., Pan, Q.-Z., Wang, D.-D., Jiang, S.-S., et al. (2013). IL-17A promotes immune cell recruitment in human esophageal cancers and the infiltrating dendritic cells represent a positive prognostic marker for patient survival. *J Immunother* *36*, 451–458.
- Lucas, C., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2017). Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* *18*.
- Lucas, C., Salesse, L., Thi Hoang, M.H., Bonnet, M., Sauvanet, P., Larabi, A., Godfraind, C., Gagnière, J., Pezet, D., Rosenstiel, P., et al. (2020). Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing Escherichia coli in ApcMin/+ Mice. *Gastroenterology*.
- Lv, Q., Wang, W., Xue, J., Hua, F., Mu, R., Lin, H., Yan, J., Lv, X., Chen, X., and Hu, Z.-W. (2012). DEDD interacts with PI3KC3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer. *Cancer Res* *72*, 3238–3250.
- Ma, H., Brosens, L.A.A., Offerhaus, G.J.A., Giardiello, F.M., de Leng, W.W.J., and Montgomery, E.A. (2018). Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology* *50*, 49–59.

- Ma, X.-H., Piao, S., Wang, D., McAfee, Q.W., Nathanson, K.L., Lum, J.J., Li, L.Z., and Amaravadi, R.K. (2011). Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 17, 3478–3489.
- Maddocks, O.D.K., Short, A.J., Donnenberg, M.S., Bader, S., and Harrison, D.J. (2009). Attaching and Effacing *Escherichia coli* Downregulate DNA Mismatch Repair Protein In Vitro and Are Associated with Colorectal Adenocarcinomas in Humans. *PLoS One* 4.
- 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.
- Marandi, Y., Hashemzade, S., Tayebinia, H., Karimi, J., Zamani, A., and Khodadadi, I. (2021). NLRP3-inflammasome activation is associated with epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer. *Iran J Basic Med Sci* 24, 483–492.
- Marsh, T., Tolani, B., and Debnath, J. (2021). The pleiotropic functions of autophagy in metastasis. *J Cell Sci* 134, jcs247056.
- 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.
- Mason, K.L., Huffnagle, G.B., Noverr, M.C., and Kao, J.Y. (2008). Overview of Gut Immunology. In *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*, G.B. Huffnagle, and M.C. Noverr, eds. (New York, NY: Springer), pp. 1–14.
- Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N., and Nukina, N. (2015). TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet* 24, 4429–4442.
- McCormack, R.M., Lyapichev, K., Olsson, M.L., Podack, E.R., and Munson, G.P. Enteric pathogens deploy cell cycle inhibiting factors to block the bactericidal activity of Perforin-2. *ELife* 4, e06505.
- 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.
- McNabb, S., Harrison, T.A., Albanes, D., Berndt, S.I., Brenner, H., Caan, B.J., Campbell, P.T., Cao, Y., Chang-Claude, J., Chan, A., et al. (2020). Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 146, 861–873.
- Meadows, K.L., and Hurwitz, H.I. (2012). Anti-VEGF therapies in the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006577.
- Meckawy, G.R., Mohamed, A.M., Zaki, W.K., Khattab, M.A., Amin, M.M., ElDeeb, M.A., El-Najjar, M.R., and Safwat, N.A. (2019). Natural killer NKG2A and NKG2D in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 10, 218–225.
- Mehrvarz Sarshekeh, A., Advani, S., Overman, M.J., Manyam, G., Kee, B.K., Fogelman, D.R., Dasari, A., Raghav, K., Vilar, E., Manuel, S., et al. (2017). Association of SMAD4 mutation with patient demographics, tumor characteristics, and clinical outcomes in colorectal cancer. *PLoS One* 12, e0173345.
- Mgrditchian, T., Arakelian, T., Paggetti, J., Noman, M.Z., Viry, E., Moussay, E., Van Moer, K., Kreis, S., Guerin, C., Buart, S., et al. (2017). Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E9271–E9279.
- Miao, Y., Li, G., Zhang, X., Xu, H., and Abraham, S.N. (2015). A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion. *Cell* 161, 1306–1319.
- Mikaeel, R.R., Young, J.P., Li, Y., Poplawski, N.K., Smith, E., Horsnell, M., Uylaki, W., Tomita, Y., Townsend, A.R., Feng, J., et al. (2021). RNF43 Pathogenic Germline Variant in a Family with Colorectal Cancer. *Clin Genet*.
- Mima, K., Nishihara, R., Qian, Z.R., Cao, Y., Sukawa, Y., Nowak, J.A., Yang, J., Dou, R., Masugi, Y., Song, M., et al. (2016). *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 65, 1973–1980.
- Mitchell, G., Cheng, M.I., Chen, C., Nguyen, B.N., Whiteley, A.T., Kianian, S., Cox, J.S., Green, D.R., McDonald, K.L., and Portnoy, D.A. (2018). *Listeria monocytogenes* triggers noncanonical autophagy upon phagocytosis, but avoids subsequent growth-restricting xenophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E210–E217.

- Miyamoto, S., Komiya, M., Fujii, G., Hamoya, T., Nakanishi, R., Fujimoto, K., Tamura, S., Kurokawa, Y., Takahashi, M., Ijichi, T., et al. (2017). Preventive Effects of Heat-Killed *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 on Mouse Intestinal Tumor Development. *Int J Mol Sci* 18, 826.
- Mlecnik, B., Tosolini, M., Charoentong, P., Kirilovsky, A., Bindea, G., Berger, A., Camus, M., Gillard, M., Bruneval, P., Fridman, W., et al. (2010). Biomolecular Network Reconstruction Identifies T-Cell Homing Factors Associated With Survival in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 138, 1429–1440.
- Monleón, D., Morales, J.M., Barrasa, A., López, J.A., Vázquez, C., and Celda, B. (2009). Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed* 22, 342–348.
- 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.
- Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14, 667–685.
- Münz, C. (2016). Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunol Rev* 272, 17–27.
- Nagarsheth, N., Wicha, M.S., and Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 17, 559–572.
- 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, Y., Nagashima, N., Minagawa, N., Inoue, Y., Katsuki, T., Onitsuka, K., Sako, T., Hirata, K., Nagata, N., and Itoh, H. (2002). Relationships between tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 22, 4291–4296.
- Narayanankutty*, A. (2019). PI3K/ Akt/ mTOR Pathway as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer: A Review of Preclinical and Clinical Evidence.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173–182.
- Neumann, Y., Bruns, S.A., Rohde, M., Prajsnar, T.K., Foster, S.J., and Schmitz, I. (2016). Intracellular *Staphylococcus aureus* eludes selective autophagy by activating a host cell kinase. *Autophagy* 12, 2069–2084.
- Newberry, R.D., and Lorenz, R.G. (2005). Organizing a mucosal defense. *Immunological Reviews* 206, 6–21.
- Ng, M.Y., Wang, M., Casey, P.J., Gan, Y.-H., and Hagen, T. (2017). Activation of MAPK/ERK signaling by *Burkholderia pseudomallei* cycle inhibiting factor (Cif). *PLoS One* 12, e0171464.
- Ng, M.Y., Gan, Y.-H., and Hagen, T. (2018). Characterisation of cellular effects of *Burkholderia pseudomallei* cycle inhibiting factor (Cif). *Biol Open* 7, bio028225.
- Nguyen, H.T.T., Dalmasso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive *Escherichia coli* Modulate Levels of microRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy. *Gastroenterology* 146, 508–519.
- Nguyen, L.H., Ma, W., Wang, D.D., Cao, Y., Mallick, H., Gerbaba, T.K., Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Hall, A.B., Sikavi, D., et al. (2020). Association Between Sulfur-Metabolizing Bacterial Communities in Stool and Risk of Distal Colorectal Cancer in Men. *Gastroenterology* 158, 1313–1325.
- Niklaus, M., Adams, O., Berezowska, S., Zlobec, I., Graber, F., Slotta-Huspenina, J., Nitsche, U., Rosenberg, R., Tschan, M.P., and Langer, R. (2017). Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget* 8, 54604–54615.
- Nishihara, R., Morikawa, T., Kuchiba, A., Lochhead, P., Yamauchi, M., Liao, X., Imamura, Y., Noshō, K., Shima, K., Kawachi, I., et al. (2013). A Prospective Study of Duration of Smoking Cessation and Colorectal Cancer Risk by Epigenetics-related Tumor Classification. *Am J Epidemiol* 178, 84–100.

- Nizri, E., Greenman-Maaravi, N., Bar-David, S., Ben-Yehuda, A., Weiner, G., Lahat, G., and Klausner, J. (2016). Analysis of histological and immunological parameters of metastatic lymph nodes from colon cancer patients reveals that T-helper 1 type immune response is associated with improved overall survival. *Medicine (Baltimore)* 95, e5340.
- Noman, M.Z., Janji, B., Kaminska, B., Van Moer, K., Pierson, S., Przanowski, P., Buart, S., Berchem, G., Romero, P., Mami-Chouaib, F., et al. (2011). Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res* 71, 5976–5986.
- Noman, M.Z., Parpal, S., Van Moer, K., Xiao, M., Yu, Y., Viklund, J., De Milito, A., Hasmim, M., Andersson, M., Amaravadi, R.K., et al. (2020). Inhibition of Vps34 reprograms cold into hot inflamed tumors and improves anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *Sci Adv* 6, eaax7881.
- Nougayrède, J.-P., Taieb, F., De Rycke, J., and Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol* 13, 103–110.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* 313, 848–851.
- Oh, D.S., and Lee, H.K. (2019). Autophagy protein ATG5 regulates CD36 expression and anti-tumor MHC class II antigen presentation in dendritic cells. *Autophagy* 15, 2091–2106.
- Ohigashi, S., Sudo, K., Kobayashi, D., Takahashi, T., Nomoto, K., and Onodera, H. (2013). Significant changes in the intestinal environment after surgery in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 17, 1657–1664.
- Olesen, S.W., and Alm, E.J. (2016). Dysbiosis is not an answer. *Nature Microbiology* 1, 1–2.
- Oliero, M., Calvé, A., Fragoso, G., Cuisiniere, T., Hajjar, R., Dobrindt, U., and Santos, M.M. (2021). Oligosaccharides increase the genotoxic effect of colibactin produced by pks+ *Escherichia coli* strains. *BMC Cancer* 21, 172.
- Omura, Y., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Yin, C., Shigemori, T., Kusunoki, K., Kusunoki, Y., Ide, S., Shimura, T., Fujikawa, H., et al. (2020). Prognostic impacts of tumoral expression and serum levels of PD-L1 and CTLA-4 in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 69, 2533–2546.
- Ondrej, M., Cechakova, L., Fabrik, I., Klimentova, J., and Tichy, A. (2020). Lys05 - A Promising Autophagy Inhibitor in the Radiosensitization Battle: Phosphoproteomic Perspective. *Cancer Genomics Proteomics* 17, 369–382.
- 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.
- Paoli, P., Giannoni, E., and Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3481–3498.
- Parekh, V.V., Pabbisetty, S.K., Wu, L., Sebzda, E., Martinez, J., Zhang, J., and Van Kaer, L. (2017). Autophagy-related protein Vps34 controls the homeostasis and function of antigen cross-presenting CD8 α dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6371–E6380.
- Parihar, M., Dodds, S.G., Hubbard, G., Javors, M.A., Strong, R., Hasty, P., and Sharp, Z.D. (2021). Rapamycin Extends Life Span in ApcMin/+ Colon Cancer FAP Model. *Clinical Colorectal Cancer* 20, e61–e70.
- Park, M., Kwon, J., Shin, H.-J., Moon, S.M., Kim, S.B., Shin, U.S., Han, Y.-H., and Kim, Y. (2020). Butyrate enhances the efficacy of radiotherapy via FOXO3A in colorectal cancer patient-derived organoids. *Int J Oncol* 57, 1307–1318.
- Paul, S., Kashyap, A.K., Jia, W., He, Y.-W., and Schaefer, B.C. (2012). Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF- κ B. *Immunity* 36, 947–958.
- Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 38, 633–643.
- Pearlman, R., Frankel, W.L., Swanson, B., Zhao, W., Yilmaz, A., Miller, K., Bacher, J., Bigley, C., Nelsen, L., Goodfellow, P.J., et al. (2017). Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* 3, 464–471.

- Péré-Védrenne, C., Cardinaud, B., Varon, C., Mocan, I., Buissonnière, A., Izotte, J., Mégraud, F., and Ménard, A. (2016). The Cytolethal Distending Toxin Subunit CdtB of *Helicobacter* Induces a Th17-related and Antimicrobial Signature in Intestinal and Hepatic Cells In Vitro. *J Infect Dis* 213, 1979–1989.
- Petrelli, F., Ghidini, M., Cabiddu, M., Pezzica, E., Corti, D., Turati, L., Costanzo, A., Varricchio, A., Ghidini, A., Barni, S., et al. (2019). Microsatellite Instability and Survival in Stage II Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Research* 39, 6431–6441.
- Petrišič, N., Kozorog, M., Aden, S., Podobnik, M., and Anderluh, G. (2021). The molecular mechanisms of listeriolysin O-induced lipid membrane damage. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1863, 183604.
- Piffoux, M., Eriau, E., and Cassier, P.A. (2021). Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 124, 333–344.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2059–2072.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Huber, A.R., van Hoeck, A., Wood, H.M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmasso, G., Stege, P.B., et al. (2020). Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature*.
- Poillet-Perez, L., Sharp, D.W., Yang, Y., Laddha, S.V., Ibrahim, M., Bommareddy, P.K., Hu, Z.S., Vieth, J., Haas, M., Bosenberg, M.W., et al. (2020). Autophagy promotes growth of tumors with high mutational burden by inhibiting a T-cell immune response. *Nat Cancer* 1, 923–934.
- Pölonen, P., Jawahar Deen, A., Leinonen, H.M., Jyrkkänen, H.-K., Kuosmanen, S., Mononen, M., Jain, A., Tuomainen, T., Pasonen-Seppänen, S., Hartikainen, J.M., et al. (2019). Nrf2 and SQSTM1/p62 jointly contribute to mesenchymal transition and invasion in glioblastoma. *Oncogene* 38, 7473–7490.
- Pommier, A., Anaparthi, N., Memos, N., Kelley, Z.L., Gouronnet, A., Yan, R., Auffray, C., Albregues, J., Egeblad, M., Iacobuzio-Donahue, C.A., et al. (2018). Unresolved endoplasmic reticulum stress engenders immune-resistant, latent pancreatic cancer metastases. *Science* 360, eaao4908.
- Pons, B.J., Vignard, J., and Mirey, G. (2019). Cytolethal Distending Toxin Subunit B: A Review of Structure-Function Relationship. *Toxins (Basel)* 11, E595.
- Porkka, N., Lahtinen, L., Ahtiainen, M., Böhm, J.P., Kuopio, T., Eldfors, S., Mecklin, J.-P., Seppälä, T.T., and Peltomäki, P. (2019). Epidemiological, clinical and molecular characterization of Lynch-like syndrome: A population-based study. *International Journal of Cancer* 145, 87–98.
- 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.A., Harrison, R.J., Primrose, J.N., and Khakoo, S.I. (2014). T cells but not NK cells are associated with a favourable outcome for resected colorectal liver metastases. *BMC Cancer* 14, 180.
- Purcell, R.V., Pearson, J., Aitchison, A., Dixon, L., Frizelle, F.A., and Keenan, J.I. (2017). Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PLoS One* 12, e0171602.
- Qiang, L., Zhao, B., Ming, M., Wang, N., He, T.-C., Hwang, S., Thorburn, A., and He, Y.-Y. (2014). Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9241–9246.
- Quah, B.J.C., Warren, H.S., and Parish, C.R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2, 2049–2056.
- Raj, S., Chandel, V., Kumar, A., Kesari, K.K., Asthana, S., Ruokolainen, J., Kamal, M.A., and Kumar, D. (2020). Molecular mechanisms of interplay between autophagy and metabolism in cancer. *Life Sciences* 259, 118184.
- Rao, S., Tortola, L., Perlot, T., Wirnsberger, G., Novatchkova, M., Nitsch, R., Sykacek, P., Frank, L., Schramek, D., Komnenovic, V., et al. (2014). A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun* 5, 3056.
- Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J.P., and Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 124, 359–367.

- Ravenhill, B.J., Boyle, K.B., von Muhlinen, N., Ellison, C.J., Masson, G.R., Otten, E.G., Foeglein, A., Williams, R., and Randow, F. (2019). The Cargo Receptor NDP52 Initiates Selective Autophagy by Recruiting the ULK Complex to Cytosol-Invading Bacteria. *Molecular Cell* 74, 320-329.e6.
- Razi, S., Baradaran Noveiry, B., Keshavarz-Fathi, M., and Rezaei, N. (2019). IL-17 and colorectal cancer: From carcinogenesis to treatment. *Cytokine* 116, 7-12.
- Réb  , C., and Ghiringhelli, F. (2020). Interleukin-1   and Cancer. *Cancers (Basel)* 12, E1791.
- Rebecca, V.W., Nicastr  , M.C., Fennelly, C., Chude, C.I., Barber-Rotenberg, J.S., Ronghe, A., McAfee, Q., McLaughlin, N.P., Zhang, G., Goldman, A.R., et al. (2019). PPT1 Promotes Tumor Growth and Is the Molecular Target of Chloroquine Derivatives in Cancer. *Cancer Discov* 9, 220-229.
- Recio-Boiles, A., Waheed, A., and Cagir, B. (2020). Cancer, Colon. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Reddy, B.S., Weisburger, J.H., Narisawa, T., and Wynder, E.L. (1974). Colon Carcinogenesis in Germ-free Rats with 1,2-Dimethylhydrazine and N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 34, 2368-2372.
- Reita, D., Bour, C., Benbrika, R., Groh, A., Pencreach, E., Gu  rin, E., and Guenot, D. (2019). Synergistic Anti-Tumor Effect of mTOR Inhibitors with Irinotecan on Colon Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 11.
- Ren, T., Zheng, B., Huang, Y., Wang, S., Bao, X., Liu, K., and Guo, W. (2019). Osteosarcoma cell intrinsic PD-L2 signals promote invasion and metastasis via the RhoA-ROCK-LIMK2 and autophagy pathways. *Cell Death Dis* 10, 261.
- Rhee, K.-J., Wu, S., Wu, X., Huso, D.L., Karim, B., Franco, A.A., Rabizadeh, S., Golub, J.E., Mathews, L.E., Shin, J., et al. (2009). Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun* 77, 1708-1718.
- Richter, B., Sliter, D.A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S.A., et al. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 4039-4044.
- Rivera Vargas, T., Cai, Z., Shen, Y., Dosset, M., Benoit-Lizon, I., Martin, T., Roussey, A., Flavell, R.A., Ghiringhelli, F., and Apetoh, L. (2017). Selective degradation of PU.1 during autophagy represses the differentiation and antitumour activity of TH9 cells. *Nat Commun* 8, 559.
- Rodriguez, P.C., Ochoa, A.C., and Al-Khami, A.A. (2017). Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol* 8, 93.
- Rosen, R.D., and Sapra, A. (2020). TNM Classification. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Rosenberg, S.A. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol* 192, 5451-5458.
- Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daill  re, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., et al. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 359, 91-97.
- Ruan, H., Xu, J., Wang, L., Zhao, Z., Kong, L., Lan, B., and Li, X. (2018). The prognostic value of p62 in solid tumor patients: a meta-analysis. *Oncotarget* 9, 4258-4266.
- 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/  -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 14, 195-206.
- Ruland, J. (2019). Colon Cancer: Epithelial Notch Signaling Recruits Neutrophils to Drive Metastasis. *Cancer Cell* 36, 213-214.
- 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.
- Sakamoto, Y., Mima, K., Ishimoto, T., Ogata, Y., Imai, K., Miyamoto, Y., Akiyama, T., Daitoku, N., Hiyoshi, Y., Iwatsuki, M., et al. (2021). The relationship of *Fusobacterium nucleatum* with antitumour immunity in colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Sci*.

- Sakuma, S., Minamino, S., Takase, M., Ishiyama, Y., Hosokura, H., Kohda, T., Ikeda, Y., and Fujimoto, Y. (2019). Hydrogen sulfide donor GYY4137 suppresses proliferation of human colorectal cancer Caco-2 cells by inducing both cell cycle arrest and cell death. *Heliyon* 5, e02244.
- Sawayama, H., Miyamoto, Y., Ogawa, K., Yoshida, N., and Baba, H. (2020). Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification. *Ann Gastroenterol Surg* 4, 528–539.
- Schulthess, J., Pandey, S., Capitani, M., Rue-Albrecht, K.C., Arnold, I., Franchini, F., Chomka, A., Illott, N.E., Johnston, D.G.W., Pires, E., et al. (2019). The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* 50, 432–445.e7.
- Sears, C.L., Islam, S., Saha, A., Arjumand, M., Alam, N.H., Faruque, A.S.G., Salam, M.A., Shin, J., Hecht, D., Weintraub, A., et al. (2008). Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin Infect Dis* 47, 797–803.
- Shaik, J.P., Alanazi, I.O., Pathan, A.A.K., Parine, N.R., Almadi, M.A., Azzam, N.A., Aljebreen, A.M., Alharbi, O., Alanazi, M.S., and Khan, Z. (2020). Frequent Activation of Notch Signaling Pathway in Colorectal Cancers and Its Implication in Patient Survival Outcome. *J Oncol* 2020.
- Shanahan, F., Ghosh, T.S., and O'Toole, P.W. (2021). The Healthy Microbiome-What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? *Gastroenterology* 160, 483–494.
- Shapiro, H., Kolodziejczyk, A.A., Halstuch, D., and Elinav, E. (2018). Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J Exp Med* 215, 383–396.
- Sheikh, A.F., Masjedi Zadeh, A.R., Saki, M., Khani, P., Hashemi, S.J., Shahin Zadeh, S., and Dastoorpoor, M. (2020). Detection of *Streptococcus gallolyticus* in colorectal cancer and inflammatory bowel disease patients compared to control group in southwest of Iran. *Mol Biol Rep* 47, 8361–8365.
- Shiau, D.-J., Kuo, W.-T., Davuluri, G.V.N., Shieh, C.-C., Tsai, P.-J., Chen, C.-C., Lin, Y.-S., Wu, Y.-Z., Hsiao, Y.-P., and Chang, C.-P. (2020). Hepatocellular carcinoma-derived high mobility group box 1 triggers M2 macrophage polarization via a TLR2/NOX2/autophagy axis. *Sci Rep* 10, 13582.
- Shibutani, M., Nakao, S., Maeda, K., Nagahara, H., Kashiwagi, S., Hirakawa, K., and Ohira, M. (2021). The Impact of Tumor-associated Macrophages on Chemoresistance via Angiogenesis in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 41, 4447–4453.
- Shirasuna, K., Ito, M., Matsuda, T., Enomoto, T., Ohara, Y., Yamamoto, M., Nishijima, S., Ohkohchi, N., and Kuromitsu, S. (2020). Correlation analysis of the proportion of monocytic myeloid-derived suppressor cells in colorectal cancer patients. *PLoS One* 15, e0243643.
- Shogan, B.D., Belogortseva, N., Luong, P.M., Zaborin, A., Lax, S., Bethel, C., Ward, M., Muldoon, J.P., Singer, M., An, G., et al. (2015). Collagen degradation and MMP9 activation by *Enterococcus faecalis* contribute to intestinal anastomotic leak. *Sci Transl Med* 7, 286ra68.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787–795.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., and Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 71, 7–33.
- Singh, S., and Resnick, K.E. (2017). Lynch Syndrome and Endometrial Cancer. *South Med J* 110, 265–269.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Manicassamy, S., Munn, D.H., et al. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40, 128–139.
- Singh, S.S., Vats, S., Chia, A.Y.-Q., Tan, T.Z., Deng, S., Ong, M.S., Arfuso, F., Yap, C.T., Goh, B.C., Sethi, G., et al. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* 37, 1142–1158.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 1065–1073.
- Starobinets, H., Ye, J., Broz, M., Barry, K., Goldsmith, J., Marsh, T., Rostker, F., Krummel, M., and Debnath, J. (2016). Antitumor adaptive immunity remains intact following inhibition of autophagy and antimalarial treatment. *J Clin Invest* 126, 4417–4429.

- Stormark, K., Krarup, P.-M., Sjövall, A., Søreide, K., Kvaløy, J.T., Nordholm-Carstensen, A., Nedrebø, B.S., and Kørner, H. (2020). Anastomotic leak after surgery for colon cancer and effect on long-term survival. *Colorectal Dis* 22, 1108–1118.
- Sui, G., Qiu, Y., Yu, H., Kong, Q., and Zhen, B. (2019). Interleukin-17 promotes the development of cisplatin resistance in colorectal cancer. *Oncol Lett* 17, 944–950.
- Sun, S., Wang, Z., Tang, F., Hu, P., Yang, Z., Xue, C., Gong, J., Shi, L., and Xie, C. (2016). ATG7 promotes the tumorigenesis of lung cancer but might be dispensable for prognosis prediction: a clinicopathologic study. *Onco Targets Ther* 9, 4975–4981.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 209–249.
- Sutcliffe, E.G., Bartenbaker Thompson, A., Stettner, A.R., Marshall, M.L., Roberts, M.E., Susswein, L.R., Wang, Y., Klein, R.T., Hruska, K.S., and Solomon, B.D. (2019). Multi-gene panel testing confirms phenotypic variability in MUTYH-Associated Polyposis. *Familial Cancer* 18, 203–209.
- Swadling, L., Pallett, L.J., Diniz, M.O., Baker, J.M., Amin, O.E., Stegmann, K.A., Burton, A.R., Schmidt, N.M., Jeffery-Smith, A., Zakeri, N., et al. (2020). Human Liver Memory CD8+ T Cells Use Autophagy for Tissue Residence. *Cell Rep* 30, 687–698.e6.
- 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.
- Tabung, F.K., Brown, L.S., and Fung, T.T. (2017). Dietary Patterns and Colorectal Cancer Risk: A Review of 17 Years of Evidence (2000–2016). *Curr Colorectal Cancer Rep* 13, 440–454.
- Taieb, F., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. (2011). Cycle inhibiting factors (cifs): cyclomodulins that usurp the ubiquitin-dependent degradation pathway of host cells. *Toxins (Basel)* 3, 356–368.
- Talukdar, S., Bhoopathi, P., Emdad, L., Das, S., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2019). Dormancy and cancer stem cells: An enigma for cancer therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 141, 43–84.
- Tang, B., Wang, K., Jia, Y., Zhu, P., Fang, Y., Zhang, Z., Mao, X., Li, Q., and Zeng, D.-Z. (2016). *Fusobacterium nucleatum*-Induced Impairment of Autophagic Flux Enhances the Expression of Proinflammatory Cytokines via ROS in Caco-2 Cells. *PLoS One* 11.
- Tavakoli, F., Sartakhti, J.S., Manshaei, M.H., and Basanta, D. (2021). Cancer immunoediting: A game theoretical approach. *In Silico Biol* 14, 1–12.
- Taylor, C.C., Millien, V.O., Hou, J.K., and Massarweh, N.N. (2020). Association Between Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer Stage of Disease and Survival. *Journal of Surgical Research* 247, 77–85.
- Taylor, J.C., Gao, X., Xu, J., Holder, M., Petrosino, J., Kumar, R., Liu, W., Höök, M., Mackenzie, C., Hillhouse, A., et al. (2021). A type VII secretion system of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* contributes to gut colonization and the development of colon tumors. *PLoS Pathog* 17, e1009182.
- Teng, M.W.L., Galon, J., Fridman, W.-H., and Smyth, M.J. (2015). From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest* 125, 3338–3346.
- Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A.F., Tartour, E., and Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res* 73, 539–549.
- 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. (2017). The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunol* 10, 421–433.
- Thomas, W., Ascott, Z.K., Harmey, D., Slice, L.W., Rozengurt, E., and Lax, A.J. (2001). Cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli* induces RhoA-dependent expression of the cyclooxygenase-2 Gene. *Infect Immun* 69, 6839–6845.
- Tomkovich, S., Dejea, C.M., Winglee, K., Drewes, J.L., Chung, L., Housseau, F., Pope, J.L., Gauthier, J., Sun, X., Mühlbauer, M., et al. (2019). Human colon mucosal biofilms from healthy or colon cancer hosts are carcinogenic. *J Clin Invest* 129, 1699–1712.

- Toor, S.M., Syed Khaja, A.S., El Salhat, H., Bekdache, O., Kanbar, J., Jaloudi, M., and Elkord, E. (2016). Increased Levels of Circulating and Tumor-Infiltrating Granulocytic Myeloid Cells in Colorectal Cancer Patients. *Front Immunol* 7, 560.
- Toprak, N.U., Yagci, A., Gulluoglu, B.M., Akin, M.L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. (2006). A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect* 12, 782–786.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, 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 Res* 71, 1263–1271.
- Tsoi, H., Chu, E.S.H., Zhang, X., Sheng, J., Nakatsu, G., Ng, S.C., Chan, A.W.H., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., and Yu, J. (2017). *Peptostreptococcus anaerobius* Induces Intracellular Cholesterol Biosynthesis in Colon Cells to Induce Proliferation and Causes Dysplasia in Mice. *Gastroenterology* 152, 1419-1433.e5.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169–174.
- Tzavlaki, K., and Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules* 10, 487.
- Uchiyama, K., Naito, Y., Yagi, N., Mizushima, K., Higashimura, Y., Hirai, Y., Dohi, O., Okayama, T., Yoshida, N., Katada, K., et al. (2021). Identification of colorectal neoplasia by using serum bile acid profile. *Biomarkers* 26, 462–467.
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., and Arnold, D. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* 25, iii1–iii9.
- Väyrynen, J.P., Haruki, K., Lau, M.C., Väyrynen, S.A., Zhong, R., Costa, A.D., Borowsky, J., Zhao, M., Fujiyoshi, K., Arima, K., et al. (2021). The Prognostic Role of Macrophage Polarization in the Colorectal Cancer Microenvironment. *Cancer Immunol Res* 9, 8–19.
- Vera-Ramirez, L., Vodnala, S.K., Nini, R., Hunter, K.W., and Green, J.E. (2018). Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat Commun* 9, 1944.
- Vetter, L.E., Merkel, S., Bénard, A., Krautz, C., Brunner, M., Mittelstädt, A., Schlegel, N., Wiegering, A., Germer, C.-T., Weber, K., et al. (2021). Colorectal cancer in Crohn’s colitis is associated with advanced tumor invasion and a poorer survival compared with ulcerative colitis: a retrospective dual-center study. *Int J Colorectal Dis* 36, 141–150.
- Vieira, A.R., Abar, L., Chan, D.S.M., Vingeliene, S., Polemiti, E., Stevens, C., Greenwood, D., and Norat, T. (2017). Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Annals of Oncology* 28, 1788–1802.
- 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.
- Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., Dowell, J.M., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Wagner, M., et al. (2007). Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 13, 1253–1259.
- Wang, L., Jiang, X., Zhang, X., and Shu, P. (2021). Prognostic implications of an autophagy-based signature in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)* 100, e25148.
- Wang, Q.-S., Shen, S.-Q., Sun, H.-W., Xing, Z.-X., and Yang, H.-L. (2018a). Interferon-gamma induces autophagy-associated apoptosis through induction of cPLA2-dependent mitochondrial ROS generation in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 498, 1058–1065.
- Wang, R., Liu, Y., Liu, L., Chen, M., Wang, X., Yang, J., Gong, Y., Ding, B.-S., Wei, Y., and Wei, X. (2019). Tumor cells induce LAMP2a expression in tumor-associated macrophage for cancer progression. *EBioMedicine* 40, 118–134.
- Wang, W., Kang, H., Zhao, Y., Min, I., Wyrwas, B., Moore, M., Teng, L., Zarnegar, R., Jiang, X., and Fahey, T.J. (2017a). Targeting Autophagy Sensitizes BRAF-Mutant Thyroid Cancer to Vemurafenib. *J Clin Endocrinol Metab* 102, 634–643.

- Wang, W., Chen, M., Jin, X., Li, X., Yang, Z., Lin, H., and Xu, S. (2018b). H2S induces Th1/Th2 imbalance with triggered NF- κ B pathway to exacerbate LPS-induced chicken pneumonia response. *Chemosphere* 208, 241–246.
- 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.
- Wasserman, I., Lee, L.H., Ogino, S., Marco, M.R., Wu, C., Chen, X., Datta, J., Sadot, E., Szeglin, B., Guillem, J.G., et al. (2019). SMAD4 Loss in Colorectal Cancer Patients Correlates with Recurrence, Loss of Immune Infiltrate, and Chemoresistance. *Clin Cancer Res* 25, 1948–1956.
- Wei, X.-L., Luo, X., Sheng, H., Wang, Y., Chen, D.-L., Li, J.-N., Wang, F.-H., and Xu, R.-H. (2020). PD-L1 expression in liver metastasis: its clinical significance and discordance with primary tumor in colorectal cancer. *J Transl Med* 18, 475.
- Wei, Y., Liu, M., Li, X., Liu, J., and Li, H. (2018). Origin of the Autophagosomal Membrane in Mammals. *Biomed Res Int* 2018, 1012789.
- Wei, Z., Cao, S., Liu, S., Yao, Z., Sun, T., Li, Y., Li, J., Zhang, D., and Zhou, Y. (2016). Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget* 7, 46158–46172.
- Wernke, K.M., Xue, M., Tirla, A., Kim, C.S., Crawford, J.M., and Herzon, S.B. (2020). Structure and bioactivity of colibactin. *Bioorg Med Chem Lett* 30, 127280.
- Wick, E.C., Rabizadeh, S., Albesiano, E., Wu, X., Wu, S., Chan, J., Rhee, K.-J., Ortega, G., Huso, D.L., Pardoll, D., et al. (2014). Stat3 activation in murine colitis induced by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Inflamm Bowel Dis* 20, 821–834.
- Wielandt, A.M., Hurtado, C., Moreno, C., Villarreal, C., Castro, M., Estay, M., Simian, D., Martinez, M., Vial, M.T., Kronberg, U., et al. (2020). Characterization of Chilean patients with sporadic colorectal cancer according to the three main carcinogenic pathways: Microsatellite instability, CpG island methylator phenotype and Chromosomal instability. *Tumour Biol.* 42, 1010428320938492.
- Wilson, M.R., Jiang, Y., Villalta, P.W., Stornetta, A., Boudreau, P.D., Carrá, A., Brennan, C.A., Chun, E., Ngo, L., Samson, L.D., et al. (2019). The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science* 363.
- Wirbel, J., Pyl, P.T., Kartal, E., Zych, K., Kashani, A., Milanese, A., Fleck, J.S., Voigt, A.Y., Palleja, A., Ponnudurai, R., et al. (2019). Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nature Medicine* 25, 679–689.
- Wong, C.C., Xu, J., Bian, X., Wu, J.-L., Kang, W., Qian, Y., Li, W., Chen, H., Gou, H., Liu, D., et al. (2020). In Colorectal Cancer Cells With Mutant KRAS, SLC25A22-Mediated Glutaminolysis Reduces DNA Demethylation to Increase WNT Signaling, Stemness, and Drug Resistance. *Gastroenterology* 159, 2163–2180.e6.
- Wong, S.H., Zhao, L., Zhang, X., Nakatsu, G., Han, J., Xu, W., Xiao, X., Kwong, T.N.Y., Tsoi, H., Wu, W.K.K., et al. (2017a). Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* 153, 1621–1633.e6.
- Wong, S.H., Kwong, T.N.Y., Chow, T.-C., Luk, A.K.C., Dai, R.Z.W., Nakatsu, G., Lam, T.Y.T., Zhang, L., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., et al. (2017b). Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut* 66, 1441–1448.
- Wong, S.H.M., Fang, C.M., Chuah, L.-H., Leong, C.O., and Ngai, S.C. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 121, 11–22.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Zhang, M., Franco, A., and Sears, C.L. (2007). *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage. *J Cell Sci* 120, 1944–1952.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 15, 1016–1022.
- Wu, S.-Y., Fu, T., Jiang, Y.-Z., and Shao, Z.-M. (2020). Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 19, 120.

- Xia, H., Wang, W., Crespo, J., Kryczek, I., Li, W., Wei, S., Bian, Z., Maj, T., He, M., Liu, R.J., et al. (2017). Suppression of FIP200 and autophagy by tumor-derived lactate promotes naïve T cell apoptosis and affects tumor immunity. *Sci Immunol* 2, eaan4631.
- Xie, C., Li, N., Wang, H., He, C., Hu, Y., Peng, C., Ouyang, Y., Wang, D., Xie, Y., Chen, J., et al. (2020). Inhibition of autophagy aggravates DNA damage response and gastric tumorigenesis via Rad51 ubiquitination in response to *H. pylori* infection. *Gut Microbes* 11, 1567–1589.
- Xie, X., White, E.P., and Mehnert, J.M. (2013). Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS One* 8, e55096.
- Xu, J., Qian, J., Zhang, W., Chen, E., Zhang, G., Cao, G., Wang, F., Shen, X., Zhou, W., and Song, Z. (2019). LYPD8 regulates the proliferation and migration of colorectal cancer cells through inhibiting the secretion of IL-6 and TNF- α . *Oncol Rep* 41, 2389–2395.
- Xu, X., Araki, K., Li, S., Han, J.-H., Ye, L., Tan, W.G., Konieczny, B.T., Bruinsma, M.W., Martinez, J., Pearce, E.L., et al. (2014). Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nat Immunol* 15, 1152–1161.
- Xue, M., Kim, C.S., Healy, A.R., Wernke, K.M., Wang, Z., Frischling, M.C., Shine, E.E., Wang, W., Herzon, S.B., and Crawford, J.M. (2019). Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science* 365.
- Yachida, S., Mizutani, S., Shiroma, H., Shiba, S., Nakajima, T., Sakamoto, T., Watanabe, H., Masuda, K., Nishimoto, Y., Kubo, M., et al. (2019). Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nature Medicine* 25, 968–976.
- Yamaguchi, M., Noda, N.N., Yamamoto, H., Shima, T., Kumeta, H., Kobashigawa, Y., Akada, R., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2012). Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate. *Structure* 20, 1244–1254.
- Yamamoto, K., Venida, A., Yano, J., Biancur, D.E., Kakiuchi, M., Gupta, S., Sohn, A.S.W., Mukhopadhyay, S., Lin, E.Y., Parker, S.J., et al. (2020). Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* 581, 100–105.
- Yan, Y., Drew, D.A., Markowitz, A., Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Nguyen, L.H., Tran, C., Chung, D.C., Gilpin, K.K., Meixell, D., et al. (2020). Structure of the Mucosal and Stool Microbiome in Lynch Syndrome. *Cell Host & Microbe* 27, 585–600.e4.
- Yang, A., Rajeshkumar, N.V., Wang, X., Yabuuchi, S., Alexander, B.M., Chu, G.C., Von Hoff, D.D., Maitra, A., and Kimmelman, A.C. (2014). Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov* 4, 905–913.
- Yang, A., Pantoom, S., and Wu, Y.-W. (2017). Elucidation of the anti-autophagy mechanism of the *Legionella* effector RavZ using semisynthetic LC3 proteins. *Elife* 6, e23905.
- Yang, G., Song, W., Postoak, J.L., Chen, J., Martinez, J., Zhang, J., Wu, L., and Van Kaer, L. (2021). Autophagy-related protein PIK3C3/VPS34 controls T cell metabolism and function. *Autophagy* 17, 1193–1204.
- Yang, Z., Ghoorun, R.A., Fan, X., Wu, P., Bai, Y., Li, J., Chen, H., Wang, L., and Wang, J. (2015). High expression of Beclin-1 predicts favorable prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 39, 98–106.
- Yao, Z.G., Cheng, X.K., Lin, C.H., Li, J., Lyu, B.B., Li, J.M., Jing, H.Y., Qin, Y.J., and Sun, X.C. (2021). [Genetic analysis of 45 patients with suspected Lynch syndrome using next-generation sequencing]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 43, 843–849.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Chakraborty, T., and Sasakawa, C. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA is a key player in evading autophagic recognition. *Autophagy* 5, 1220–1221.
- Yu, A.I., Zhao, L., Eaton, K.A., Ho, S., Chen, J., Poe, S., Becker, J., Gonzalez, A., McKinstry, D., Hasso, M., et al. (2020a). Gut Microbiota Modulate CD8 T Cell Responses to Influence Colitis-Associated Tumorigenesis. *Cell Rep* 31, 107471.
- Yu, M.R., Kim, H.J., and Park, H.R. (2020b). *Fusobacterium nucleatum* Accelerates the Progression of Colitis-Associated Colorectal Cancer by Promoting EMT. *Cancers (Basel)* 12, E2728.
- Yu, N., Zhu, H., Tao, Y., Huang, Y., Song, X., Zhou, Y., Li, Y., Pei, Q., Tan, Q., and Pei, H. (2016). Association between prognostic survival of human colorectal carcinoma and ZNRF3 expression. *Oncotargets Ther* 9, 6679–6687.

- Yu, T., Guo, F., Yu, Y., Sun, T., Ma, D., Han, J., Qian, Y., Kryczek, I., Sun, D., Nagarsheth, N., et al. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* 170, 548-563.e16.
- Yu, Y.-R., Imrichova, H., Wang, H., Chao, T., Xiao, Z., Gao, M., Rincon-Restrepo, M., Franco, F., Genolet, R., Cheng, W.-C., et al. (2020c). Disturbed mitochondrial dynamics in CD8⁺ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nat Immunol* 21, 1540–1551.
- Zamani, S., Taslimi, R., Sarabi, A., Jasemi, S., Sechi, L.A., and Feizabadi, M.M. (2019). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A Possible Etiological Candidate for Bacterially-Induced Colorectal Precancerous and Cancerous Lesions. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 449.
- Zeh, H.J., Bahary, N., Boone, B.A., Singhi, A.D., Miller-Ocuin, J.L., Normolle, D.P., Zureikat, A.H., Hogg, M.E., Bartlett, D.L., Lee, K.K., et al. (2020). A Randomized Phase II Preoperative Study of Autophagy Inhibition with High-Dose Hydroxychloroquine and Gemcitabine/Nab-Paclitaxel in Pancreatic Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 26, 3126–3134.
- Zhang, L., and Shay, J.W. (2017). Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 109.
- Zhang, K., Mao, T., He, Z., Wu, X., Peng, Y., Chen, Y., Dong, Y., Ruan, Z., and Wang, Z. (2019). Angiotensin I-converting enzyme gene plays a crucial role in the pathology of carcinomas in colorectal cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47, 2500–2506.
- Zhang, L., Hu, W., Cho, C.H., Chan, F.K., Yu, J., Fitzgerald, J.R., Cheung, C.K., Xiao, Z.G., Shen, J., Li, L.F., et al. (2018a). Reduced lysosomal clearance of autophagosomes promotes survival and colonization of *Helicobacter pylori*. *J Pathol* 244, 432–444.
- Zhang, Y., Choksi, S., Chen, K., Pobezinskaya, Y., Linnoila, I., and Liu, Z.-G. (2013). ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res* 23, 898–914.
- Zhang, Y., Weng, Y., Gan, H., Zhao, X., and Zhi, F. (2018b). *Streptococcus gallolyticus* conspires myeloid cells to promote tumorigenesis of inflammatory bowel disease. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 907–911.
- Zhang, Z., Aung, K.M., Uhlin, B.E., and Wai, S.N. (2018c). Reversible senescence of human colon cancer cells after blockage of mitosis/cytokinesis caused by the CNF1 cyclomodulin from *Escherichia coli*. *Sci Rep* 8, 17780.
- Zhao, Z., Fei, K., Bai, H., Wang, Z., Duan, J., and Wang, J. (2021). Metagenome association study of the gut microbiome revealed biomarkers linked to chemotherapy outcomes in locally advanced and advanced lung cancer. *Thorac Cancer* 12, 66–78.
- Zhen, Y.-H., Liu, X.-H., Yang, Y., Li, B., Tang, J.-L., Zeng, Q.-X., Hu, J., Zeng, X.-N., Zhang, L., Wang, Z.-J., et al. (2015). Phase I/II study of adjuvant immunotherapy with sentinel lymph node T lymphocytes in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 64, 1083–1093.
- Zheng, H., Zhang, X., Wang, X., and Sun, B. (2012). Autophagy Enhances the Aggressiveness of Human Colorectal Cancer Cells and Their Ability to Adapt to Apoptotic Stimulus. *Cancer Biol Med* 9, 105–110.
- Zheng, K., He, Z., Kitazato, K., and Wang, Y. (2019). Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. *Theranostics* 9, 104–125.
- Zhou, Q., Shen, Z.-F., Wu, B., Xu, C., He, Z., Chen, T., Shang, H., Xie, C., Huang, S., Chen, Y., et al. (2019). Risk of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2019.
- Zhu, M., Deng, G., Tan, P., Xing, C., Guan, C., Jiang, C., Zhang, Y., Ning, B., Li, C., Yin, B., et al. Beclin 2 negatively regulates innate immune signaling and tumor development. *J Clin Invest* 130, 5349–5369.
- Zirakzadeh, A.A., Marits, P., Sherif, A., and Winqvist, O. (2013). Multiplex B Cell Characterization in Blood, Lymph Nodes, and Tumors from Patients with Malignancies. *The Journal of Immunology* 190, 5847–5855.
- Zou, Y., Ling, Y.-H., Sironi, J., Schwartz, E.L., Perez-Soler, R., and Piperdi, B. (2013). The autophagy inhibitor chloroquine overcomes the innate resistance to erlotinib of non-small cell lung cancer cells with wild-type EGFR. *J Thorac Oncol* 8, 10.1097/JTO.0b013e31828c7210.
- (2017). Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. 111.

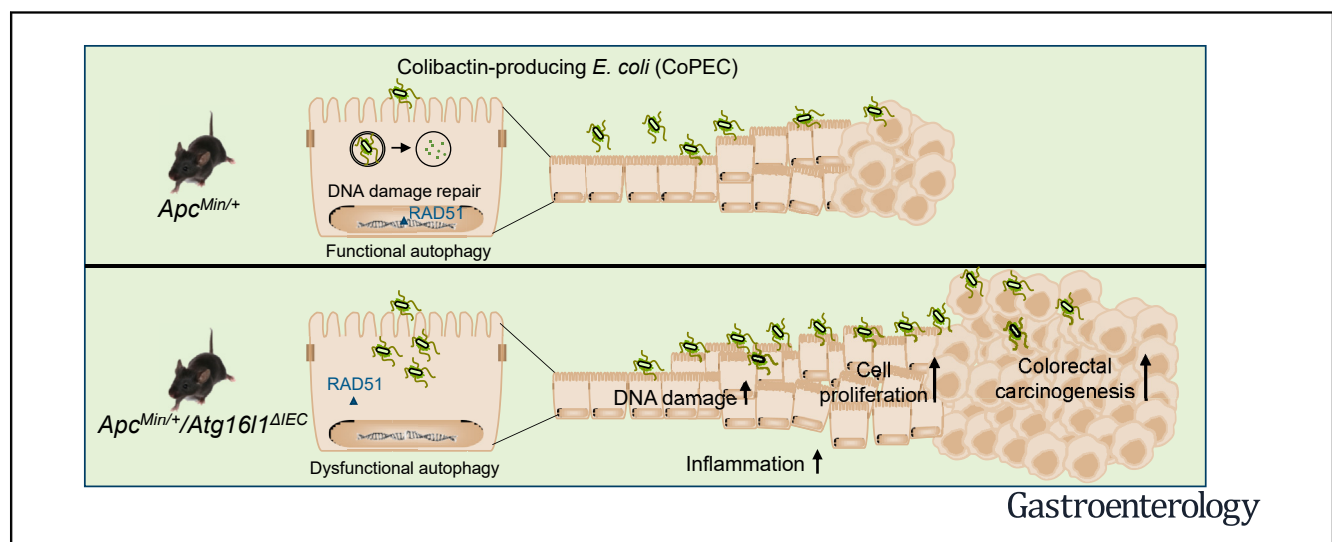
Annexe



Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing *Escherichia coli* in *Apc^{Min/+}* Mice

Cécily Lucas,¹ Laurène Salesse,¹ My Hanh Thi Hoang,^{1,2} Mathilde Bonnet,¹ Pierre Sauvanet,^{1,3} Anaïs Larabi,¹ Catherine Godfraind,^{1,4} Johan Gagnière,^{1,3} Denis Pezet,^{1,3} Philip Rosenstiel,⁵ Nicolas Barnich,¹ Richard Bonnet,^{1,6} Guillaume Dalmasso,¹ and Hang Thi Thu Nguyen¹

¹M2iSH (Microbes, intestine, inflammation and Susceptibility of the Host), UMR 1071 Inserm, University of Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ²Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam; ³Department of Digestive and Hepatobiliary Surgery, CHU (Centre Hospitalier Universitaire) Clermont-Ferrand, France; ⁴Department of Pathology, CHU Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France; ⁵Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University and University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; ⁶Department of Bacteriology, CHU Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France



BACKGROUND & AIMS: Colibactin-producing *Escherichia coli* (CoPEC) colonize the colonic mucosa of a higher proportion of patients with vs without colorectal cancer (CRC) and promote colorectal carcinogenesis in susceptible mouse models of CRC. Autophagy degrades cytoplasmic contents, including intracellular pathogens, via lysosomes and regulates intestinal homeostasis. We investigated whether inhibiting autophagy affects colorectal carcinogenesis in susceptible mice infected with CoPEC. **METHODS:** Human intestinal epithelial cells (IECs) (HCT-116) were infected with a strain of CoPEC (11G5 strain) isolated from a patient or a mutant strain that does not produce colibactin (11G5ΔclbQ). Levels of ATG5, ATG16L1, and SQSTM1 (also called p62) were knocked down in HCT-116 cells using small interfering RNAs. *Apc^{Min/+}* mice and *Apc^{Min/+}* mice with IEC-specific disruption of *Atg161* (*Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}*) were infected with 11G5 or 11G5ΔclbQ. Colonic tissues were collected from mice and analyzed for tumor size and number and by immunohistochemical staining, immunoblot, and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction for markers of autophagy, DNA damage, cell proliferation, and

inflammation. We analyzed levels of messenger RNAs (mRNAs) encoding proteins involved in autophagy in colonic mucosal tissues from patients with sporadic CRC colonized with vs without CoPEC by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. **RESULTS:** Patient colonic mucosa with CoPEC colonization had higher levels of mRNAs encoding proteins involved in autophagy than colonic mucosa without these bacteria. Infection of cultured IECs with 11G5 induced autophagy and DNA damage repair, whereas infection with 11G5ΔclbQ did not. Knock-down of ATG5 in HCT-116 cells increased numbers of intracellular 11G5, secretion of interleukin (IL) 6 and IL8, and markers of DNA double-strand breaks but reduced markers of DNA repair, indicating that autophagy is required for bacteria-induced DNA damage repair. Knock-down of ATG5 in HCT-116 cells increased 11G5-induced senescence, promoting proliferation of uninfected cells. Under uninfected condition, *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* mice developed fewer and smaller colon tumors than *Apc^{Min/+}* mice. However, after infection with 11G5, *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* mice developed more and larger tumors, with a significant

increase in mean histologic score, than infected *Apc*^{Min/+} mice. Increased levels of *Il6*, *Tnf*, and *Cxcl1* mRNAs, decreased level of *Il10* mRNA, and increased markers of DNA double-strand breaks and proliferation were observed in the colonic mucosa of 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔIEC} mice vs 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice. **CONCLUSION:** Infection of IECs and susceptible mice with CoPEC promotes autophagy, which is required to prevent colorectal tumorigenesis. Loss of ATG16L1 from IECs increases markers of inflammation, DNA damage, and cell proliferation and increases colorectal tumorigenesis in 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice. These findings indicate the importance of autophagy in response to CoPEC infection, and strategies to induce autophagy might be developed for patients with CRC and CoPEC colonization.

Keywords: Microbiome; Pathogenic Bacteria; Toxin; Colon Cancer.

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with approximately 1.36 million new cases per year, and is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide, with about 700,000 death per year.¹ CRC is a multifactorial disease for which several risk factors have been identified, such as age, genetic factors, unhealthy behaviors, microbial factors, and inflammatory bowel diseases. Among them, the gut microbiota has emerged as a key player in CRC development. A modification of gut microbiota composition or dysbiosis has been reported in patients with CRC, with an increase in *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus bovis/galloyticus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Fusobacterium nucleatum* and a decrease in *Faecalibacterium prausnitzii*.² The involvement of gut microbiota in CRC has been then determined by using mouse models of CRC. One of the best-known CRC models is *Apc*^{Min/+} mice bearing a loss-of-function germinal mutation in the *Apc* gene,³ which is the most prevalent mutation and has been found in about 80% of CRCs.⁴ Germ-free *Apc*^{Min/+} mice display a lower number of intestinal and colorectal tumors compared with microbiota-bearing *Apc*^{Min/+} mice.⁵ Similar results were obtained for the CRC mouse model chemically induced by azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS).⁶ Germ-free mice colonized with the fecal microbiota from AOM/DSS-treated mice exhibit enhanced colorectal tumorigenesis compared with those colonized with the fecal microbiota from untreated mice, suggesting that the dysbiotic microbiota directly contribute to colorectal carcinogenesis.⁶ A recent study showed that conventional mice treated with antibiotics and then with AOM or germ-free mice receiving fecal samples from patients with CRC exhibit increases in polyp numbers, intestinal dysplasia and proliferation, and inflammation compared with those receiving fecal samples from healthy individuals.⁷ These studies provided evidence that CRC-associated dysbiotic microbiota can promote colorectal carcinogenesis.

Studies have shown a higher prevalence of colonic mucosa-associated *E coli* in patients with CRC compared with

WHAT YOU NEED TO KNOW

BACKGROUND AND CONTEXT

Colibactin-producing *Escherichia coli* (CoPEC) have been associated with development of colorectal cancer (CRC).

NEW FINDINGS

CoPEC induce autophagy in intestinal epithelial cells, which promotes DNA damage repair. Inhibiting autophagy increased the inflammatory and carcinogenic effects of CoPEC in susceptible mice.

LIMITATIONS

This study was performed in mice and cell lines, and with a small number of human tissues. More studies of the effects of CoPEC in humans are needed.


IMPACT

CoPEC induce autophagy in intestinal epithelial cells. Strategies to modulate autophagy might be developed for treatment of CRC in patients with CoPEC colonization.

control individuals.² Particularly, *E coli* strains harboring the polyketide synthase (*pks*) pathogenicity island, which encodes the genotoxin colibactin, have attracted growing research interest. Colibactin-producing *E coli* (CoPEC) have been identified in the colonic mucosa of approximately 55.3% of patients with CRC vs 19.3% of patients with diverticulosis.⁸ CoPEC have been shown to induce DNA double-strand breaks (DSBs), chromosomal instability, and cell cycle arrest.^{9,10} CoPEC induce senescence of infected cells accompanied by secretion of inflammatory mediators and growth factors, thus promoting proliferation of adjacent uninfected cells.¹¹ Importantly, CoPEC are able to promote colon tumorigenesis in CRC mouse models, including *Apc*^{Min/+} mice,¹² AOM-treated *il10*^{-/-} mice,¹³ AOM/DSS-treated mice¹¹ and *Apc*^{Min/+}/*il10*^{-/-} mice.¹⁴ CoPEC might therefore promote colorectal carcinogenesis by genomic instability, intestinal cell senescence and inflammation.

Autophagy is a lysosome-dependent degradative process that targets intracellular components, such as damaged organelles, misfolded proteins, toxic aggregates, and intracellular pathogens, into double-membraned vesicles known as autophagosomes, which fuse with lysosomes to form autolysosomes, where the cargos are degraded. Autophagy is considered a major survival mechanism that confers stress tolerance, limits damage, and sustains cellular viability under adverse conditions.¹⁵ Autophagy deficiency causes

Abbreviations used in this paper: AOM, azoxymethane; *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔIEC}, *Apc*^{Min/+} mice deficient for *Atg16l1* specifically in intestinal epithelial cells; CoPEC, colibactin-producing *Escherichia coli*; CRC, colorectal cancer; DSB, double-strand break; DSS, dextran sodium sulfate; IECs, intestinal epithelial cells; IL, interleukin; mRNA, messenger RNA; PBS, phosphate-buffered saline; *pks*, polyketide synthase; qRT-PCR, quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA.

 Most current article

© 2020 by the AGA Institute. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

0016-5085

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.12.026>

oxidative stress and genomic instability and has contributed to the etiopathogenesis of many diseases, including cancers and infectious diseases.¹⁵ In tumorigenesis, autophagy has a complex and dual role. Indeed, some studies have highlighted its antitumor role of protecting cells from conditions contributing to transformation and carcinogenesis, such as oxidative stress, DNA damage, genetic instability, and inflammation. However, other studies have described a protumor role of autophagy because of its ability to protect cancer cells from metabolic stress and hypoxia in the tumor microenvironment.¹⁶

Recently, several studies have shown a link between autophagy and CRC. An increased level of LC3-II, the form associated with the autophagosomes, was observed in colorectal tumors compared with normal tissues in patients with CRC.¹⁷ A positive correlation between LC3 protein expression and tumor aggressiveness was also reported.¹⁷ Increased expression of the autophagy-related protein ATG10 in CRC was associated with tumor invasion and metastasis.¹⁸ Furthermore, the 5-year survival rate of patients bearing tumors without ATG10 expression was significantly higher than that of patients with ATG10-expressing tumors.¹⁸ Nevertheless, patients with CRC with higher expression of the autophagic proteins BECLIN 1, LC3B, and BCL-xL, both in the center of the tumor and adjacent noncancerous mucosa, compared with those with lower expression, have a better overall survival rate.¹⁹ So far, the role of autophagy in CRC is complex and remains poorly understood.

Here, we investigated the implication of autophagy in host defense against the carcinogenic effects of CoPEC strains and in CRC development induced by the latter.

Materials and Methods

Information on bacterial strains, CoPEC colonization in samples from patients with CRC, cell culture, infection and invasion assay, small interfering RNA (siRNA) transfection, protein extraction and Western blot, total RNA extraction, complementary DNA synthesis, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay, senescence-associated β -galactosidase staining, immunofluorescent microscopy, histologic examination, and immunohistochemical staining appears in the [Supplementary Materials](#).

Bacterial Strains and Culture

The clinical *E coli* strains isolated from patients with CRC^{8,20}; the K12 C600 strain; the nonpathogenic *E coli* MG1655 strain; the commensal *E coli* HS strain; the clinical 11G5 strain; and its isogenic mutant 11G5 Δ *clbQ*, depleted for the *clbQ* gene in the *pks* island and unable to produce colibactin,²¹ were grown at 37°C in Luria-Bertani medium overnight.

Animal Model and Infection of Mice

Apc^{Min/+} mice deficient for *Atg16l1* specifically in intestinal epithelial cells (IECs) (*Apc*^{Min/+}/*Atg16l1* ^{Δ IEC}) and their littermate controls (*Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{fllox/fllox}, hereafter termed *Apc*^{Min/+}) were generated by using C57BL/6J-*Apc*^{Min/+} mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and *Atg16l1* ^{Δ IEC} or

Atg16l1^{fllox/fllox} mice.²² Mice were infected or not with the 11G5 strain or the mutant 11G5 Δ *clbQ*, as previously described,¹² and killed on day 65 after infection. Colonic tumor number and tumor volume ($[\text{width}^2 \times \text{length}]/2$) were determined with a dissecting microscope. The colons were then swiss-rolled and fixed in buffered 10% formalin and embedded in paraffin. Nontumoral mucosa was frozen at -80°C for protein and RNA extraction.

Ethical Statement

Animal protocols were in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Université Clermont Auvergne and were approved by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#11254).

Samples from patients with CRC came from the MiPaCor (Microbiote et Pathologies ColoRectales) collection (ethical approval for human study no. DC-2017-2972). Patients underwent surgery for resectable CRC in the Digestive and Hepatobiliary Surgery Department of the University Hospital of Clermont-Ferrand. All patients were adult volunteers and signed informed consent before they were included in the study. The exclusion criteria included clinically suspected hereditary CRC based on the revised Bethesda criteria,²³ neoadjuvant chemotherapy, history of previous colonic resection, emergency surgery, and use of antibiotics within 4 weeks before surgery. Macroscopically normal mucosa samples adjacent to the tumor (10 cm from the tumor) were collected as previously described.^{12,24}

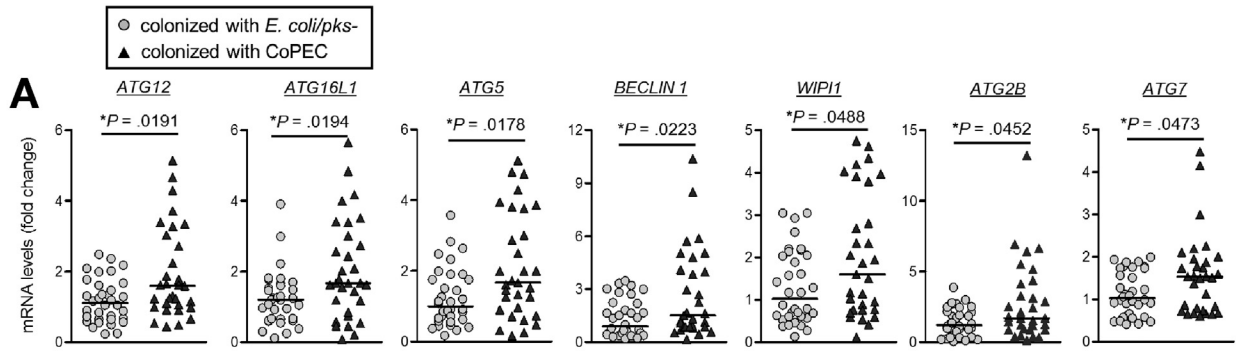
Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm standard error of the mean or median. Statistical analyses between 2 or several groups were performed with the Student *t* test (Mann-Whitney if not parametric) or analysis of variance (ANOVA) followed by a posttest Bonferroni correction (Kruskal-Wallis if not parametric), respectively, with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). A *P* value less than .05 was considered statistically significant.

Results

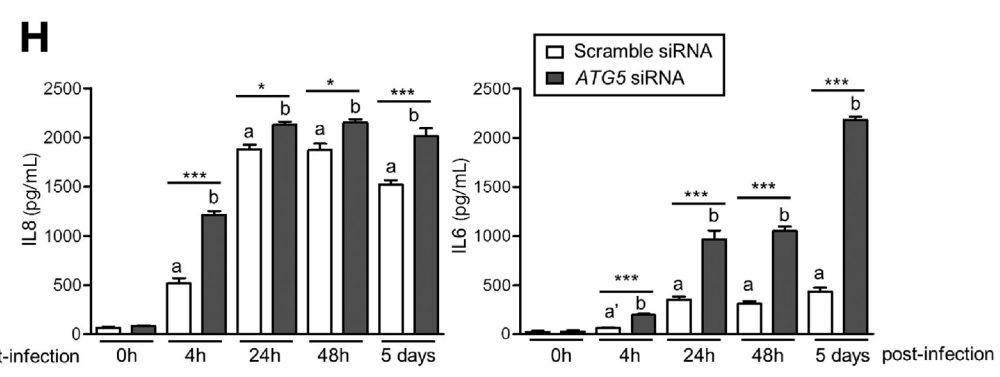
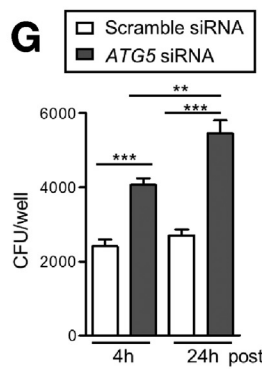
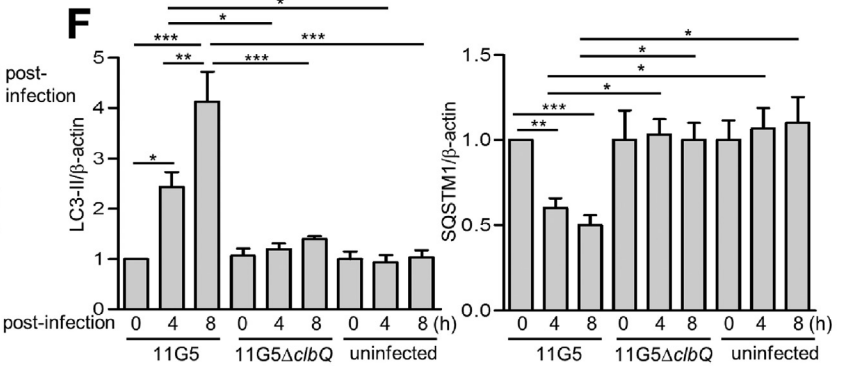
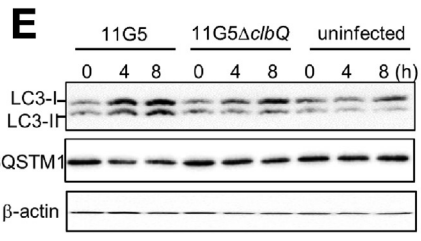
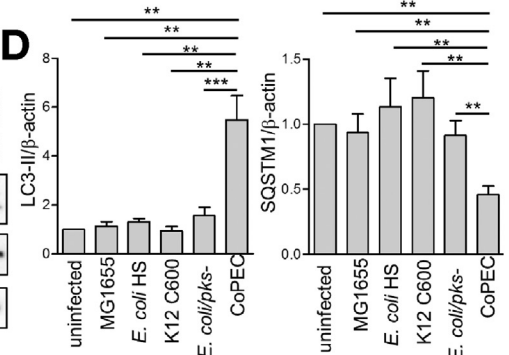
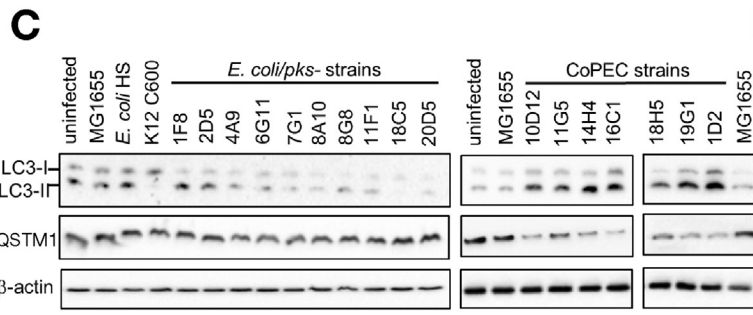
Colonization of Nontumoral Colonic Mucosa From Patients With Colorectal Cancer With Colibactin-Producing *Escherichia coli* Is Associated With High Messenger RNA Expression Levels of Autophagy-Related Genes

To investigate the potential link between autophagy and CoPEC colonization, we analyzed messenger RNA (mRNA) levels of different autophagy genes by qRT-PCR in the normal colonic mucosa from patients with sporadic CRC colonized with CoPEC or with *E coli* strains that do not carry the *pks* island, designated as *E coli/pks*⁻ (Figures 1A and Supplementary Figure 1). A significant increase in mRNA expression levels of several autophagy-related genes was observed in the mucosa colonized with CoPEC compared with those colonized with *E coli/pks*⁻ (Figure 1A). The proportion of patients with high mRNA levels of autophagy-related genes (>median) was increased in



B

	<i>E. coli/pks-</i>		CoPEC		P value
	< Median	> Median	< Median	> Median	
ATG16L1	64.71%	35.29%	32.26%	67.74%	< .0001 ***
ATG5	61.76%	38.24%	35.48%	64.52%	.0002 ***
ATG7	61.76%	38.24%	38.71%	61.29%	.0011 **
ATG2B	55.88%	44.12%	38.71%	61.29%	.0155 *
MAP1LC3B	58.82%	41.18%	41.94%	58.06%	.0157 *
ATG13	58.82%	41.18%	41.94%	58.06%	.0157 *
ATG12	55.88%	44.12%	41.94%	58.06%	.0465 *



BASIC AND
 TRANSLATIONAL AT

the group with CoPEC colonization compared with the *E coli/pks-* group (Figure 1B). These data suggest that CoPEC colonization in the CRC mucosa is associated with autophagy activation.

Colibactin-producing *Escherichia coli* Infection Induces Autophagy in Human Colon Cancer Cells, and This Requires the *pks* Island

To support the data with patient samples, human CRC HCT-116 cells were infected with the clinical CoPEC 11G5 strain, or its mutant 11G5 Δ *clbQ* unable to produce colibactin,²¹ or the transcomplemented 11G5 strain, and levels of mRNAs encoding proteins involved in autophagy were assessed. Supplementary Figure 2 shows that infection with 11G5 or the transcomplemented 11G5 strain increased mRNA levels of several genes implicated in autophagy process compared with 11G5 Δ *clbQ* infection.

We next investigated whether autophagy is activated in HCT-116 cells after infection with different clinical CoPEC strains^{8,20} by analyzing the levels of LC3-I (cytosolic form) and LC3-II (autophagosome-associated form) by Western blot. Infection with CoPEC strains resulted in increased LC3-II level, indicating autophagy activation, compared with the uninfected condition or infection with the nonpathogenic *E coli* K12 C600 or MG1655 strains, or with the commensal *E coli* HS strain, or with the clinical *E coli/pks-* strains (Figure 1C and D). Induction of a degradative autophagy in CoPEC-infected HCT-116 cells was confirmed by the concomitant decrease in SQSTM1 (also called p62), a receptor protein degraded by functional autophagy (Figure 1C and D). These were not observed with *E coli/pks-* infection (Figure 1C and D), suggesting that autophagy is specifically activated upon CoPEC infection.

To confirm the implication of the *pks* island in autophagy activation, HCT-116 cells were infected with the 11G5 strain or its mutant 11G5 Δ *clbQ*. As expected, 11G5 infection led to autophagy activation, as evidenced by increased LC3-II level and SQSTM1 degradation. This was not observed after 11G5 Δ *clbQ* infection (Figure 1E and F). Infection with the transcomplemented 11G5 strain resulted in similar results

as obtained for 11G5 infection (data not shown). Furthermore, the increase in LC3-II level induced by 11G5 infection was also observed in cells treated with the inhibitor of autophagy flux bafilomycin A1, indicating that 11G5 infection induces autophagy rather than blocks autophagy flux (Supplementary Figure 3).

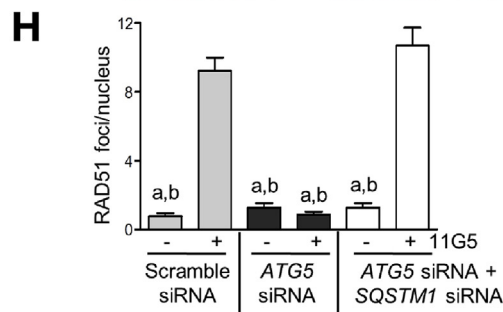
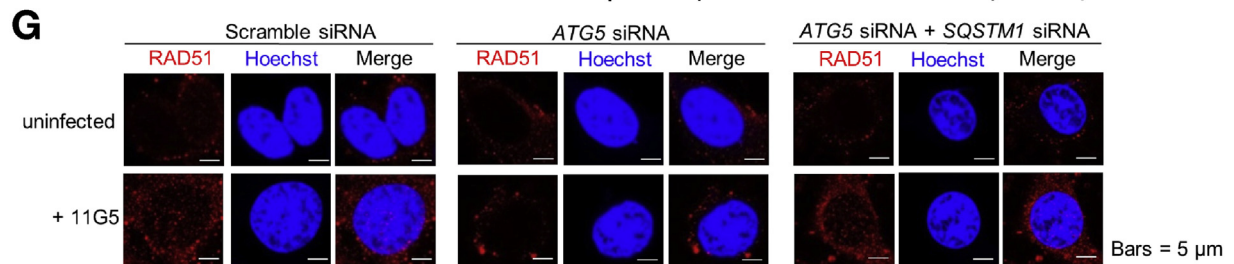
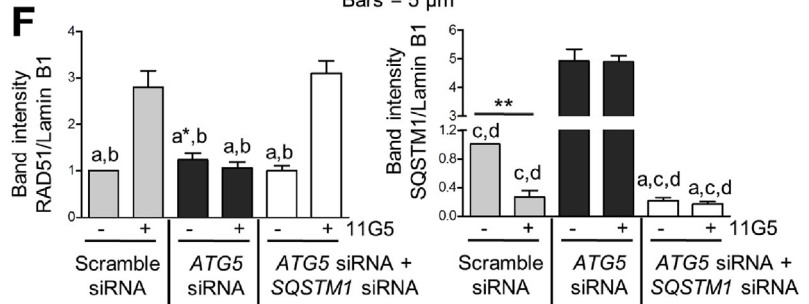
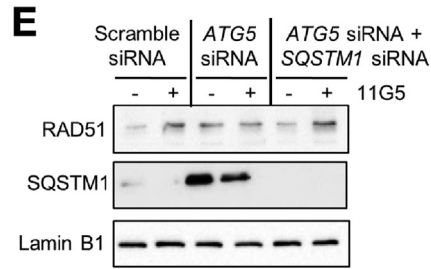
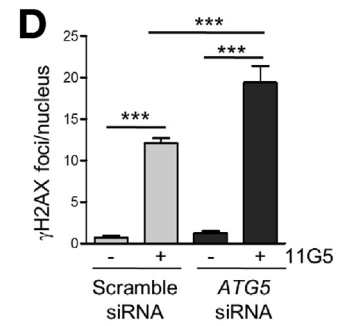
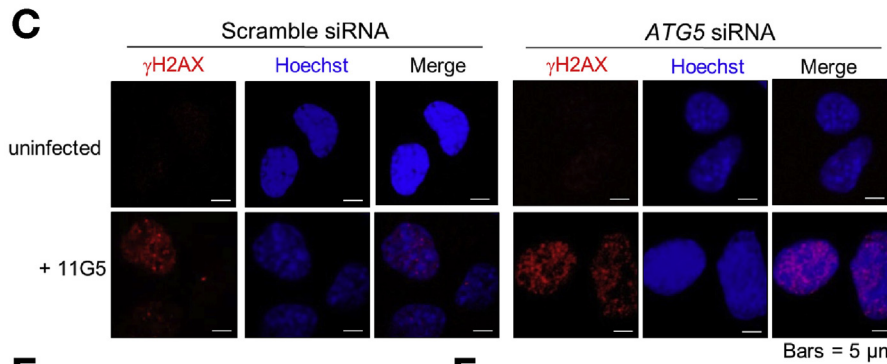
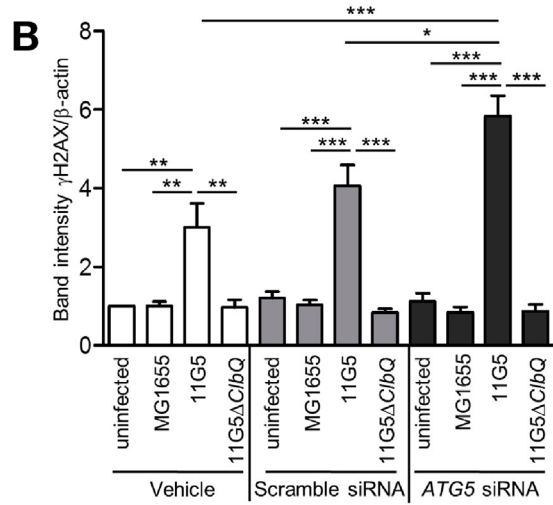
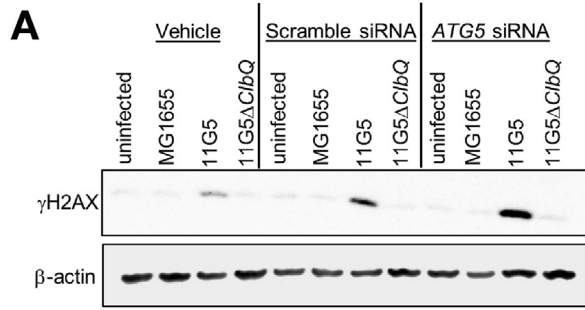
Autophagy Is Necessary to Eliminate Intracellular 11G5 Bacteria and Inhibit 11G5-Induced Inflammation

Because autophagy is a key process used to eliminate intracellular bacteria, we sought to check intracellular 11G5 number and proinflammatory cytokine production in autophagy-defective cells. We inhibited autophagy by transfecting HCT-116 cells with *ATG5*-specific siRNA, which markedly reduced *ATG5* protein expression compared with scramble siRNA (Supplementary Figure 4). An increase in intracellular 11G5 number was observed in *ATG5* siRNA-transfected compared with scramble siRNA-transfected cells (Figure 1G). Secreted interleukin (IL) 6 and IL8 levels were increased after 11G5 infection in scramble siRNA-transfected cells, and this increase was more pronounced in *ATG5* siRNA-transfected cells (Figure 1H). Similarly, *ATG16L1* siRNA-transfected cells exhibited increases in intracellular 11G5 number and secreted IL6 and IL8 levels compared with scramble siRNA-transfected cells (Supplementary Figure 5). These data indicate that *ATG5*- and *ATG16L1*-dependent autophagy is necessary to eliminate intracellular 11G5 bacteria and to inhibit 11G5-induced inflammation.

Autophagy Is Necessary for DNA Damage Repair After Infection With Colibactin-Producing *Escherichia coli*

In cells transfected with vehicle or scramble siRNA, the level of γ H2AX, a marker of DNA DSBs, was increased upon 11G5 infection compared with that in uninfected cells or in cells infected with the MG1655 strain or the 11G5 Δ *clbQ* mutant (Figure 2A and B). After 11G5 infection, γ H2AX level was markedly increased in *ATG5* siRNA-transfected vs

Figure 1. Colonization of the colonic mucosa from patients with CRC with CoPEC is associated with high autophagy-related gene expression. Autophagy is activated in human CRC cells upon CoPEC infection to eliminate intracellular bacteria and inhibit inflammation. (A) qRT-PCR analysis for mRNA expression levels of autophagy-related genes in the normal colonic mucosa from patients with CRC colonized with *E coli/pks-* (34 patients) or CoPEC (31 patients) strains. Each dot in the graphs shows the value for each patient, with a line at the median. Statistical analysis was performed with the nonparametric Mann-Whitney test. (B) For each autophagy-related gene, the median mRNA level for all patients (65 patients) was determined, and the proportions of patients with mRNA levels higher or lower than the median were determined. Statistical analysis was performed using the Fisher exact test. * $P < .05$, ** $P \leq .01$, *** $P \leq .001$. (C, D) HCT-116 cells were uninfected or infected with nonpathogenic *E coli* strains (MG1655, commensal HS or K12 C600) or with clinical *E coli/pks-* and CoPEC strains. (E, F) HCT-116 cells were uninfected or infected with 11G5 or the mutant 11G5 Δ *clbQ*. Representative Western blot analysis at 8 hours after infection (C) or at the indicated time points after infection (E). Quantification of band intensity from 3 independent blots, $n = 3$ /condition (D, F). (G, H) HCT-116 cells were transfected with a scramble siRNA or *ATG5* siRNA and then infected or not with 11G5. (G) Intracellular 11G5 number counted on Luria-Bertani agar plates ($n = 6$ /condition). (H) Secreted IL6 and IL8 amounts in cell culture supernatant quantified by enzyme-linked immunosorbent assay ($n = 6$ /condition). (D, F–H) Values represent mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni posttest. * $P < .05$, ** $P \leq .01$, *** $P \leq .001$; ^a $P < .05$, ^a $P \leq .001$ vs scramble siRNA + 11G5 at 0 hours; ^b $P \leq .001$ vs *ATG5* siRNA + 11G5 at 0 hours.



scramble siRNA-transfected cells (Figure 2A and B). These results were confirmed using HeLa cells in which the *ATG16L1* gene was depleted by the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 gene editing system (Supplementary Figure 6). Immunofluorescent labeling of γ H2AX consistently showed an accumulation of γ H2AX foci, indicating phosphorylation of histone H2AX at the site of DNA DSBs, after 11G5 infection in both *ATG5* siRNA-transfected and scramble siRNA-transfected HCT-116 cells. Furthermore, this accumulation was more important in *ATG5* siRNA-transfected cells (Figure 2C and D).

Next, we analyzed the recruitment of RAD51 into the nucleus, which plays a central role in DNA damage repair. After 11G5 infection, Western blot analysis showed increased RAD51 level in the nuclear fraction from scramble siRNA-transfected cells, indicating DNA repair activation, and this was inhibited in *ATG5* siRNA-transfected cells (Figure 2E and F). Because the accumulation of SQSTM1 in cells with defective autophagy was shown to inhibit the recruitment of DNA repair proteins, such as RAD51, to the sites of DNA DSBs, thereby impairing DNA damage repair,²⁵ we investigated whether the observed effects were SQSTM1 dependent. As expected, SQSTM1 was accumulated in the nuclear fraction from *ATG5* siRNA-transfected cells compared with scramble siRNA-transfected cells (Figure 2E and F). However, in cells transfected with both *ATG5* siRNA and *SQSTM1* siRNA, SQSTM1 level was markedly decreased (Figure 2E and F). Importantly, *SQSTM1* siRNA abolished the inhibition of RAD51 recruitment into the nucleus upon 11G5 infection in *ATG5* siRNA-transfected cells, because we observed RAD51 recruitment into the nucleus in cells transfected with both *ATG5* and *SQSTM1* siRNAs to a similar level as that in scramble siRNA-transfected cells (Figure 2E and F). This showed that SQSTM1 accumulation in autophagy-deficient cells is responsible for the inhibition of DNA damage repair. Immunofluorescent staining consistently showed an accumulation of RAD51 foci in the nucleus and at the nuclear periphery in scramble siRNA-transfected cells upon 11G5 infection, and this was blocked in *ATG5* siRNA-transfected cells (Figure 2G and H). However, inhibition of SQSTM1 expression in *ATG5* siRNA-transfected cells increased RAD51 foci number upon 11G5 infection to a level similar to what was observed in scramble siRNA-transfected cells (Figure 2G and H). Together, these results show that upon CoPEC infection, a functional autophagy is necessary to activate DNA damage repair, and this is dependent on SQSTM1.

Autophagy Deficiency Leads to Enhanced Colibactin-Producing *Escherichia coli*-Induced Cellular Senescence, Promoting Proliferation of Uninfected Cells

To investigate the role of autophagy in CoPEC-induced cellular senescence, we infected HCT-116 cells pre-transfected with scramble or *ATG5* siRNA with 11G5 or 11G5 Δ *clbQ* and detected senescent cells by β -galactosidase staining at pH 6. 11G5 infection increased the number of β -galactosidase-positive cells in scramble siRNA-transfected cells, and this number was markedly increased in *ATG5* siRNA-transfected cells (Supplementary Figure 7A and B). These results were confirmed using *ATG16L1*-knockout HeLa cells (Supplementary Figure 8).

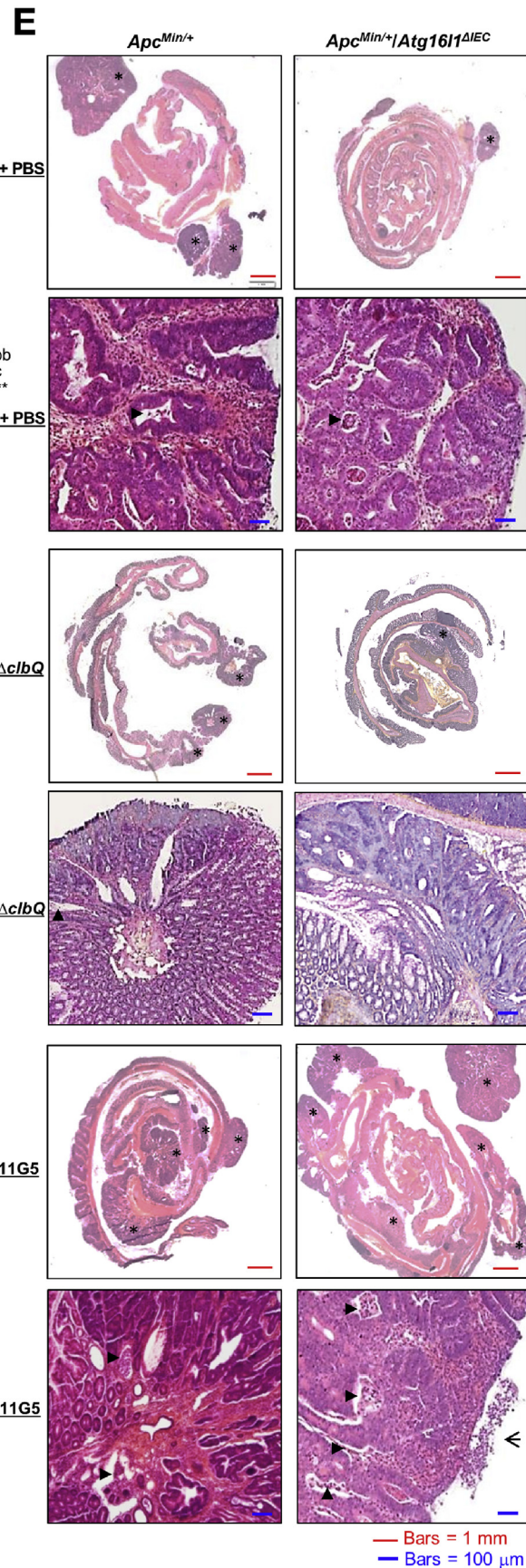
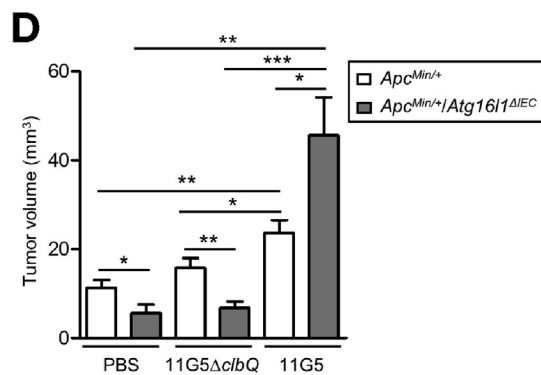
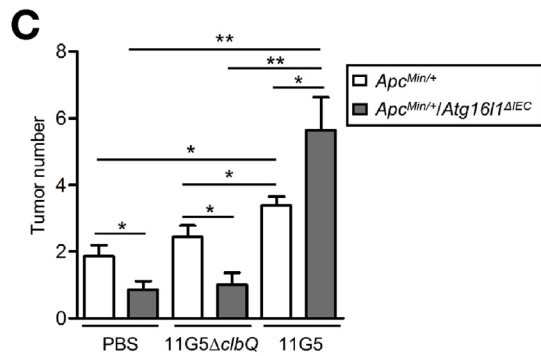
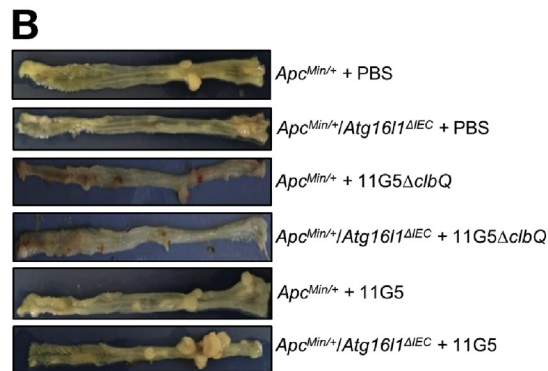
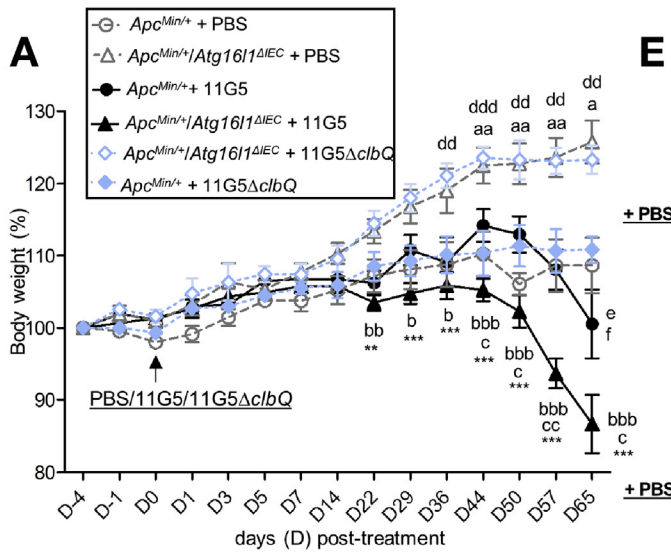
Conditioned media derived from cells transfected with *ATG5* siRNA and infected with 11G5 enhanced HCT-116 cell proliferation compared with that derived from cells transfected with scramble siRNA and infected with 11G5 (Supplementary Figure 7C). A similar result was not observed for infection with the MG1655 strain or the 11G5 Δ *clbQ* mutant. These data show that autophagy deficiency enhances CoPEC-induced cellular senescence, which consequently increases proliferation of uninfected cells.

Together, these data showed that autophagy is activated in IECs upon CoPEC infection, and this is required to limit the inflammatory and carcinogenic effects of the bacteria.

Intestinal Epithelial Cell-Specific Autophagy Deficiency Increases 11G5-Induced Colorectal Carcinogenesis in *Apc*^{Min/+} Mice

To study the role of autophagy in host susceptibility to CoPEC infection, *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1* ^{Δ IEC} and *Apc*^{Min/+} mice were orally administered phosphate-buffered saline (PBS) (uninfected) or 11G5 or 11G5 Δ *clbQ* bacteria. Under uninfected or 11G5 Δ *clbQ*-infected conditions, *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1* ^{Δ IEC} mice exhibited increased body weight compared with *Apc*^{Min/+} mice from day 44 or day 36 after administration, respectively (Figure 3A). Uninfected *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1* ^{Δ IEC} mice exhibited increased body weight, and this could be explained by the fact that these mice were in good health and showed no pale feet or rectal prolapse. This was consistent with the study by Lévy et al, who reported that *Apc*^{Min/+} mice, after tamoxifen-mediated *Atg7* inactivation specifically in IECs, showed no signs of illness and that the occurrence of intestinal neoplasia was very rare.²⁶ In contrast, after 11G5 infection, a decrease in body weight in

Figure 2. Autophagy is necessary to limit 11G5-induced DNA damage. HCT-116 cells were transfected with a scramble or *ATG5* siRNA, or with both *ATG5* siRNA and *SQSTM1* siRNA, and then infected or not with the MG1655 strain, the 11G5 strain, or the mutant 11G5 Δ *clbQ*. (A) Representative Western blot analysis at day 5 after infection using total cell lysate and (B) quantification of band intensity from 3 independent blots. (C) Immunofluorescent labeling of γ H2AX (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). (D) Quantification of γ H2AX foci number/nucleus determined from 20 cells/condition and 2 independent experiments. (E) Representative Western blot analysis using nuclear fraction lysate and (F) quantification of band intensity from 3 independent blots. (G) Immunofluorescent labeling of RAD51 (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). (H) Quantification of RAD51 foci number/nucleus determined from 20 cells/condition and 2 independent experiments. Values represent mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni posttest. **P* < .05, ***P* \leq .01, ****P* \leq .001; ^a*P* \leq .001, ^{a*}*P* \leq .01 vs scramble siRNA + 11G5; ^b*P* \leq .001 vs *ATG5* siRNA + *SQSTM1* siRNA+11G5; ^c*P* \leq .001 vs *ATG5* siRNA uninfected; ^d*P* \leq .001 vs *ATG5* siRNA + 11G5.



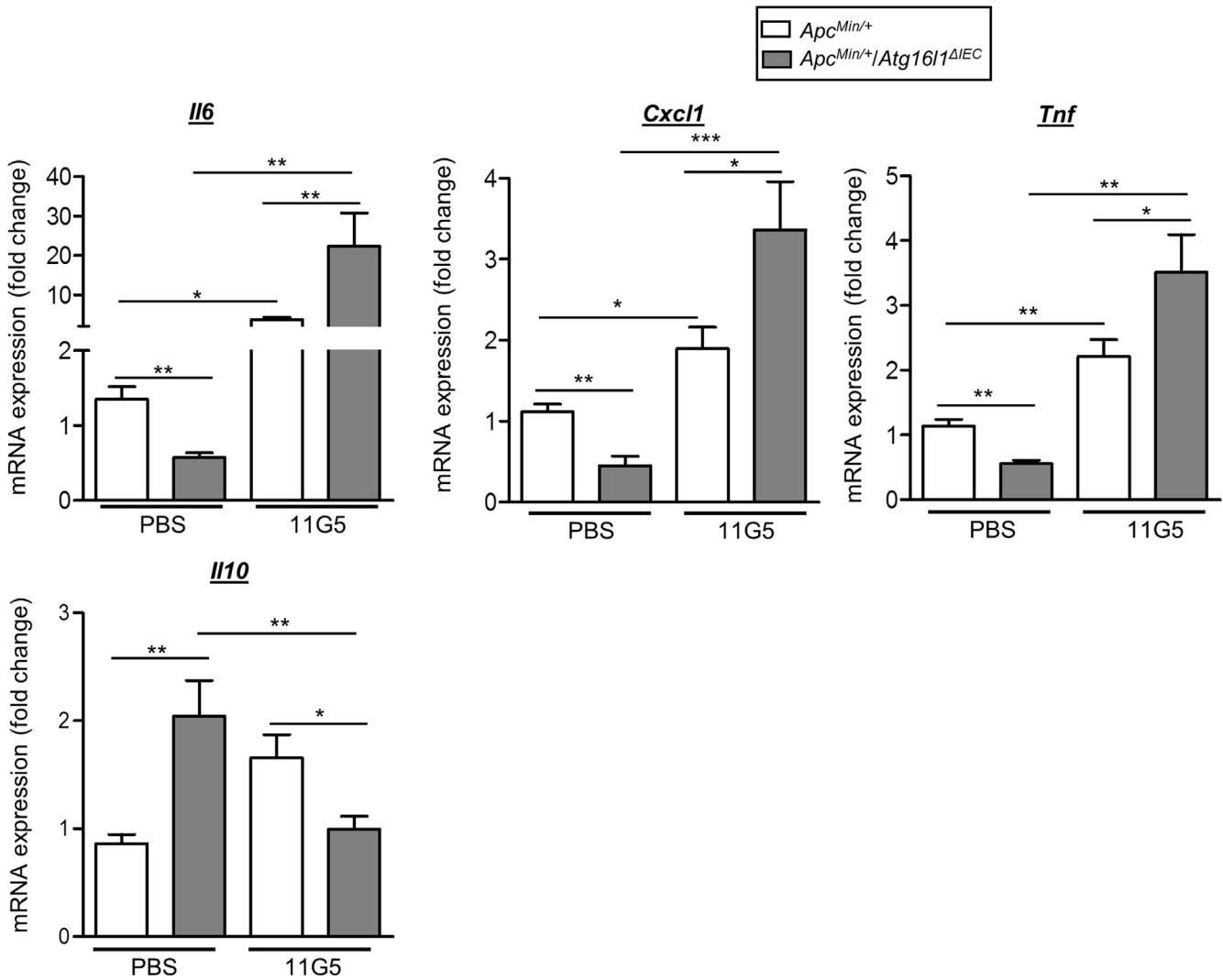


Figure 4. Autophagy is necessary to limit 11G5-induced colonic inflammation in *Apc^{Min/+}* mice. *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* and *Apc^{Min/+}* mice were orally administered PBS or 10^9 colony-forming units of 11G5 bacteria and killed on day 65 after administration. *Il6*, *Tnf*, *Cxcl1*, and *Il10* mRNA levels in the colonic mucosa were quantified by qRT-PCR. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (uninfected mice: n = 7/group; *Apc^{Min/+}* + 11G5: n = 13; *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + 11G5: n = 11) and are representatives of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni posttest. **P* < .05, ***P* \leq .01, ****P* \leq .001.

Figure 3. IEC-specific autophagy deficiency in *Apc^{Min/+}* mice leads to increased 11G5-induced colorectal carcinogenesis. *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* and *Apc^{Min/+}* mice were treated with streptomycin for 3 days (day -4) and then received water (day -1) for 24 hours. Mice were orally administered (day 0) PBS or with 10^9 colony-forming units of 11G5 or 11G5 Δ *clbQ* bacteria and were killed at day 65 after administration. (A) The body weight of each mouse at different time points was determined and is presented as percentage of body weight of the same mouse at day -4, defined as 100%. Data are presented as mean \pm standard error of the mean. ^a*P* < .05, ^{aa}*P* \leq .01: *Apc^{Min/+}* + PBS vs *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + PBS. ^b*P* < .05; ^{bb}*P* \leq .01; ^{bbb}*P* < .001: *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + PBS vs *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + 11G5. ^c*P* < .05, ^{cc}*P* < .01: *Apc^{Min/+}* + 11G5 vs *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + 11G5. ^{dd}*P* \leq .01; ^{ddd}*P* \leq .001: *Apc^{Min/+}* + 11G5 Δ *clbQ* vs *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + 11G5 Δ *clbQ*. ^e*P* < .05: *Apc^{Min/+}* + PBS vs *Apc^{Min/+}* + 11G5. ^f*P* \leq .01: *Apc^{Min/+}* + 11G5 Δ *clbQ* vs *Apc^{Min/+}* + 11G5. **P* < .05, ***P* \leq .01, ****P* \leq .001: *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + 11G5 Δ *clbQ* vs *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + 11G5. (B) Representative photos of the colons taken on the day mice were killed. (C) The number of colorectal tumors was determined by using a dissecting microscope. (D) Tumor volume (volume of all tumors/number of tumors of each mouse). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (uninfected mice: n = 7/group; 11G5 Δ *clbQ*-infected mice: n = 8/group; *Apc^{Min/+}* + 11G5: n = 13; *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* + 11G5: n = 11) and are representatives of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni posttest. **P* < .05, ***P* \leq .01, ****P* \leq .001. (E) Histologic examination of H&E-stained mouse colonic sections. Stars show colorectal tumor, arrowheads show infiltration of immune cells within tumors, and arrows show superficial ulcerations in the tumor.

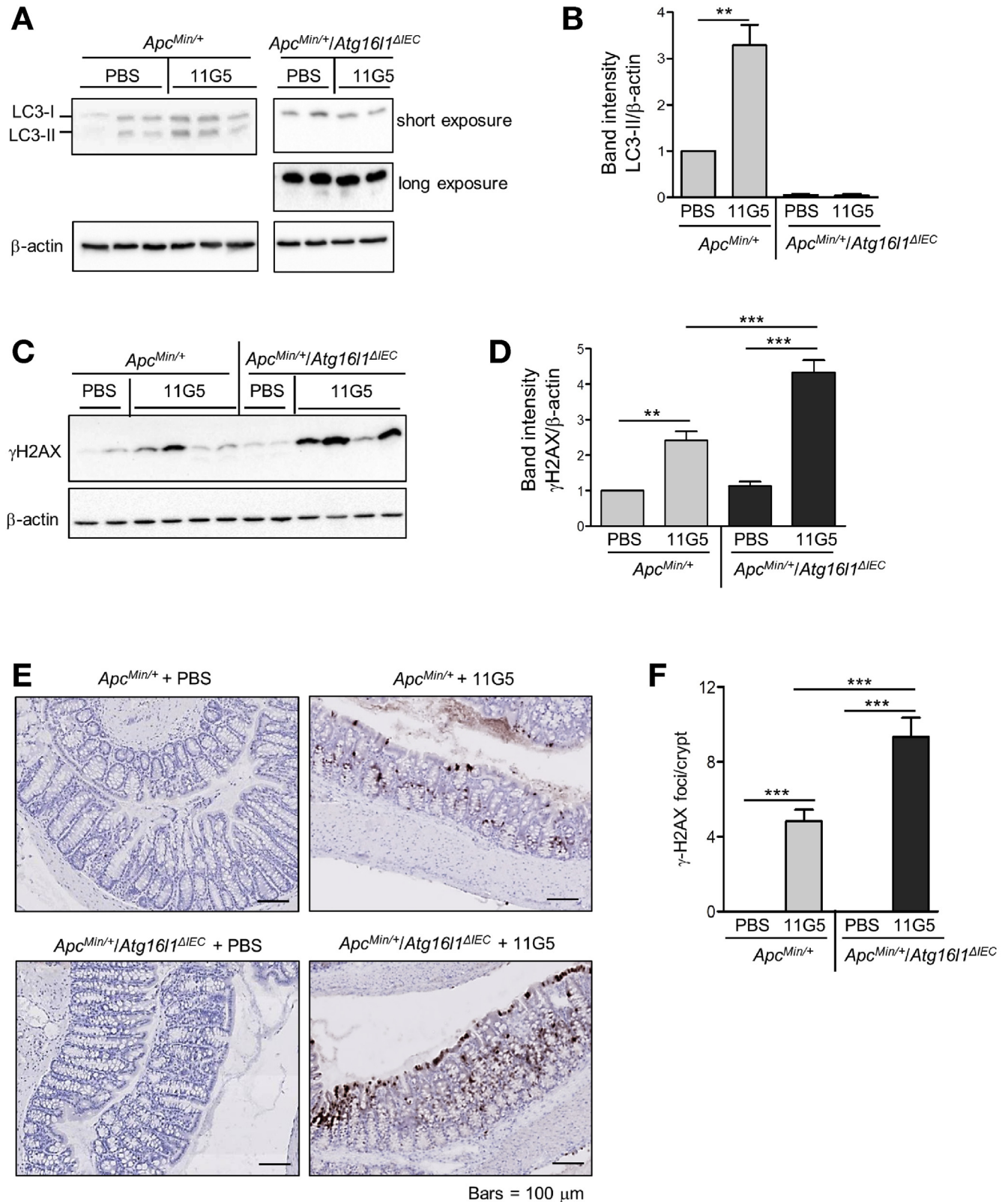


Figure 5. Autophagy is necessary to limit 11G5-induced DNA damage in the colon in *Apc^{Min/+}* mice. *Apc^{Min/+}/Atg161^{ΔIEC}* and *Apc^{Min/+}* mice were orally administered PBS or 10^9 colony-forming units of 11G5 bacteria and were killed on day 65 after administration. Representative Western blot analysis of (A) LC3 and (C) γ H2AX levels in the nontumoral colonic mucosa. (B, D) Quantification of band intensity from $n = 7$ /group for uninfected mice and $n = 10$ /group for infected mice. (E) γ H2AX immunohistochemical staining of nontumoral colonic mucosa and (F) quantification of γ H2AX foci number/crypt determined from 20 crypts/mouse and 6 mice/group. Values represent mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni posttest. ** $P \leq .01$, *** $P \leq .001$.

Apc^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs *Apc*^{Min/+} mice was observed from day 44 after administration (Figure 3A). Furthermore, 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice exhibited decreased body weight compared with uninfected or 11G5Δ*clbQ*-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice from day 22 after administration (Figure 3A).

Shortening of the colon, a macroscopic parameter of tumor development, was more pronounced ($P = .036$) in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice (colon length, 6.8 ± 0.28 cm; $n = 11$) compared with *Apc*^{Min/+} mice (colon length, 7.58 ± 0.59 cm; $n = 13$) after 11G5 infection. The representative photos of the colons of each group are shown in Figure 3B.

Under uninfected or 11G5Δ*clbQ*-infected conditions, *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice had a lower number of tumors and decreased tumor volume compared with *Apc*^{Min/+} mice (Figure 3C and D). The decrease in tumorigenesis in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice, which was consistent with the study by Lévy et al,²⁶ also explained the increase in their body weight compared with *Apc*^{Min/+} mice. However, after 11G5 infection, increases in the number and volume of tumors were observed in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs *Apc*^{Min/+} mice (Figure 3C and D). Histologic examination consistently showed larger adenocarcinomas with increased inflammatory cell infiltration in the tumors in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs *Apc*^{Min/+} mice after 11G5 infection (Figure 3E). Under uninfected or 11G5Δ*clbQ*-infected conditions, this trend was reversed because, compared with *Apc*^{Min/+} mice, *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice exhibited less and smaller adenocarcinomas (Figure 3E). Importantly, IEC-specific autophagy deficiency was associated with increased histologic score of colonic adenocarcinomas in 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice (16.22 ± 1.623 for *Apc*^{Min/+} + 11G5 vs 25.43 ± 2.785 for *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} + 11G5; $P = .0093$, unpaired t test).

Autophagy Is Necessary to Limit 11G5-Induced Colonic Inflammation in *Apc*^{Min/+} Mice

We next investigated the mechanisms by which autophagy limits 11G5-induced colorectal carcinogenesis in *Apc*^{Min/+} mice. In the uninfected condition, mRNA expression levels of the proinflammatory cytokines *Il6* and *Tnf* and the chemokine *Cxcl1* were significantly decreased, whereas the expression level of the anti-inflammatory cytokine *Il10* was increased, in the nontumoral colonic mucosa of *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs *Apc*^{Min/+} mice (Figure 4). In contrast, after 11G5 infection, *Il6*, *Tnf*, and *Cxcl1* mRNA levels were increased, whereas *Il10* mRNA level was decreased, in the mucosa of *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs *Apc*^{Min/+} mice (Figure 4). These results suggest that autophagy limits 11G5-induced colonic inflammation in *Apc*^{Min/+} mice.

Autophagy Is Necessary to Limit 11G5-Induced Colonic DNA Damage in *Apc*^{Min/+} Mice

Next, we verified whether functional autophagy is required to inhibit 11G5-induced DNA damage in *Apc*^{Min/+} mice. First, we examined autophagy activation in the colonic mucosa of mice by Western blot. In uninfected *Apc*^{Min/+} mice, a low level of LC3-II showing basal autophagy activity was observed (Figure 5A and B). This level was increased in

the colonic mucosa of 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice (Figure 5A and B), confirming the data on activation of autophagy in IECs upon infection with the CoPEC strains. As expected, we did not detect LC3-II in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice under both the uninfected and 11G5-infected conditions (Figure 5A and B).

Western blot analysis showed that γ H2AX levels in the nontumoral colonic mucosa of uninfected groups were not different (Figure 5C and D). The 11G5 infection increased γ H2AX levels in the colonic mucosa of *Apc*^{Min/+} mice, confirming the data obtained by using human IECs. Importantly, the γ H2AX levels were increased in 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice (Figure 5C and D). These results were confirmed by immunohistochemical staining for γ H2AX of the colonic sections. Figure 5E and F shows an increase in the number of γ H2AX foci per crypt in the colonic mucosa of *Apc*^{Min/+} mice upon 11G5 infection, and this number was higher in 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice. These results suggest that autophagy is necessary to limit 11G5-induced DNA damage in the colon of *Apc*^{Min/+} mice.

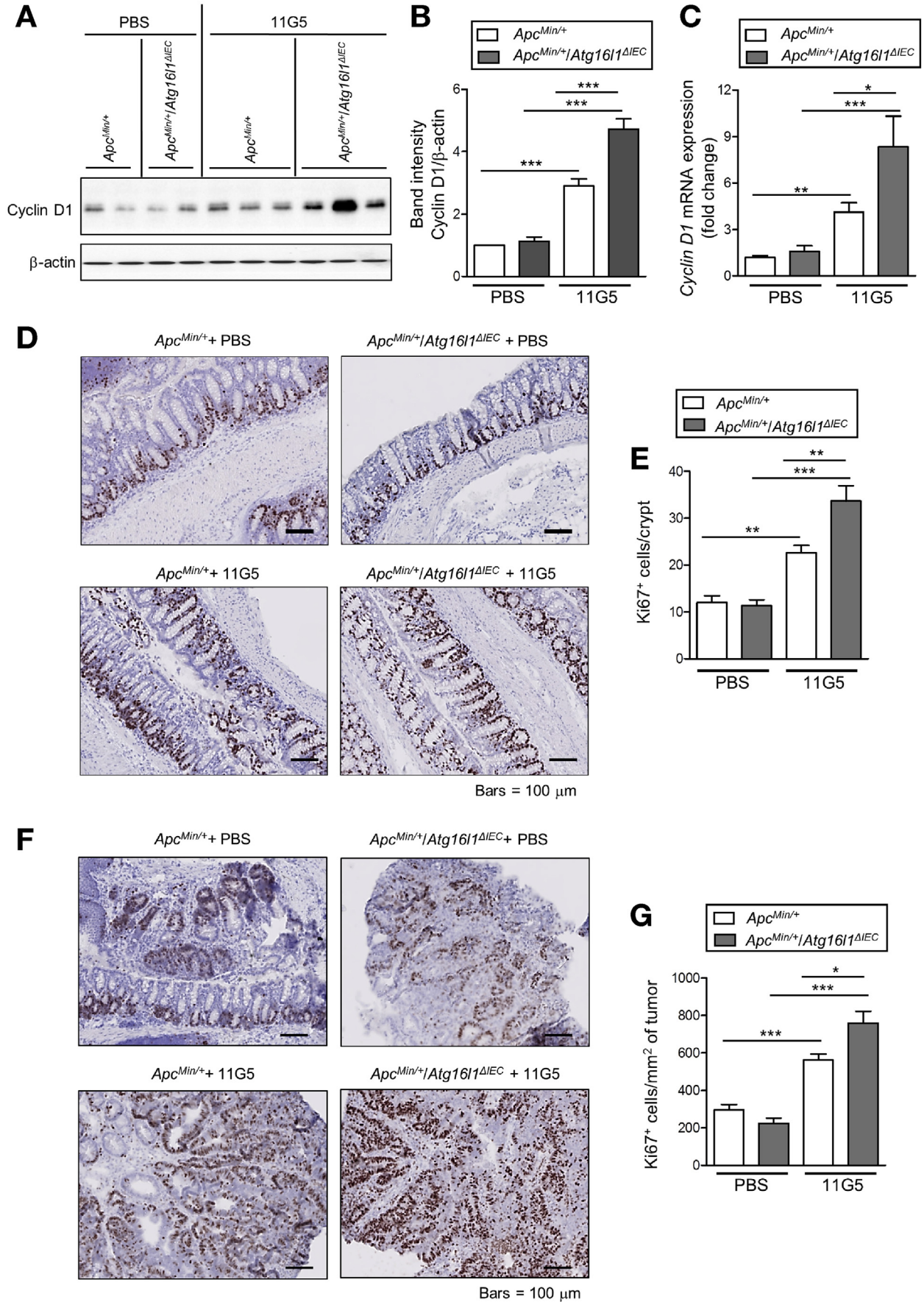
Intestinal Epithelial Cell-Specific Autophagy Deficiency Leads to Increased Colonic Cell Proliferation in 11G5-Infected *Apc*^{Min/+} Mice

Finally, the effect of IEC-specific autophagy deficiency on cell proliferation was examined by analyzing the level of cyclin D1, which is involved in regulating cell cycle progression. Western blot and qRT-PCR analyses consistently showed that cyclin D1 expression in colonic mucosa was not different between uninfected *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} and *Apc*^{Min/+} mice (Figure 6A–C). The 11G5 infection increased cyclin D1 mRNA and protein expression in the colonic mucosa of *Apc*^{Min/+} mice (Figure 6A–C). Importantly, IEC-specific autophagy deficiency led to increased cyclin D1 expression in 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice (Figure 6A–C). These results were confirmed by immunohistochemical staining of Ki67, a marker of cell proliferation. The number of Ki67-positive cells in the nontumoral colonic mucosa was not different between uninfected mice, but after 11G5 infection, this was increased in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} vs *Apc*^{Min/+} mice (Figure 6D and E). Importantly, the proliferation of tumor cells was also increased in *Apc*^{Min/+}/*Atg1611*^{ΔIEC} mice compared with *Apc*^{Min/+} mice after 11G5 infection, although this was not different between uninfected groups (Figure 6F and G).

Together, these results show that autophagy deficiency leads to increased proliferation of colonic epithelial cells during 11G5 infection in *Apc*^{Min/+} mice, which could contribute to the development of tumorigenesis.

Discussion

Autophagy has a complex and context-dependent role in carcinogenesis. Autophagy serves as a surveillance mechanism that protects normal cells from the transformation to malignancy by removing damaged organelles and



aggregated proteins and by reducing damaged mitochondria, reactive oxygen species, and DNA damage.¹⁶ In addition, autophagy has a crucial role in both innate and adaptive immune responses, thus preventing the establishment and proliferation of malignant cells.²⁷ In contrast, increasing evidence shows that autophagy can promote tumorigenesis by supporting the survival and growth of tumor cells under metabolic and hypoxic stress in the tumor microenvironment, inhibiting cellular death, and increasing anticancer drug resistance.¹⁶ However, a role for autophagy in host responses to infection with CoPEC strains, which have been emerged as important players in CRC,² has not yet been investigated.

Here, we showed for the first time, to our knowledge, the link between autophagy and CoPEC colonization in CRC. Indeed, the colonization of the colonic mucosa from CRC patients with CoPEC is associated with higher expression of several autophagy-associated genes. Modification of autophagy-associated protein expression in CRC has been reported, although the results from different reports are inconsistent. Increased expression of autophagy-associated proteins has been shown in most patients with CRC and CRC cell lines.^{17–19,28–30} However, down-regulation of the autophagic protein BECLIN 1 and impairment of autophagy was reported in a small population of patients with CRC.³¹ Together with these studies, our data indicate the importance of autophagy in CRC, particularly CRC with abnormal CoPEC colonization.

We also showed that in HCT-116 colon carcinoma cells, CoPEC infection activates autophagy, and this is dependent on the *pks* island. Previous studies have shown autophagy activation in IECs upon infection with adherent-invasive *E coli* strains, which abnormally colonize the ileal mucosa of patients with Crohn's disease.^{32–35} The link between autophagy and CRC-associated bacteria is only beginning to be explored. To date, only 2 studies are available on the link between autophagy and *F nucleatum*, a CRC-associated bacterium that increases tumor development in *Apc*^{Min/+} mice,³⁶ and its abundance is correlated with a decreased survival rate in patients with CRC.³⁷ *F nucleatum* infection was reported to activate autophagy, inducing the resistance of culture cells to chemotherapeutic drugs.³⁸ In contrast, Tang et al³⁹ showed that *F nucleatum* blocks the autophagic process at the autophagosome–lysosome fusion stage, and this promotes the proinflammatory response in the human Caco-2 CRC cell line. Our study, therefore, contributes to a better understanding of the role of autophagy in the infectious etiology of CRC, an area that is still little explored.

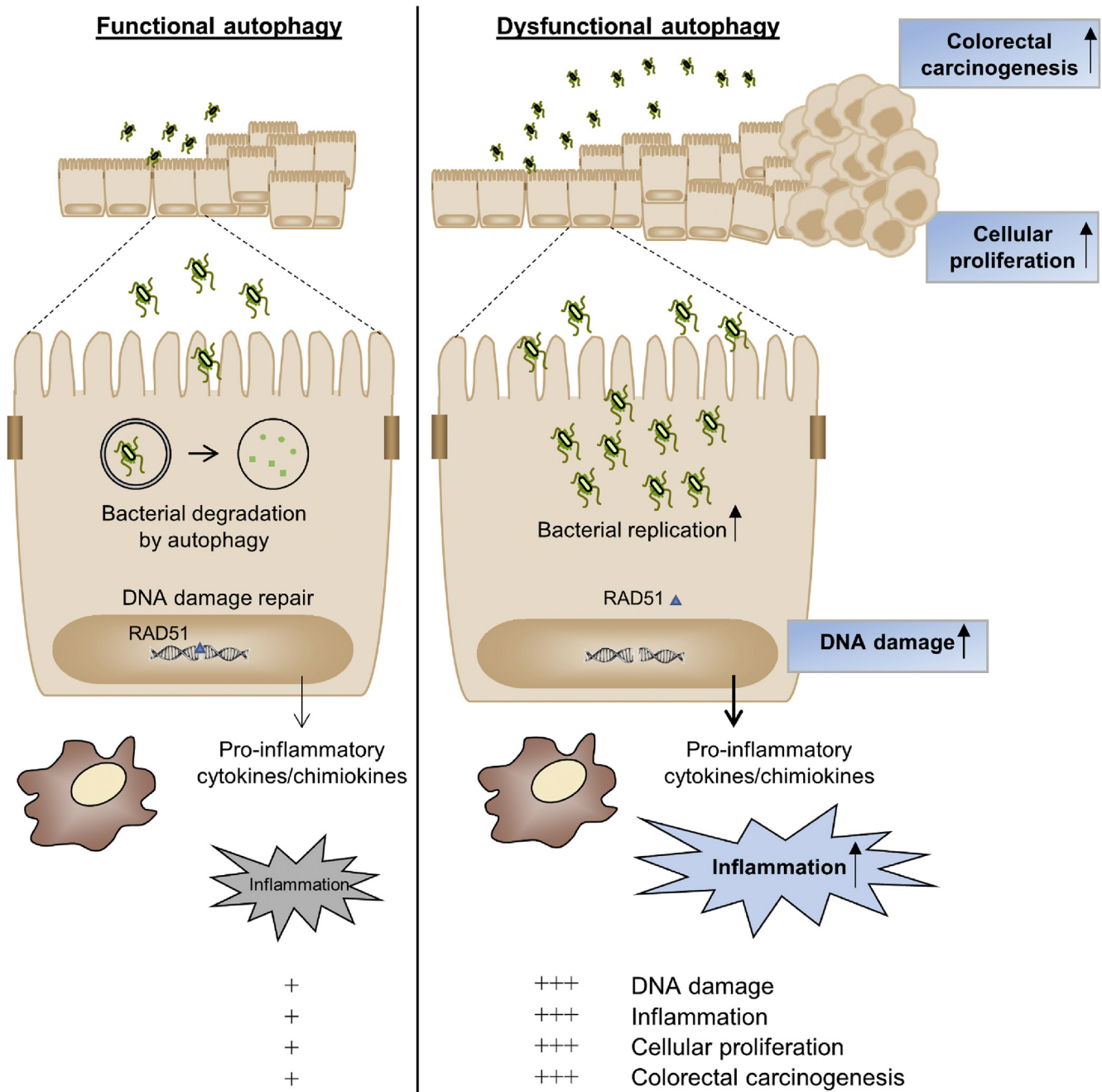
The *pks* island encodes enzymes necessary for the synthesis of colibactin, which has been shown to induce DNA DSBs in mammalian cell lines¹⁰ and in mouse enterocytes.⁹ Here, we report that autophagy is required for DNA damage repair upon infection with the CoPEC 11G5 strain and occurs through recruitment of the DNA repair protein RAD51 into the nucleus. Our data are consistent with a previous study showing that DNA repair proteins, including RAD51, cannot be recruited to the sites of DNA DSBs in autophagy-deficient cells, leading to impaired DNA damage repair.²⁵ Furthermore, we showed that the autophagy-mediated DNA damage repair is dependent on SQSTM1, a receptor that targets ubiquitinated cargos for degradation via both autophagy and proteasomal pathways.⁴⁰ The role of SQSTM1 and autophagy in the DNA damage response has been shown. DNA damage and oxidative stress resulting from autophagy defects are suppressed by inhibition of SQSTM1 accumulation.⁴¹ SQSTM1 accumulated in autophagy-defective cells directly binds to and inhibits nuclear RNF168, an E3 ligase essential for histone H2A ubiquitination and DNA damage responses.²⁵ This, consequently, inhibits the recruitment of DNA repair proteins, including RAD51, to the sites of DNA DSBs, impairing DNA damage repair.²⁵

It has been shown that increased DNA damage induced by CoPEC causes cell cycle arrest and senescence of infected cells.¹¹ The latter then acquires a senescence-associated secretory phenotype, which is accompanied by the secretion of growth factors that can stimulate uninfected cell proliferation.¹¹ Here, we show that autophagy inhibition in HCT-116 cells leads to increased 11G5-induced senescence, which consequently promotes proliferation of uninfected cells. Furthermore, our group showed that CoPEC strains are able to adhere to and to invade IECs, although at a lower level compared with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E coli*,²¹ inducing a proinflammatory response.^{11,21} Here, we show that autophagy deficiency in IECs leads to increased 11G5 intracellular replication and enhanced proinflammatory cytokine secretion. Together, our data suggest that upon CoPEC infection, autophagy is activated in IECs, and this is important to inhibit the inflammatory and carcinogenic effects of CoPEC strains.

It has been shown that CoPEC induce tumorigenesis in mouse models of CRC.^{11–14} However, to our knowledge, to date, no data are available on the role of autophagy in CoPEC-induced colorectal carcinogenesis. To study this, we used *Apc*^{Min/+} mice with IEC-specific autophagy deficiency. *Apc*^{Min/+} mice are a relevant preclinical tumor model of CRC

Figure 6. IEC-specific autophagy deficiency leads to increased colonic cell proliferation in 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice. *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔIEC} and *Apc*^{Min/+} mice were orally administered PBS or 10⁹ colony-forming units of 11G5 bacteria and were killed on day 65 after administration. (A) Representative Western blot analysis of cyclin D1 level in nontumoral colonic mucosa and (B) quantification of band intensity from n = 7/group for uninfected mice and n = 10/group for 11G5-infected mice. (C) *Cyclin D1* mRNA level in the nontumoral colonic mucosa was quantified by qRT-PCR. Data are presented as mean ± standard error of the mean (uninfected mice: n = 7/group; *Apc*^{Min/+} + 11G5: n = 13; *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔIEC} + 11G5: n = 11) and are representatives of 2 independent experiments. (D) Ki67 immunohistochemical staining of colonic mucosa and (E) quantification of Ki67-positive cell number/crypt determined from 20 crypts/mouse and 6 mice/group. (F) Ki67 immunohistochemical staining of colonic tumors and (G) quantification of Ki67⁺ number/mm² of tumor determined from 6 mice/group. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni posttest. **P* < .05, ***P* ≤ .01, ****P* ≤ .001.

Host predisposed to CRC development



BASIC AND TRANSITIONAL AT

Figure 7. Proposed model for the role of autophagy in colorectal carcinogenesis associated with CoPEC colonization. In a host predisposed to CRC development, in response to abnormal colonization with CoPEC strains, autophagy is activated to protect colonic epithelium from DNA damage via activating the DNA damage repair, to reduce colonic inflammation and cell proliferation, thus limiting colorectal carcinogenesis. Autophagy dysfunction leads to promoted colorectal carcinogenesis, which is associated with increases in epithelial DNA damage, intestinal inflammation and colonic epithelial cell proliferation.

because mutations in the *APC* gene have been found in more than 80% of sporadic CRC.⁴ First, we showed autophagy activation in the colonic mucosa of *Apc^{Min/+}* mice upon 11G5 infection, which is consistent with the data from human biopsy samples and cultured IECs. Furthermore, our work shed light on the complex role of autophagy in colorectal carcinogenesis in *Apc^{Min/+}* mice. Indeed, without infection, the number and size of colorectal tumors were

decreased in *Apc^{Min/+}/Atg16l1^{ΔIEC}* vs *Apc^{Min/+}* mice. This was accompanied with decreased proinflammatory cytokine mRNA levels and increased anti-inflammatory cytokine mRNA levels in the normal colonic mucosa. These results are in agreement with the study by Lévy et al showing that conditional inactivation of *Atg7* in IECs prevents tumor development in *Apc^{Min/+}* mice via increasing antitumor inflammatory responses and affecting tumor cell

proliferation.²⁶ In contrast, after infection with 11G5, *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔIEC} mice exhibited increased colonic tumor number and size compared with *Apc*^{Min/+} mice. This can be explained by increased DNA damage, higher proinflammatory cytokine and chemokine production in normal colonic mucosa, and enhanced cellular proliferation in both normal mucosa and tumors observed for 11G5-infected *Apc*^{Min/+}/*Atg16l1*^{ΔIEC} vs 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice. Importantly, the effect of autophagy on inhibiting colorectal carcinogenesis was specific to infection with the colibactin-producing *E coli* strain, because the same effects were not observed for infection with the mutant 11G5Δ*clbQ* unable to produce colibactin.

In conclusion, our work explored a novel role of autophagy as a host defense mechanism against CoPEC colonization in CRC. In particular, we showed for the first time (1) the association between colonization of CoPEC in patients with CRC and increased mRNA expression levels of autophagy-related genes and (2) the molecular mechanism by which autophagy inhibits the protumoral effects of CoPEC and CoPEC-induced colorectal carcinogenesis in *Apc*^{Min/+} mice. Our work also highlighted the complex role of autophagy in colorectal carcinogenesis, because inhibition of autophagy in IECs suppresses colonic tumorigenesis in *Apc*^{Min/+} mice in normal conditions but promotes colorectal carcinogenesis under CoPEC-infection condition (Figure 7). This study helps us better understand the mechanism underlying the interaction between the host and CRC-associated CoPEC strains. In the future, this work could contribute to the development of a personalized therapeutic strategy based on autophagy modulation for patients with abnormal CoPEC colonization.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.12.026>.

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–E386.
2. Lucas C, Barnich N, Nguyen HTT. Microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18(6):1310.
3. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990;247(4940):322–324.
4. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience* 2015;9:520.
5. 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.
6. Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, et al. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio* 2013; 4(6):e00692-13.
7. 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.
8. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, et al. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One* 2013;8(2):e56964.
9. 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 U S A* 2010;107:11537–11542.
10. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006;313(5788):848–851.
11. Cournoux A, Dalmasso 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. 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.
13. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012;338(6103):120–123.
14. Tomkovich S, Yang Y, Winglee K, et al. Locoregional effects of microbiota in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2017;77:2620–2632.
15. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol* 2018; 20:521–527.
16. Singh SS, Vats S, Chia AY-Q, et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* 2018;37:1142–1158.
17. Zheng H, Zhang X, Wang X, et al. Autophagy enhances the aggressiveness of human colorectal cancer cells and their ability to adapt to apoptotic stimulus. *Cancer Biol Med* 2012;9:105–110.
18. Jo YK, Kim SC, Park IJ, et al. Increased expression of ATG10 in colorectal cancer is associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis. *PLoS One* 2012;7(12):e52705.
19. Yang M, Zhao H, Guo L, et al. Autophagy-based survival prognosis in human colorectal carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:7084–7103.
20. Raisch J, Buc E, Bonnet M, et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2014;20:6560–6572.
21. 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. *Lab Invest* 2015;95:296–307.
22. Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 2013;503(7475):272–276.
23. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261–268.
24. 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.
25. Wang Y, Zhang N, Zhang L, et al. Autophagy regulates chromatin ubiquitination in DNA damage response through elimination of SQSTM1/p62. *Mol Cell* 2016;63:34–48.
 26. Lévy J, Cacheux W, Bara MA, et al. Intestinal inhibition of *Atg7* prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nat Cell Biol* 2015;17:1062–1073.
 27. Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, et al. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* 2013;39:211–227.
 28. Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011;25:460–470.
 29. Li B-X, Li C-Y, Peng R-Q, et al. The expression of *beclin 1* is associated with favorable prognosis in stage IIIb colon cancers. *Autophagy* 2009;5:303–306.
 30. Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, et al. Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS* 2007;115:1344–1349.
 31. Chen Z, Li Y, Zhang C, et al. Downregulation of Beclin1 and impairment of autophagy in a small population of colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2013;58:2887–2894.
 32. Bretin A, Carrière J, Dalmasso G, et al. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 α -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy* 2016;12:770–783.
 33. Lapaquette P, Glasser A-L, Huett A, et al. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 2010;12:99–113.
 34. Nguyen HTT, Lapaquette P, Bringer M-A, et al. Autophagy and Crohn's disease. *J Innate Immun* 2013;5:434–443.
 35. Nguyen HTT, Dalmasso G, Müller S, et al. Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* 2014;146:508–519.
 36. Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013;14:207.
 37. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 2016;65:1973–1980.
 38. Yu T, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell* 2017;170:548–563.
 39. Tang B, Wang K, Jia Y, et al. *Fusobacterium nucleatum*-induced impairment of autophagic flux enhances the expression of proinflammatory cytokines via ROS in Caco-2 Cells. *PLoS One* 2016;11(11):e0165701.
 40. Cohen-Kaplan V, Ciechanover A, Livneh I. p62 at the crossroad of the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Oncotarget* 2016;7:83833–83834.
 41. Mathew R, Karp C, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009;137:1062–1075.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Received March 23, 2019. Accepted December 18, 2019.

Correspondence

Address correspondence to: Hang Nguyen, PhD, M2iSH, UMR 1071 Inserm, University of Clermont Auvergne, 28 Place Henri-Dunant, Clermont-Ferrand 63001, France. e-mail: hang.nguyen@uca.fr; fax: 33 4 73 17 83 71.

Acknowledgements

We would like to thank Professor Xavier Ramnik (Harvard Medical School, Boston, MA) for kindly providing us with clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated *ATG16L1*-knockout HeLa cells. We thank the platforms CLIC (Clermont-Ferrand Imagerie Confocale, Université Clermont Auvergne) for assistance with confocal microscopy and CICS (Centre Imagerie Cellulaire Santé, Université Clermont Auvergne) for assistance with tissue preparation. We also thank Christelle DAMON-SOUBEYRAND (Anipath histology platform, GReD, Université Clermont Auvergne) for her help with immunohistochemical staining.

Author contributions: Cécily Lucas performed the experiments and analyzed and interpreted data. Laurène Salesse, My Hanh Thi Hoang, Pierre Sauvanet, and Anaïs Larabi performed the experiments. Catherine Godfraind performed histologic examination. Johan Gagnière and Denis Pezet were involved in patient inclusion and human sample collection. Philip Rosenstiel supported materials and supervised the manuscript. Guillaume Dalmasso, Mathilde Bonnet, Nicolas Barnich, and Richard Bonnet critically revised the manuscript for important intellectual content. Hang Thi Thu Nguyen developed experimental concepts and designs, performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale; UMR1071), INRAE (Institut national de recherche en agriculture, alimentation et environnement; USC 2018), the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program "Investissements d'Avenir" (16-IDEX-0001 CAP 20-25) (to Hang Thi Thu Nguyen), the European Union FP7 People Marie Curie International Incoming Fellowship (to Hang Thi Thu Nguyen) and the DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) ExC Precision Medicine in Chronic Inflammation and the CRC1182 project C2 (to Philip Rosenstiel).

