



HAL
open science

Évaluation des facteurs de virulence associés aux Escherichia coli producteurs de colibactine dans le cancer colorectal.

Héloïse Chat

► **To cite this version:**

Héloïse Chat. Évaluation des facteurs de virulence associés aux Escherichia coli producteurs de colibactine dans le cancer colorectal.. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0104 . tel-04506276

HAL Id: tel-04506276

<https://theses.hal.science/tel-04506276>

Submitted on 15 Mar 2024

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

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

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

Thèse

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

Spécialité : Microbiologie
Soutenue le 1^{er} décembre 2023 par

Héloïse CHAT

**Évaluation des facteurs de virulence associés aux
Escherichia coli producteurs de colibactine
dans le cancer colorectal**

Rapporteurs :

- Dr. Muriel MERCIER-BONIN, Directrice de recherche INRAE, Toxalim UMR INRAE 1331, Université de Toulouse, Toulouse
- Dr. Benoît CHASSAING, Directeur de recherche, Institut Cochin, INSERM U1016, Université Paris Cité, Paris

Président :

- Pr. Frédéric DELBAC, Professeur des universités, LMGE, CNRS UMR6023, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Examineurs :

- Dr. Amel METTOUCHI, Chargée de recherche, Toxines Bactériennes, Institut Pasteur, Paris
- Dr. Lucie ETIENNE-MESMIN, Maître de conférences des universités, MEDIS, INRAE UMR454, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Directeur de thèse :

- Dr. Julien DELMAS, Maître de conférences des universités – praticien hospitalier, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

~Remerciements~

Je tiens à remercier très sincèrement Madame la Docteure **Muriel Mercier-Bonin**, ainsi que Monsieur le Docteur **Benoit Chassaing** d'avoir accepté de corriger mon travail de thèse. Je les remercie pour le temps consacré à la lecture et à la critique de ce manuscrit.

Je souhaite remercier la Docteure **Lucie Etienne-Mesmin** et la Docteure **Amel Mettouchi**, ainsi que le Professeur **Frédéric Delbac**, d'avoir accepté de participer au jury de thèse. Je suis reconnaissante, par avance, des avis critiques qu'ils pourront apporter à ce travail de thèse en vue de son amélioration. Mes remerciements vont également au Docteur **Emmanuel Lemichez** et son équipe de l'Institut Pasteur pour leur participation et leurs conseils lors de la rédaction de mon premier article de thèse.

Je tiens à remercier également mon directeur de laboratoire le Professeur **Nicolas Barnich** pour avoir initié mon intérêt pour la microbiologie dès mes premières années dans les études supérieures et pour m'avoir permis de le faire grandir jusqu'à mes dernières années d'études. Merci, à lui, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de partir présenter mes travaux de recherche dans plusieurs congrès.

Merci au Docteur **Guillaume Dalmasso**, pour tout le temps et les précieux conseils apportés lors de la rédaction de ce manuscrit de thèse. Tu as toujours été disponible et bienveillant, (et en plus un peu drôle je l'avoue aussi) pour tout cela, merci !

Pour terminer, merci à mon chef, le Docteur **Julien Delmas** (ou comme il préfère que je l'appelle « maître Ju' ») pour ses enseignements, son écoute, sa patience. Au cours de ces quatre ans à tes côtés, j'ai évolué et j'ai beaucoup appris, en grande partie grâce à toi. Merci de m'avoir fait confiance à la sortie du Master, pour poursuivre avec toi en thèse. J'ai énormément apprécié nos échanges et la vision du « microbiologiste » que tu as su m'apporter tout au long de cette période. Merci pour les sessions musicales lors de nos sacrifices et pour m'avoir fait découvrir les Escape games. J'ai toujours admiré l'aisance que tu avais à l'oral devant les étudiants, j'espère un jour pouvoir enseigner et transmettre aussi bien que tu l'as fait avec moi. Merci aussi, pour ta patience et ta bonne humeur quand la mienne avait disparu lors des derniers moments de rédaction un peu difficiles. Merci, pour le temps et les conseils apportés pour faire évoluer mon manuscrit et mon travail de recherche. Je me souviendrais sans nul doute de ton humour et de tes blagues toujours au plus haut niveau, que ce soit lors de nos réunions au bureau ou pendant les enseignements. J'en profite, pour remercier l'équipe pédagogique des enseignements microbio : **Guillaume**, **Eugénie** (une bien belle rencontre) et merci surtout à **Frédéric Robin** de m'avoir fait confiance pour enseigner aux étudiants de Licence. Je n'oublierais pas non plus

tes blagues (toujours presque de qualité ...). Merci à **Aurélien** pour le travail et l'aide que tu as fournis pour toutes les analyses bio-informatiques, ainsi que pour les temps conviviaux que tu as organisé. Pour terminer avec les remerciements adressés « aux anciens du R3 », merci à **Richard Bonnet** et **Racha Beyrouthy** pour leur aide et leurs précieux conseils dans l'analyse des données de séquençage.

Bien sûr un paragraphe devait être dédié à mes techniciens préférés : **Laurent Guillouard** et **Virginie Bonnin** ... Mais qu'aurait été ma thèse sans ces deux être magnifiques ?! D'un point de vue technique, j'aurais peut-être pu me débrouiller au bout d'un moment (et encore), mais d'un point de vue humain, cela aurait été bien différent. Dès mon arrivée en Master, vous m'avez pris sous votre aile. Merci, pour tout le temps et la patience que vous m'avez accordée.

Merci **Laurent**, pour nos longues discussions sous le PSM (rien que pour cela je ne regrette pas ces dizaines et dizaines de manips d'adhésions), merci pour ta bonne humeur quotidienne et tes blagues (pas toujours au top, là je l'avoue), pour nos matchs de tennis ou de badmintons, pour tes tartes meringuées (qui je l'avoue sont meilleurs que les miennes). Laurent, même si je ne serais plus là pour te le répéter tous les jours, ne l'oublie jamais : « tu es génial ! » - « Je sais », répondit Laurent. Je te souhaite pleins de belles choses et de continuer à t'épanouir dans ce que tu fais au laboratoire.

Virginie, mon petit double roux, « askip » (= à ce qu'il paraît, dans mon langage de jeune Vivi). Si jamais tu venais au M2ISH, je me retrouverais nez à nez avec une personne qui me ressemble autant ! Dès le début, ça a très vite matché : nos discussions un peu écolo sur les bords, nos étourderies en manips, notre passion culinaire mais aussi nos moments de fous rires et nos petites sessions musicales lors des sacrifices. J'ai été très heureuse de partager avec toi les premiers moments de vie avec ta petite Zoé, tu es une maman géniale et je te souhaite plein de bonheur dans ta petite famille avec Clément.

Merci encore également à tous les deux, pour toute l'aide technique et morale que vous m'avez apportée pendant ces quatre années. Vous allez me manquer !

Merci à **Gwen, Sandra, Patricia, Séverine, Micha et Lucas**, pour votre aide, votre humour (pas ouf quand c'était pour se moquer de ma taille), mais je vous aime quand même bien je crois ! Dans la même lignée, merci à **Fred** pour son humour et sa bonne humeur quotidienne. Je ne sais pas si je dois vraiment te remercier pour toutes les bêtises que tu m'as faites, mais elles ont eu le mérite de beaucoup me faire rire ! Mon eau de boisson ne sera plus jamais salée sans toi, cela va me manquer ...

Merci à **Magalie** pour toute l'aide que tu m'as apportée, toujours réactive et efficace, tu es en plus de cela une très belle personne que j'ai apprécié découvrir lors de mes dernières années de thèse. Je n'oublie pas non plus **Caroline** pour sa gentillesse et nos petites discussions écolos. Merci aussi à **Alex**, pour sa joie de vivre et son énergie débordante, tu es la petite fée du logis du M2ISH. Avec un débit de parole quasiment équivalent, je tiens à remercier aussi **Pedro** pour son aide technique que ce soit pour

de l'histologie ou réparer une étuve. Je vous charrie, mais j'ai toujours appris beaucoup de choses en discutant avec chacun d'entre vous. En parlant d'aide technique, je sors un peu du laboratoire, mais je tiens à remercier personnellement **Caroline Vachias**, pour tout l'aide qu'elle m'a apporté pour les nombreuses heures passées au microscope confocal du Gred. J'ai adoré nos longs moments de partage et de discussion, tu es vraiment une belle personne ne l'oublie jamais.

Merci à mes anciens enseignants de Microbiologie de l'IUT, **Delphine** et **Jérémy**, qui comme pour Nicolas, ont su faire naître ma passion pour la microbio à travers leurs cours. Merci à eux de toujours avoir été disponibles, pendant ma thèse, pour répondre à toutes mes questions. Merci aussi à **Mathilde**, une enseignante de qualité, mais aussi une personne toujours à l'écoute pour répondre à nos peurs et nos questions. J'ai toujours admiré, le nombre de missions que tu menais de front en même temps. Tes conseils m'ont été très précieux, merci ! Bien évidemment, je n'oublie pas l'immunologie avec **Elisabeth Billard** ou Zabou, merci pour toute l'énergie que tu as apporté dans la création de notre petite minute écolo avec Vivi, Caroline, Margot et Valérie. Merci aussi **Valérie**, pour m'avoir permis de faire les enseignements à tes côtés lors de ma 1^{ère} année de thèse, j'ai beaucoup apprécié ces moments partagés avec Vivi. Je tiens à te remercier également pour m'avoir fait découvrir le monde de la vulgarisation scientifique dans lequel j'ai aimé m'épanouir. Merci pour ta douceur et tes conseils tout au long de ma thèse. Merci aussi aux précieux conseils de **Marine** et **Hang** lors des réunions, l'étendu de votre savoir scientifique m'impressionnera toujours. Merci à **Adeline**, une bien belle personne, débordante d'énergie et de conseils. Que j'ai apprécié toutes nos discussions autour de nos problématiques de recherche et nos déboires avec le mucus ! Tu as toujours été l'une des premières à nous suivre dans l'organisation d'activité avec le labo, si tu le pouvais. Je n'oublierais pas ce dernier congrès à la SFM avec Nicolas et Julien, qui était exceptionnel ! Je te souhaite de toujours garder cette énergie qui te caractérise si bien.

Quand je suis arrivée au M2ISH, j'ai trouvé une petite équipe de post-docs qui ont su me prendre sous leurs ailes, et dont les conseils m'ont toujours été précieux : merci à **Romain, Sandrine, Hanh** et **Devon** ! Devon, j'aurais été perdu dans le monde du mucus sans ton aide, merci aussi pour toutes tes corrections de la langue anglaise. Je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille.

J'ai aussi une petite pensée pour les anciennes thésardes du M2ISH **Laurène, Claire, Clara**, merci pour tous vos conseils. Merci aussi à **Mélissa**, pour ta gentillesse, tu as toujours été disponible pour mes questions techniques. J'espère que tu t'éclates dans ton post-doc à Paris et te souhaite tout le meilleur.

Une petite pensée à toutes les personnes dernièrement arrivées au M2ISH et que je n'ai pas encore eu la chance de bien connaître, **Charlotte et Cyril**, vous allez voir l'ambiance de ce laboratoire est plutôt fort sympathique !

Alors si maintenant je m'attèle aux remerciements des étudiants du M2ISH, la liste va être longue car en quatre ans j'ai eu la chance d'en rencontrer des belles personnes qui sont passées par ce laboratoire. Alors malgré le fait que l'âme étudiante du M2ISH soit majoritairement féminine, je suis rentrée en Master avec une équipe surtout composée de mecs. Je n'oublierais pas la petite équipe avec qui j'ai passé des moments de stress autour de la préparation des oraux. Merci à **Mathilde, Micka, Théo** et **Jammy** (une petite partie te sera dédiée un peu plus bas) pour l'entraide et la bonne ambiance que vous avez fait régner. Une petite pensée aussi aux stagiaires qui sont passés au M2ISH : **Annaëlle, Mathilde** (si tu m'entends du Canada), **Elisa** (un amour cette personne), mais aussi la petite dream Team de 2021-2022 **Maxime, Hannah, Elia et Ingrid** (cœur sur vous pour l'ambiance exceptionnelle que vous avez mise) ! Merci également à **Léa Girondier**, pour tout l'aide que tu m'as apporté, j'espère que tu t'épanouiras dans la voie que tu auras choisie.

Mes remerciements se tournent ensuite vers les derniers étudiants (et ingénieurs) arrivés, les petits 2000 de ce labo, **Zoé** et **Florian**, mais aussi les jeunes doctorantes **Méline** et **Charline**, je vous souhaite de vous épanouir dans ce que vous faites, mais je sais que vous serez bien entourés pour cela ! **Fanny, Flavie** et **Coline**, j'ai énormément apprécié les moments passés à vos côtés. Fanny, ce n'est pas si grave si tes marqueurs ne sont pas rangés dans l'ordre (:p), tu gères toujours que ce soit à Rennes ou à NY et Flavie, notre athlète du labo, garde ta douceur et ta gentillesse. Coline, tu pourras maintenant me raconter toute ta vie, sans que je sois préoccupée par mon manuscrit, promis ! La thèse peut parfois vous sembler compliquée, mais au bout, c'est une expérience formidable !

Merci à **Angéline**, pour nos discussions et nos moments partagés autour d'une petite galette chez moi, ou à notre marché préféré d'Aubières. Je te souhaite d'être heureuse et de t'épanouir, tu es une personne formidable et pleine de qualité.

Leslie... Ah Leslie, par où commencer étant donné qu'en si peu de temps, je me suis beaucoup attaché à toi ! Je ne vais pas trop te faire de compliments non plus, pour préserver la taille de tes chevilles, mais qu'est-ce que j'ai apprécié tes petites blagues un peu piquantes (même si une par jour sur ma taille, c'était large suffisant) et ta bonne humeur quotidienne ! Toutes nos petites galères de thèses, nous aurons bien fait rires et j'espère que tu continueras à me raconter les tiennes même quand je serais parti. Tu vas me manquer ! PS : rien que pour cela, je te lègue mon chrono ET tout ce que tu peux trouver sur ma paillasse. La bise à Mathieu et vos deux petits amours !

Si je descends au 2^{ème} étage du M2ISH et que je pousse la porte de l'open space, comme chaque matin de ces dernières années, je sais que, tout de suite, je vais avoir le sourire car de biens belles personnes y sont présentes. Même si je l'avoue le niveau sonore a bien augmenté, depuis l'arrivée de **Chloé**. PS : Bon courage à vos tympanes, les filles si elle décide de faire une thèse... Bon, mes remerciements pour la personne exceptionnelle que tu es, sont un peu courts, mais vu que Margot m'avait

déjà tout écrit je n'ai plus rien à ajouter : « *Merci Chloé, pour tout ... Pour tout n'est pas assez fort pour te dire à quel point je t'aime et tiens à toi. Tes massages, tes blagues et ton smile remplissent chaque jour mon cœur de joie. Je suis tellement reconnaissante de tout ce que tu m'apportes que je suis prête à m'occuper de ta future manip souris (mais non, je ne crois pas désolé) ... »*

Merci aussi à « ton petit cœur », **Amandine**, j'ai été très heureuse de partager mes deux dernières années de thèse avec toi ! Derrière cette étudiante modèle que j'ai vu arrivée en Master, j'ai très vite découvert, une fille pleine d'humour et de joie de vivre (et de faire la fête) ! Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, mais je suis certaine que tu auras une bien belle carrière.

Alison, finalement notre histoire a commencé bien plus tôt, à l'IUT, et même si nos chemins ont pris pendant un moment des voies différentes, j'ai été très heureuse de passer ces années de thèse à tes côtés. Nos discussions sur nos galères de thèse m'ont fait beaucoup de bien et je te remercie pour tous ces moments. J'espère que ta poisse légendaire, s'en ira dès que la thèse sera terminée. Et même si, ma soutenance se tient 15 jours avant la tienne, jusqu'au bout je serais là pour te soutenir, si tu as besoin ! Force à toi !

Hélène, ou **Elène**, deux prénoms mais aussi deux facettes différentes de cette personne. Quand je t'ai vu t'asseoir à côté de moi, au début de ma 1^{ère} année, je me suis dit que tu avais l'air fort sympathique mais plutôt sage ... Ah, mais qu'est-ce que je me suis trompée sur toi à ce moment-là ! J'ai découvert, une personne magnifique et tellement drôle. Je crois que j'ai encore les larmes aux yeux en écrivant ces remerciements et me remémorant tous ces fous rires à la paillasse. Mais qu'est-ce que j'ai aimé ces moments partagés tard le soir, à parler avec toi, au labo ou au bureau. Bien évidemment, toutes mes plates excuses pour le nombre incalculable de fois où je t'ai volé des crayons et j'ai (un peu) empiété sur ton bureau. Ma thèse n'aura tout simplement pas été la même sans toi, à mes côtés, merci vraiment pour tout ! Je te souhaite tout le meilleur pour cette dernière période de ta thèse, mais je serais là pour t'épauler, comme tu l'as si bien fait avec moi !

Margot, comment une femme peut avoir autant de qualités en même temps, tu es une artiste mais aussi une scientifique d'exception et une amie d'une grande qualité. Tes massages, ta douceur et ton écoute quotidienne m'ont énormément aidée, surtout dans la période de rédaction. Merci pour tous les petits moments de qualité passés à tes côtés, et bien évidemment j'espère qu'il y en aura encore plein d'autre. J'ai l'impression que mes mots ne seront pas assez bien pour t'exprimer toute ma gratitude, alors je pense qu'un énième câlin serait bien mieux ! Mais que serait Margot et Héloïse, sans notre petite **Léa** ! Ce petit trio est né il y a à peine un an, j'ai appris à te découvrir et à m'attacher tellement vite à toi, Léa. Ta gentillesse est à l'égale, de celle de Margot, exceptionnelle ! Tu as toujours été là quand j'ai eu besoin de toi, et tu as toujours eu les mots pour me redonner le sourire quand c'était compliqué. Notre belle amitié, je compte bien la chérir et la conserver encore longtemps, peu importe la distance. Je vous souhaite à toutes les deux, de vous éclater dans votre dernière année de thèse !

Comme je l'expliquais plus haut, l'ambiance au M2ISH était assez exceptionnelle, je suis heureuse d'avoir eu la chance de réaliser ma thèse avec une telle atmosphère bienveillante, que ce soient les étudiants comme les titulaires. Merci à tous, pour m'avoir permis d'évoluer dans de telles conditions !

Mais en dehors de ce laboratoire, j'ai aussi énormément de personnes que je souhaiterais remercier et qui ont été un soutien moral lors de la rédaction de ce manuscrit de thèse. Merci à **tous mes amis**, d'avoir été présents et désolé si j'ai pu vous accorder moins de temps lors ces derniers mois. Des petits remerciements spécifiques à ma **Didou**, qui a eu le courage de relire ma thèse malgré ton impression de lire du chinois. Merci pour aussi pour être venu, me soutenir avec Aurélie, lors de l'expérience MT180S. J'en profite pour remercier aussi toutes les belles personnes que j'ai pu croiser lors de cette aventure formidable ! Merci aussi à **Mél** et **Kévin** pour m'avoir permis de travailler dans le beau bar de Thiers !

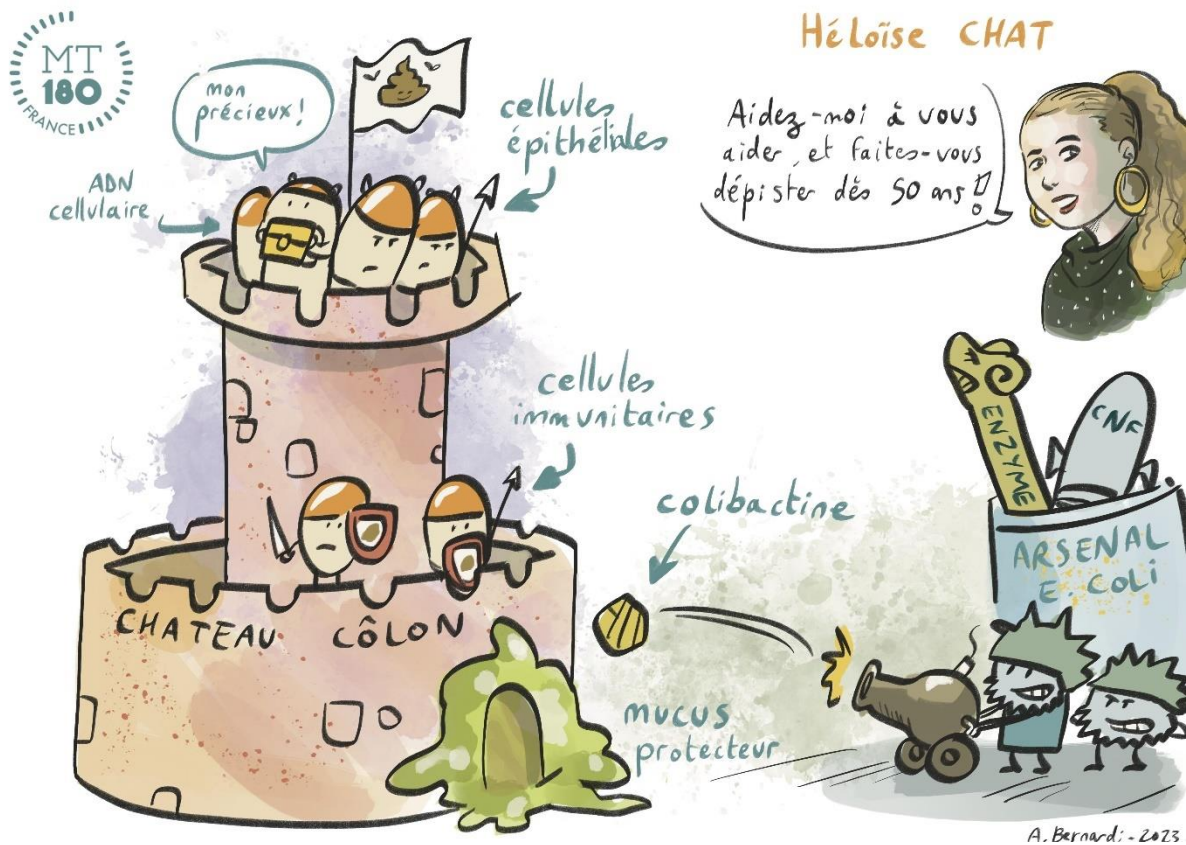
Merci à la Team IUT, **Amélie B.**, **Océ**, **Marjorie** et **Amélie D.** pour votre soutien au cours de ces années de thèse. Merci pour tout ce que vous m'apportez dans ma vie ! De biens belles rencontres, j'ai pu aussi en faire au cours de mon master, Flo, Coco, Erwann et Mel ! **Mélanie**, je vais être nostalgique de nos petits moments et nos cafés sur la passerelle du CBRV, mais bon j'aurais aussi beaucoup plus de temps pour profiter de toi ! Dépêche-toi, de terminer cette thèse ! En tant que marraine et amie, j'espère pouvoir arriver à être présente autant que tu l'as été pour moi, merci pour ton soutien quotidien. Mon **Jam'**, comment pourrais-je assez te remercier pour tout, ta joie de vivre, ton sourire, tes conseils. Nous avons commencé l'aventure M2ISH ensemble, et même si le destin en a décidé autrement et que tu es parti à Paris, ce n'est pas pour autant que notre amitié en a été ébranlée. Merci pour tous ces appels quotidiens le matin, en allant au laboratoire, pour m'avoir remonté le moral quand il était un peu bas et pour m'avoir écouté râler un nombre incalculable de fois sur ma thèse ! Maintenant, c'est à ton tour de rentrer en période de rédaction et c'est au mien d'être là pour toi et te soutenir ! Tu es formidable, ne l'oublie pas. **Marie**, nous deux, c'est depuis le lycée, et on ne sait pas lâcher depuis ! Coloc, amie, confidente tu as toujours eu une épaule ou une oreille disponible pour moi, peu importe l'heure tu as toujours été disponible ! -Même pour monter des meubles à 23h- Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi, merci pour tout le soutien que tu m'as apporté ! Je n'oublie pas tous ces petites attentions adorables pendant ma période de rédaction (le nombre incalculable de fois où tu m'a nourris, merci !). Merci aussi de m'avoir fait rencontrer le Team Imost et pour toutes ces petites soirées au top !

Enfin, je tiens à remercier ma famille, Maman, Papa, merci de m'avoir toujours soutenue dans mes études et merci d'avoir trouvé les mots pour me remonter le moral ! Les petites pauses dans ma petite maison de campagne à Mariol (beaucoup de petits parce que c'est mignon comme toujours

maman), m'auront fait beaucoup de bien. Merci à mon petit bro, pour ton soutien et nos longues discussions philosophiques sur la Science, merci surtout à toi de m'avoir offert ce livre de Giulia Enders, qui m'a fait découvrir ce monde passionnant de la microbiologie !

Et si, j'ai pu oublier quelque personne dans ces remerciements, je m'en excuse par avance et veuillez pardonner ma petite mémoire.

Merci à tous,



« Le monde est bien plus passionnant quand on ne voit pas seulement de lui ce qu'il daigne nous montrer, mais aussi ce qu'il nous cache » - Giulia Enders.

~

À mon petit frère et mes parents qui m'ont toujours soutenue.



HELOÏSE CHAT | DOCTOR IN MICROBIOLOGY

24.07.1997 | 26 years | Clermont-Ferrand (FRANCE)
+33632084126 | heloisechat@gmail.com

[Linkedin](#)



PROFESSIONAL SUMMARY

Highly motivated and adaptable with hands-on practice in microbiology sciences, I completed a 3-years PhD with specific focus on colibactin-producing *E. coli* in colorectal cancer. Fluent at spoken and written English. Optimistic person and sociable with excellent communication skills. **Looking for a post-doctoral placement in microbes-host interaction.**

EDUCATION

2020 - 2023 | PhD student in Microbiology | Université Clermont-Auvergne (UCA), France (63)

PhD school "Sciences de la Vie, de la Santé, Agronomie et Environnement" (ED SVSAE)

Defense scheduled for 1st december 2023

Supervisor: : Associate professor - Hospital praticien Julien DELMAS

Funding: Ministerial scholarship

2018-2020 | Biology's Master in Biology and Health option Nutrition | UCA, France (63)

Courses: Microbiology, Nutrition, Genetics and Epigenetics, Immunology, Cell signaling, Glycosylation.

2017-2018 | Bachelor's degree in Biology | UCA, France (63)

Courses: Microbiology, Nutrition, Genetic, Immunology, Cell signaling, Biology Cellular and Physiology

2015-2017 | Technical University's degree in applied Biology | UCA, France (63)

Courses: Applied Microbiology, Immunology, Cell signaling, Biology Cellular and Animal Physiology

2013-2015 | High school diploma in sciences | Lycée de Presles, France (03)

PLACEMENTS

2020 - 2023 | PhD student (3 years) and Master 2 (6 months) position in Microbiology and Health in microbes host-interactions | Clermont-Ferrand (FRANCE)

Subject: Evaluation of virulence factors from colibactin-producing *Escherichia coli* in the development of colorectal cancer

Host laboratory: UMR1071 Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2ISH) - Clermont-Ferrand- FRANCE

Supervisor: Associate professor - Hospital praticien Julien DELMAS

Supervison: 3 students (from technical university's degree, bachelor's degree and master 2)

June - August 2019 (10 weeks) | Master 1 placement | Microbiology and Health | Oxford (UK)

Subject: Characterization of actinomycete bacterial strains producing glycopeptide antibiotics

Host laboratory: Department of Biological and Medical Sciences at Oxford Brookes University

Supervisor: Hee-Jeon Hong, Professor

June 2018 (4 weeks) | Voluntary Bachelor placement | Parasitology and Bioinformatics | Clermont-Ferrand (FRANCE)

Subject: Domestication of a transposable element in microsporidia: expression in *Escherichia Coli* for study of its function.

Host laboratory: Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE)

Supervisor: Eric Peyretailade, Lecturer in bioinformatics

May - June 2017 (10 weeks) | DUT placement | Parasitology | Aberystwyth (WALES)

Subject: Optimization of identification techniques for the protozoan *Histomonas meleagridis* in turkeys' samples

Host laboratory: IBERS in Aberystwyth University

Supervisor: James Pickup, PhD

TECHNICAL SKILLS

- ✓ Animal experimentation (certification level 2)
- ✓ Cell culture (adhesion, transwell, protein extraction)
- ✓ Cytometry (cell cycle analysis)
- ✓ Analytical technics (ELISA, Immunofluorescence, IHC, Western Blot, FISH, Biofilm evaluation)
- ✓ Microbiology (culture, isogenic mutants)
- ✓ Molecular Biology (DNA, RNA, RT-qPCR)
- ✓ Microscopy (confocal, imaris analysis)

COMMUNICATION

Publication

2023 | Gut Microbes

[Chat H](#), Dalmasso G, Godfraind C, Bonnin V, Beyrouthy R, Bonnet M, Barnich N, Mettouchi A, Lemichez E, Bonnet R, Delmas J. Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ mice. Gut Microbes. 2023 Jan-Dec;15(1):2229569. doi: 10.1080/19490976.2023.2229569. PMID: 37417545; PMCID: PMC10332217.

Oral communication

International

- [Chat H](#), Dalmasso G, Godfraind C, Bonnin V, Beyrouthy R, Bonnet M, Barnich N, Mettouchi A, Lemichez E, Bonnet R, Delmas J. Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ mice, **United European Gastroenterology (UEGW) | Vienne (AUSTRIA) | 8th – 11th October 2022**

National

- [Chat H](#), Dalmasso G, Godfraind C, Bonnin V, Beyrouthy R, Bonnet M, Barnich N, Mettouchi A, Lemichez E, Bonnet R, Delmas J. Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ mice **Société Française de Microbiologie (SFM) | Nantes (FRANCE) | 22nd – 24th September 2021**

Local

- [Chat H](#), Dalmasso G, Godfraind C, Bonnin V, Beyrouthy R, Bonnet M, Barnich N, Mettouchi A, Lemichez E, Bonnet R, Delmas J. Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ mice, **Journée de l'école doctorale ED SVSAE | Clermont-Ferrand (FRANCE) | 5th – 6th June 2022**
- [Chat H](#), Guillouard L, Bonnin V, Dalmasso G, Bonnet M, Barnich N, Bonnet R, Delmas J. The mucin-protease Vat increased colonisation and colorectal tumorigenesis of colibactin-producing *Escherichia coli*. **Rencontre des microbiologistes clermontois | Clermont-Ferrand (FRANCE) | 7th April 2022**
- [Chat H](#), Dalmasso G, Godfraind C, Bonnin V, Beyrouthy R, Bonnet M, Barnich N, Mettouchi A, Lemichez E, Bonnet R, Delmas J. Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ mice **Groupe Cancer Clermont Auvergne (GCCA) | Clermont-Ferrand (FRANCE) | 16th December 2021**

Poster

International

- [Chat H](#), Guillouard L, Bonnin V, Dalmasso G, Bonnet M, Barnich N, Bonnet R, Delmas J. The mucin-protease Vat increased colonisation and colorectal tumorigenesis of colibactin-producing *Escherichia coli*. **Cell symposia | Paris (FRANCE) | 7th_9th June 2023**

SCIENCE MEDIATION

- National finalist of My Thesis in 180 secondes | Rennes | 6th June 2023
Semi finalist in Paris (April 2023) and regional finalist in Clermont-Ferrand (March 2023)
Speech your subject thesis in 180 secondes for general public
- Short communication for "Printemps des Talents" at Clermont-Ferrand | June 2023
- Testimony of my PhD career and on short video to PhD school and IUT of Clermont-Ferrand
- Participation in scientific events "nuées ardentes" for youngs and adults around microbiota popularization | Clermont-Ferrand | June 2020 to June 2023

TEACHING EXPERIENCE

2023 - 2022 | Teaching assistant | Microbiology and Health

- Tutorial and practical courses of Microbiology for undergraduate students (2nd and 3rd years of Biology's Bachelor) - 52 hours / years
Reference : Professor Nicolas Barnich

2022 - 2021 | Teaching assistant | Parasitology

- Tutorial and practical courses of parasitology for pharmacy students (4th year) - 49 hours / years

2021 | Pedagogic and interactive project | Microbiology

- Participation in conception for microbiology escape game - 14 hours / years

2020 | Pedagogic project | Biodiversity

- Pedagogic project with nursery school - 20 hours / years

2017 | Tutorial | Biology, Physics and Chemistry

- Tutorial of Biology, Physics and Chemistry for undergraduate students (1st and 2nd years of Technical University's degree) - 52 hours / years

~Sommaire~

Remerciements~	
Sommaire~	
Index des illustrations~	
Glossaire~	
Abréviations~.....	
Résumé.....	
Abstract.....	
Présentation du manuscrit.....	1
Étude bibliographique	3
PREMIERE PARTIE : HOMEOSTASIE DU TUBE DIGESTIF	3
I.1 Le tube digestif.....	3
I-1-1 Structure de l'épithélium	3
I-1-2 Composition cellulaire de l'épithélium intestinal.....	4
I-1-3 Fonctions de la barrière épithéliale intestinale	4
I-1-3-1 Barrière physique	5
I-1-3-2 Barrière immunitaire	5
I-1-3-3 Barrière chimique	8
I-2 Le mucus : une barrière à double fonction.....	8
I-2-1 Composition de la couche de mucus	9
I-2-1-1 Composition des mucines.....	9
I-2-1-2 Mucines transmembranaires.....	10
I-2-1-3 Mucines sécrétées.....	10
I-2-2 Structure de la couche de mucus	11
I-2-3 Formation de la couche de mucus	12
I-2-3-1 Synthèse du mucus	12
I-2-3-2 Bactéries et sécrétion de la couche de mucus	12
I-2-4 Fonction du mucus.....	13

I-2-4-1 Une barrière physique tout le long du tube digestif	13
I-2-4-2 Une barrière chimique : mucus et système immunitaire	14
I-2-4-3 Transduction de signaux cellulaires	14
I-2-4-4 Une niche écologique pour le microbiote	15
I-2-5 Dégradation du mucus par les bactéries	16
I-2-5-1 Les glycosidases bactériennes	16
I-2-5-2 Les protéases bactériennes	17
I-2-6 Altération du mucus.....	18
I-2-6-1 Altération du mucus par des facteurs extrinsèques	18
I-2-6-2 Altération du mucus et développement tumoral	20
I-2-7 Mucus et modèles d'études.....	22
I.3 Le microbiote intestinal.....	23
I-3-1 Composition du microbiote intestinal bactérien	24
I-3-2 Fonctions du microbiote intestinal.....	28
I-3-2-1 Digestion et production de métabolites	28
I-3-2-2 Fonctions trophiques	29
I-3-2-3 Fonctions neurologiques.....	29
I-3-2-4 Défenses de l'hôte par des mécanismes de compétition	30
I-3-2-5 Développement du système immunitaire	30
I-3-3 Facteurs impactant le microbiote intestinal	32
I-4 Points de contrôle de la cellule	34
I-4-1 Points de contrôle de l'ADN.....	34
I-4-2 Systèmes de réparation de l'ADN (DDR)	35
I-4-3 Apoptose	36
I-4-4 Sénescence cellulaire	37
DEUXIEME PARTIE : LE CANCER COLORECTAL	38
II-1 Epidémiologie.....	38
II-2 Différentes formes du cancer colorectal.....	38
II-2-1 Formes héréditaires de CCR.....	39
II-2-1-1 Syndrome de Lynch	39
II-2-1-2 Polypose juvénile	39

II-2-1-3 Polypose adénomateuse familiale	39
II-2-2 Cancer colorectal sporadique	40
II-3 Diagnostic du cancer colorectal.....	42
II-4 Stratégies thérapeutiques	43
II-5 Facteurs de risque du CCR	44
II-6 Cancer et microbiote.....	47
II-6-1 Dysbiose chez les patients CCR.....	48
II-6-2 Théorie driver-passenger.....	49
II-6-3 Bactéries candidates dans le cancer.....	50
II-6-3-1 Mécanismes carcinogènes des bactéries intestinales	50
II-6-3-2 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	51
II-6-3-3 <i>Bacteroides fragilis</i>	52
II-6-3-4 <i>Enterococcus faecalis</i>	53
II-6-3-5 <i>Escherichia coli</i>	53
TROISIEME PARTIE : Les <i>Escherichia coli</i> associés au CCR.....	54
III-1 <i>Escherichia coli</i>	54
III-1-1 Généralités sur les <i>E. coli</i>	54
III-1-2 Phylogénie des <i>E. coli</i>	54
III. 2 Les facteurs de virulence produits par les <i>E. coli</i>	55
III-2-1 Cdt.....	56
III-2-2 Cif.....	56
III-2-3 Cnf.....	57
III-2-3-1-Prévalence du gène <i>cnf</i> dans le génome des <i>Escherichia coli</i>	57
III-2-3-2 Support génétique, régulation de l'expression de Cnf1	58
III-2-3-3 Entrée de Cnf1 dans la cellule	58
III-2-3-4 Mécanisme d'action de Cnf1	58
III-2-3-5 Cnf1 chez les <i>E. coli</i> associés au cancer.....	61
III-2-3-6 Portée thérapeutique de Cnf1.....	61
III-2-4 La colibactine	62
III-2-4-1 Prévalence de l'îlot <i>pks</i>	63
III-2-4-2 Production et structure de la colibactine.....	63

III-2-4-3 Impacts de la colibactine sur l'hôte	64
III-2-4-4 Impact de la colibactine sur le microbiote intestinal	67
III-2-4-5 Modulation de la synthèse de la colibactine	68
III -2-4-6 Une toxine contact-dépendant	70
III-2-5 La sécrétion de sidérophores	71
III-2-6 Protéines d'adhésion à la muqueuse épithéliale.....	71
III-2-7 Les mucine-protéases des <i>E. coli</i>	72

Travail expérimental

Objectif du travail de recherche.....

Travail expérimental de l'axe 1 : Impact de la cyclomoduline Cnf1 sur le pouvoir tumorigène des CoPEC

Commentaires de la publication n°1 & perspectives.....

Travail expérimental de l'axe 2 :

Implication de la mucine-protéase Vat dans la colonisation et la tumorigenèse des CoPEC....

Commentaire de la publication n°2 & perspectives

Discussion et conclusion.....

Références bibliographiques.....

Introduction bibliographique

Illustrations

~Index des illustrations~

Index des figures

Figure 1 : Composition du tube digestif et de l'épithélium intestinal.

Figure 2 : Structure d'une cellule caliciforme de l'épithélium colique

Figure 3 : Les différentes jonctions de l'épithélium intestinal

Figure 4 : TLR et voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire innée

Figure 5 : Fonctions du mucus intestinal

Figure 6 : Structure chimique du mucus

Figure 7 : Domaines structuraux des mucines sécrétées et membranaires

Figure 8 : Régulation des bactéries intestinales par le système immunitaire mucosal

Figure 9 : Mucines transmembranaires, récepteurs et senseurs de l'environnement

Figure 10 : Enzymes clivant les mucines

Figure 11 : Adaptation des pathogènes intestinaux : colonisation et invasion de la barrière mucoale au niveau colique

Figure 12 : Altérations de la barrière mucoale

Figure 13 : Représentation de l'antigène sialylé Tn et dans les cellules cancéreuses

Figure 14 : Expression des mucines dans le développement du cancer

Figure 15 : Arbre phylogénétique de l'abondance des phyla et des genres bactériens du microbiote intestinal humain issus des projets MetaHit et Human Microbiome Project

Figure 16 : Cycle cellulaire et points de contrôles

Figure 17 : Systèmes de réparation de l'ADN

Figure 18 : Mécanisme de l'apoptose

Figure 19 : Mécanisme de sénescence

Figure 20 : Incidence et mortalité du CCR dans le monde

Figure 21 : Séquences adénome-cancer et voies de signalisation impliquées dans le développement du CCR

Figure 22 : Classification des stades du cancer colorectal d'après la 8^{ème} édition de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC)

Figure 23 : Théorie des bactéries « drivers-passengers » impliquées dans le développement du CCR

Figure 24 : Mécanismes carcinogènes des bactéries intestinales

Figure 25 : Pathotypes d'*Escherichia coli*

Figure 26 : Cyclomodulines produites par les *E.coli* agissant sur le cycle cellulaire

Figure 27 : Endocytose de la toxine Cnf1 et translocation du domaine catalytique dans le cytosol de la cellule

Figure 28 : Action de CNF1 sur la cellule

Figure 29 : Mode d'action de Cnf1 sur les mécanismes inflammatoires

Figure 30 : Représentation schématique de l'îlot *pks*

Figure 31 : Représentation de la biosynthèse de la colibactine

Figure 32 : Changements morphologiques induits par l'interaction d'*E. coli pks+* et de cellules épithéliales

Figure 33 : Effets des *E. coli* productrices de la colibactine sur la cellule

Figure 34 : Représentation de la structure et de l'organisation des autotransporteurs à activité sérine protéase *Enterobacteriaceae* (SPATE) : exemple de la structure de Vat

Figure 35 : Gènes de virulences retrouvés dans le génome des CoPEC

Index des tables

Table 1 : Expression des mucines de l'organisme humain

Table 2 : Sérine-protéases auto-transporteurs décrites chez les *Enterobacteriaceae* (SPATEs)

~Glossaire~

Les mots indiqués par un astérisque (*) dans le texte lors de la première utilisation sont définis ci-dessous.

Axénique = élevé dans un milieu stérile, dépourvu de germe contaminant.

Colite = inflammation du côlon.

Commensal = se dit d'un micro-organisme qui vit en symbiose avec son hôte sans action néfaste (en opposition aux pathogènes).

Dysbiose = altération de la fonction et de la composition du microbiote intestinal.

Dysplasie = prolifération épithéliale néoplasique mais non invasive.

Eubiose = état d'équilibre du microbiote intestinal.

Facteur de virulence = ensemble des molécules produites par un agent infectieux qui contribuent au caractère pathogène de l'agent pour un hôte donné.

Génotoxine = toxine capable d'interagir avec le matériel génétique, d'induire des mutations dans l'ADN.

Glycocalyx = structure complexe située au pôle apical de la cellule endothéliale, composée de protéoglycanes, glycosaminoglycanes et de glycoprotéines.

Gnotobiotique = qualificatif d'un animal de laboratoire obtenu dans des conditions qui permet le contrôle total de la flore microbienne.

Pathobionte = micro-organisme unicellulaire, le plus souvent bactérien, n'exprimant pas de pouvoir pathogène dans un contexte eubiotique.

Prébiotique = substance non-digestible par l'hôte mais qui permet le développement de bactéries bénéfiques dans le microbiote de cet hôte.

Probiotique = micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité suffisante, induit un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

Oncogène = gène dont l'expression favorise la survenue d'un cancer.

Suppresseurs de tumeurs = gène dont l'expression contrôle négativement la survenue d'un cancer.

Transcyctose = passage de macromolécules d'un espace extracellulaire à un autre.

~Abréviations~

AA = acide aminé	MAMP = <i>microbes-associated molecular pattern</i>
AB = acide biliaire	MICI = maladie inflammatoire chronique de l'intestin
Ag = Antigène	MSI = <i>microsatellite instability</i>
AGCC = acide gras à chaîne courte	NOD = <i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing molecules</i>
AIEC = <i>E. coli</i> adhérent-invasif ou <i>adherent-invasive E. coli</i>	PAF = polypose adénomateuse familiale
ATM = <i>ataxia telangiectasia mutated</i>	PAMP = <i>pathogen associated molecular pattern</i>
CAC = colite associée au CCR	PRR = récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires ou <i>pattern recognition receptor</i>
CCR = cancer colorectal	ROS = espèces réactives de l'oxygène ou <i>reactive oxygen species</i>
CDB = cassure double-brin	SASP = phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou <i>senescence-associated secretory phenotype</i>
Cdt = <i>cytotoxic distending toxin</i>	SENP1 = <i>septrin-specific protease 1</i>
Cif = <i>cycle-inhibiting factor</i>	SII = syndrome de l'intestin irritable
CIMP = <i>cpG island methylator phenotype</i>	SPATE = <i>serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae</i>
CIN = <i>chromosomal instability</i>	ST = <i>sequence-type</i>
CNF = <i>cytotoxic necrotizing factor 1</i>	TEM = transition épithélio-mésenchymateuse
CoPEC = <i>Escherichia coli</i> producteurs de colibactine ou <i>colibactin-producing E. coli</i>	TIRAP = <i>TIR domain containing adaptor protein</i>
CPA = cellule présentatrice d'antigène	TLR = <i>toll-like receptor</i>
DC = cellule dendritique ou <i>dendritic cell</i>	TMF = transplantation de microbiote fécal
DDR = <i>DNA damage-response</i>	TRIFF = <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
DSS = <i>dextran sulfate sodium</i>	UFC = unité formant des colonies
EHEC = <i>enterohaemorrhagic E. coli</i>	UPEC = <i>uropathogenic E. coli</i>
EPEC = <i>enteropathogenic E. coli</i>	WD = <i>western diet</i>
ETEC = <i>enterotoxigenic E. coli</i>	
GAP = <i>goblet cell-associated antigen passages</i>	
GlcNac = N-acetylglucosamines	
Ig = immunoglobuline	
IL = interleukine	
LB = lymphocyte B	
LT = Lymphocyte T	

~Résumé~

Le cancer colorectal (CCR) est le 2^{ème} cancer le plus mortel, tout sexe confondu. Dans 90 % des cas, les patients développent un CCR spontanément, soulignant l'importance des facteurs environnementaux dans l'étiologie de ce cancer. L'altération de la composition du microbiote est associée dans de nombreuses études au développement du CCR. La muqueuse colique des patients atteints de CCR est anormalement colonisée par des *Escherichia coli* producteurs de la toxine colibactine (CoPEC). Ce composé, synthétisé par un îlot génomique de pathogénicité *pks*, a une action génotoxique. Il est capable d'alkyler l'ADN, d'induire des instabilités chromosomiques et des cassures double-brin après infection de cellules humaines en culture ou d'organoïdes mais également dans différents modèles murins. L'augmentation des dommages à l'ADN dans les cellules infectées peut amener à l'apparition de mutations, à l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence des cellules infectées. Néanmoins, la présence des CoPEC n'explique pas, à elle-seule, la pathogénie de la souche. Afin de comprendre l'implication des CoPEC dans le développement du CCR, il s'avère nécessaire **d'étudier la synergie entre les différents facteurs de virulence* produits par ces bactéries.**

Le premier axe de ma thèse porte sur l'impact de l'association entre deux cyclomodulines retrouvées chez les CoPEC : la colibactine et Cnf1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*). Nous avons démontré que le gène *cnf1* est associé à la présence de l'îlot *pks* dans 95 % des *E. coli* isolés d'une cohorte de patients ayant un CCR. **Nos travaux de recherche ont mis en évidence que Cnf1 limite le pouvoir de tumorigénèse des CoPEC et diminue la sénescence et l'inflammation associées à l'infection.**

Dans un deuxième axe, nous avons montré que les CoPEC possèdent des enzymes mucolytiques et nous avons déterminé leur rôle sur l'effet cancérigène des bactéries. En effet, il a été démontré que les CoPEC doivent être en contact étroit avec les cellules intestinales pour induire des dommages à l'ADN. La bactérie doit donc traverser le mucus protecteur qui recouvre l'épithélium colique pour accéder aux cellules. Le gène codant la mucine-protéase Vat, déjà décrite chez d'autres *E. coli* pathobiontes*, est associé dans 100 % des cas à la présence de l'îlot *pks* dans les souches de *E. coli* isolées de patients CCR. **Cette mucine-protéase pourrait permettre aux CoPEC de coloniser la couche de mucus intestinal protectrice, d'atteindre les cellules épithéliales coliques et ainsi d'induire leur action génotoxique.**

Ces travaux de recherches justifient la nécessité de prendre en compte l'ensemble du virulome des *E. coli* pour mieux comprendre leur pathogénie et ainsi améliorer la prise en charge des patients colonisés par des CoPEC et ayant un CCR.

~Abstract~

Colorectal cancer (CRC) is the 2nd most deadly cancer, regardless of gender. In 90% of cases, patients develop CRC spontaneously, underlining the importance of environmental factors in the etiology of this cancer. In fact, altered microbiota composition has been associated with the development of CRC in numerous studies. The colonic mucosa of CRC patients is abnormally colonized by colibactin toxin-producing *Escherichia coli* (CoPEC). This compound, synthesized by a genomic island of *pks* pathogenicity, has a genotoxic action. It can alkylate DNA, induce chromosomal instabilities and double-strand breaks after infection of human cells in culture or organoids, but also in various mouse models. Increased DNA damage in infected cells can lead to mutations, cell cycle arrest and senescence. Nevertheless, the presence of CoPEC alone does not explain the pathogenesis of the strain. In order to understand the involvement of CoPEC in the development of CRC, it is necessary **to study the synergy between the different virulence factors produced by these bacteria.**

The first part of my thesis focuses on the impact of the association between two cyclomodulins found in CoPEC: colibactin and Cnf1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*). We have demonstrated that the *cnf1* gene is associated with the presence of the *pks* island in 95% of *E. coli* isolated from a cohort of CRC patients. **Our research has shown that Cnf1 limits the tumorigenic potential of CoPEC and reduces associated senescence and inflammation.**

Secondly, we have shown that CoPEC possess mucolytic enzymes, and we have determined their role in the carcinogenic effect of bacteria. Indeed, it has been shown that CoPEC must be in close contact with intestinal cells to induce DNA damage. The bacteria must therefore penetrate the protective mucus covering the colonic epithelium to gain access to the cells. The gene encoding the Vat mucin protease, already described in other pathobiontic *E. coli*, is associated in 100% of cases with the presence of the *pks* island in our cohort of CRC patients. **This mucin protease could enable CoPEC to colonize the protective intestinal mucus layer, reach colonic epithelial cells and thus induce their genotoxic action.**

This research reinforces the need to consider the entire virulome of the bacterium to better understand its pathogenesis, and thus potentially improve the management of CoPEC-colonized patients with CRC.

~Présentation du manuscrit~

Les récentes avancées sur le microbiote intestinal nous amènent à repenser et étudier l'implication de cet acteur dans de nombreuses pathologies métaboliques, immunitaires, neurologiques et digestives. Le laboratoire M2iSH focalise ses recherches sur la compréhension de l'interaction entre le « pathogène » bactérien et l'hôte humain dans des pathologies digestives telles que la maladie de Crohn et le cancer colorectal (CCR).

Le cancer colorectal est d'après les derniers chiffres parus de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le 2^{ème} cancer, tout sexe confondu, le plus fréquent. Son étiologie est multifactorielle et assez documentée. Cependant, ces dernières années un nouvel acteur a été mis en lumière par les scientifiques : le microbiote intestinal. *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, ou encore, *Fusobacterium nucleatum* sont des bactéries qui ont déjà montré leur potentiel dans la carcinogénèse colique. En 2006, Éric Oswald et son équipe ont découvert l'existence de souches d'*Escherichia coli* capables de produire une génotoxine* qui s'est avérée, par la suite, possiblement impliquée dans le développement du CCR. Cette toxine, nommée colibactine, induit des dommages à l'ADN et la sénescence cellulaire des cellules infectées avec un phénotype sécrétoire associé favorisant la prolifération des cellules non-infectées. Les *Escherichia coli* producteurs de colibactine (CoPEC) augmentent le nombre de tumeurs coliques chez des souris prédisposées au CCR. Ces CoPEC possèdent des facteurs de virulence qui sont fréquemment associés aux *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales.

Les travaux de recherches de ma thèse se concentrent sur l'étude de ces facteurs chez les CoPEC dans le cadre du cancer colorectal.

➤ Le premier axe de recherche est consacré à **l'étude du rôle de Cnf1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*) dans le mécanisme de tumorigénèse des CoPEC**. Nous avons mis en évidence une co-occurrence du gène *cnf1* et l'îlot *pks* qui permet la production de la colibactine. Nous avons donc cherché à savoir si ces deux toxines pouvaient agir de concert sur la tumorigénèse colorectale.

➤ Le deuxième axe de recherche est porté sur **l'implication de la mucine-protéase Vat dans le mécanisme de tumorigenèse des CoPEC**. En effet, pour agir, les CoPEC doivent traverser la couche de mucus imperméable et atteindre les cellules intestinales. Notre hypothèse est que Vat pourrait être impliqué dans ce processus.

Le manuscrit débutera par une première partie introductive, dressant un résumé sur les connaissances portant sur l'homéostasie intestinale humaine et sur le rôle du microbiote intestinal dans cet équilibre. La seconde partie sera consacrée à l'état des connaissances actuelles sur le cancer colorectal et les mécanismes bactériens impliqués dans son développement. La troisième partie sera dédiée à l'étude des *Escherichia coli*, souches commensales* qui peuvent devenir pathogènes pour l'Homme par l'acquisition de facteurs de virulence comme la colibactine, CNF1 ou encore la mucine-protéase Vat. Par la suite, le travail expérimental sera présenté sous la forme de deux articles scientifiques. Chacun d'entre eux sera suivi par une réflexion au cours de laquelle nous discuterons des résultats obtenus et des perspectives à envisager. Enfin, le manuscrit se terminera par une mise en contexte et une discussion générale sur l'ensemble du travail présenté.

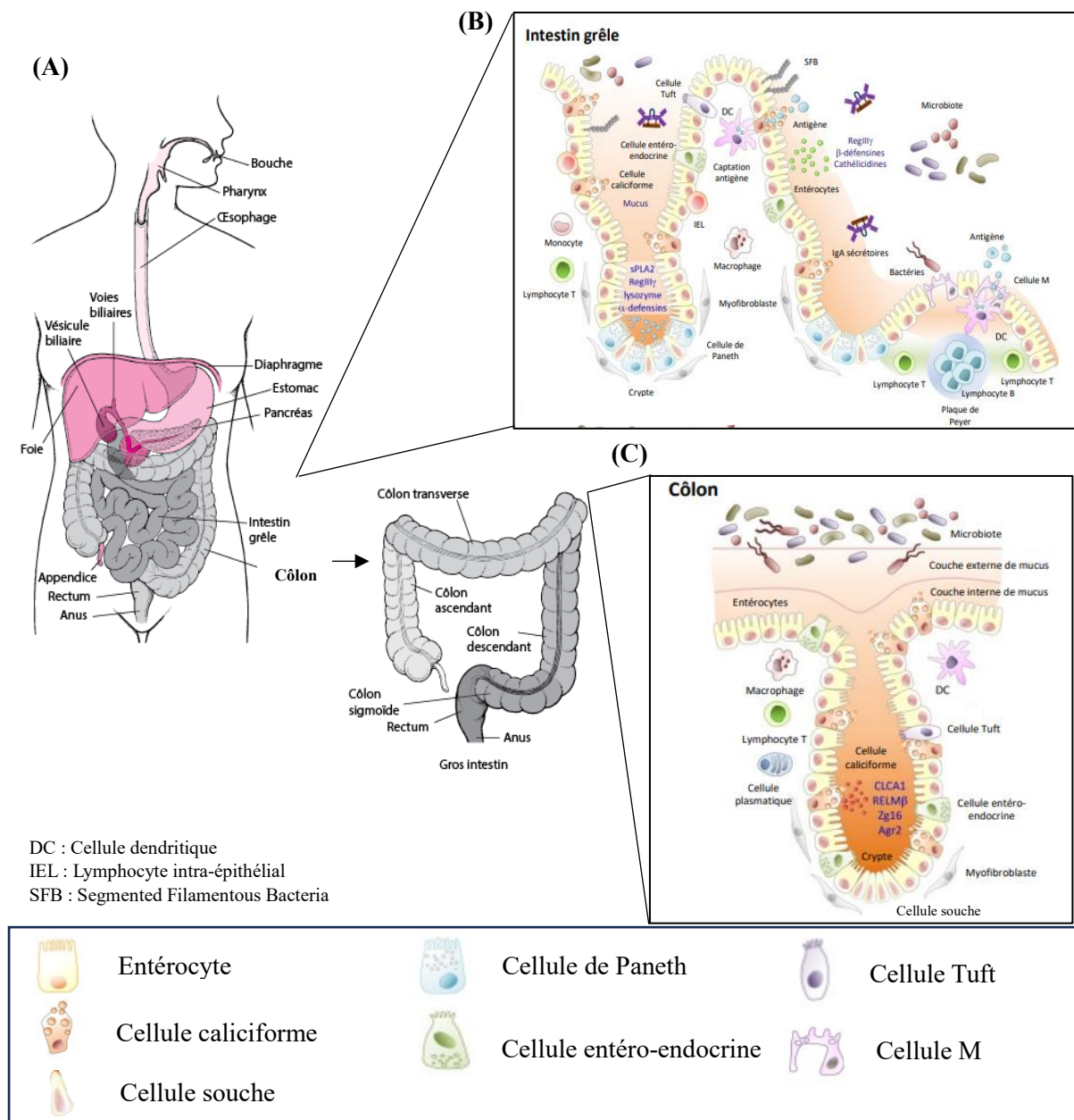


Figure 1 : Composition du tube digestif et de l'épithélium intestinal

(A) Constitution du tube digestif de la bouche à l'anus (adaptée d'après le manuel de MSD <https://www.msmanuals.com/fr>)

(B) Épithélium de l'intestin grêle. Les entérocytes sont les principales cellules retrouvées. Elles permettent l'absorption des nutriments présents dans la lumière intestinale et sont capables de sécréter des peptides antimicrobiens (RegIIIγ, β-défensines, cathélicidines). L'épithélium contient aussi d'autres cellules sécrétantes telles que les **cellules caliciformes** productrices de mucus, les **cellules entéro-endocrines** sécrétant des hormones (5-HT, sérotonines) et les **cellules de Paneth** (lysozyme, α-défensines, sPLA2), présentes à la base des cryptes. Les **cellules M** sont localisées au niveau de l'épithélium associé au follicule recouvrant les plaques de Peyer et participent à la captation et au passage des antigènes vers les cellules immunitaires sous-jacentes. Les cellules Tufts sont plus particulièrement impliquées dans l'immunité contre les parasites.

(C) Épithélium du côlon. À la différence de l'intestin grêle, l'épithélium colique est riche en entérocytes et en cellules caliciformes.

Illustration modifiée (Allaire *et al.*, 2018).

~Étude bibliographique~

PREMIERE PARTIE : HOMEOSTASIE DU TUBE DIGESTIF

I.1 Le tube digestif

I-1-1 Structure de l'épithélium

L'appareil digestif assure l'assimilation des aliments chez l'Homme. Pour cela, l'homéostasie doit être maintenue aussi bien au niveau de la structure, de la composition, que de la fonction de l'intestin. La structure du tube digestif est détaillée en **Figure 1A**. Le côlon, qui termine le tube digestif, est lui-même divisé en plusieurs sections : on distingue au commencement du cæcum, le côlon ascendant, suivi du côlon transverse, prolongé par le côlon descendant et terminant par le côlon dit « sigmoïde ».

La paroi intestinale (intestin grêle et côlon) est composée de quatre membranes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est bordée par un épithélium spécialisé où l'on dénombre plusieurs types de cellules épithéliales notamment les entérocytes, les cellules en gobelet, les cellules de Paneth et les cellules endocrines (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013). Le type et la proportion de ces cellules varient tout le long de l'intestin (**Figure 1B et C**).

Dans l'intestin grêle, l'épithélium se présente sous la forme de multiples villosités qui augmentent la surface d'absorption des nutriments. En comparaison avec l'intestin grêle, le côlon présente une surface d'échange plus faible, l'épithélium n'est pas structuré en longues villosités mais présente des invaginations que l'on appelle les cryptes de Lieberkühn. L'épithélium a une capacité permanente de renouvellement et est remplacé tous les 4 à 5 jours chez l'homme (van der Flier and Clevers, 2009). Ce renouvellement est assuré par les cryptes qui contiennent des cellules souches et progénitrices.

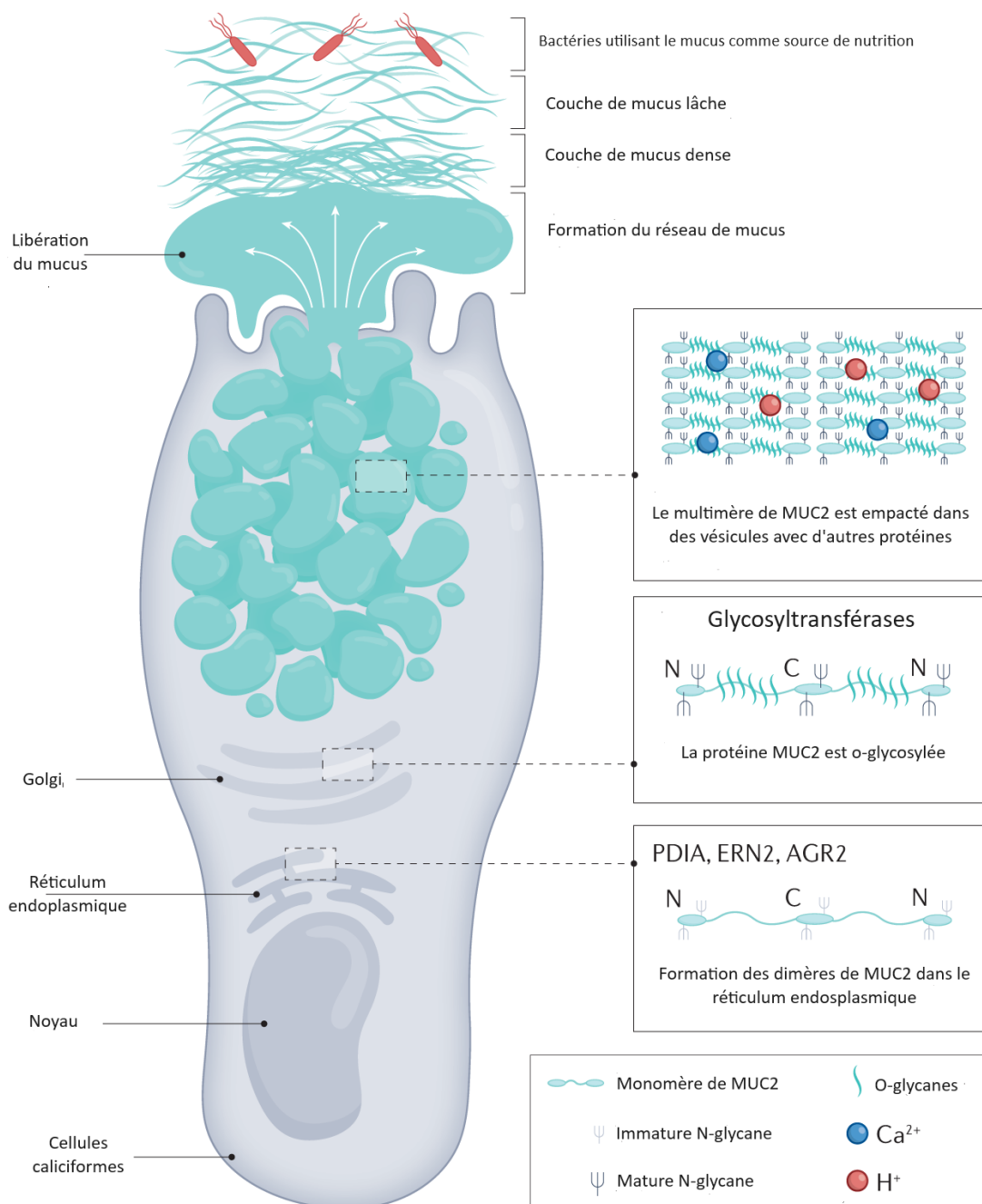


Figure 2 : Structure d'une cellule caliciforme de l'épithélium colique

MUC2 est la principale mucine sécrétée par les cellules caliciformes du côlon. Les ARN messagers de cette apomucine sont produits en continu au cours du développement. Elle est ensuite traduite sous forme dimérique dans le réticulum endoplasmique grâce à plusieurs enzymes, avant d'être prise en charge par l'appareil de Golgi. C'est dans cet organe que les O-glycosylations sont ajoutées sur des acides aminés sérine et thréonine via des glycosyltransférases. Une fois la mucine totalement formée avec toutes les O-glycosylations, elle peut atteindre une taille de 5 mDalton. Elle est ensuite compactée au niveau du pôle apical de la cellule caliciforme avant d'être sécrétée à l'extérieur de la cellule.

Illustration modifiée d'après (Gustafsson and Johansson, 2022).

I-1-2 Composition cellulaire de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est constitué majoritairement par les **entérocytes** dans l'intestin grêle et les colonocytes dans le côlon ; elles réalisent la fonction d'absorption de nutriments situés dans la lumière intestinale. Les entérocytes présentent à leur surface de nombreux résidus glycosylés comportant des acides sialiques, fortement chargés négativement qui favorisent également la répulsion électrostatique avec le LPS des bactéries. Elles participent aussi de manière active à la défense contre les pathogènes, en sécrétant des peptides antimicrobiens comme RegIII γ ou des β -défensines.

Dispersés entre les entérocytes, on trouve, des cellules à mucus (cellules caliciformes ou cellules en gobelet), des cellules de Paneth, des cellules endocrines et quelques lymphocytes intra-épithéliaux. Les **cellules de Paneth** localisées dans le fond des cryptes et les **cellules M** situées au niveau des plaques de Peyer sont retrouvées seulement au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle (**Figure 1B**). Les cellules de Paneth jouent un rôle dans l'immunité innée de la barrière intestinale en sécrétant des peptides antimicrobiens dans la lumière intestinale qui sont une défense chimique contre les pathogènes. Les cellules M quant à elles, de par leur structure, permettent le passage d'antigènes (Ag) de la lumière intestinale vers les cellules immunitaires du système lymphatique sous-jacent. Ces cellules sont recouvertes par des résidus glycosylés, notamment le fucose, qui favorisent la réduction des répulsions électrostatiques et les interactions Ag-cellules M.

Les cellules caliciformes contiennent des granules intracytoplasmiques remplis de mucines qui seront secrétées pour former la couche de mucus (**Figure 2**). La proportion de ces cellules augmente le long du tractus intestinal de 4% au niveau du duodénum jusqu'à atteindre 16% dans le côlon distal (Kim and Ho, 2010). Ainsi, la couche de mucus est plus développée dans le côlon, là où se trouve la densité bactérienne la plus importante (Allaire *et al.*, 2018).

I-1-3 Fonctions de la barrière épithéliale intestinale

La barrière épithéliale intestinale est à la fois **physique (1)** grâce à la présence de jonctions inter-cellulaires, **immunologique (2)** de par la participation de cellules de l'immunité innée et adaptative, ainsi que **chimique (3)** avec la sécrétion d'une couche de mucus protectrice et la présence de peptides antimicrobiens.

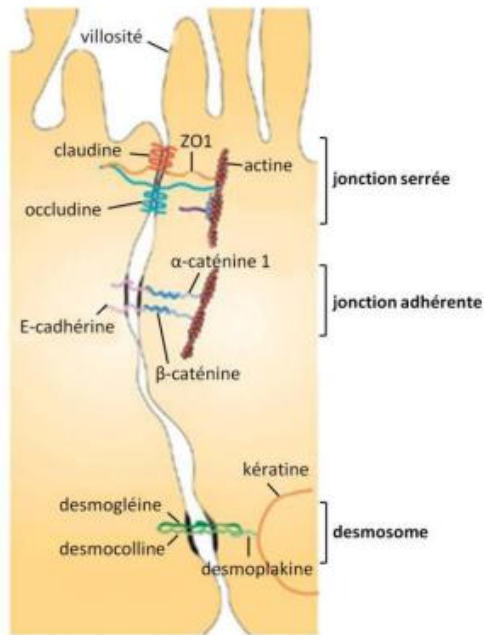


Figure 3 : Les différentes jonctions de l'épithélium intestinal

Illustration modifiée d'après (Turner, 2009)

I-1-3-1 Barrière physique

L'épithélium intestinal permet l'absorption des nutriments mais il constitue aussi l'une des principales barrières de l'organisme. Il permet de maintenir à distance les organismes présents dans la lumière intestinale (bactéries, virus, parasites, molécules toxiques, allergènes...). La rupture de cette barrière physiologique peut entraîner de nombreuses complications locales ou générales ainsi que des pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Jay, 2021).

Le rôle de barrière physique de l'épithélium intestinal est porté par 3 types de structures (**Figure 3**) :

- **Les jonctions serrées** sont situées au niveau du pôle apical des cellules épithéliales. Ce sont des complexes multiprotéiques composés de protéines transmembranaires de la famille des claudines comme les occludines, des protéines *zonula occludens* ZO1 et ZO2 et des protéines du cytosquelette telles que l'actine. Ces jonctions permettent de contrôler le flux paracellulaire et la perméabilité intestinale.
- **Les jonctions adhérentes** comme leur nom l'indique permettent de maintenir l'adhésion entre les cellules, grâce notamment aux protéines cytoplasmiques caténines et cadhérines. Ces complexes caténines-cadhérines favorisent également l'assemblage des jonctions serrées et des desmosomes.
- **Les desmosomes** sont composés de protéines transmembranaires de la famille des cadhérines, de desmoplakine et des filaments de kératine du cytosquelette. Ils permettent l'adhésion entre les cellules ou l'ancrage au pôle basal (dans ce cas, on parle « d'hémidesmosomes » (Tsukita *et al.*, 2001; Turner, 2009).

I-1-3-2 Barrière immunitaire

Activation du système immunitaire : reconnaissance cellulaire de molécules d'origine microbienne.

La muqueuse intestinale est exposée à de nombreux micro-organismes commensaux et/ou pathogènes. Le système immunitaire tolère les bactéries commensales tout en détectant la présence de bactéries pathogènes et permet ainsi de **maintenir l'homéostasie intestinale** (Medzhitov and Janeway, 2002). Pour cela les cellules épithéliales vont reconnaître, grâce à

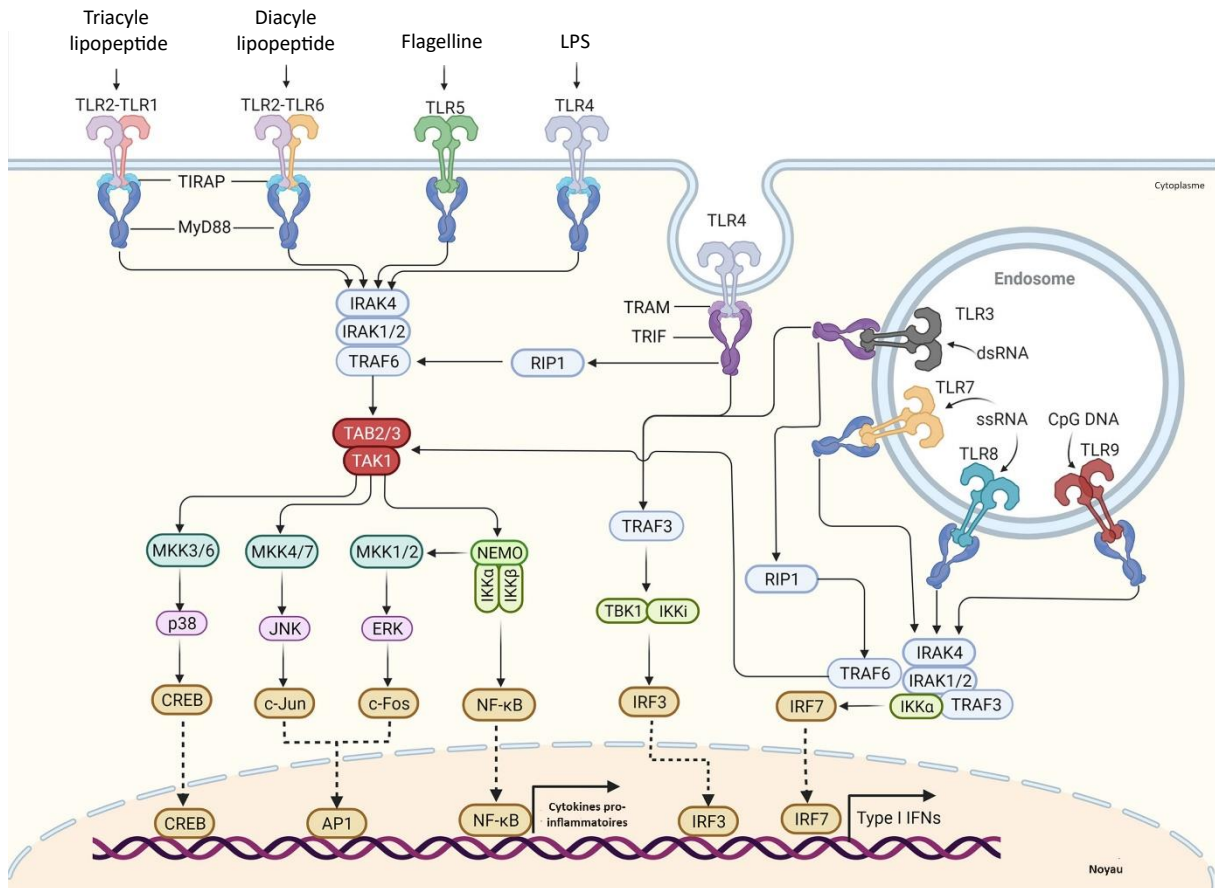


Figure 4 : TLR et voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire innée

Illustration modifiée d'après (Duan *et al.*, 2022).

Voie de signalisation des TLR dans les cellules de l'immunité innée. TLR5, TLR4 et les hétérodimères TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 reconnaissent les composants membranaires des pathogènes à la surface des cellules, tandis que TLR3, TLR7-TLR8 et TLR9 se localisent dans les endosomes, où ils reconnaissent les acides nucléiques de l'hôte et des micro-organismes étrangers. Le TLR4 se localise à la membrane plasmique, mais il est endocytosé dans les endosomes lors de l'activation. La signalisation des TLR est initiée, lors de la liaison avec leurs ligands respectifs, par la dimérisation des récepteurs, conduisant à l'engagement des domaines TIR des TLR avec TIRAP et MyD88 ou avec TRAM et TRIF (ou interagissent directement avec TRIF). L'engagement de MyD88 recrute les molécules de signalisation en aval pour former le Myddosome, qui est composé de IRAK4 et IRAK1/2. IRAK1 active le complexe TAK1. TAK1 activé phosphoryle entraîne également l'activation des MAPK. L'activation de ces MAPK entraîne l'activation de certains facteurs de transcription importants, tels que CREB et AP1. Ces facteurs de transcription coopèrent avec NF- κ B pour favoriser l'induction de cytokines pro-inflammatoires. L'engagement de TRIF recrute TRAF6 et TRAF3. TRAF6 activé peut recruter la kinase RIP1 et activer le complexe TAK1 et le complexe IKK, ce qui entraîne l'activation de NF- κ B et des MAPK. TRIF favorise également l'activation dépendante de TRAF3 de TBK1 et IKK α (à l'origine IKKi), qui phosphoryle et active IRF3. Parmi les signaux TLR7, TLR8 et TLR9 dans les pDC, IRF7 peut se lier au Myddosome et est directement activé par IRAK1 et IKK α . L'activation de IRF3 et IRF7 conduit à l'induction de l'IFN de type I.

des récepteurs de motifs moléculaires ou **PRR** (*pattern recognition receptor*), la présence d'organismes microbiens étrangers qui possèdent des motifs **MAMP** (*microbes-associated molecular pattern*) présents à leur surface (Allaire *et al.*, 2018).

Historiquement ces motifs étaient nommés PAMP pour Pathogens associated molecular pattern mais depuis 2004, on utilise le terme de MAMP pour inclure la reconnaissance de motifs microbiens à la surface de bactéries commensales.

Les PRR sont exprimés par de nombreux types cellulaires au niveau de la muqueuse intestinale : les cellules de l'épithélium comme les entérocytes, les cellules immunitaires telles que les monocytes, les adipocytes, les myofibroblastes mais aussi les cellules dendritiques de la lamina propria.

➤ Les **TLR** sont une large famille de **récepteurs transmembranaires** comprenant, à ce jour, 10 TLR chez l'Homme et 12 chez la souris reconnaissant des MAMP bactériens, fongiques mais aussi parasitaires et viraux (**Figure 4**) (Duan *et al.*, 2022) . En 2004, l'équipe de Rakoff-Nahoum a mis en évidence que la reconnaissance de molécules microbiennes par le système des TLR permettait de protéger le côlon murin de la colite* induite par le DSS (*dextran sulfate sodium*) en favorisant l'organisation des jonctions serrées (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). À la suite de l'activation des TLR par la fixation d'un MAMP bactérien, le facteur de différenciation myéloïde (MyD88) et l'adaptateur TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) ou TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*) sont recrutés (**Figure 4**). Ceci débouche sur une cascade de phosphorylations impliquant les voies des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases et l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription tels que NF- κ B qui vont aller réguler les voies de synthèses de cytokines pro-inflammatoires (Interleukines-6 ou IL-6, IL-8, TNF- α ...). Les mécanismes de tolérance sont finement contrôlés par une diminution de ces récepteurs TLR à la surface des cellules épithéliales intestinales (Cario, 2005).

➤ Les **NOD** (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing molecules*) sont des **récepteurs intracellulaires**. Il en existe une vingtaine pour reconnaître les MAMP présents à l'intérieur des cellules. NOD1 et NOD2 sont capables d'activer la voie de signalisation NF- κ B lorsqu'ils se lient à leurs ligands et de promouvoir une réponse pro-inflammatoire (Cario, 2005). Le récepteur NOD2, exprimé dans les macrophages et les cellules de Paneth, est l'un des plus étudiés notamment pour son implication dans la maladie de Crohn.

➤ Les **RLR** (pour RIG-I-like récepteurs) et les **CLR** (pour C-lectine-like récepteurs) sont d'autres familles de récepteurs cytoplasmiques et membranaires existants qui reconnaissent les ARNs viraux d'une part et d'autre part les molécules fongiques. Ces récepteurs participent à l'activation des facteurs de transcriptions IRF3/7 et NF- κ B, permettant la production des interférons IFN-I et IFN-III et celle de cytokines inflammatoires.

Immunité innée

Tout l'enjeu de la barrière immunologique est d'être prêt à répondre rapidement à l'agression par des bactéries pathogènes grâce à la reconnaissance des MAMP. Au niveau épithélial, la capture des MAMP est portée par trois structures : les cellules épithéliales, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) situées au niveau de la *lamina propria* comme les cellules dendritiques et les plaques de Peyer qui présentent des cellules épithéliales dédifférenciées appelées cellules M. Associés aux plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes primaires et secondaires sont les sites inducteurs de la réponse immunitaire adaptative.

Immunité adaptative

Au niveau épithélial, l'activation des effecteurs de la réponse immunitaire adaptative (lymphocytes et plasmocytes) se fait au niveau des tissus lymphoïdes associés au tube digestif (situés sous les cellules M) que l'on appelle GALT (pour *gut associated lymphoid tissue*). La transcytose* d'antigènes microbiens par les cellules M au niveau du GALT permet l'activation des cellules dendritiques, des macrophages, des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes sécréteurs d'IgA. Cette sécrétion d'IgA est dépendante de la présence des bactéries : ainsi des souris axéniques* (stérile) sécrètent une très faible quantité d'IgA par rapport à des souris conventionnelles (Macpherson *et al.*, 2000; Macpherson *et al.*, 2008).

Les lymphocytes T helper (CD4+) ou cytotoxiques (CD8+) sont également activés au niveau de ces sites effecteurs et participent activement à la réponse face à des signaux de danger. Ces signaux de danger peuvent provenir de tout type de cellules présent, *via* la sécrétion de TNF- α , IL- β , IL-6, IL-8 ou IL-12. On distingue les lymphocytes T effecteurs (au phénotype pro-inflammatoire) et les lymphocytes T régulateurs (anti-inflammatoire). L'activation basale de lymphocytes T régulateurs (synthétisant de l'IL-10, TGF- β ou IL-35) permet de maintenir une tolérance par rapport aux bactéries de la flore commensale au niveau de l'épithélium intestinal. Des signaux d'induction de la tolérance sont sécrétés par les cellules épithéliales ou mésenchymateuses comme la sécrétion de TGF- β ou d'IL-10 elle-même.

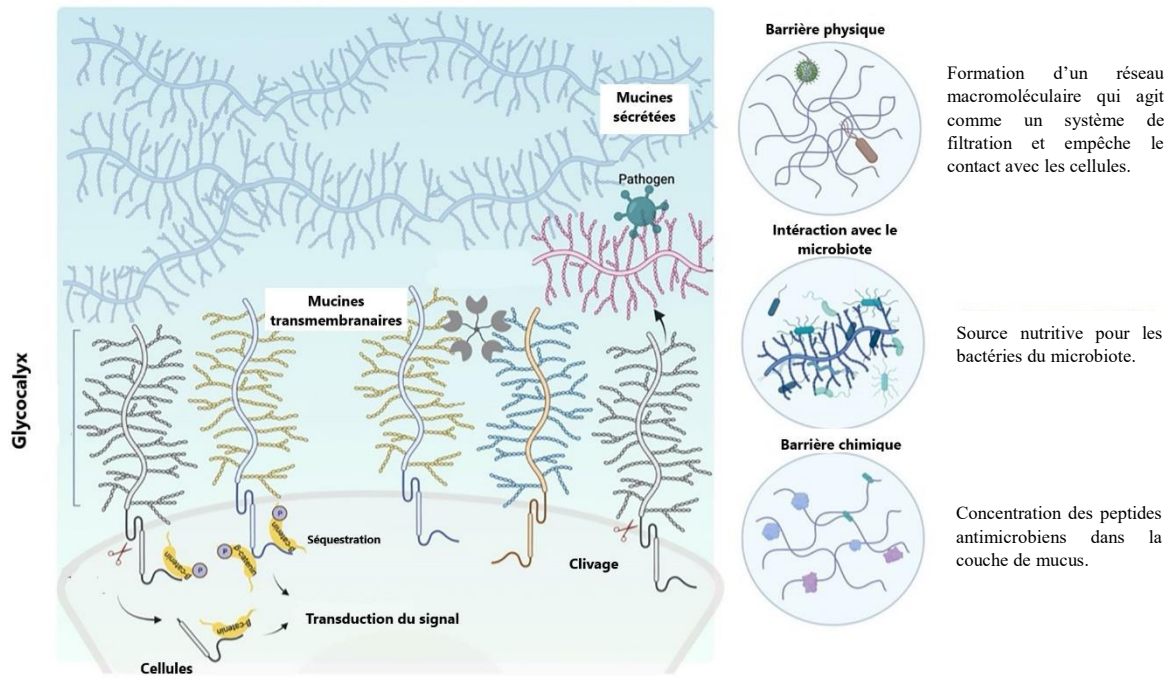


Figure 5 : Fonctions du mucus intestinal

Illustration modifiée d'après (Sheng and Hasnain, 2022).

I-1-3-3 Barrière chimique

Les peptides antimicrobiens

En plus du système de veille réalisé par les cellules du système immunitaire, l'épithélium intestinal constitue une barrière chimique avec la sécrétion de peptides antimicrobiens. Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens tels que les α -défensines, qui agissent directement contre les bactéries présentes dans le mucus. Ces peptides ont une partie cationique qui va venir se fixer par interactions électrostatiques sur les charges négatives du LPS. Les cellules de Paneth sécrètent aussi des lysozymes qui agissent en lysant les peptidoglycanes composant la paroi bactérienne des bactéries Gram positifs. L'accumulation de ces peptides au niveau de la membrane de la bactérie va aboutir à la création de nombreux pores dans la membrane bactérienne conduisant à la mort de la bactérie (Wimley *et al.*, 1994). En plus d'attaquer les membranes des bactéries, ces peptides peuvent aussi agir au niveau des activités enzymatiques bactériennes et inhiber la synthèse des composants de la paroi bactérienne, des acides nucléiques, ou des protéines.

Les cellules épithéliales peuvent elles aussi participer à cette réponse en sécrétant directement des molécules antimicrobiennes, comme REGIII α (ou REGIII γ chez l'homologue murin) (Loonen *et al.*, 2014). Ces molécules antibactériennes sont sécrétées vers la lumière intestinale et se retrouvent dans la couche de mucus externe où la densité bactérienne est importante (Johansson and Hansson, 2016).

I-2 Le mucus : une barrière à double fonction

Les épithéliums intestinaux sont en constantes interactions avec les environnements extérieurs et sont donc soumis à de nombreux stress environnants (forces mécaniques au passage du bol alimentaire, pH, concentration ionique, stress hydrique et oxydatif) mais aussi à des expositions constantes, dues à des agressions par des toxines, des protéases ou encore des lipases. Pour protéger les cellules épithéliales de ces attaques et maintenir l'homéostasie intestinale, la couche de mucus protectrice, présente à la surface de ces épithéliums, joue un rôle primordial. La structure et la composition de cette couche de mucus permettent à celui-ci d'agir comme une **barrière physique et chimique** contre les bactéries présentes dans la lumière intestinale. Cependant elle est également une source d'énergie nutritive pour ces

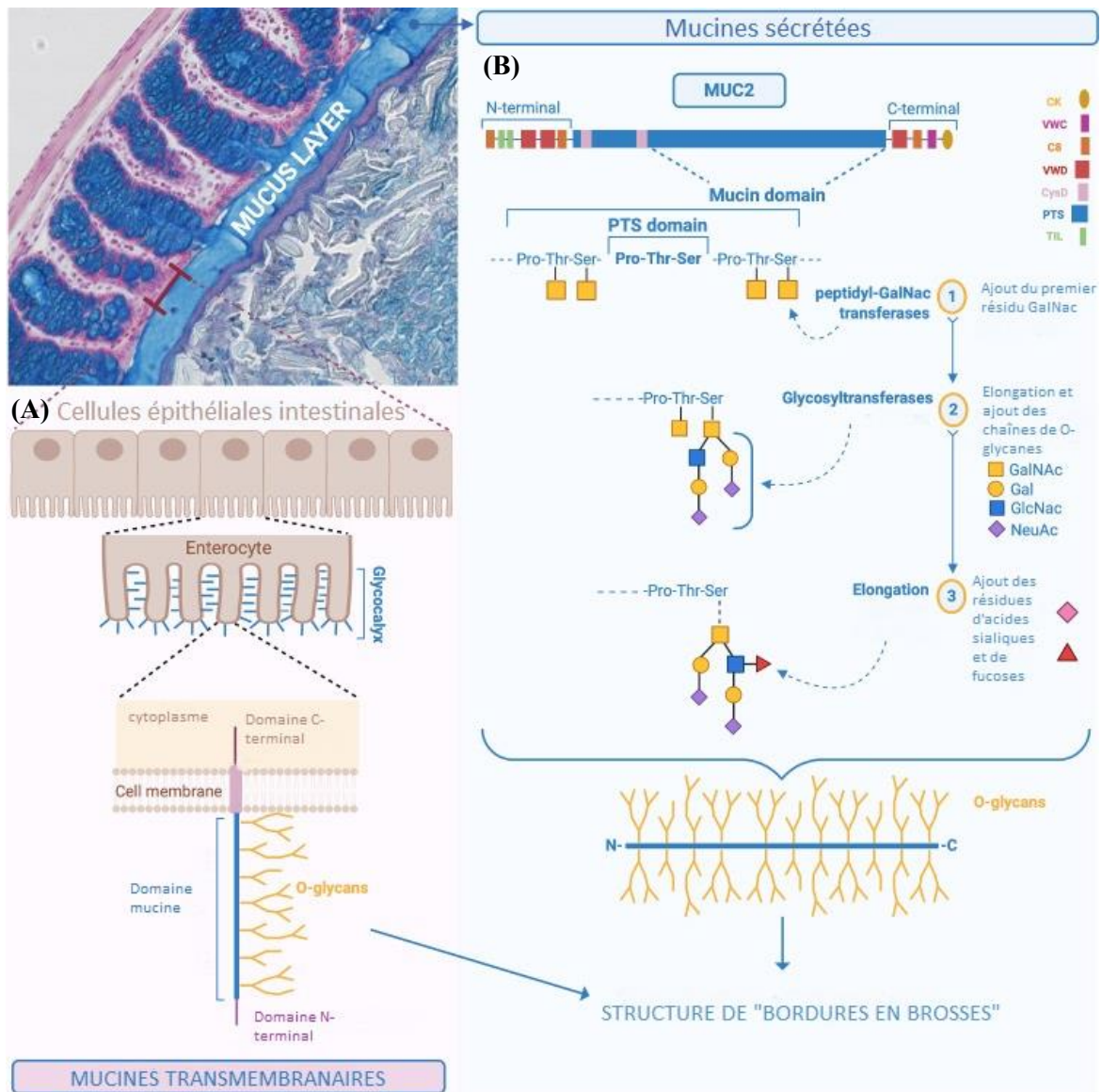


Figure 6 : Structure chimique du mucus

Les cellules de l'épithélium intestinal sont recouvertes par une épaisse couche de mucus qui est composée de mucines dites transmembranaires et attachées à la membrane cellulaire ou sécrétées (A). MUC2 est la principale mucine sécrétée au niveau colique. Sa structure et sa synthèse sont détaillées en (B). Sur un squelette protéique riche en acide aminés de type Proline, Thréonine et Sérine (motif PTS), des glycosylations de type N-acetylgalactosamine (GalNAc), galactose et N-acetylglucosamine (GlcNAc) sont ajoutées. Lors de la dernière étape d'élongation des résidus de fucose et d'acide sialique comme l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc). L'ajout de ces nombreux groupements est caractéristique de la structure « en brosse » du mucus de l'épithélium colique.

Illustration modifiée d'après (Paone and Cani, 2020).

bactéries. Certains signaux de transduction des cellules de l'épithélium intestinales sont même induits par des modifications de ces mucines (**Figure 5**).

I-2-1 Composition de la couche de mucus

Le mucus est un gel viscoélastique composé à 95% d'eau et de 1 à 5% de mucines, de lipides, d'électrolytes et de diverses protéines comme les TFF (*trefoil factor family*) (McGuckin et al., 2011). Les **mucines** sont des glycoprotéines à haut poids moléculaire car fortement glycosylées. Leur masse peut atteindre jusqu'à 30 000 kDa et les chaînes glycaniques représentent jusqu'à 50% du poids sec de la glycoprotéine. Les mucines forment un réseau macromoléculaire dense en établissant entre elles de nombreuses liaisons ce qui confère les propriétés rhéologiques du mucus.

I-2-1-1 Composition des mucines

Les mucines sont composées d'un squelette peptidique (apomucine) sur lequel peuvent être fixées des longues ramifications de sucres.

Les **résidus glycosylés** sont le plus souvent reliés par des liaisons de type O-glycosidiques aux résidus sérine ou thréonine de l'apomucine, cependant des liaisons N-glycanes existent avec les résidus asparagine (Porter and Martens, 2017). Les sucres qui forment le motif principal sont le galactose, le N-acétylgalactosamine et le N-acétylglucosamine. Sur ce motif peuvent être ajoutées plusieurs chaînes oligosaccharides et le monosaccharide terminal est souvent un fucose ou un acide sialique (Juge, 2012). Les glycanes terminaux forment également une structure 3D dit en forme de goupillon qui permet l'interaction avec les cellules immunitaires circulantes ou les micro-organismes de la lumière intestinale (**Figure 6**).

Le **squelette protéique** de l'apomucine est formé d'une région amino-terminale qui peut comprendre des domaines vW (von Willebrand). Ces domaines, riches en cystéines, jouent un rôle dans l'oligomérisation des monomères de mucines et dans l'empaquetage dans des vésicules de sécrétion du mucus. La région centrale de l'apomucine est riche en chaînes glycaniques parfois interrompue par des domaines hydrophobes CYS (Demouveau *et al.*, 2018). La région terminale est assez peu conservée entre les mucines (**Figure 7**). Les régions centrales des apomucines sont pour la plupart constituées de régions répétées en tandem enrichies en motif PTS (soit en acides aminés de type proline, thréonine et sérine) et qui vont

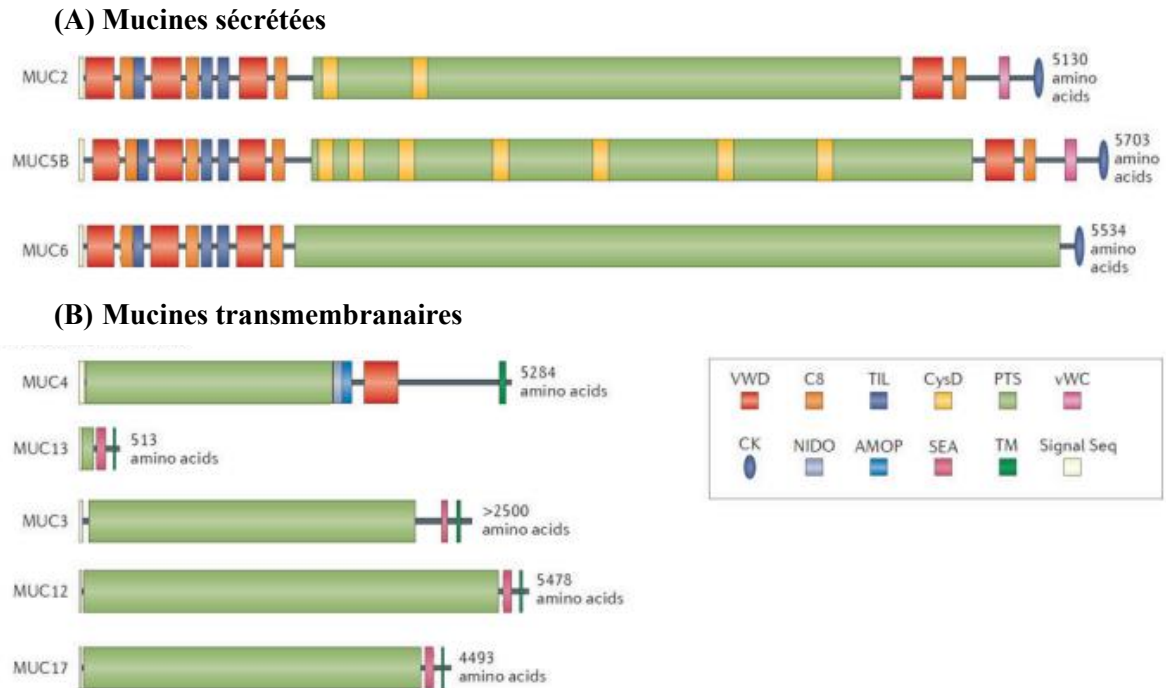


Figure 7 : Domaines structuraux des mucines sécrétées et membranaires

Les domaines PTS riches en Proline, Thréonine et Sérine représentent le corps principal de l'apomucine et sont les régions où sont ajoutés les groupements O-glycosylés. Les extrémités C-ter et N-ter des mucines dites **sécrétées (A)** sont composées de domaine C8-TIL (*trypsin inhibitor-like cystein-rich domain*) et vWD (*von Willebrand domain*) majoritairement. Elles sont également riches en cystéines (CysD) au niveau des séquences PTS, ce qui permet de former la structure dense du mucus. Les mucines **transmembranaires (B)** sont dépourvues de ces régions, mais possèdent un site de clivage au niveau de leur motif SEA (*sea urchin sperm protein, enterokinase, agrin*).

Illustration modifiée d'après (Johansson and Hansson, 2016).

être hautement glycosylées. Le nombre et la taille de ces séquences répétées sont variables entre les différents types de mucines et les individus, c'est ce qu'on appelle un polymorphisme dit VNTR (*variable number tandem repeat*) (**Figure 7**). La présence d'un tel polymorphisme permet de distinguer plusieurs types de mucines qui sont exprimées différemment selon les tissus. À ce jour ce sont une vingtaine de mucines qui ont été décrites. Elles sont caractérisées en deux familles distinctes : les mucines sécrétées et les mucines transmembranaires (**Figure 6-7, Table 1**).

I-2-1-2 Mucines transmembranaires

Les **mucines transmembranaires** sont fermement attachées à la membrane cellulaire des cellules de l'épithélium colique par leur **extrémité C-terminale** hydrophobe. Cette insertion dans la membrane cellulaire permet à ces mucines de participer à la transmission de nombreux signaux cellulaires (Quin and McGuckin, 2000). L'**extrémité N-terminale** des mucines dépasse largement au niveau du pôle apical et de la partie du glycocalyx* (**Figure 6A**). Les **régions centrales** VNTR des mucines transmembranaires sont très variables en taille : MUC13 est une mucine de très petite taille (513 acides aminés (AA)) comparativement à MUC12 (5478 AA). À l'exception de MUC4 et MUC13, les mucines transmembranaires sont clivées au niveau du motif SEA (*sea urchin sperm protein, enterokinase, agrin*) (**Figure 7**). Cependant, les deux sous-unités créées restent associées et nécessitent l'action de forces mécaniques ou de protéases pour être séparées.

I-2-1-3 Mucines sécrétées

Il existe deux types de mucines sécrétées : les mucines formant un gel et celles n'en formant pas. Les **mucines sécrétées formant un gel** sont exprimées par les cellules caliciformes au niveau des cryptes intestinales (**Figure 6B**). **MUC2** est la principale mucine sécrétée au niveau de la muqueuse intestinale. Les extrémités de ces mucines sécrétées possèdent des domaines vWD (*von Willebrand domain*), ainsi que des motifs C8 et TIL (*trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain*) impliqués dans l'oligomérisation de la protéine (Perez-Vilar *et al.*, 1998) (**Figure 7**). Les mucines sécrétées sont riches en cystéines où les ramifications glycosidiques sont plus rares et reliées par des liaisons N-glycosidiques qui sont composées de N-acétylglucosamine, de galactose et de mannose (Aksoy and Akinci, 2004). Dans ces régions, le squelette protéique des mucines est plus accessible et les rend sensibles

Table 1 : Expression des mucines de l'organisme humain

Nom	Expression cellulaire	Localisation tissulaire	Signalisations et pathologies intestinales	Réf
Mucines sécrétées				
MUC2	Cellules caliciformes, cellules de Paneth	Poumon, conjonctive, œil, oreille, intestin grêle, côlon , prostate	Induction de polypes au niveau colique en son absence.	(Velcich <i>et al.</i> , 2002)
MUC5AC	Cellules caliciformes	Poumon, oreille, nasopharynx, conjonctive, oreille, estomac , vésicule biliaire, utérus	Sur-exprimé dans le carcinome de l'intestin grêle.	(Shibahara <i>et al.</i> , 2014)
MUC5B	Cellules caliciformes	Poumon, oreille, glande salivaire, nasopharynx, larynx, oreille, œsophage, estomac , duodénum, vésicule biliaire, utérus		(Thornton <i>et al.</i> , 1997)
MUC6	Cellules caliciformes	Oreille, estomac , duodénum, vésicule biliaire, pancréas, rein, utérus	Sur-exprimé dans le carcinome de l'estomac	(Owens <i>et al.</i> , 2008)
MUC7	Cellules caliciformes	Oreille, poumon, glande lacrymale et salivaire, nez		(Gururaja <i>et al.</i> , 1998)
MUC8	Cellules épithéliales	Oviducte		(Kim <i>et al.</i> , 2005)
MUC9	Cellules épithéliales	Glande sous-mandibulaire		(Takeuchi <i>et al.</i> , 2003)
MUC19	Cellules épithéliales	Poumon, glande lacrymale, rein, foie, côlon , placenta, prostate		(Chen <i>et al.</i> , 2004)
Mucines transmembranaires				
MUC1	Cellules épithéliales	Poumon, cornée, oreille, glande salivaire, œsophage, estomac , pancréas, duodénum, côlon , sein, prostate, ovaire, rein, utérus, lymphocytes B et T	Sur-exprimé dans le carcinome de l'intestin grêle.	(Shibahara <i>et al.</i> , 2014; Agrawal <i>et al.</i> , 2018)
MUC3A	Entérocytes	Thymus, intestin grêle, côlon , rein.	Sur-exprimé dans le cancer colorectal.	(Su <i>et al.</i> , 2022)
MUC3B	Entérocytes	Intestin grêle		(Stepanjuk <i>et al.</i> , 2019)
MUC4	Cellules caliciformes, entérocytes	Poumon, cornée, oreille, glande salivaire, œsophage, intestin grêle , rein		(Abidullah <i>et al.</i> , 2023)
MUC12	Entérocytes	Poumon, estomac, pancréas, intestin grêle, côlon , prostate, rein, utérus	Sur-exprimé dans le cancer de l'œsophage, du pancréas et colorectal.	(Matsuyama <i>et al.</i> , 2010)
MUC13	Entérocytes	Poumon, oreille, conjonctive, estomac, intestin grêle, côlon , rein	Sur-exprimé dans le cancer colorectal.	(Packer <i>et al.</i> , 2004)
MUC15	Cellules épithéliales	Conjonctive, amygdale, thymus, nodule lymphoïde, sein, intestin grêle, côlon , foie, rate, testicule, prostate, ovaire, leucocyte, moëlle osseuse	Sur-exprimé dans le cancer colorectal.	(Huang <i>et al.</i> , 2009)
MUC16	Cellules épithéliales	Conjonctive, oreille, œil, ovaire	Sur-exprimé dans le carcinome de l'intestin grêle.	(Shibahara <i>et al.</i> , 2014)
MUC17	Entérocytes	Conjonctive, oreille, estomac, intestin grêle, côlon	Sur-exprimé dans le cancer pancréatique.	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
MUC20	Cellules épithéliales	Poumon, oreille, foie, rein, côlon , placenta, prostate		(Stepanjuk <i>et al.</i> , 2019)
MUC21	Cellules épithéliales	Poumon, côlon , thymus, testicule		(Wang <i>et al.</i> , 2022)

à l'action de **protéases** bactériennes et endogènes (Dharmani *et al.*, 2009). Ces régions riches en cystéine permettent d'initier la formation de ponts disulfures et la multimérisation de la protéine. L'empaquetage final est dépendant d'une forte concentration en ion calcium et d'un pH bas. Une inversion de ces paramètres (élévation du pH et diminution du taux de Ca^{2+}) induit la sécrétion de mucus. Une fois secrétées, certaines mucines sont encore attachées à l'épithélium. Par exemple, le détachement de MUC2 du pôle apical de la cellule caliciforme nécessite un clivage sous l'action de la métalloprotéase méprine β sécrétée par les entérocytes (Schütte *et al.*, 2014). Certaines mucines sont secrétées tout le long du tube digestif pour former le gel de mucus alors que d'autres ont une expression variable et spécifique. MUC5AC, par exemple, est normalement exprimée dans l'estomac mais elle peut aussi être exprimée dans l'intestin grêle en cas d'infection ou de cancer (Shibahara *et al.*, 2014) (**Table 1**).

Les **mucines ne formant pas de gel** (MUC7, MUC8 et MUC9) ont une structure de petite taille différente des mucines sécrétées formant un gel mais elles gardent un contenu riche en résidus sérine et thréonine (Bobek *et al.*, 1996). Elles servent à maintenir l'intégrité des muqueuses épithéliales, mais elles ont aussi des effets spécifiques. MUC7, par exemple, est sécrétée principalement par les glandes sublinguales et sous-mandibulaires humaines. En tant que glycoprotéine salivaire, elle participe à la mastication, à la parole, à la déglutition et à la lubrification de la cavité buccale.

I-2-2 Structure de la couche de mucus

La couche de mucus recouvre la lumière des organes creux de l'organisme comme les voies respiratoires, l'appareil génital et le tractus digestif. Historiquement, le mucus au niveau colique a été décrit comme une structure viscoélastique avec deux couches distinctes :

- Une **couche interne** fine ($< 200 \mu\text{m}$ chez l'Homme et $50 \mu\text{m}$ chez la souris), attachée à l'épithélium, et **stérile** maintenant les bactéries à distance de l'épithélium intestinal (Johansson *et al.*, 2008).
- Une **couche externe** moins dense mais plus épaisse (qui peut atteindre jusqu'à $800 \mu\text{m}$ d'épaisseur chez l'Homme et $100 \mu\text{m}$ chez la souris). Elle assure les fonctions de lubrification en facilitant le passage du bol alimentaire et de protection contre les stress chimiques et mécaniques, tout en servant de niche écologique au microbiote intestinal.

Néanmoins, en 2017, les travaux de l'équipe de Muriel Mercier-Bonin ont révélé qu'au niveau du côlon distal des rongeurs, ce qui aurait pu être défini comme la couche interne du mucus n'était pas attaché à la surface épithéliale mais qu'elle recouvrait le contenu colique pour confiner le microbiote (Kamphuis *et al.*, 2017). Par la suite en 2020, les travaux de Bergstrom *et al.*, sont venus compléter ce modèle en démontrant que le mucus colique murin est composé de deux formes distinctes de Muc2, avec des motifs glycosylés différents entre le **côlon proximal et distal** (Bergstrom *et al.*, 2020). Au niveau du côlon proximal, une épaisse couche de Muc2 encapsulerait directement le microbiote fécal et servirait à la fois de niche écologique et de barrière physique. Le microbiote contrôlerait directement l'encapsulation des fèces en stimulant la sécrétion de Muc2 par les cellules caliciformes. Au niveau du côlon distal, cette barrière serait renforcée par une couche secondaire de mucus plus fine. Ces nouvelles données interrogent donc sur le modèle établi des deux couches distinctes chez l'Homme qui a été basé sur des observations du côlon en présence d'un contenu colique.

I-2-3 Formation de la couche de mucus

I-2-3-1 Synthèse du mucus

L'équilibre entre la synthèse et la dégradation du mucus permet de contrôler son épaisseur et sa structure. La sécrétion de mucus par les cellules caliciformes peut être divisée en une sécrétion constitutive basale et une sécrétion induite et régulée par de nombreux stimuli comme le passage du bol alimentaire. La libération par les cellules caliciformes est décrite en **Figure 2** avec l'exemple de la mucine majeure du côlon, MUC2. Cette libération peut être accélérée sous l'effet d'irritations locales, d'agents cholinergiques, d'hormones, de facteurs de croissance, de médiateurs de l'inflammation ou encore de constituants bactériens.

I-2-3-2 Bactéries et sécrétion de la couche de mucus

En 2014, une équipe de chercheurs a réalisé une expérience en séparant dans deux pièces distinctes des souris ayant un microbiote différent et exempt de bactéries pathogènes. Ils ont remarqué une différence de perméabilité de la couche de mucus entre ces deux groupes d'animaux. Celles dont le microbiote était enrichi en *Proteobacteria* avaient une couche de mucus plus perméable que les souris qui avaient un microbiote enrichi en *Erysipelotrichi*

(Jakobsson *et al.*, 2015). Certaines bactéries semblent donc positivement associées à la sécrétion de mucus.

L'action du microbiote intestinal s'avère également nécessaire pour la formation de la couche de mucus, par exemple pour activer la métalloprotéase méprine β qui clive la protéine MUC2 dans les dernières étapes de sa synthèse permettant sa sécrétion (Schütte *et al.*, 2014).

Impact sur la sécrétion

Les souris axéniques ont une prolifération réduite des cellules de leur épithélium et une moindre production de mucines, donc une couche de mucus beaucoup plus fine que leurs congénères colonisés (Szentkuti *et al.*, 1990; Jakobsson *et al.*, 2015). La colonisation du tractus intestinal de ces souris par le microbiote de souris conventionnelles restaure les propriétés de la couche de mucus. La couche de mucus colique interne devient imperméable aux bactéries dès la 6^{ème} semaine post-colonisation (Johansson *et al.*, 2015).

Le LPS des bactéries présentent dans le contenu colique joue un rôle dans l'établissement de la couche de mucus. Le LPS est reconnu par les senseurs de type TLR des cellules caliciformes, ce qui va activer le récepteur de l'inflammasome NLRP6, stimulant la sécrétion de mucus dans les cryptes coliques (Birchenough *et al.*, 2016).

Impact sur la glycosylation

Les bactéries de la flore commensale peuvent participer à la formation des structures glycaniques du mucus. La bactérie *Ruminococcus gnavus*, par exemple, augmente l'expression des glycosyltransférases dans les cellules caliciformes (la lignée cellulaire hyper-productrice de mucus HT29-MTX), mais également en modèle murin (Graziani *et al.*, 2016). *Bacteroides thetaiotaomicron*, quant à elle, est capable d'induire une fucosylation des mucines (Xu *et al.*, 2003).

I-2-4 Fonction du mucus

I-2-4-1 Une barrière physique tout le long du tube digestif

Le mucus permet de protéger l'épithélium digestif des bactéries et sa forte hydratation permet de lubrifier les épithéliums et de faciliter le passage du bol alimentaire (Gaudier and

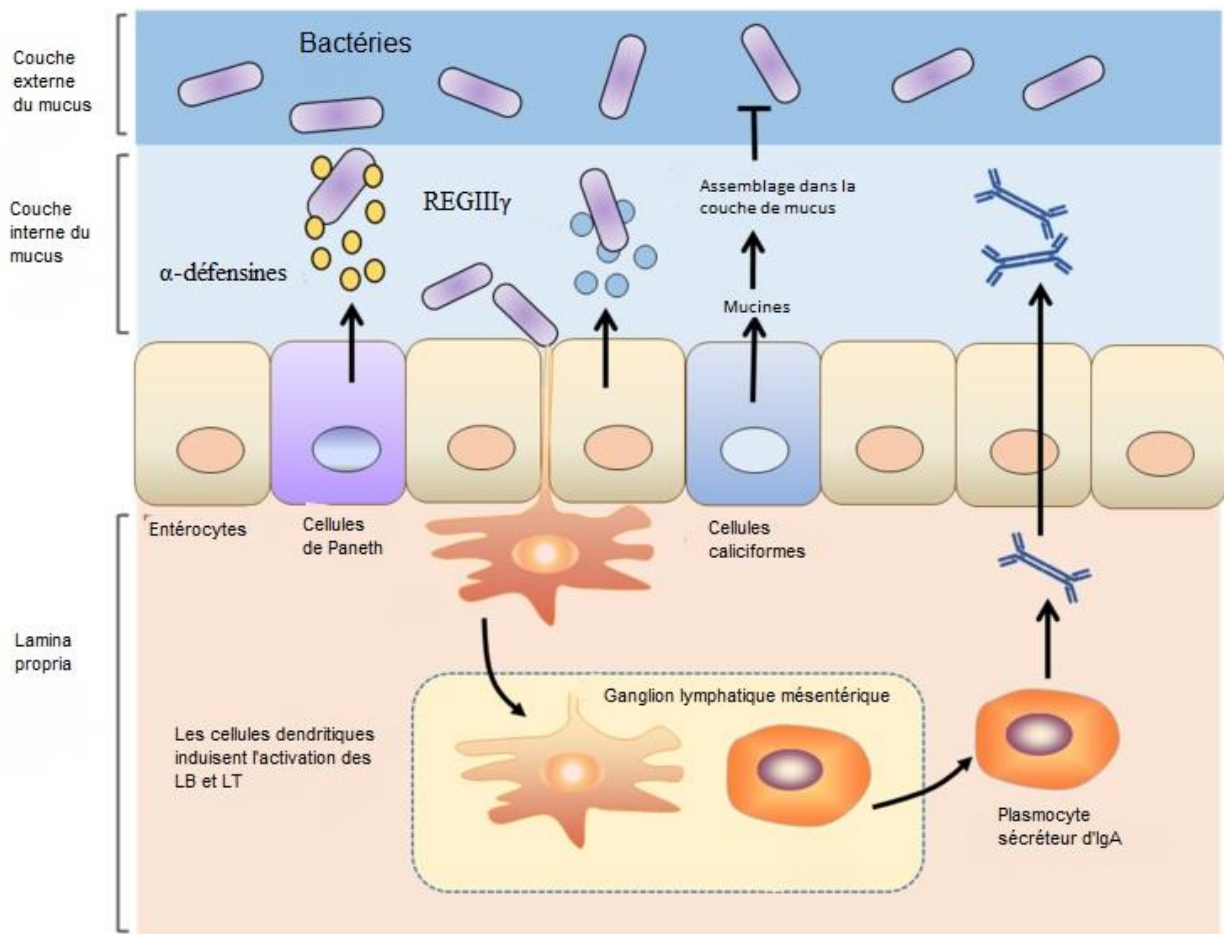


Figure 8 : Régulation des bactéries intestinales par le système immunitaire mucosal

Les cellules caliciformes sécrètent le mucus, limitant le contact entre l'épithélium intestinal et les bactéries. Dans la réponse immunitaire innée, les entérocytes et les cellules caliciformes peuvent sécréter également des peptides antimicrobiens tels que les α -défensines ou REGIII γ . Les cellules dendritiques (ou cellules présentatrices d'antigènes) participent à la réponse immunitaire humorale, en séquestrant grâce à leurs pseudopodes des antigènes bactériens dans la lumière intestinale. Ces antigènes sont ensuite présentés à des lymphocytes B naïfs au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques. Les lymphocytes B activés vont ensuite se transformer en plasmocytes sécréteurs d'IgA.

Illustration modifiée d'après (Peng *et al.*, 2021) .

Hoebler, 2006). Il protège également les cellules de l'épithélium de l'acidité gastrique de l'estomac ou des enzymes de digestion à effet abrasif. Les nombreuses ramifications glycaniques rendent également l'action des enzymes protéolytiques plus difficile.

Le mucus joue également un rôle de filtre en fonction de la taille des molécules et des micro-organismes : il bloque les particules de grandes tailles et retarde la progression des autres vers l'épithélium (Szentkuti and Enss, 1998). Son épaisseur varie selon les régions de l'intestin. La couche du mucus est fine dans les régions hautes de l'intestin (où la quantité de bactérie est également faible) et elle s'épaissit en fonction du gradient de concentration bactérienne (Atuma *et al.*, 2001). Néanmoins ces chiffres sont variables selon les modèles d'études *in vivo* et les outils utilisés (Paone and Cani, 2020).

La fonction de barrière physique du mucus est assurée également par le renouvellement constant de la couche supérieure du mucus et de la sécrétion continue des mucines sécrétées avec 10 litres par jour, qui favorise la présence d'une épaisse couche de mucus à la surface des épithéliums intestinaux (Cone, 2009).

I-2-4-2 Une barrière chimique : mucus et système immunitaire

La couche de mucus est la première ligne de défense de la réponse **immunitaire innée** et participe à la mise en place de la **réponse immunitaire adaptative** en séquestrant des antigènes bactériens (**Figure 8**).

Les IgA, responsables de la réponse humorale, sont séquestrées au niveau de la couche de mucus qui concentre également une forte quantité de bactéries. Ces IgA peuvent venir séquestrer la bactérie ciblée, ralentissant ainsi sa mobilité et sa diffusion au sein de la couche de mucus (Tsuji *et al.*, 2008; Slack *et al.*, 2014). Le système immunitaire produit également des médiateurs qui **agissent sur la sécrétion du mucus par les cellules caliciformes**. Des souris déficientes pour la production d'interleukines 10 (IL-10) présentent une couche de mucus plus perméable à l'entrée des bactéries (Johansson *et al.*, 2014). Les souris *IL-18^{-/-}*, quant à elles, ont un défaut de maturation des cellules caliciformes (Nowarski *et al.*, 2015).

I-2-4-3 Transduction de signaux cellulaires

En plus de son rôle de barrière physico-chimique le mucus participe également à la **transmission de signaux cellulaires**. En effet, les mucines transmembranaires sont situées à

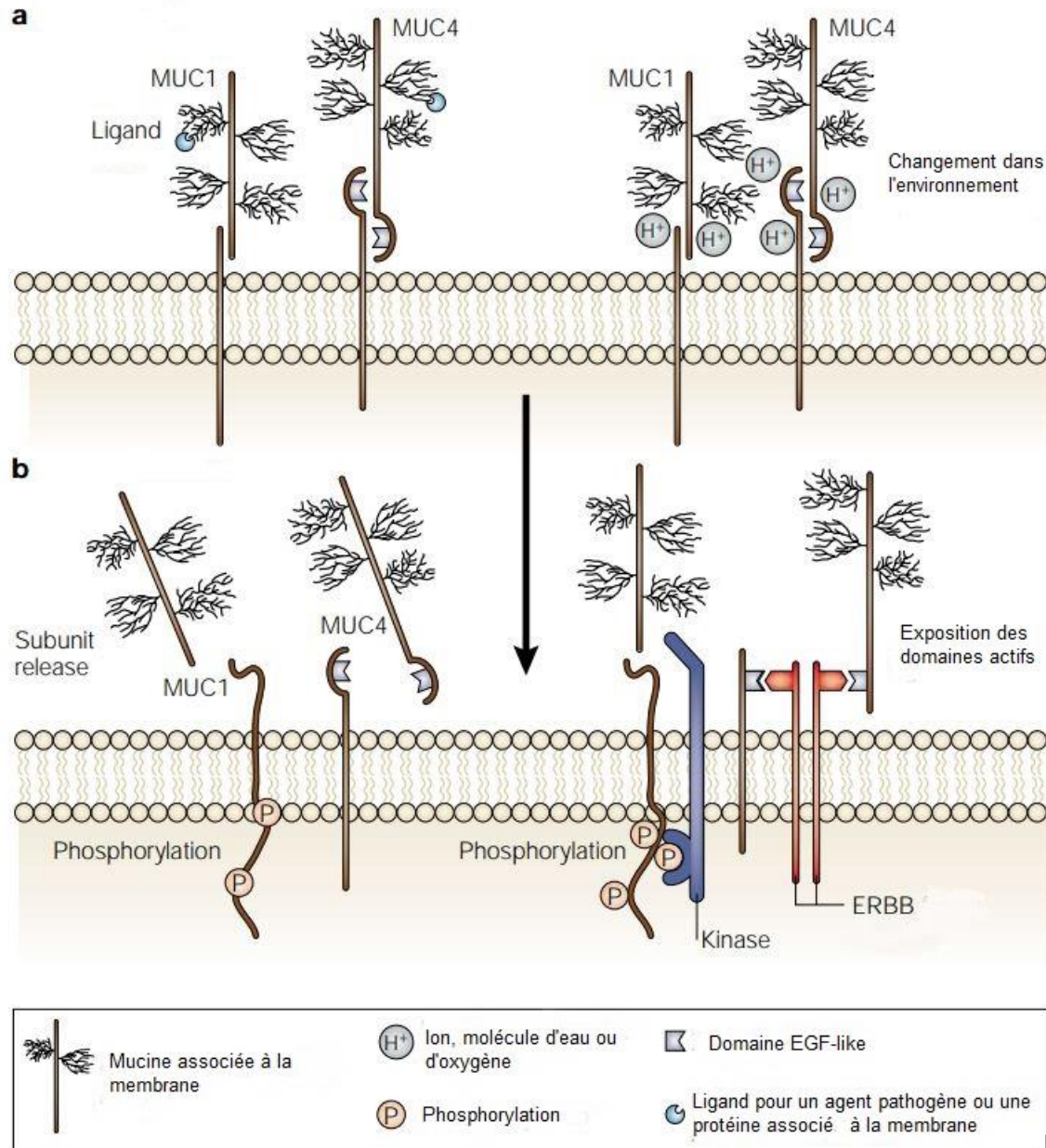


Figure 9 : Mucines transmembranaires, récepteurs et senseurs de l'environnement

(a) Les mucines transmembranaires *via* leur partie N-terminale exposée à la lumière intestinale, sont des ligands pour de nombreuses molécules telles que les lectines, les sélectines ou encore des molécules biologiques ou bactériennes. Elles sont sensibles aux paramètres environnementaux : pH, taux d'hydratation et d'oxygénation.

(b) La partie C-terminale des mucines transmembranaires possède des sites de phosphorylation qui, à la suite de l'activation par un ligand, peuvent changer de conformation, et ainsi recruter des molécules participant à la signalisation cellulaire (comme celles de la famille ERBB) et des facteurs de transcription.

Illustration modifiée d'après (Hollingsworth and Swanson, 2004).

l'interface entre la lumière intestinale et le cytoplasme des cellules de l'épithélium et agissent comme des **senseurs moléculaires** (Hollingsworth and Swanson, 2004).

Elles peuvent servir de ligands pour des lectines, sélectines ou autres molécules biologiques ou microbiennes pathogènes via la **partie N-terminale** exposée dans la lumière intestinale (**Figure 9A**). **MUC1** est une mucine transmembranaire, qui recouvre la majorité des épithéliums du tube digestif et elle est impliquée dans les **mécanismes d'adhésion, de prolifération et d'apoptose cellulaire ce qui en fait un acteur clé de la carcinogénèse** (Quin and McGuckin, 2000; Wei *et al.*, 2005). En effet, en cas de transformation et de perte de polarité des cellules épithéliales, MUC1 est présent à des niveaux élevés dans le cytosol et sur toute la surface des cellules carcinomateuses (Cao *et al.*, 1997). La **partie C-terminale intracellulaire** de MUC1, possède de nombreux sites de phosphorylation et peut permettre de recruter des facteurs de transcription (**Figure 9B**). Elle participe à la polarisation des cellules épithéliales en se liant à ERBB2, un récepteur des tyrosines kinases. MUC1 interagit aussi avec divers acteurs de la réponse inflammatoire, comme le complexe IKK kinase (Ahmad *et al.*, 2007) ou encore des molécules impliquées dans la prolifération comme la β -caténine, un facteur de transcription nucléaire (Balducci *et al.*, 2004).

I-2-4-4 Une niche écologique pour le microbiote

Le mucus s'avère être un espace complexe où cohabitent de multiples micro-organismes (bactéries, champignons, phages, virus). Dans le tube digestif il peut donc s'avérer difficile pour une bactérie de s'implanter dans cet écosystème complexe.

Compétition pour les sites d'adhésion

Les bactéries, qui ont la capacité d'adhérer aux motifs glycosylés du mucus *via* des **molécules d'adhésion** (adhésines spécifiques, pili, flagelles), colonisent plus facilement l'épithélium intestinal (Ouwerkerk *et al.*, 2013). C'est le cas de la souche probiotique* *Lactobacillus rhamnosus* qui produit un pilus se liant aux mucines *via* des liaisons électrostatiques (Kankainen *et al.*, 2009). Les bactéries de la flore commensale peuvent rentrer également en compétition pour les sites d'attachement du mucus et empêcher la fixation de bactéries pathogènes qui sont présentes de manière transitoire dans le tube digestif. Les adhésines sont aussi décrites chez les bactéries associées à des pathologies digestives,

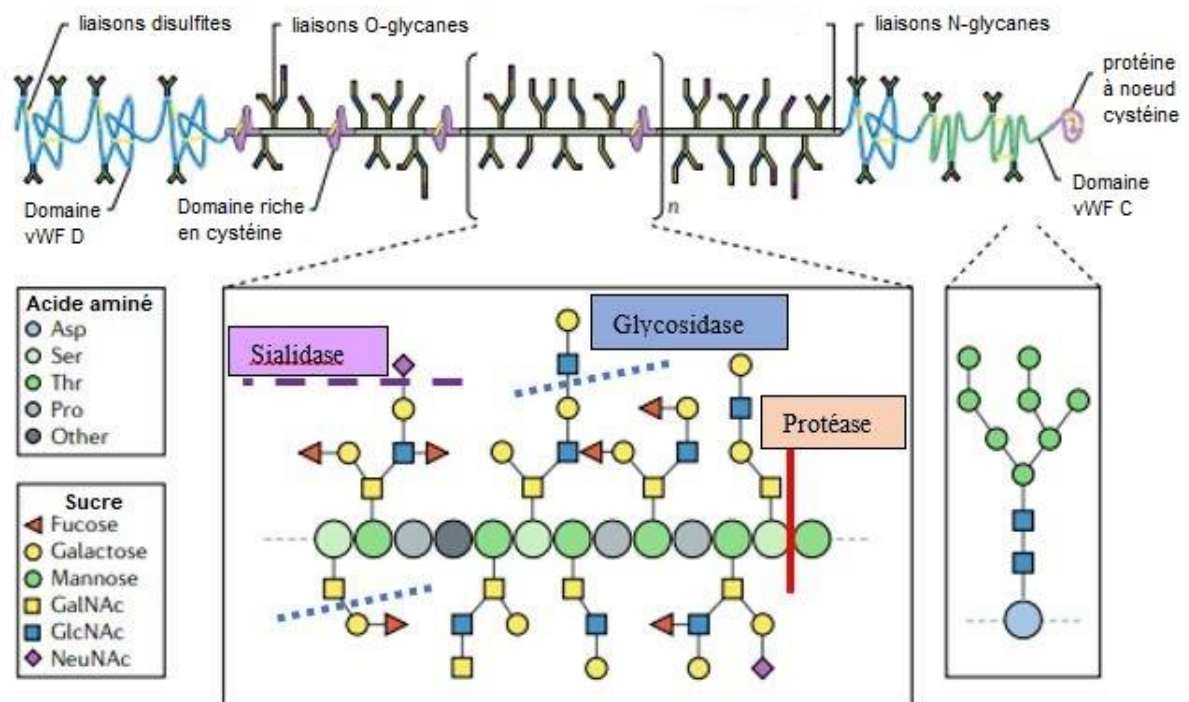


Figure 10 : Enzymes clivant les mucines

Illustration modifiée d'après (Werlang *et al.*, 2019)

FimH, par exemple est une adhésine qui permet la fixation des AIEC, *E. coli* adhérent-invasif (AIEC) qui sont des bactéries associées à la maladie de Crohn (Dreux *et al.*, 2013).

Compétition pour les sources de nutrition

Le mucus peut être dégradé par une grande variété d'enzymes bactériennes (glycosidases, sulfatases, sialidases, etc.) qui vont libérer des glycanes servant au métabolisme des bactéries. Ces enzymes confèrent donc aux bactéries les produisant un avantage compétitif pour coloniser la muqueuse. Les résidus O-glycanes présents au niveau de MUC2 sont une **source de nutriments** pour de nombreuses bactéries dites **mucohydrolases** telles que *Akkermansia muciniphila* ou *Ruminococcus gnavus* (Png *et al.*, 2010; Schroeder, 2019). À l'inverse, les *E. coli* sont incapables d'utiliser les polysaccharides complexes du mucus (Hoskins *et al.*, 1985), mais ils peuvent s'associer à d'autres bactéries comme les *Bacteroides thetaiotaomicron* qui vont dégrader les oligosides en monosaccharides ou disaccharides qui, eux, pourront être utilisés par les *E. coli* (Fabich *et al.*, 2008; Conway and Cohen, 2015). *Martens et al.*, ont montré que le mutant de *B. thetaiotaomicron* incapable de dégrader les O-glycanes colonisait moins bien le tube digestif de souris axéniques, comparativement à la souche sauvage (Martens *et al.*, 2008), suggérant que le mucus est une source de nutriments importante pour la colonisation intestinale.

I-2-5 Dégradation du mucus par les bactéries

Du fait de la structure complexe du mucus, le mécanisme de dégradation s'avère être un enjeu complexe pour la bactérie faisant intervenir plusieurs enzymes. Certaines bactéries sont capables de dégrader des résidus sulfates et acides sialiques à l'aide de sulfatases et de sialidases, d'autres peuvent déconstruire les résidus sucrés grâce à des **glycosidases**, cependant pour dégrader le squelette protéique elles doivent posséder des **protéases** pour couper les liaisons peptidiques (**Figure 10**).

I-2-5-1 Les glycosidases bactériennes

Avant de pouvoir utiliser les composants carbonés des sucres comme source d'énergie, les bactéries doivent d'abord avoir la capacité d'accéder à ces longues chaînes glycosylées qui composent le mucus (**Figure 10**). En effet l'extrémité de ces chaînes ramifiées est décorée

d'un acide sialique qui doit être clivé par des **sialidases**. *B. thetaiotaomicron* possède de telles enzymes, néanmoins elle n'est pas capable de cataboliser ce sucre, le rendant accessible comme source nutritive pour d'autres bactéries comme le pathogène *Clostridium difficile* ou *Salmonella* Typhimurium (Ng *et al.*, 2013). Une fois ce motif retiré, les *Bacteroides*, grâce à diverses glycosylases, peuvent dégrader et utiliser les sucres issus des chaînes glycosylées pour leur croissance. Contrairement à ce dernier exemple, certaines bactéries possèdent un ensemble d'enzymes leur permettant de dégrader la couche de mucus, c'est le cas d'*Akkermansia muciniphila*, qui possède 35 glycosyl hydrolases, 13 protéases, 11 sulfatases et 2 sialidases (van Passel *et al.*, 2011).

I-2-5-2 Les protéases bactériennes

La dégradation du squelette peptidique de la couche de mucus colique nécessite l'action de protéases (**Figure 10**). Les bactéries produisant des **mucine-protéases** ont essentiellement été décrites chez des bactéries entéro-pathogènes telles que *Vibrio cholerae* et certaines entérobactéries comme *Shigella flexneri*, les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC), entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) ainsi que les *E. coli* adhérent-invasif (AIEC) qui sont des bactéries associées à la maladie de Crohn (Silva *et al.*, 2003; Parham *et al.*, 2004; Dautin, 2010; Gibold *et al.*, 2016). Pour coloniser les muqueuses et envahir l'hôte, les micro-organismes pathogènes doivent traverser la barrière de mucus puis se fixer au pôle apical des cellules épithéliales. Les mucine-protéases, en clivant les liaisons peptidiques des mucines, diminueraient la viscosité du mucus et favoriseraient la pénétration des micro-organismes en profondeur favorisant l'accès à l'épithélium (Martens *et al.*, 2018). Les mucine-protéases hydrolysent les liaisons peptidiques des mucines en activant une molécule d'eau du site catalytique. Ces protéases peuvent être divisées en deux groupes : les **métalloenzymes** qui utilisent un ion métallique pour activer la molécule d'eau catalytique et les **protéases à sérine** qui, elles, utilisent un résidu sérine.

Dans le cadre de mon manuscrit de thèse, nous nous focaliserons sur les mucine-protéases des Escherichia coli qui seront décrites plus précisément dans la partie III-2-6 du manuscrit.

Cette dégradation du mucus a donc un effet direct sur l'accès des pathogènes à l'épithélium intestinal.

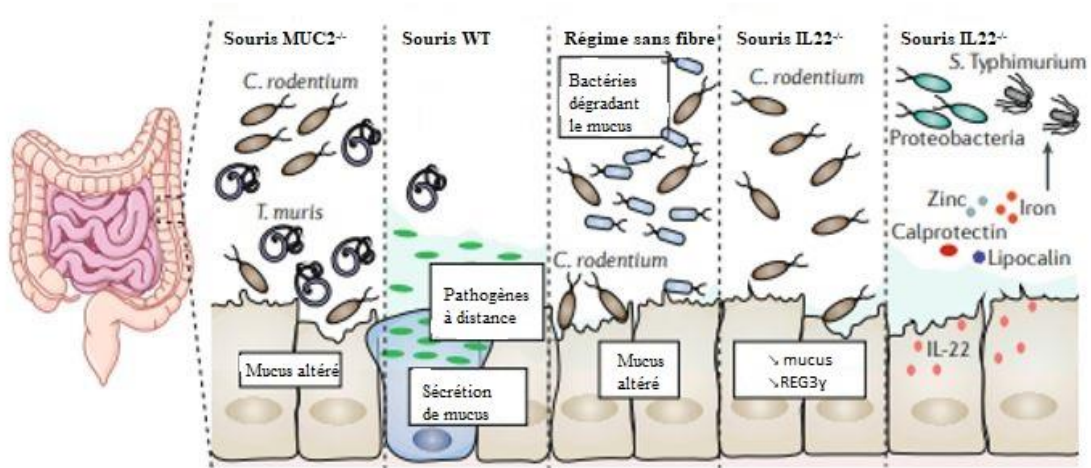


Figure 11 : Adaptation des pathogènes intestinaux : colonisation et invasion de la barrière mucosale au niveau colique

Les souris *Muc2^{-/-}* présentent une couche de mucus colique altérée, ce qui facilite la progression de pathogènes comme *Citrobacter rodentium* ou le nématode *Trichuris muris*. La présence d'une couche de mucus intacte permet de tenir les pathogènes intestinaux à distance des cellules. Cette couche de mucus peut également être altérée par le régime alimentaire, car un régime dépourvu de fibres entraîne une augmentation des bactéries dégradant le mucus. L'intégrité de la couche est aussi dépendante de l'inflammation. Des souris déficientes dans la production de l'IL-22 ont une production de mucus réduite, ainsi que des peptides antimicrobiens REG3γ et sont plus sensibles à l'infection *C. rodentium*.

Illustration modifiée d'après (Martens *et al.*, 2018)

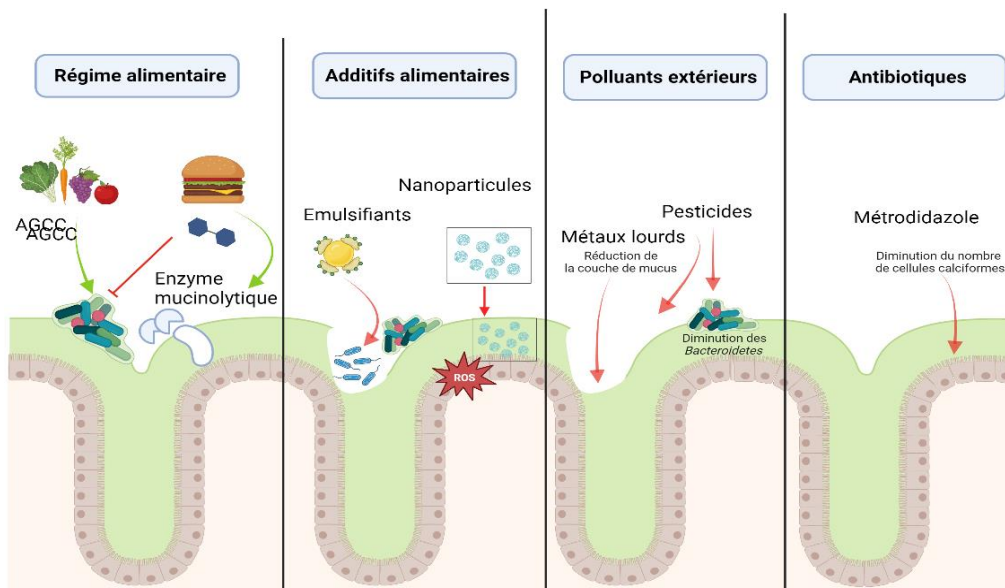


Figure 12 : Altérations de la barrière mucosale

Illustration modifiée d'après (Etienne-Mesmin *et al.*, 2019)

Les composants du mucus peuvent également influencer le **comportement des bactéries** en augmentant ou diminuant l'expression de facteurs de virulence (**Figure 11A**). La régulation de ces enzymes mucolytiques peut s'avérer être différente en fonction du mode de croissance des bactéries. La croissance en **biofilm** permet la coopération de plusieurs bactéries et permet ainsi à *C. difficile* de croître dans un milieu dépourvu de glucose en utilisant les sucres libérés par les glycosides hydrolases d'*A.muciniphila*, de *B. thetaiotaomicron*, et de *Ruminococcus torques*. (Engevik *et al.*, 2021).

I-2-6 Altération du mucus

I-2-6-1 Altération du mucus par des facteurs extrinsèques

L'étude de l'altération de la couche de mucus dans de nombreux modèles murins a permis de comprendre l'importance de son intégrité pour protéger l'hôte contre les bactéries intestinales (**Figure 11**). L'équilibre de cet écosystème est complexe et fragile, et il peut être rompu par des **paramètres internes ou externes** à l'hôte (**Figure 12**).

La structure viscoélastique du mucus peut être altérée par le pH, la force ionique, le degré d'hydratation ou encore la présence de protéases endogènes (Bansil and Turner, 2018). Des **facteurs extrinsèques** peuvent aussi venir altérer la barrière mucosale.

L'**alimentation** des régimes dits « occidentaux » est pauvre en fibres et riche en matières grasses et en sucres. Des souris, nourries avec ce type régime (*high fat / high sugar* HF/HS), présentent une perméabilité de la couche de mucus intestinale plus importante que celle des souris ayant un régime dit équilibré (Schroeder *et al.*, 2018). De plus, l'ingestion à ces souris sous régime HF/HS d'une souche probiotique telle que *Bifidobacterium longum* ou d'un prébiotique* tel que l'inuline, permet de restaurer la barrière mucosale intestinale. L'effet observé chez ces souris pourrait impliquer une modification du microbiote intestinal. En effet, l'alimentation peut directement impacter la proportion de bactéries dégradant le mucus (Martens *et al.*, 2018). Certaines bactéries sont également capables de changer de source d'énergie carbonée en fonction des nutriments biodisponibles. *B. thetaiotaomicron*, quand l'alimentation est dépourvue des polysaccharides nécessaires à son développement, est

capable de s'adapter et active la transcription de gènes codant des enzymes capables de dégrader le mucus, afin de l'utiliser comme nouvelle source d'énergie (Sonnenburg *et al.*, 2005). À l'inverse, les fibres et les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont des facteurs qui ont démontré leur impact protecteur sur l'épaisseur de la couche de mucus (Suriano *et al.*, 2022).

Les **additifs alimentaires** sont très présents dans l'alimentation occidentale car les industriels les utilisent pour préserver ou modifier les propriétés structurales de nombreux aliments que nous consommons. Les émulsifiants, par exemple, permettent de modifier les textures et le goût d'aliments transformés comme le Tween-80 (ou E433) ou le carboxyméthylcellulose (CMC ou E466) que l'on retrouve dans les pâtisseries, les crèmes fraîches ou encore les chewing-gums. Ces deux **émulsifiants**, quand ils sont administrés à des souris, seraient responsables de l'induction d'une inflammation à bas bruit et d'une dysbiose* bactérienne avec une augmentation des bactéries aux propriétés mucolytiques comme *Ruminococcus gnavus* (Chassaing *et al.*, 2015). Dans ce même article, les souris ayant reçu ces émulsifiants, présentaient également une desquamation de la surface épithéliale et une **altération de la perméabilité de la couche mucus** facilitant l'accès des bactéries à la surface de l'épithélium. Chez les souris ayant reçu des émulsifiants alimentaires, une réduction de la distance entre les bactéries et l'épithélium a été observée (Chassaing *et al.*, 2015). Le **dioxyde de titane (TiO₂)**, sous forme de nanoparticules, est un additif alimentaire (E171) qui a récemment été interdit dans l'Union Européenne (janvier 2022). Il était utilisé dans la composition des pâtisseries, des soupes ou également des chewing-gums (Peters *et al.*, 2014) et de nombreuses études aujourd'hui sont disponibles portant sur les interactions entre l'E171 et le mucus (Koeneman *et al.*, 2010; Dorier *et al.*, 2017). L'E171, quand il est administré par voie orale à des rats, est capable de traverser la couche de mucus, d'induire au niveau de cellules de l'épithélium du stress oxydant et d'initier des pré-lésions néoplasiques coliques (Bettini *et al.*, 2017).

Les **polluants environnementaux** ont également des effets sur la structure et la composition du mucus. L'Homme est exposé dans son quotidien à de nombreux **métaux lourds** comme le mercure, retrouvé dans les produits de la mer, ou le cadmium, issu des pesticides et fertilisants, qui se retrouve dans la matière organique et dans notre chaîne alimentaire. Des rats, ayant ingéré une forte concentration de cadmium (15 µg/mL) dans leur eau de boisson pendant 30 jours, présentent une diminution de l'épaisseur de la barrière mucoale gastrique (Asar *et al.*, 2000). Les **pesticides** peuvent aussi impacter la couche de

mucus : l'imazalil est un fongicide qui se retrouve dans les fruits et les légumes ingérés par l'Homme. L'exposition chronique de souris mâles adultes à des doses de 2,5 mg/kg de poids corporel d'imazalil diminue l'expression des mucines Muc2 dès 2 semaines et entraîne une dysbiose avec une diminution des *Bacteroidetes* (Jin *et al.*, 2018).

La **prise d'antibiotiques** peut aussi altérer la couche de mucus de manière indirecte en modifiant la composition des bactéries présentes au niveau du mucus (Chen *et al.*, 2020a). De plus, dans les modèles murins conventionnels, l'étude de l'implantation d'une ou plusieurs bactéries nécessite souvent l'utilisation d'antibiotiques pour déstabiliser les niches écologiques commensales et permettre l'implantation de la souche souhaitée. Pour cela, des antibiotiques à large spectre sont couramment utilisés néanmoins ceux-ci peuvent avoir un impact direct sur la couche de mucus. En effet, l'administration de métronidazole à des souris a montré une diminution du nombre et de la fonction des cellules caliciformes, alors que la streptomycine n'a pas montré d'impact sur l'intégrité de la couche de mucus des souris congénères infectées parallèlement (Wlodarska *et al.*, 2011). Cet effet est notamment expliqué par l'action drastique du métronidazole sur le microbiote qui réduit les populations de *Porphyromonadaceae* et augmente les lactobacilles.

I-2-6-2 Altération du mucus et développement tumoral

L'expression de la mucine MUC2 semble négativement corrélée à l'apparition de tumeurs coliques. Des souris *Muc2^{-/-}*, incapables de produire la principale mucine sécrétée au niveau colique, présentent des anomalies structurelles au niveau de l'épithélium colique, avec des cryptes à la morphologie anormale, un défaut de maturation et de migration des cellules caliciformes et donc une réduction de la couche de mucus (Velcich *et al.*, 2002). Velcich *et al.*, ont observé que les souris *Muc2^{-/-}* **développaient spontanément des adénomes intestinaux**, aux propriétés invasives. Quelques années après, cette même équipe a mis en évidence les mécanismes cellulaires impliqués en croisant des souris *Muc2^{-/-}* avec un modèle murin génétiquement modifié développant spontanément des tumeurs, les souris *Apc^{Min/+}* (Yang *et al.*, 2008). En comparant les souris *Muc2^{-/-}/Apc^{Min/+}* et les souris *Apc^{Min/+}*, ils ont démontré que la délétion du gène codant pour la protéine Muc2 exacerbe le phénotype tumoral et la réponse inflammatoire dans un contexte de cancer colorectal. Notons également que l'expression de MUC2 est régulée négativement dans les tumeurs colorectales d'origine humaine (Imai *et al.*, 2013).

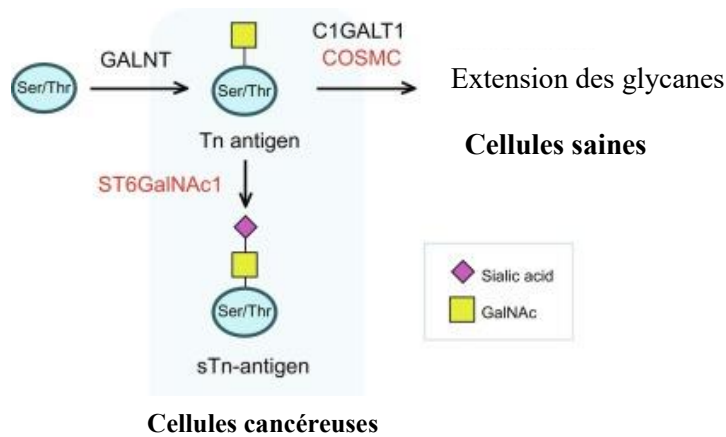


Figure 13 : Représentation de l'antigène sialylé Tn dans les cellules cancéreuses

Sur les motifs sérines et thréonines l'enzyme GALNT vient apposer un motif N-acétylgalactosamine (GalNAc), ce qui forme l'**antigène Tn** retrouvé dans les cellules saines mais aussi dans les cellules cancéreuses. L'enzyme C1GALT1 est responsable de la prise en charge de l'extension des ramifications glycosidiques formant la structure « core-1 » des glycanes. La protéine chaperonne COSMC permet le repliement et la formation de la molécule. Des mutations dans les gènes *C1GALT1* et *COSMC*, aboutissent à la formation de l'**antigène sialylé sTn**. L'antigène Stn est associé à de nombreux cancers dont le cancer du côlon.

Illustration modifiée d'après (Munkley, 2016)

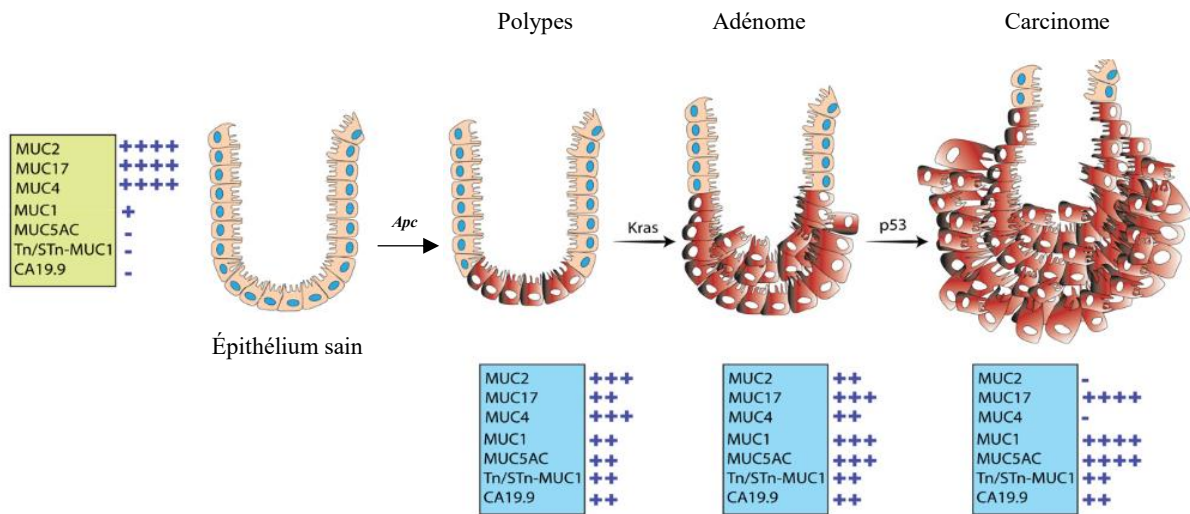


Figure 14 : Expression des mucines dans le développement du cancer

Le développement du cancer colorectal est la résultante de l'accumulation de mutations au cours du temps, notamment dans les gènes *Apc*, *Kras* et *TP53*, qui découle de la transformation d'un épithélium sain vers un carcinome. Ces mutations sont accompagnées de modifications dans l'expression des gènes codants pour les mucines. Ainsi la diminution de l'expression de MUC2 est corrélée à une augmentation du nombre de polypes alors que la surexpression de MUC1 au niveau des tumeurs est plutôt associée à un phénotype invasif.

Modifiée d'après (Pothuraju *et al.*, 2020).

Des modifications sur les **O-glycosylations** de la couche de mucus peuvent être impliquées dans les mécanismes tumorigènes. *Fu et al.*, ont utilisé des souris génétiquement modifiées incapables de produire l'enzyme C1GALT1 (*Fu et al.*, 2011). Cette enzyme est responsable de l'ajout de groupements glycosylés sur le motif GalNAc α 1-O-Ser/Thr, aussi appelée **Tn antigène** (ou motif Core 1), des mucines. Ce motif Core 1 est exprimé dans les cellules des tissus sains mais il est surexprimé dans les cellules cancéreuses (*Ju et al.*, 2014). Si l'enzyme C1GALT1 n'est pas fonctionnelle, c'est la transférase ST6GalNac1 qui va prendre en charge la glycoprotéine néoformée, pour ajouter un groupement acide sialique et former « **l'antigène sTn** » (*Fu et al.*, 2016) (**Figure 13**). Les souris, délétées pour le gène permettant la synthèse de l'enzyme *C1GALT1*, développent spontanément une inflammation du côlon, des abcès au niveau des cryptes intestinales et des prolapsus rectaux (protrusion du rectum à travers l'anus). Elles présentent également une couche de mucus perméable au passage des bactéries intestinales (*Fu et al.*, 2011).

Trois motifs structurels des mucines ont été retrouvés associé au CCR : l'antigène Tn (GalNAc α Thr/Ser), l'antigène TF (Gal β 3GalNAc) et l'antigène sialyl Tn (NeuAc α 6GalNAc) (*Byrd and Bresalier*, 2004).

Plusieurs mucines transmembranaires se sont révélées pathologiquement exprimées et impliquées dans la tumorigenèse du CCR (*Rachagani et al.*, 2009; *Pothuraju et al.*, 2020) (**Table 1-Figure 14**). Par exemple, une expression anormale de MUC15 a été observée dans les tumeurs colorectales (ARNm et protéines) par rapport aux tissus normaux et son expression augmente le potentiel invasif des cellules colorectales (*Huang et al.*, 2009). MUC1 et MUC3 ont une expression significativement plus élevée dans les lésions malignes du côlon et elles sont associées à un mauvais pronostic (*Kesari et al.*, 2015). Dans les cellules épithéliales sécrétoires, MUC1 est normalement exprimée sur les bords apicaux, mais dans les cellules tumorales, son expression est répartie sur toute la surface cellulaire (*Gendler*, 2001).

La déstabilisation de la couche de mucus a aussi été associée dans les travaux de *Ijssennagger et al.*, avec une alimentation riche en fer héminique et la présence dans le microbiote de bactéries productrices de sulfure d'hydrogène (*Ijssennagger et al.*, 2015). Dans cette étude, les souris dont le régime était enrichi en fer héminique présentaient une prolifération épithéliale plus importante que les souris nourries avec un régime contrôle. L'administration d'antibiotiques à ces souris abrogeait les effets observés. Le sulfure

d'hydrogène, produit par les bactéries du microbiote, pourrait fragiliser la couche de mucus protectrice, rendant l'épithélium colique plus exposé au fer héminique cytotoxique.

L'altération de l'expression de plusieurs mucines est associée au **développement de nombreux cancers dont le cancer colorectal** (Table 1). Il semble donc important, pour étudier et comprendre la carcinogenèse colique, d'avoir des modèles *in vitro* et *in vivo* pour étudier le mucus.

I-2-7 Mucus et modèles d'études

Les modèles de cellules épithéliales productrices de mucus

Malgré tous les modèles *in vitro* utilisés pour étudier les cellules du tube digestif, rares sont ceux qui miment la couche de mucus présente dans l'organisme humain (Etienne-Mesmin *et al.*, 2019). À ce jour les modèles de cellules épithéliales coliques productrices de mucus les plus décrits, sont les cellules dérivées de la lignée cellulaire HT29 qui ont été différenciées sous des conditions spécifiques. Les cellules HT29-MTX forment une monocouche de cellules polarisées constituées de cellules caliciformes capables de produire une couche de mucus de 3-5 μm , composée principalement de mucines MUC5AC mais aussi de MUC2 (Navabi *et al.*, 2013). Les cellules HT29-16E (qui secrètent surtout MUC2), quant à elles, ont été également obtenues à partir des cellules épithéliales HT29, en les cultivant avec du butyrate de sodium (Augeron and Laboisse, 1984). La lignée LS174T dérivée de cellules coliques de carcinome est aussi productrice de MUC2 et de MUC5AC (Hews *et al.*, 2017; Escoula *et al.*, 2019). La production de mucus dans ces lignées peut être augmentée quand les cellules sont cultivées sur des filtres *Transwells* avec une stimulation mécanique mimant le péristaltisme intestinal, comme cela a été montré récemment (Elzinga *et al.*, 2021).

Les modèles murins

Les **modèles murins** permettent, quant à eux, d'étudier le rôle biologique en conditions physiologiques ou pathologiques à l'échelle de l'organisme entier. Les données de la littérature rapportent que l'organisation et l'expression des mucines sont bien conservées entre les souris et l'Homme (Nguyen *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2015). Muc2 est également la principale mucine présente au niveau de l'épithélium colique des souris (Johansson *et al.*, 2014). Néanmoins, la composition bactérienne mucosale (Nguyen *et al.*, 2015) et le degré de

glycosylation sont différents chez les souris comparativement au mucus du côlon humain (Holmén Larsson *et al.*, 2013). La mucine colique de l'Homme est riche en O-glycanes de type Core 3 composés d'un N-acetylglucosamine et d'un N-acetylgalactosamine, alors qu'aucune structure de ce type n'a été trouvée dans la composition des mucines Muc2 murines (Capon *et al.*, 2001). La vitesse de renouvellement de la couche de mucus varie également entre les espèces humaines et murines : avec une croissance de 240 $\mu\text{M}/\text{heure}$ chez l'Homme, contre 100 $\mu\text{M}/\text{heure}$ chez la souris (Gustafsson *et al.*, 2012; Johansson *et al.*, 2013; Ermund *et al.*, 2013). Cette vitesse de renouvellement du mucus dépend de nombreux paramètres comme les forces motrices présentes au niveau colique, mais également de la présence d'enzymes bactériennes présentes dans la couche externe du mucus.

I.3 Le microbiote intestinal

Depuis maintenant la fin du 20^{ème} siècle, nous avons été amenés à revoir la manière de comprendre le corps humain et sa physiopathologie en prenant en compte non pas le dysfonctionnement du corps unique, mais plutôt en analysant son écosystème complet. En effet, celui-ci n'est pas composé que de nos propres cellules eucaryotes, mais il est aussi composé de nombreux autres organismes, tels que des champignons, les bactéries et les archées. Néanmoins de nos jours, parmi l'ensemble de ces micro-organismes constituant le microbiote humain, les bactéries restent les plus étudiées car elles apparaissent majoritaires au regard des données de séquençage des génomes microbiens que nous possédons. Les virus représentent quant à eux 5,8% des communautés présentes, alors que les archées et les eucaryotes constituent respectivement 0,8 et 0,5% de notre microbiote (Arumugam *et al.*, 2011). Ainsi, lorsque le terme microbiote intestinal est utilisé, il est souvent sous-entendu microbiote intestinal bactérien.

Historiquement, il était admis que notre corps est composé de 10^{13} cellules et de dix fois plus de bactéries. Néanmoins, pour Judah Rosner, ce rapport a été estimé par Thomas Luckey sans véritable argument (Rosner, 2014). Il aurait évalué la quantité bactérienne dans un gramme de contenu intestinal à 100 milliards de bactéries. En parallèle, il a estimé qu'un individu humain contient en moyenne 1000 grammes d'un tel contenu. Par la suite, c'est le microbiologiste Dwayne Savage qui a associé ces chiffres aux 10 billions de cellules estimées pour le corps humain. C'est ainsi que d'après Rosner, ledit rapport de 10 bactéries pour une cellule a été cité dans de multiples ouvrages sans vraie corrélation scientifique, jusqu'en 2016, où une étude scientifique est venue ré-évaluer le nombre de bactéries contenues dans le corps humain à 10^{13} bactéries. Néanmoins, depuis les outils scientifiques pour quantifier le nombre de bactéries ont évolué. C'est ainsi qu'un nouveau rapport de 1:1 bactérie / cellule a vu le jour dans la communauté scientifique d'après les travaux de l'équipe Ron Milo (Sender et al., 2016). Il est encore néanmoins important de souligner que ces chiffres ne sont encore qu'une estimation.

I-3-1 Composition du microbiote intestinal bactérien

Classifications bactériennes

Dans les années 1970, l'étude de la composition du microbiote intestinal, se faisait majoritairement sur des prélèvements de selles, on estimait donc qu'il n'était qu'un reflet imparfait du microbiote présent dans le tube digestif (Moore and Holdeman, 1974). En effet, la plupart des bactéries anaérobies strictes ne sont pas prises en compte dans ces analyses. Néanmoins, depuis les années 1990 les **approches moléculaires et génomiques** sont venues compléter les **approches culturomiques**. Les scientifiques ont récolté plus de données sur les espèces qui n'étaient pas cultivables ou très difficilement cultivables notamment par l'analyse et le séquençage du gène codant l'**ARN16S** (Clooney et al., 2016). Ce marqueur ubiquiste du règne bactérien possède à la fois des régions conservées sur lesquelles peuvent se fixer les amorces de PCR et des régions hypervariables qui vont être séquencées et produire de courts fragments d'ADN spécifiques. Ceci va permettre de discriminer les différentes espèces bactériennes dans un échantillon donné. Cependant, le fait de générer de courts fragments d'ADN peut introduire rapidement de nombreuses erreurs dans la séquence. C'est pour cela

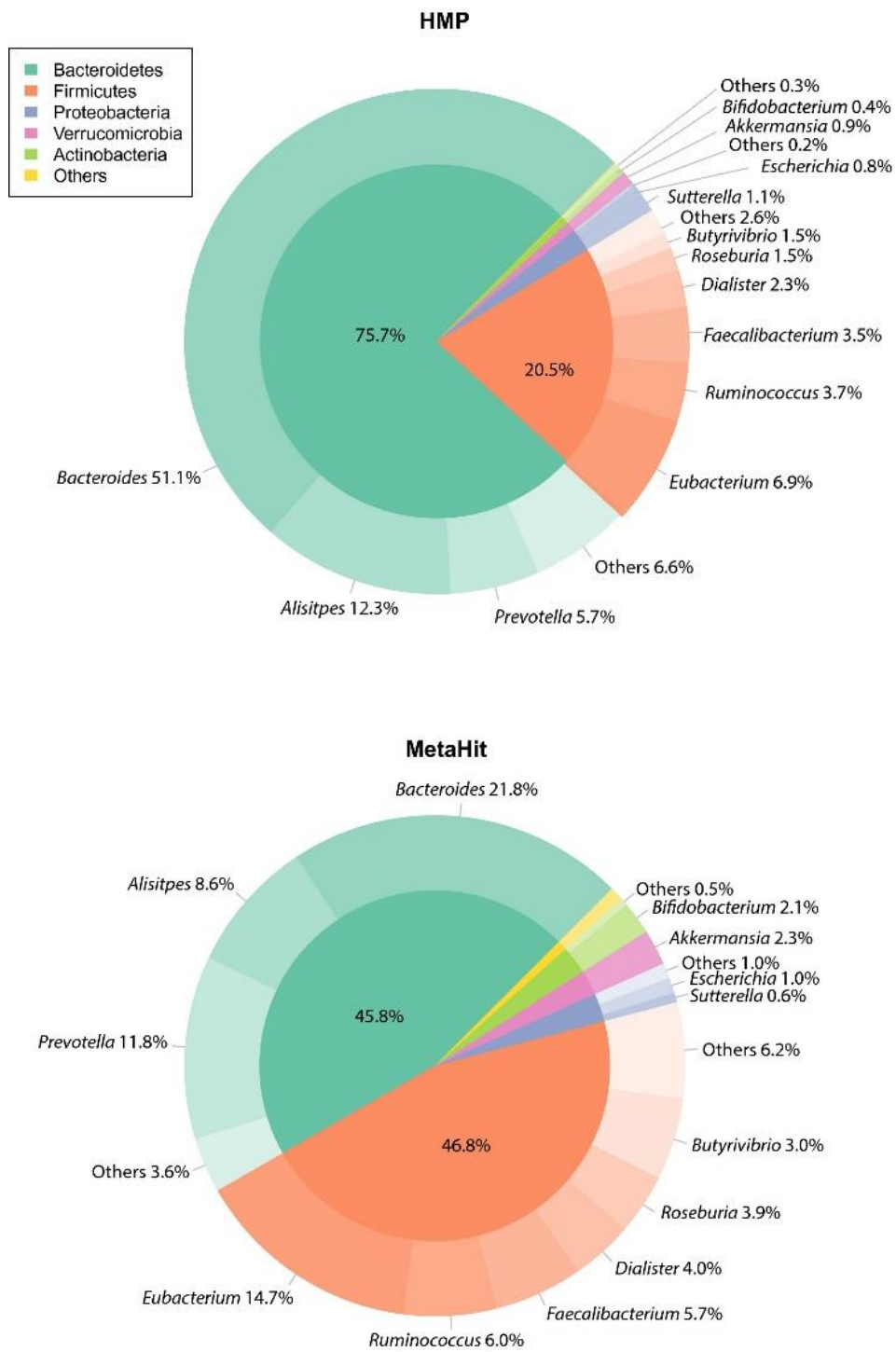


Figure 15 : Arbre phylogénétique de l'abondance des phyla et des genres bactériens du microbiote intestinal humain issus des projets MetaHit et Human Microbiome Project

Illustration modifiée (Arora and Bäckhed, 2016).

qu'aujourd'hui, les techniques de **métagénomiques** ciblant la totalité du génome sont plus couramment utilisées car plus fiables (Poretzky *et al.*, 2014). Grâce à ces techniques, des projets de séquençage du microbiote humain sur de larges populations ont été mis en place afin de comprendre l'implication du microbiote intestinal en santé humaine : MetaHit sur une cohorte européenne (2008-2012), Human Gut Microbiome aux Etats-Unis (2007-2016) ou encore le French Gut, lancé récemment sur une cohorte française et qui finira en 2027 (Arumugam *et al.*, 2011; Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2019).

L'étude du microbiome humain, c'est-à-dire de l'ensemble des génomes ou des gènes qui constitue le microbiote, a révélé que **la diversité intra-individuelle et inter-individuelle fluctue en fonction des microbiotes**. Les projets de séquençage menés ont permis d'identifier les 3 phyla majoritaires du microbiote intestinal qui sont représentés par les *Bacteroidetes* (46-76%), les *Firmicutes* (21-47%), et les *Actinobacteria* (2-25%) (Donaldson *et al.*, 2016) (**Figure 15**). Les *Firmicutes* sont composés principalement des genres *Eubacterium*, *Ruminococcus* et *Faecalibacterium* alors que les *Bacteroidetes* sont représentés par le genre *Bacteroides* et *Prevotella*.

La taxonomie de ces phyla bactériens a récemment été mise à jour par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) : les Firmicutes ont été renommés les Bacillota et les Bacteroidetes et Proteobacteria sont dorénavant appelés respectivement les Bacteroidota et Pseudomonadota (Schoch et al., 2020). Cependant pour une meilleure harmonisation entre les études bibliographiques, l'ancienne taxonomie datant de 2012 sera conservée.

Néanmoins, la diversité des espèces microbiennes au niveau intestinal est importante. Les scientifiques ont réussi à classifier le microbiote humain en 3 **entérotypes**, c'est-à-dire en grands types de communautés microbiennes en fonction de l'abondance de certaines bactéries (Arumugam *et al.*, 2011). Ces entérotypes peuvent être associés avec le type de régime alimentaire et semblent également avoir un intérêt clinique en tant qu'indicateur de risques mais aussi comme outils de diagnostic pour des pathologies digestives (Costea *et al.*, 2018).

- **L'entérotipe 1** est représenté par les *Bacteroides*. L'augmentation de cet entérotipe est associée à un régime de type « occidental » riche en gras et est

corrélée à une diminution de la diversité du microbiote de manière générale qui est un marqueur de mauvaise santé (Le Chatelier *et al.*, 2013).

- **L'entérotype 2** correspond au genre *Prevotella*, que l'on retrouve surtout dans le microbiote des personnes au régime riche en fibres comme les végétariens et en carbohydrates (Wu *et al.*, 2011; Yatsunenکو *et al.*, 2012).
- **L'entérotype 3** est caractérisé par la présence des *Ruminococcus*.

Ces entérotypes ont également pu être mis en corrélation avec un certain nombre de **fonctions métaboliques communes** (Arumugam *et al.*, 2011). Les bactéries fermentatives de l'entérotype 1 possèdent un grand nombre d'enzymes nécessaires au métabolisme des sucres (galactosidases, hexosaminidases...). Les bactéries du genre *Prevotella* (entérotype 2) et *Ruminococcus* (entérotype 3), quant à elles, présentent de nombreuses enzymes capables de dégrader les structures complexes des glycoprotéines du mucus telles que des sulfatases, des sialidases ou des protéases (Wright *et al.*, 2000; Crost *et al.*, 2016).

Dans le tractus intestinal humain, la distribution spatiale du microbiote s'étend selon deux axes, l'un **longitudinal** (de la cavité orale jusqu'au rectum) et l'autre **radial** (de la lumière intestinale jusqu'à la couche du mucus en contact avec les cellules épithéliales).

Axe longitudinal

La quantité de bactéries varie tout le long du tube digestif : l'estomac, le duodénum et le jéjunum sont peu colonisés par le microbiote intestinal, avec environ 10^1 à 10^2 bactéries par gramme de contenu luminal alors qu'au niveau du côlon, ce nombre atteint 10^{13} bactéries par gramme de contenu luminal. La prolifération bactérienne au niveau de la partie supérieure du tube digestif est limitée par différents facteurs tels que le pH acide de l'estomac, le flux luminal qui est rapide à ce niveau, la présence du gel de mucus contenant des IgA et des peptides antimicrobiens. Au niveau du duodénum, il y a également la présence de sels biliaires qui possèdent une activité antimicrobienne (Inagaki *et al.*, 2006). Plus on descend le long du tube digestif, plus le pH augmente, plus le dioxygène se raréfie et plus les conditions sont propices au développement de bactéries non aérotolérantes (Sartor, 2008). Le côlon est le site le plus favorable à la prolifération bactérienne avec un pH proche de la neutralité, peu de sels biliaires, un péristaltisme plus lent et une couche de mucus plus épaisse qui est également une source d'énergie nutritive pour les bactéries (Savage, 1977).

Axe radial

Il existe également des distinctions entre la composition du **microbiote intestinal dit « luminal »** et le **microbiote associé à la muqueuse**. Les différences qui existent entre ces microbiotes sont principalement dues à l'existence d'un gradient de viscosité et de concentration en oxygène et autres ressources nutritives pour les bactéries (Swidsinski *et al.*, 2007). Albenberg *et al.*, ont étudié le microbiote de sujets humains sains pour comprendre ces disparités. La proportion des phyla *Actinobacteria* et *Proteobacteria* (majoritairement représentée par des espèces tolérantes à l'oxygène) est plus importante au niveau de la muqueuse comparativement aux échantillons fécaux (issus du microbiote luminal) (Albenberg *et al.*, 2014). La survie de ces bactéries tolérantes à l'oxygène est facilitée par l'expression d'enzymes bactériennes, comme les catalases ou les peroxydases. Ces enzymes sont capables de transformer les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (pour *reactive oxygen species*) produites par les cellules épithéliales en réponse à un signal de danger (bactérien par exemple). De plus, ils ont démontré que le microbiote associé à la muqueuse était enrichi en bactéries qui utilisent préférentiellement les protéines comme sources d'énergie par rapport au microbiote luminal riche en bactéries saccharolytiques. Certaines bactéries asaccharolytiques des phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes*, sont plus abondantes dans le microbiote associé à la muqueuse que dans le microbiote luminal (Mayrand and Holt, 1988; Albenberg *et al.*, 2014). Les bactéries de la famille des *Lactobacillaceae* sont, elles, largement majoritaires au niveau du microbiote luminal (Walter and Ley, 2011). L'hypothèse d'une interaction mutualiste entre les bactéries utilisant ces deux types de sources nutritives est avancée par plusieurs auteurs (Fischbach and Sonnenburg, 2011; Albenberg *et al.*, 2014).

Malgré la biodiversité et la variabilité inter-individuelle du microbiote, le **métabolome** associé au microbiote semble être conservé entre les individus et les organes concernés (Turnbaugh *et al.*, 2009; Walter and Ley, 2011). C'est pour cela, que les scientifiques ont proposé d'utiliser les notions de répertoire de **fonctions bactériennes communes** (core fonctionnel métabolique) plutôt que la notion de répertoire génique commun (core génome) pour décrire le microbiote (Lozupone *et al.*, 2012).

I-3-2 Fonctions du microbiote intestinal

I-3-2-1 Digestion et production de métabolites

Le microbiote intestinal participe de manière active à **la nutrition et à la biodisponibilité** de certaines molécules. Il est capable de digérer les macronutriments grâce à des enzymes non-synthétisées par l'Homme et de détoxifier les xénobiotiques* (substances étrangères à notre corps). Pour terminer, les bactéries jouent également un rôle clé dans la production de vitamines non-synthétisables par l'Homme comme la vitamine K et B et le métabolisme du tryptophane (Agus and Sokol, 2019; Dominguez-Bello *et al.*, 2019).

En utilisant les produits issus des derniers nutriments du bol alimentaire non-digérés, le microbiote intestinal colique est responsable de la **production de nombreux métabolites** favorables à l'hôte. Ces **fibres alimentaires** aussi appelées polysaccharides sont des sucres complexes (comme l'amidon, l'inuline). Ils sont dégradés par des bactéries possédant des enzymes hydrolytiques pour former des sucres simples, assimilables et des produits intermédiaires (lactate, formate) qui seront transformés par la fermentation en gaz (CO₂, H₂ et SO₄) et en **Acide Gras à Chaîne Courte** (AGCC) (Allaire *et al.*, 2018). La dégradation de certaines chaînes complexes nécessite parfois la coopération de nombreuses enzymes bactériennes (Bernalier-Donadille, 2010). Cette fonction est surtout portée par les bactéries de la flore anaérobie comme *Clostridium* clusters IV et IXa, *Faecalibacterium prausnitzii*, et *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Les trois AGCC majoritairement produits lors de la fermentation sont le propionate, l'acétate et le butyrate. La concentration de ces trois AGCC dans le côlon est relativement constante, avec respectivement 50 à 70 mmol/kg de contenu luminal pour l'acétate, et 15 à 25 mmol/kg pour le propionate et le butyrate (Cummings, 1981). Les AGCC générés par le microbiote intestinal sont ensuite absorbés par les cellules épithéliales du côlon. Le **butyrate** est utilisé par les cellules coliques des cryptes et possède de nombreuses fonctions. Environ 70% de l'énergie utilisée par les colonocytes provient de la transformation du butyrate en corps cétoniques (Papillon *et al.*, 1999). Le butyrate agit également sur les marques épigénétiques en inhibant les HDAC (histone désacétylase) ce qui module la réponse immunitaire des cellules T régulatrices (Furusawa *et al.*, 2013). Il pourrait également prévenir la transformation des cellules souches en cellules cancéreuses (Roediger, 1980; Kaiko *et al.*, 2016). L'**acétate**, quant à lui, est produit majoritairement par les *Bacteroidetes* ; il est utilisé

comme source d'énergie pour de nombreux tissus mais également par les cellules tumorales (Hosios and Vander Heiden, 2014). Le **propionate** est consommé par les hépatocytes et participe à la néoglucogenèse (Hosseini *et al.*, 2011). La régulation de la proportion de ces métabolites permet de maintenir une homéostasie au niveau de la muqueuse colique. *B. thetaiotaomicron* produit de l'acétate qui est consommé par *Faecalibacterium prausnitzii*, qui produit à son tour du butyrate, activant la **production de mucus** et induisant un remaniement du squelette glycosidique sur les protéines de mucines (Wrzosek *et al.*, 2013).

Les bactéries du microbiote sont également capables de déconjuguer les **hormones sexuelles** et **les sels biliaires** provenant de la dégradation du cholestérol dans le foie. Les acides biliaires (AB) primaires issus de la synthèse hépatique sont déconjugués grâce à des enzymes de la classe des hydrolases que l'on trouve notamment chez *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Ridlon *et al.*, 2014). La transformation en AB secondaires (ABII) se fait aussi grâce aux enzymes bactériennes ; ces ABII sont ensuite réabsorbés dans la circulation hépatique, et transformés en AB tertiaires par réoxydation ou éliminés dans les selles après sulfatation.

I-3-2-2 Fonctions trophiques

La présence du microbiote dès les premiers jours de vie induit des **modifications anatomiques et histologiques** au niveau de l'intestin. En comparant l'épithélium de souris axéniques et celui de souris conventionnelles, on constate un ralentissement du transit intestinal et de la motilité intestinale, mais également une diminution de la perméabilité intestinale et du nombre de jonctions serrées chez les souris axéniques (Hayes *et al.*, 2018). Les bactéries de la flore commensale peuvent garantir l'homéostasie de la barrière intestinale grâce à la production des AGCC comme le butyrate qui augmente l'expression des protéines des jonctions serrées, claudine-1 et occludine-1 (Wang *et al.*, 2012).

I-3-2-3 Fonctions neurologiques

De récentes études sur le microbiote se sont intéressées à l'axe « intestin-cerveau ». En effet le tube digestif possède un important réseau de neurones qui compose le **système nerveux entérique** (Rhee *et al.*, 2009b; Mayer *et al.*, 2022). La communication se fait de façon « bidirectionnelle » entre les deux acteurs et l'altération de ce dialogue peut aboutir à des pathologies gastro-intestinales comme le syndrome de l'intestin irritable (SII) (Schwetz

et al., 2003). Les signaux moléculaires qui favorisent cette communication peuvent être **des métabolites** produits par le microbiote comme les AGCC, les molécules issues de la dégradation des polyphénols, des AB, des hormones stéroïdiennes ou des neurotransmetteurs issus de la transformation des acides aminés. Certains **MAMP ou des toxines bactériennes** peuvent également circuler à travers la circulation systémique jusqu'au cerveau pour agir.

I-3-2-4 Défenses de l'hôte par des mécanismes de compétition

Les bactéries commensales peuvent rentrer en **compétition directe pour les sources d'énergie et les sites d'adhésion** qui sont utilisés par les bactéries pathogènes. En occupant la niche écologique, elles protègent l'hôte de l'implantation de souches pathogènes (Earle *et al.*, 2015; Desai *et al.*, 2016). De plus, certaines bactéries commensales sont capables de produire elles-mêmes des **composés antimicrobiens** qui empêchent l'implantation d'autres bactéries, potentiellement pathogènes (Walter and Ley, 2011). Ainsi, des souris dont la flore bactérienne est déplétée par l'utilisation d'antibiotiques sont plus susceptibles à l'implantation de bactéries pathogènes (Bammann *et al.*, 1978; Rupnik *et al.*, 2009).

Le **taux d'oxygène** peut également être modulé par certaines bactéries du microbiote commensal. *Shigella flexneri* est un pathogène responsable de diarrhées aiguës, qui exprime ses facteurs d'invasion en condition anaérobie. D'après les travaux de Marteyn *et al.*, l'expression des facteurs de virulence de *S. flexneri* pourrait être inhibée dans les zones de l'épithélium intestinal riches en oxygène (proche de la lumière intestinale) (Marteyn *et al.*, 2010).

I-3-2-5 Développement du système immunitaire

Le microbiote intestinal participe dès le plus jeune âge à la **mise en place et à la maturation du système immunitaire** et donc la protection de l'hôte contre des micro-organismes pathogènes (Round and Mazmanian, 2009). Chez les animaux axéniques (dépourvus de flore commensale), la sécrétion des peptides antimicrobiens est réduite et ils présentent moins de lymphocytes intra-épithéliaux. Les plaques de Peyer de ces animaux sont également moins actives et plus petites, et le nombre de plasmocytes sécréteurs d'IgA est fortement diminué. Au niveau local et systémique, le niveau des lymphocytes Th1 et Th17 est réduit (Macpherson and Harris, 2004). La colonisation bactérienne du tractus intestinal de souris axéniques permet dès le 4^{ème} jour un changement de morphologie de l'épithélium

colique, une production des molécules de l'immunité innée comme REGIII γ , une production d'IL-10 et une maturation des LT (El Aidy *et al.*, 2012).

La reconnaissance des MAMP commensaux par les PRR permet aux systèmes de défense de l'hôte de stimuler le système immunitaire inné. En effet, cette stimulation permet la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth, la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes et permet de maintenir ainsi l'homéostasie immunitaire intestinale pour prévenir l'implantation de pathogènes. La réponse immunitaire adaptative est également enclenchée *via* les PRR qui induisent la différenciation et l'activation des lymphocytes T régulateurs et des plasmocytes sécréteurs d'IgA.

Les récentes études de Newberry et son équipe ont également dévoilé le rôle central des **cellules caliciformes** dans l'exposition des antigènes luminaux aux CPA et la mise en place d'une **tolérance immunitaire** (Knoop *et al.*, 2015; Gustafsson *et al.*, 2021). Ces cellules vont endocyter des MAMP, à la suite d'une activation des TLR, qui vont être transportés dans la cellule et présentés aux cellules dendritiques situées sous le pôle basal de la cellule. C'est ce qu'on appelle le « passage d'antigènes associés aux cellules caliciformes » (GAP pour *goblet cell-associated antigen passages*). Ce mécanisme n'est pas encore totalement élucidé mais il semble être stimulé par l'acétylcholine et régulé de manière indépendante de la sécrétion de mucus. Le microbiote semble également jouer un rôle de rétrocontrôle dans la régulation de ce mécanisme, car des souris déficientes pour l'expression de MyD88 (impliqué dans la voie de signalisation des TLR) ont un GAP plus important (Knoop *et al.*, 2015). Ces souris présentent aussi une altération de la production des peptides antimicrobiens, une diminution de l'expression de Muc2, de la réponse humorale IgA et une augmentation de la translocation bactérienne (Vaishnava *et al.*, 2008; Frantz *et al.*, 2012; Schoenborn *et al.*, 2019).

Certaines bactéries de la flore commensale du microbiote intestinal, comme *Bacteroides spp* ou *Clostridium spp* sont capables de synthétiser par fermentation des AGCC, comme le butyrate et le propionate. Ces molécules possèdent une activité anti-inflammatoire et peuvent diminuer la dégradation de la protéine I κ B, empêchant la translocation au niveau du noyau du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B (Yin *et al.*, 2001; Tedelind *et al.*, 2007; Puertollano *et al.*, 2014).

Ainsi, si la composition du microbiote intestinal est altérée, cela peut également impacter la régulation du système immunitaire et déstabiliser l'homéostasie intestinale.

I-3-3 Facteurs impactant le microbiote intestinal

Le tractus intestinal humain est colonisé dès le plus jeune âge par le microbiote maternel lors de l'accouchement. Dès cette étape, des modifications du microbiote peuvent être observées. Les enfants nés par césarienne ont une faible abondance* bactérienne et leur microbiote est appauvri en *Bacteroides* par rapport à ceux nés par voie basse (Korpela and de Vos, 2018). Après la naissance, les populations microbiennes colonisent rapidement les épithéliums jusqu'à atteindre 10^{11} bactéries par gramme de selles. Des modifications majeures de la composition intestinale du microbiote se produisent dans les premières années, notamment lors de la diversification alimentaire, avant de rester relativement stable tout au long de la vie au sein d'un même individu (Bäckhed *et al.*, 2015). Lors des dernières années de vie, la diversité de ce microbiote est néanmoins nettement réduite.

Les **facteurs héréditaires** et le **mode de vie** peuvent modifier la composition du microbiote. Ils participent aux différences de microbiote entre les individus. Les facteurs externes, liés entre autres au mode de vie, participent aux modifications du microbiote, transitoire, ou stable, observables au cours de la vie.

Goodrich *et al.*, ont estimé en examinant 416 microbiotes fécaux de jumeaux, que 8,8% de la composition bactérienne du microbiote est liée à des **facteurs héréditaires** (Goodrich *et al.*, 2016). Cette étude a également permis d'identifier des espèces bactériennes dites « héréditaires » en lien avec le mode d'alimentation, au métabolisme et au système immunitaire de la famille. Par exemple, les personnes intolérantes au lactose et porteuses d'un variant spécifique du gène codant la lactase, présentent une augmentation dans les fèces des Bifidobactéries par rapport aux patients sains.

L'**alimentation** a un impact direct et ceci dès le plus jeune âge. Une étude sur le microbiote d'enfants allaités ou ayant reçu du lait infantile, montre une différence dans leur microbiote intestinal. Le premier groupe a révélé un microbiote enrichi en Bifidobactéries et en Lactobacilles là où le second était dominé par les *Enterobacteriaceae* (Bezirtoglou *et al.*, 2011). De plus, une alimentation riche en lipides et en sucres diminue la diversité microbienne comme il a été démontré en modèle murin (Everard *et al.*, 2013). Les additifs alimentaires, présents en grande quantité dans l'alimentation dite « occidentale » sont également des molécules qui diminuent la diversité* microbienne (Gillois *et al.*, 2018). C'est le cas du polysorbate-80 et du carboxyméthylcellulose. Chassaing *et al.*, ont démontré que l'administration de CMC ou de P80 à des souris entraînait des altérations de la composition

du microbiote, caractérisée par une augmentation de son potentiel pro-inflammatoire. En effet, les animaux traités avec les émulsifiants développaient une inflammation intestinale de bas grade chez des souris sauvages, ou sévère chez des souris prédisposées génétiquement (Chassaing *et al.*, 2015; Viennois and Chassaing, 2018). Chez l'Homme, l'impact de la consommation du CMC chez des individus sains a été évalué dans une étude récente (Chassaing *et al.*, 2022). Les individus ont soit suivi un régime alimentaire dépourvu d'émulsifiants, soit un régime enrichi en CMC (15g/jour) durant 11 jours. La consommation de CMC induisait une perturbation de la composition du microbiote intestinal et entraînait des modifications du métabolome fécal, en comparaison aux patients contrôles (sans administration de CMC). Ces observations ont été associées à une réduction de métabolites bénéfiques pour la santé tels que les AGCC et les acides aminés libres. De plus, ces deux émulsifiants peuvent induire l'expression de gènes de virulence chez les AIEC (Viennois *et al.*, 2020) et augmenter leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales en culture, pouvant favoriser la survenue des MICI (Chassaing *et al.*, 2015).

La **consommation d'alcool** et le **tabagisme actif** sont des facteurs qui modifient le microbiote intestinal chez l'Homme (Biedermann *et al.*, 2013; Y *et al.*, 2022). Après 9 semaines d'arrêt de la cigarette, les fumeurs présentaient dans l'étude de Biedermann *et al.*, une augmentation des *Firmicutes* et des *Actinobactéries* au détriment des *Bacteroides* et des *Proteobactéries*.

La **pratique d'une activité physique** a une action positive sur l'augmentation de la diversité et de l'abondance microbienne chez l'Homme (Aya *et al.*, 2021). Par ailleurs, des études menées sur des animaux ont révélé que des rats faisant de l'exercice (courir dans une roue) avait un microbiote enrichi en bactéries productrices de butyrate comparativement au groupe contrôle (Matsumoto *et al.*, 2008).

La prise d'**antibiotique** déstabilise également de manière directe le microbiote intestinal. Byndloss *et al.*, ont traité des souris avec de la streptomycine, un antibiotique à large spectre ciblant les bacilles à Gram négatif et certaines bactéries à Gram positif. Ils ont observé l'apparition d'une dysbiose trois jours après l'administration de streptomycine à des souris. La dysbiose induite par la streptomycine peut rendre les animaux plus sensibles à l'infection de souches pathogènes de la famille des *Enterobacteriaceae* tels que *Escherichia* et *Salmonella* qui peuvent coloniser la niche écologique à la suite du traitement par antibiotiques (Byndloss *et al.*, 2017). C'est également le cas lors des infections à *Clostridium difficile* post-antibiothérapie. Les patients porteurs de *C. difficile* ont une diversité et une

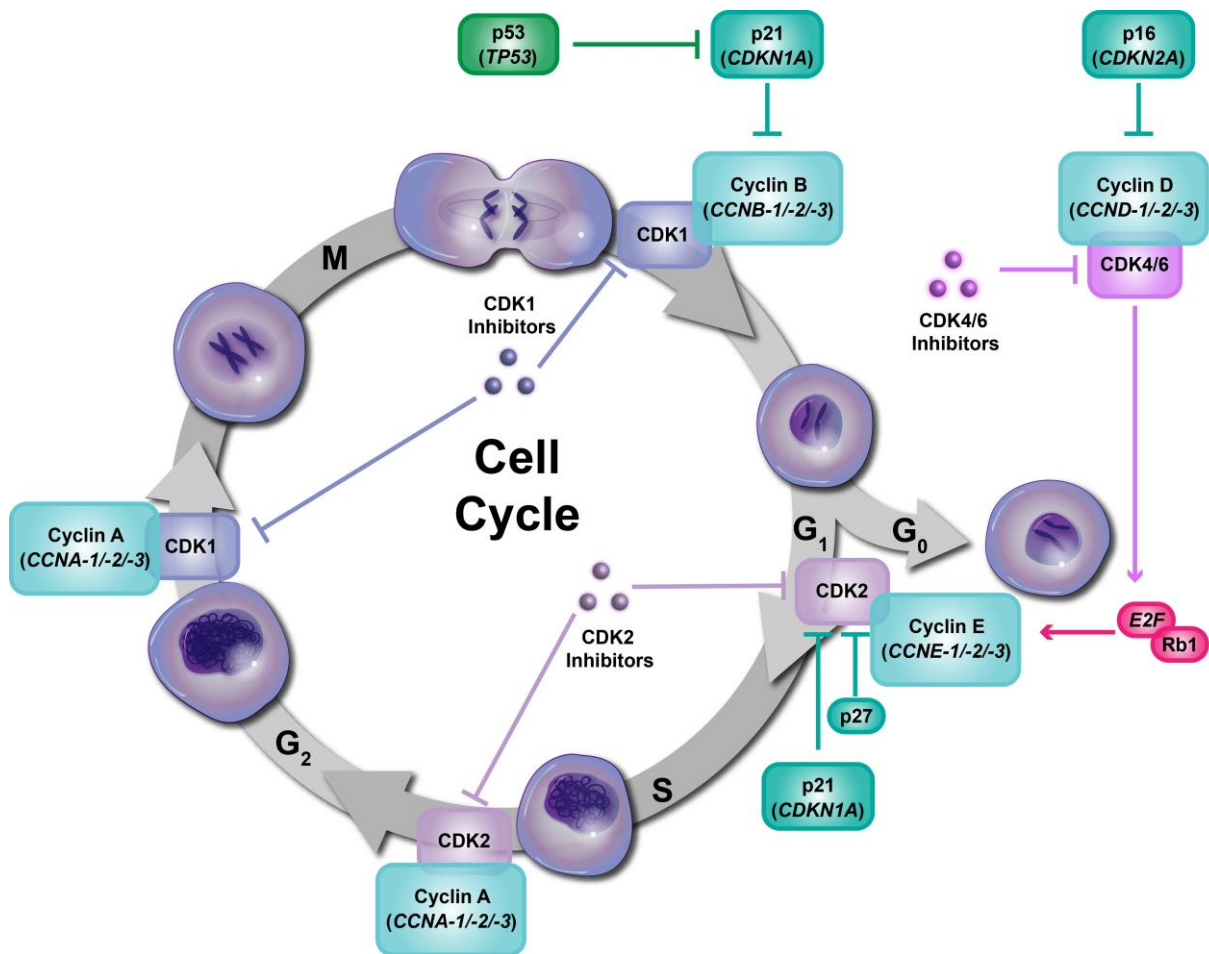


Figure 16 : Cycle cellulaire et points de contrôle

Le cycle cellulaire permettant la division d'une cellule mère d'ADN est divisé en quatre phases : la phase G₁, S (de réplication de l'ADN), G₂ et la phase M de mitose (division de l'ADN). Le passage d'une phase à l'autre est finement régulé par plusieurs points de contrôle (« checkpoints » en anglais) grâce aux protéines CDK (-1,-2,-4,-6) et aux cyclines (-A, -B,-D,-E). Chaque complexe CDK/cycline est lui-même régulé par d'autres protéines telles que les facteurs de transcription : p21, p27 et p53. La phase G₀ correspond à un état de quiescence pour les cellules, sans réplication de la cellule, cependant celle-ci peut retourner en phase G₁ sous le contrôle de facteurs mitogènes (facteurs de croissance, cytokines).

D'après <https://www.mycancergenome.org/content/pathways/cell-cycle-control/>

richesse microbienne réduites par rapport aux sujets sains (Seekatz *et al.*, 2016). La transplantation d'un microbiote intestinal d'une personne saine à de tels patients permet de restaurer ces deux paramètres (Gianotti and Moss, 2017).

De nombreux paramètres viennent donc modifier de manière plus ou moins directe la composition du microbiote intestinal. Cette altération de la composition et de la fonction du microbiote intestinal, désignée **dysbiose intestinale**, peut être transitoire et le microbiote originel de l'individu peut être restauré à la fin de l'exposition à l'agent perturbateur. Toutefois, cette résilience du microbiote peut être mise en défaut, par exemple dans le cas de pathologies chroniques telles que le cancer ou la maladie de Crohn où la dysbiose est permanente.

Dans le cas d'une dysbiose, les bactéries du microbiote peuvent avoir une action néfaste sur l'homéostasie intestinale, mais elles peuvent aussi avoir une action au niveau de la cellule elle-même, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit.

I-4 Points de contrôle de la cellule

Des points de contrôle sont programmés entre chaque phase du cycle cellulaire, afin de vérifier que le processus en cours se déroule de façon normale. Si la cellule identifie d'éventuelles anomalies dans son cycle cellulaire, elle peut déclencher soit une action de correction de ces erreurs, soit son autodestruction (apoptose ou sénescence).

I-4-1 Points de contrôle de l'ADN

Le cycle cellulaire est composé de quatre phases distinctes (G1, S, G2 et M) et d'une phase dite de quiescence (G0) permettant le passage d'une cellule mère à deux cellules filles avec une information génétique égale (**Figure 16**). Le passage d'une phase à l'autre est finement régulé par plusieurs **points de contrôle** (ou *checkpoints*) permettant d'arrêter l'avancée du cycle cellulaire si une erreur dans l'intégrité du génome de la cellule fille est détectée. Ce contrôle est réalisé par des protéines kinases qui vont fixer des **cyclines** (d'où leur appellation **CDK** pour *cyclin-dependant kinases*). Les CDK sont présentes de manière constante dans les cellules, alors que la concentration des cyclines fluctue en fonction des

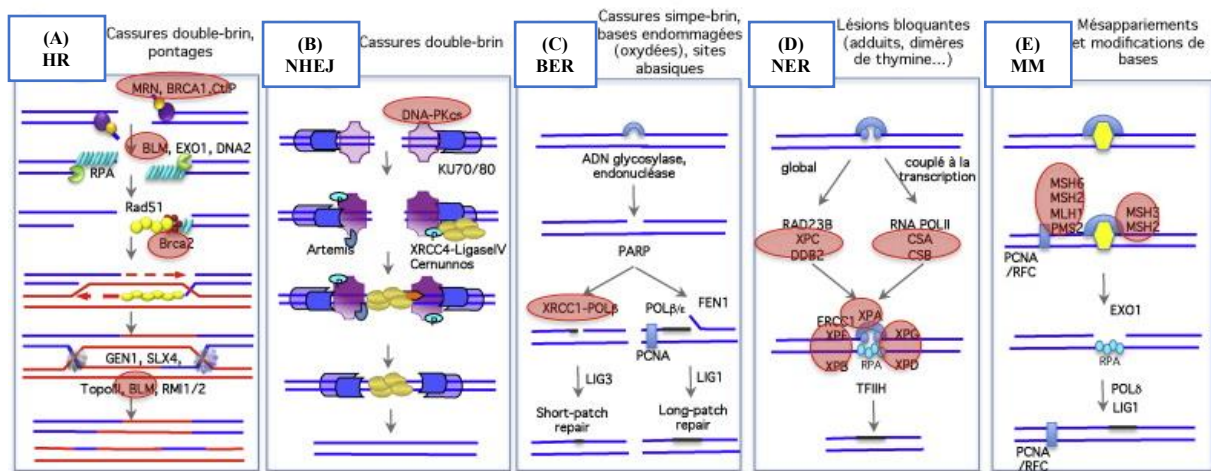


Figure 17 : Systèmes de réparation de l'ADN

(A) La recombinaison homologue (**HR**) est impliquée dans la réparation des cassures double-brin. Le complexe MRN, BRCA1 et CtIP est recruté sur le site de la CBD en premier et recruté par la suite d'autres nucléases (comme EXO1). BRCA2 permet le transport nucléaire de la recombinase RAD51 qui est chargée sur la région simple brin de la molécule d'ADN ouverte. La reconstruction du brin se fait ensuite à l'aide du brin matrice intact par homologie de séquences à l'aide d'autres complexes enzymatiques (GEN1, SLX4...) Le brin néoformé est ensuite ligaturé par l'ADN ligase.

(B) La recombinaison de jonctions non-homologues (**NHEJ**) médie la réparation des CDB, sans restaurer l'information génétique de manière exacte. Le complexe ku70/80 et la kinase DNA-PK α se fixent sur la molécule d'ADN et activent par phosphorylation des protéines du complexe de réparation Artémis, XRCC4, Cernunnos et l'ADN ligase IV qui permet de refermer la molécule d'ADN réparée.

(C) L'excision de bases (**BER**) permet de réparer les dommages de bases tels que les bases oxydées ou les sites abasiques et les cassures simple-brin. Une glycosylase vient exciser la base modifiée, l'ADN polymérase vient synthétiser une nouvelle base avant que l'ADN ligase referme la molécule double brin.

(D) La réparation par excision de nucléotide (**NER**) élimine les lésions bloquantes (tels que les dimères de thymine ou les pontages intra ou inter-brin). Il existe deux voies qui font toutes les deux intervenir des endonucléases qui vont cliver l'ADN en amont de la région lésée, pour permettre à l'ADN polymérase se synthétiser un nouveau brin. L'ADN ligase vient refermer le brin d'ADN réparé.

(E) Le système de réparation des mésappariements (**MMR**) est impliqué dans la réparation des bases mal appariées lors de la réplication. Il fait intervenir le complexe MSH, qui permet le recrutement des exonucléases qui vont cliver le brin avec la base mésappariée. L'ADN polymérase va ensuite pouvoir synthétiser un nouveau brin avant de permettre de refermer le brin d'ADN réparé grâce à l'ADN polymérase.

Les principales protéines retrouvées déficitaires dans les cellules cancéreuses et qui sont associées à la tumorigénèse sont entourées en rouge.

Illustration modifiée d'après (Rass *et al.*, 2012).

phases du cycle cellulaire et de leur dégradation dans le protéasome par le mécanisme d'ubiquitylation.

I-4-2 Systèmes de réparation de l'ADN (DDR)

Les systèmes DDR (*DNA damage-response*) sont déclenchés par les cellules afin d'éviter l'apparition et la transmission d'erreurs dans l'ADN. Ces erreurs peuvent apparaître lors de la réplication de l'ADN ou être induites après contact avec un agent alkylant de l'ADN. En fonction de l'origine et du type de dommages, différents systèmes sont activés (**Figure 17**).

- **Les systèmes de réparation par recombinaison homologue (HR) ou non-homologue (NHEJ)** permettent de prendre en charge les **cassures double-brin (CDB) de l'ADN**.
 - Le **système HR** nécessite le recrutement du complexe MRN (composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1), BRCA1 et CtIP (qui est phosphorylé par les CDK qui contrôlent l'avancée du cycle cellulaire). La protéine ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) est également recrutée sur le lieu de la CDB. Par un mécanisme d'autophosphorylation, la protéine ATM s'active et phosphoryle par la suite l'**histone H2AX**. La molécule H2AX phosphorylée sur la sérine 139 est un marqueur de CDB reconnu et utilisé comme un **indicateur de dommages de l'ADN** (Rogakou *et al.*, 1998). Ceci permet le recrutement de nucléases comme EXO1, responsable de la formation d'extrémités sortantes simple-brin qui vont être recouvertes par la protéine RPA. Grâce à BRCA2, la recombinaise RAD51 est chargée sur la région simple brin de la molécule d'ADN ouverte, afin d'empêcher l'appariement de séquences complémentaires et d'enclencher la recombinaison homologue. La reconstruction du brin se fait ensuite, à l'aide du brin matrice intact par homologie de séquences à l'aide d'autres complexes enzymatiques (GEN1, SLX4...) Le brin néoformé est ensuite ligaturé par l'ADN ligase (**Figure 17A**).
 - Le **système NHEJ** ne restaure pas la séquence initiale de l'ADN et conduit donc à une modification de l'information génétique. Il est porté par la formation du complexe KU70/80 et de la protéine kinase ADN dépendante (DNA-PKc). En s'autophosphorylant, la protéine DNA-PKc phosphoryle et active également les

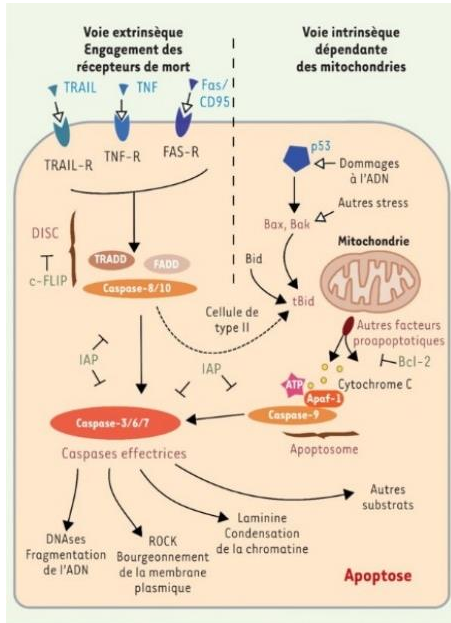
protéines de réparation : Artemis, XRCC4, Cernunnos et l'ADN ligase IV qui permet de refermer la molécule d'ADN réparée (**Figure 17B**).

- **Les systèmes de réparation par excision de base (BER)** reposent sur la reconnaissance d'une modification chimique au niveau d'une base. Une glycosylase vient exciser la base modifiée, l'ADN polymérase vient synthétiser une nouvelle base avant que l'ADN ligase referme la molécule double brin (**Figure 17C**).
- **Les systèmes de réparation par excision de nucléotide (NER)** font intervenir des hélicases pour agir au niveau d'une région plus large de l'ADN. Une fois le double brin ouvert, des endonucléases vont cliver l'ADN en 5' et en 3' de la région lésée, pour permettre à l'ADN polymérase de synthétiser le nouveau brin à partir du brin intact. L'ADN ligase vient refermer le brin d'ADN réparé (**Figure 17D**).
- **Les systèmes de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR)** sont déclenchés par la détection de paires de bases incorrectes par le complexe MSH, ce qui permet le recrutement des exonucléases qui vont cliver le brin avec la base mésappariée. Comme dans les autres systèmes, c'est l'action de l'ADN polymérase et de l'ADN ligase qui permet la synthèse du brin correctement apparié (**Figure 17E**). Le syndrome de Lynch est une anomalie génétique qui touche le système MMR et qui est à l'origine de 5% des cancers colorectaux (Pino *et al.*, 2009).

I-4-3 Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire génétiquement programmée qui correspond à une fragmentation de l'ADN, une condensation de la chromatine, un bourgeonnement de la membrane plasmique et un rétrécissement de la cellule (**Figure 18**). Les cellules qui rentrent en apoptose affichent à leur surface des phosphatidylsérines qui sont reconnues par les cellules phagocytaires afin d'éliminer les cellules apoptotiques sans induire de phénomène inflammatoire (Lemke, 2019). Cette action est sous le contrôle d'une cascade enzymatique composée de caspases, qui sont des protéases à cystéines, présentes sous forme de précurseurs, les pro-caspases. Les caspases dites initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) permettent le démarrage de la cascade et contrôlent les caspases effectrices (caspase 3, 6, 7). Deux voies distinctes de l'apoptose ont été décrites en fonction de l'origine du « signal de mort ». La **voie extrinsèque**

Figure 18 : Mécanisme de l'apoptose



L'apoptose peut être déclenchée par deux voies différentes selon la localisation du signal : via les récepteurs de mort à la surface des cellules (**voie extrinsèque**) ou par la voie mitochondriale au travers de signaux internes (**voie intrinsèque**). Dans les deux situations, l'induction de l'apoptose passe par des **caspases initiatrices**. Dans la voie extrinsèque, la caspase-8 ou -10 ou pour la voie intrinsèque par la caspase-9 qui va former l'**apoptosome** avec APAF-1 et le cytochrome c. Ces caspases initiatrices activent les **caspases exécutrices** -3, -6 et -7 qui vont cliver des substrats différents. Cela conduit à la fragmentation de l'ADN, au bourgeonnement de la membrane plasmique et à la condensation de la chromatine. Il existe des points de convergence entre les deux voies, comme la protéine Bid, membre de la famille Bcl-2, qui active la voie mitochondriale après clivage par la caspase-8. Ce mécanisme peut être un moyen d'amplifier le signal apoptotique.

Illustration modifiée d'après (Cabon *et al.*, 2013).

Figure 19 : Mécanisme de sénescence

Deux voies de sénescence ont été décrites : la **sénescence répllicative** déclenchée par le raccourcissement des télomères (rectangle rose) et la **sénescence induite par un stress** (rectangle jaune). Le recrutement et la phosphorylation de la molécule γ -H2AX (**marqueur de dommages à l'ADN**) sur le brin d'ADN endommagé par ces stress vont activer les systèmes DDR et la protéine p53. La **sénescence induite** est régulée par deux voies distinctes :

(1) la voie p53/p21^{WAF1} où le facteur de transcription p53 serait activé par les kinases ATM/Chk2 (médiateurs des systèmes de réparation des dommages de l'ADN) ou par p19^{ARF} (qui module Mdm2 chez la souris).

(2) la voie p16^{INK4a}/pRb où le facteur de transcription p16^{INK4a} (**marqueur de dommages à l'ADN**) va inhiber l'activation (par phosphorylation) de pRb qui contrôle les gènes impliqués dans la division cellulaire, aboutissant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire.

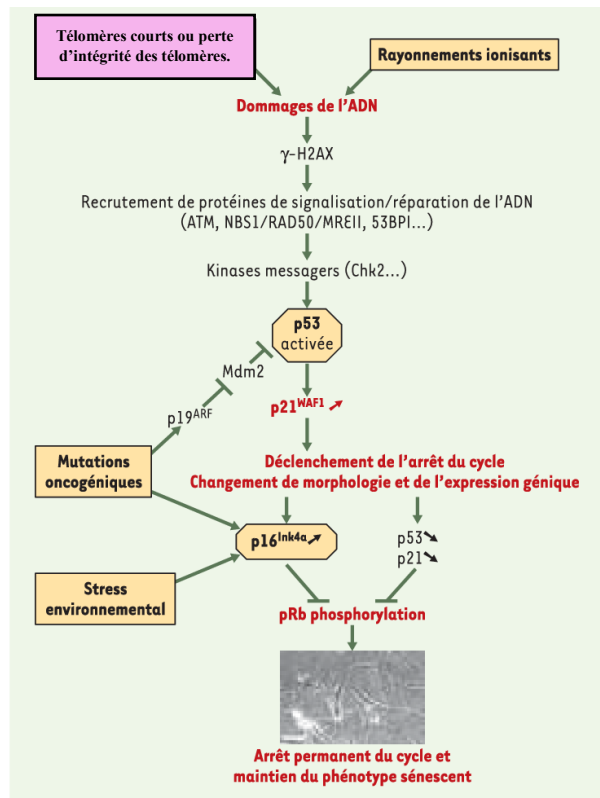


Illustration modifiée d'après (Gire, 2005).

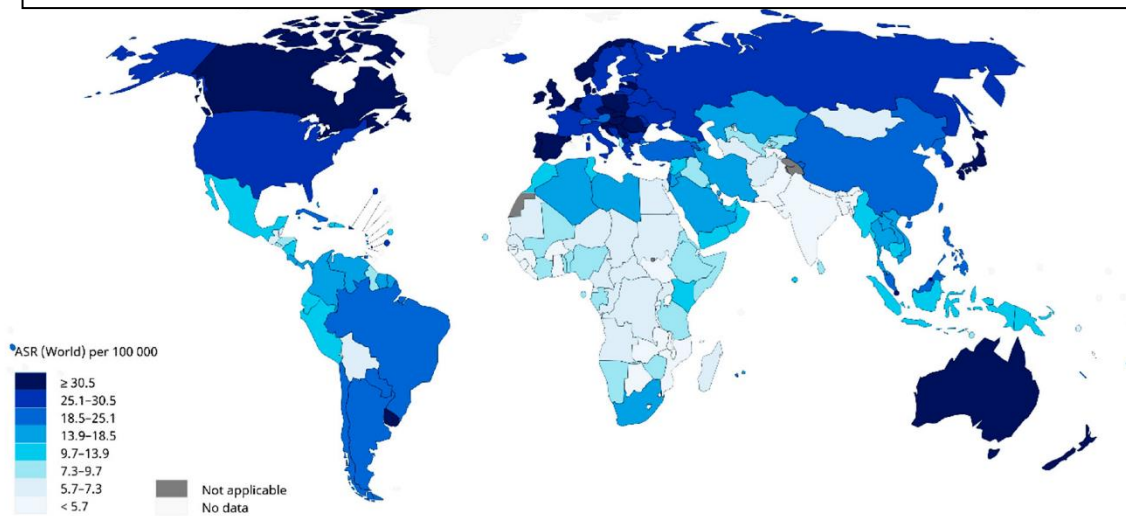
de l'apoptose est déclenchée par la reconnaissance entre des récepteurs membranaires de la famille du *tumor necrosis factor* (TNFR) exposés à la surface des cellules et des ligands des cellules T cytotoxiques. La **voie intrinsèque mitochondriale**, est, elle, activée par un stress génotoxique ou oxydatif et régulée par un équilibre entre les protéines pro-apoptotiques (BAX) et les protéines anti-apoptotiques (BCL-2). Quand cet équilibre est rompu à la suite d'un signal pro-apoptotique, le cytochrome C mitochondrial est libéré dans le cytosol, il s'associe avec le facteur APAF-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) pour former l'apoptosome. Celui-ci active la caspase initiateur 9 qui clive la caspase effectrice 3 entraînant la mort de la cellule.

I-4-4 Sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire correspond à un arrêt du cycle cellulaire prolongé et irréversible. Elle a un rôle physiologique et permet de protéger l'organisme quand les dommages cellulaires sont trop importants et irréparables. Les mécanismes de sénescence sont induits à la suite de la détection de stress cellulaires comme des agents alkylants (**sénescence dite « induite »**) ou un raccourcissement des télomères (**sénescence dite « répllicative »**) (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003) (**Figure 19**). Les cellules sénescents restent **métaboliquement actives** et sont capables de sécréter des molécules pro-inflammatoires, des protéases ou encore des facteurs de croissance, c'est ce qu'on appelle le **phénotype sécrétoire associé à la sénescence** (ou SASP pour *senescence-associated secretory phenotype*) (Coppé *et al.*, 2010). Les cellules qui rentrent en sénescence ont une morphologie différente avec une taille plus importante (mégaloocyte), un nombre de vacuoles abondant et des nucléoles plus grands (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Lorsque les systèmes **DDR des cellules coliques** sont dépassés, il y a un **échappement cellulaire** aux points de contrôle ce qui déclenche des mécanismes anarchiques qui peuvent mener par exemple au développement du cancer colorectal (CCR).

(A) Répartition géographique de l'incidence du CCR standardisé en fonction de l'âge en 2020



(B) Taux d'incidence et de mortalité du CCR standardisé en fonction de l'âge en 2020

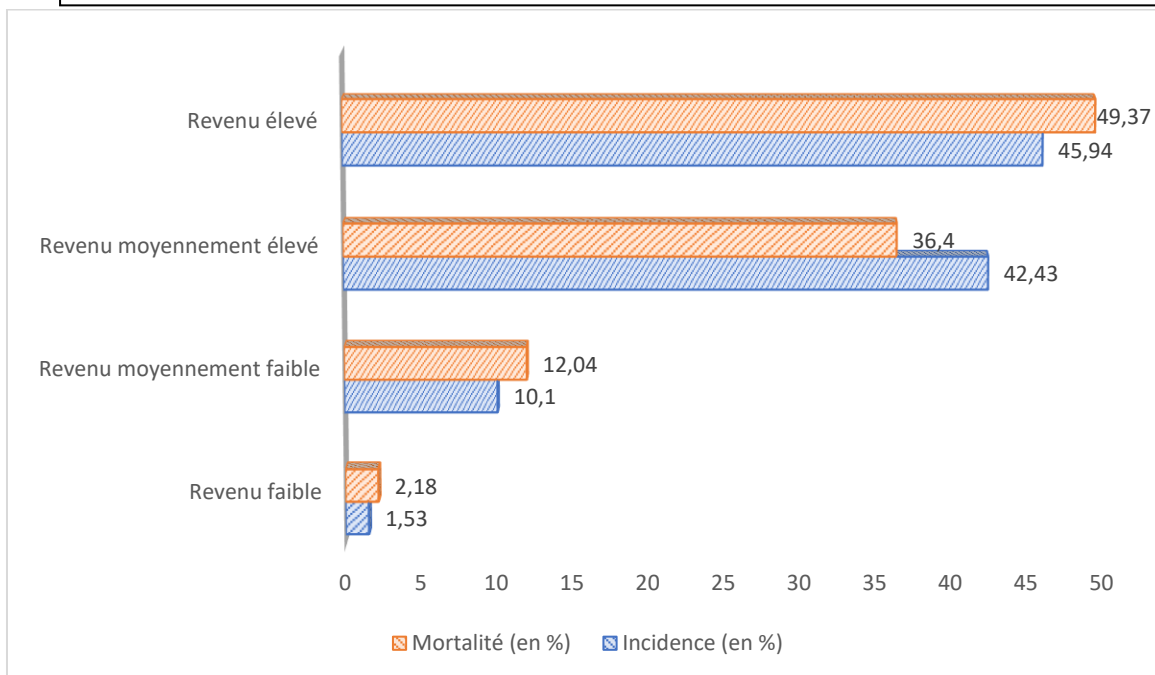


Figure 20 : Incidence et mortalité du CCR dans le monde

(A) Répartition géographique du taux d'incidence du CCR dans le monde en 2020. L'incidence est plus élevée dans les régions industrialisées (Australie, Europe, Amérique du Nord) que dans les pays les moins industrialisés et en voie de développement (appartenant à l'Afrique et l'Asie). Les résultats sont exprimés pour 100 000 personnes et normalisés sur l'âge pour les deux sexes.

(B) Taux d'incidence (en bleu) et de mortalité (en orange) du CCR réparti en fonction des revenus des populations. Les résultats sont exprimés pour 100 000 personnes et normalisés sur l'âge pour les deux sexes. Les pays aux revenus les plus élevés sont ceux où l'incidence du CCR est la plus haute.

Illustration modifiée d'après (Hossain *et al.*, 2022).

DEUXIEME PARTIE : LE CANCER COLORECTAL

Le cancer colorectal (CCR) est un cancer de l'adulte, et de l'adulte âgé. Il survient rarement avant 50 ans. Il touche le rectum (40%) et le côlon (60%) avec une incidence plus élevée dans le côlon distal (83,1%) par rapport au côlon proximal (16,9%) (Topdagi and Timuroglu, 2018).

II-1 Epidémiologie

Le CCR est, d'après les derniers chiffres de l'OMS, le 2^{ème} plus mortel dans le monde et représentait 9,4% des décès liés aux cancers en 2020 (Hossain *et al.*, 2022). Il est le 2^{ème} cancer le plus diagnostiqué chez les femmes et le 3^{ème} chez les hommes (données de 2018). L'incidence du CCR s'élève à 1,93 million, soit 10% des cancers, mais avec une diversité géographique importante (**Figure 20A**). Près de la moitié des nouveaux cas estimés concernent des patients d'Europe et d'Amérique du Nord. L'incidence est très faible dans la majorité des pays d'Afrique. Il touche majoritairement les pays développés aux revenus plus élevés (46%) que les pays où le revenu est plus faible (1,5%) (**Figure 20B**).

Au niveau européen, il y a également une disparité entre les régions du nord et du sud (Ait Ouakrim *et al.*, 2015). Dans ce contexte, la France est au 15^{ème} rang (chez la femme) et 16^{ème} (chez l'homme) rang par rapport au taux d'incidence européen. Entre 1990 et 2018, l'incidence du CCR en France a diminué chez l'homme mais elle est restée stable chez la femme (Defossez *et al.*, 2021). La mortalité a diminué chez l'homme et aussi chez la femme du fait probablement de l'accès simplifié au dépistage.

II-2 Différentes formes du cancer colorectal

La majorité des CCR se développe à partir de lésions bénignes, les adénomes, qui au cours de leur évolution peuvent se transformer en cancer : les adénocarcinomes. La majorité (>90%) des cancers colorectaux survient de façon sporadique, c'est-à-dire en dehors de toute prédisposition génétique ou de maladie inflammatoire intestinale prédisposant au CCR. Environ 25% des patients atteints de CCR auraient des antécédents familiaux de CCR, mais seulement 5 à 6% de l'ensemble des cas ont des mutations génétiques héréditaires avérées (Bibeau *et al.*, 2020).

II-2-1 Formes héréditaires de CCR

Les formes héréditaires de CCR sont dues à une altération monogénique, le plus souvent à transmission autosomique dominante (Buecher and de Pauw, 2012). Il existe plusieurs types de CCR héréditaires : ceux sans polypose, comme le syndrome de Lynch, et ceux avec polypose, notamment les polyposes adénomateuses.

II-2-1-1 Syndrome de Lynch

Le cancer héréditaire sans polypose ou « **syndrome de Lynch** » représente 2 à 4 % des CCR, dont la cause est une mutation autosomale dominante qui atteint les cellules germinales du côlon (Porkka *et al.*, 2019). Les gènes qui sont touchés sont les gènes MMR impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) dont les instabilités microsatellites vont aboutir à l'inactivation bi-allélique des gènes et une augmentation des mutations dans les cellules du côlon. Le risque de développer un CCR en cas de diagnostic d'un syndrome de Lynch atteint 60% avec un diagnostic à l'âge moyen de 45 ans (Rasool *et al.*, 2014; Samadder *et al.*, 2015). Les patients atteints d'un syndrome de Lynch ont des prédispositions au développement d'autres cancers du tube digestif tels que le cancer de l'estomac, du pancréas ou encore des voies biliaires (Bujanda and Herreros-Villanueva, 2017; Cloyd *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020).

II-2-1-2 Polypose juvénile

La **polypose juvénile** doit notamment son appellation au développement de multiples polypes au niveau du côlon et du rectum à l'adolescence. Certains polypes peuvent progresser vers le développement de tumeurs et prédisposent les patients aux cancers du côlon mais aussi de l'estomac, de l'intestin grêle et du pancréas (Howe *et al.*, 1998). Cette polypose est liée à une mutation des gènes *SMAD4* ou *BMPRA1* impliqués dans la voie de signalisation du TGF- β . Le risque de développer un CCR à la suite du diagnostic de cette pathologie est de 30% (Boparai *et al.*, 2010).

II-2-1-3 Polypose adénomateuse familiale

La **polypose adénomateuse familiale** (PAF) est une anomalie génétique rare qui représente environ 1% des cancers, néanmoins une PAF non-traitée aboutit à un risque de

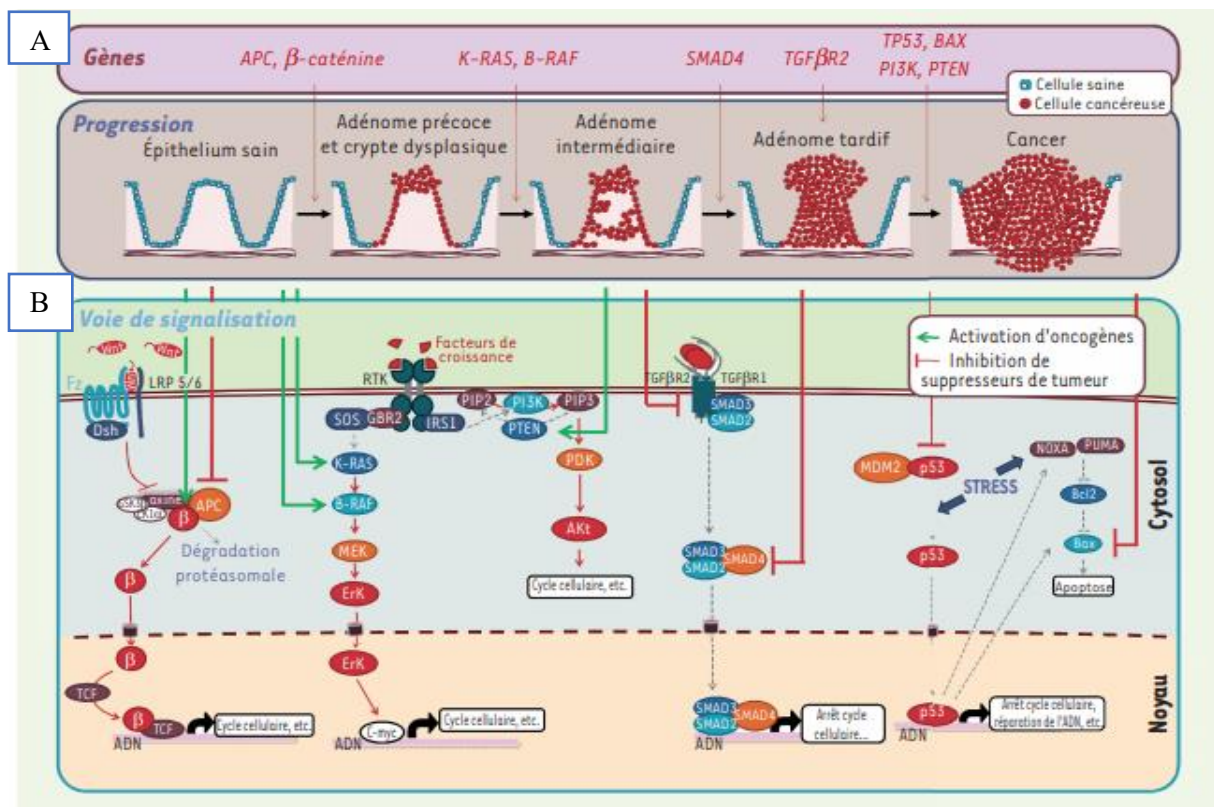


Figure 21 : Séquences adénome-cancer et voies de signalisation impliquées dans le développement du CCR

A : La mise en place et la progression du cancer colorectal (progression de l'épithélium sain vers l'adénome puis le cancer) sont des processus multi-étapes sur plusieurs années. La transformation et progression de la maladie résultent d'une dérégulation de gènes nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme : *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), *KRAS* (Oncogène viral du sarcome du rat de Kirsten), *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinoma) et *p53* (Protéine tumorale 53 ; TP53).

B : La dérégulation de ces gènes active de multiples voies de signalisation qui induisent la transcription de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, l'inflammation ou encore la réparation des dommages de l'ADN.

D'après (Olivier *et al.*, 2011)

100% de développer un CCR dès l'âge de 40 ans (Samadder *et al.*, 2015). Cette maladie est caractérisée par le développement de milliers de polypes au niveau colique et rectal dès l'adolescence. Elle est causée dans la plupart des cas par une mutation du gène suppresseur de tumeur* *APC*, qui aboutit à un défaut dans l'apoptose et une dérégulation du cycle cellulaire (Carr and Kasi, 2023).

II-2-2 Cancer colorectal sporadique

Le cancer colorectal sporadique touche une population dite âgée, supérieure à 50 ans. Son apparition résulte d'une transformation, sur 10 à 20 ans, d'une lésion bénigne en polypes adénomateux puis en adénome à la suite de l'accumulation de mutations et de modifications épigénétiques dans les cellules épithéliales qui bordent la muqueuse colique (Terzić *et al.*, 2010). Cet adénome peut envahir la sous-muqueuse et se disséminer dans l'organisme, sous l'impulsion d'autres mutations sur des protéines contrôlant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Vu and Datta, 2017). C'est un processus au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales (polarité, adhésion ...) pour acquérir des propriétés de cellules mésenchymateuses (motilité, invasion...) qui sont responsables des métastases, principalement hépatiques et pulmonaires.

Au niveau génétique, ce cancer résulte d'une somme d'évènements mutationnels au cours du temps qui peut affecter soit des **oncogènes*** (*APC*, *K-RAS*) qui vont agir au niveau de la signalisation cellulaire et stimuler la prolifération des cellules, soit des gènes **suppresseurs de tumeurs** (*TP53*) impliqués dans les voies de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'inactivation de l'apoptose.

Dans les années 90, l'avancée des techniques de séquençage a permis d'identifier la séquence de mutations génétiques majeure impliquée dans l'étiologie du CCR, ou « **séquence adénome-cancer** » (**Figure 21A**). Les trois principaux gènes mutés sont *APC*, *K-RAS*, *TP53*. Les premiers dérèglements observés dans la cancérogenèse colique sont dus, pour 85% des cas, à des altérations génétiques d'*APC*, aboutissant à l'expression d'une protéine tronquée qui ne sera plus capable de séquestrer la β -caténine. Cette dernière s'associe à la protéine TCF (T-Cell Factor) au niveau nucléaire, formant un facteur de transcription qui active l'expression de gènes qui contrôlent le cycle cellulaire comme *c-MYC* ou le gène de la cycline D1 (Olivier *et al.*, 2011) (**Figure 21B**). Cette mutation peut être suivie par la mutation activatrice du proto-oncogène *K-RAS* (qui touche 35-40% des patients CCR), qui favorise la synthèse de gènes

impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire *via* la voie des MAP kinases. Elle va ainsi participer à la transformation en adénome précoce. Puis, les mutations de *PIK3CA* et *SMAD4* ainsi que la perte d'hétérozygotie du chromosome 18 (LOH 18q) sont impliquées dans l'évolution vers un adénome tardif (Schmitt and Greten, 2021). Enfin, la transformation en carcinome est liée à des mutations dans un gène suppresseur de tumeur : *TP53*.

Au cours de ces dernières années, les CCR ont pu être classés en fonction des mutations génétiques ou encore des altérations des marques épigénétiques (Testa *et al.*, 2018). Cette classification moléculaire permet de distinguer trois types d'adénocarcinomes coliques :

- Les adénocarcinomes liés aux **instabilités chromosomiques** (**CIN** pour *chromosomal instability*) représentent la cause la plus fréquente des CCR sporadiques (75 à 85%) (Pino and Chung, 2010). Les CIN résultent de la perte d'une région d'un chromosome. Les instabilités chromosomiques impliquées dans le CCR sont notamment celles qui touchent le chromosome 5q pour le gène *APC*, le chromosome 17p pour le gène *TP53* ou le chromosome 12 pour le gène *KRAS*.
- Les adénocarcinomes liés à **l'hyperméthylation des îlots CpG** (**CIMP** pour *cpG island methylator phenotype*) correspondent à 20 à 30% des cas de CCR. La méthylation des cytosines des régions promotrices de nombreux gènes permet de réguler leur expression. Chez les patients CCR, de nombreuses études ont mis en évidence que la perte de l'expression du gène *APC* peut être due à une hyperméthylation du promoteur (Chen *et al.*, 2005).
- Les adénocarcinomes liés aux **instabilités microsatellitaires** (**MSI** pour *microsatellite instability*) sont associés à 10 à 15% des CCR sporadiques (Ogino and Goel, 2008). Ils correspondent à des altérations dans de courtes séquences répétées du génome ce qui le rend sensible aux erreurs de réplifications, surtout au niveau des séquences codant des gènes du système de réparation de l'ADN par mésappariement MMR.

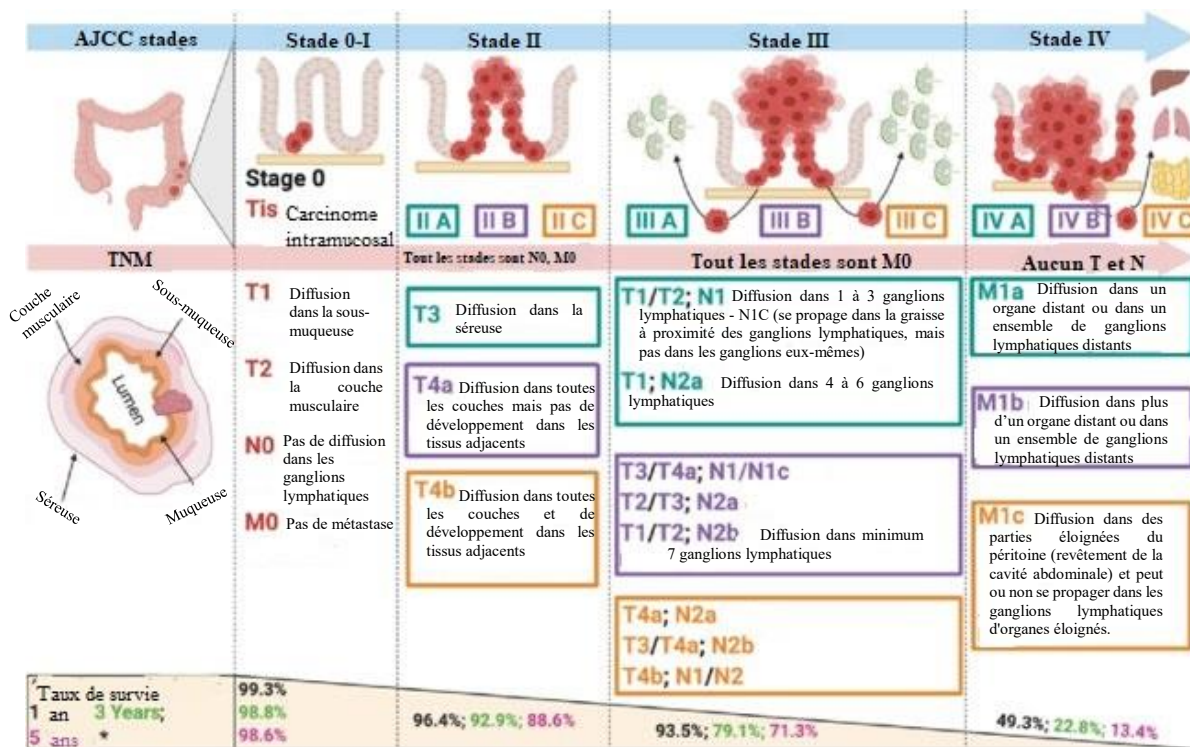


Figure 22 : Classification des stades du cancer colorectal d'après la 8^{ème} édition de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC)

La classification TNM est basée sur la caractérisation de la taille de la tumeur (T) répertoriée de Tis à T4, son extension dans les ganglions lymphatiques (N) selon trois niveaux de N0 à N2 et la présence de métastases (M0) ou non (M1). En fonction de ces trois paramètres on peut distinguer les tumeurs des stades TNM 0 à TNM IV avec un stade 0 où les cellules cancéreuses ont une localisation restreinte au niveau de la muqueuse de la paroi intestinale, au fur et à mesure de l'avancée dans les stades les cellules invasives jusqu'au stade IV de **cancer métastatique** prolongé au-delà du côlon.

Illustration modifiée d'après (Shek *et al.*, 2021)

II-3 Diagnostic du cancer colorectal

Le diagnostic du CCR est souvent tardif car dans la plupart des cas, le CCR est asymptomatique avant d'atteindre les stades avancés de la maladie. C'est pour cela, qu'en France depuis 2009, un test de dépistage est préconisé, dès l'âge de 50 ans, tous les deux ans. Ce test repose sur la **détection de la présence de sang dans les selles**, par méthode immunologique en utilisant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui ciblent l'hémoglobine humaine. Si le test s'avère positif alors une **coloscopie** est prescrite.

La coloscopie est un examen d'endoscopie digestive qui permet de repérer la présence de lésions suspectes, de tumeurs et d'établir le stade d'avancée du cancer. La **classification TNM** est basée sur la caractérisation de la taille de la tumeur (T), son extension dans les ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastases (M) dans les organes et/ou les tissus (**Figure 22**). Cette classification sert à définir les différents stades du cancer (0 à IV) qui sont utilisés dans la prise en charge thérapeutique du CCR. La survie à 5 ans des patients atteints de CCR dépend du stade d'avancée du cancer, elle est de 74% si le diagnostic est établi au stade 1, cependant elle chute à 5% si le diagnostic est fait au stade métastatique IV (Lotfollahzadeh *et al.*, 2023). En dehors de la classification anatomo-pathologique, une autre classification du CCR a été proposée en fonction du **profil génétique** des tumeurs (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

D'autres marqueurs de pronostics de l'avancée du cancer peuvent être utilisés comme des **facteurs moléculaires et sériques**. Par exemple, le dosage de la protéine C-réactive pour suivre la réponse inflammatoire systémique et le dosage sérique des ACE (antigène carcino-embryonnaire) dont l'augmentation est associée à un mauvais pronostic du CCR (Zhang *et al.*, 2019).

Le diagnostic précoce du CCR permet une prise en charge dans les premiers stades de la maladie et favorise un meilleur taux de survie des patients (Ciccolallo *et al.*, 2005).

II-4 Stratégies thérapeutiques

Le coût total du traitement du CCR a été estimé aux États-Unis à 24,3 billions de dollars en 2020, ce qui en fait le 2^{ème} plus coûteux après le cancer du sein (Mariotto *et al.*, 2020).

La prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un CCR dépend en premier lieu du stade auquel a été diagnostiqué le cancer (Slattery *et al.*, 1998). Les stades 0 à II sont traités avec une simple opération chirurgicale qui a pour but d'enlever la zone tumorale. Le stade III nécessite de coupler l'opération chirurgicale avec un traitement chimio-adjuvant tel que le fluoropyrimidine (5-FU), l'oxaloplatine, la capécitabine ou encore l'irinotecan. Le diagnostic d'un stade tardif IV nécessite la mise en place en plus de ces traitements d'une thérapie ciblée.

La thérapie ciblée vise à inhiber ou bloquer directement l'un des mécanismes qui est utilisé par les cellules cancéreuses, souvent par utilisation de l'**immunothérapie**. Par exemple, des anti-EGFR (*epithelial growth factor receptor*, comme le cetuximab) sont utilisés pour bloquer la prolifération. Néanmoins, il semble montrer peu d'effet pour le traitement des métastases du CCR (Lee *et al.*, 2021). PD-L1 (*programmed cell death 1*) est un récepteur des LT qui inhibe la réponse immunitaire contre les cellules du « soi », empêchant de nombreuses réactions auto-immunes mais également la réaction du système immunitaire contre les cellules cancéreuses (Bardhan *et al.*, 2016). Les thérapies anti-PD1/PD-L1 (ex : pembrolizumab) semblent être très efficaces chez les patients atteints de CCR avec MSI mais pas sur les patients MSS où l'utilisation d'une autre molécule anti-CTLA-4 (ciblant les LT CD4+) semble associée à une meilleure survie des patients (Chen *et al.*, 2019). Pour terminer, la troisième molécule principalement ciblée dans le traitement des CCR est le récepteur VEGF (*vascular endothelial growth factor*) situé à la surface des cellules endothéliales et qui participe à l'angiogenèse et la vasculogenèse. Les traitements anti-VEGF (ciblant le facteur) ou anti-VEGFR (ex : ramucirumab) ont montré une diminution du nombre de LT régulateurs chez les patients ayant un CCR (Terme *et al.*, 2013). D'autres thérapies sont à l'essai ou en développement, mais elles ne seront pas développées dans ce mémoire.

II-5 Facteurs de risque du CCR

Facteurs intrinsèques

L'âge

Bien que de jeunes adultes puissent développer un CCR, le risque augmente avec l'âge. L'âge moyen est relativement élevé : 68 ans en moyenne chez les hommes et 72 ans chez les femmes (Driver *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2014).

Les antécédents familiaux de CCR

Une méta-analyse, regroupant plus de 8 000 patients atteints de CRC, a évalué que le risque de développer un CCR était deux fois plus élevé lorsque ces individus présentaient dans leur famille une histoire de CCR (Johnson *et al.*, 2013).

Maladies inflammatoires chroniques

Une méta-analyse réalisée en 2013, regroupant les résultats de 13 études cliniques et de 45 000 patients, a estimé que le risque de développer un CCR était trois fois plus élevé chez les patients ayant une **MICI** (Johnson *et al.*, 2013). Ce risque est lié à la présence d'une inflammation chronique au niveau de la muqueuse colique (colite) conduisant à une dysplasie* qui peut évoluer vers un adénocarcinome. Les altérations génétiques retrouvées dans ces CCR associés aux MICI sont celles de la voie des CIN.

Une autre maladie inflammatoire chronique qui pourrait influencer le développement du CCR et le **syndrome métabolique** qui regroupe plusieurs pathologies comme l'**obésité** ou le **diabète de type 2**. Le risque de développer un CCR est augmenté de 10% pour chaque augmentation de l'IMC (indice de masse corporelle) de 8 kg/m² (Johnson *et al.*, 2013). L'obésité favorise l'insulino-résistance et l'hyper-insulinémie qui sont la principale cause du déclenchement d'un diabète de type 2. Le facteur IGF (*insuline-like growth factor*) est surexprimé dans les cellules cancéreuses dont celles du côlon ; il va favoriser la progression du cycle cellulaire et inhiber les mécanismes apoptotiques (Moschos and Mantzoros, 2002).

Facteurs environnementaux

Le CCR est l'un des cancers où le facteur environnemental est le plus important : la **consommation de tabac**, d'**alcool**, l'**alimentation** et l'absence de pratique d'une **activité sportive** sont d'autant de paramètres influençant la tumorigenèse colorectale. La plupart de ces facteurs de risque ont été associés à une altération de la composition des bactéries constituant le **microbiote intestinal** qui est aujourd'hui considéré comme un acteur à part entière du CCR (Martin *et al.*, 2004; Gagnière *et al.*, 2016; Lucas *et al.*, 2017; Dougherty and Jobin, 2023).

Consommation de tabac et d'alcool

La consommation de tabac est l'un des premiers facteurs de risque qui a été associé au CCR (Schaal and Chellappan, 2014). Le risque de développer un CCR augmente de 39% chez les hommes et de 20% chez les femmes qui fument par rapport à des individus n'ayant jamais fumé (Gram *et al.*, 2020). Le tabac contient une multitude d'agents carcinogènes comme les benzopyrènes, les nitrosamines ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui forment des adduits à l'ADN et génèrent des ROS. De plus, la molécule de **nicotine** a un impact direct sur la progression tumorale en activant les récepteurs à l'acétylcholine et à la noradrénaline qui déclenchent des cascades de phosphorylation dans différentes voies médiant l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse (Singh *et al.*, 2011).

La consommation régulière d'**alcool** est également un facteur de risque de développer un CCR. Plus la période de consommation est longue, plus le risque de développer un CCR est important (Pedersen *et al.*, 2003; Driver *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2020). L'éthanol et ses différents métabolites peuvent causer des effets carcinogènes notables comme l'induction de stress oxydatifs, des dommages à l'ADN mais également des changements épigénétiques, ainsi que des dérégulations de la réponse immunitaire. La transformation des métabolites de l'éthanol est réalisée par des enzymes du microbiote intestinal, notamment au niveau colique où les *Enterobacteriaceae* sont capables de transformer l'éthanol en acétaldéhyde dont l'accumulation est toxique (Rossi *et al.*, 2018). L'acétaldéhyde augmente la production de ROS qui peuvent induire des mutations dans l'ADN et contribuer ainsi à la carcinogenèse (Homann *et al.*, 2000).

L'alimentation

La **consommation de viande rouge** (bœuf, porc, agneau) est un facteur de risque classé comme « probablement cancérigène (groupe 2A) » d'après l'OMS. Le nombre d'études prospectives à ce sujet est grandissant et a permis d'identifier que chez les consommateurs quotidiens de viande rouge, le risque de développer un CCR était augmenté de 20 à 30% (Aykan, 2015). Le fer et les ions hémiques présents en grande quantité dans les viandes rouges sont des agents mutagènes de l'ADN (Chua *et al.*, 2010). De plus, la **consommation de viande transformée** est classée comme cancérigène (groupe 1) pour l'Homme, depuis 2015. Les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés mais cela pourrait découler de la production lors de la cuisson d'espèces carcinogènes comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les composés nitrosyles et les amines hétérocycliques.

L'utilisation **d'additifs alimentaires** a également considérablement augmenté au cours des dernières années, surtout dans les pays industrialisés. Certains comme les émulsifiants sont capables d'altérer la couche de mucus et d'induire une dysbiose favorisant une inflammation à bas bruit. Des souris ayant reçu des émulsifiants dans l'eau de boisson (1%) pendant 3 mois développent des colites (Chassaing *et al.*, 2015). D'autres additifs sont des nanoparticules, comme le TiO₂ ou E171, qui sont capables de traverser la couche de mucus intestinale et d'atteindre les cellules de l'épithélium colique. Des cellules épithéliales en culture, au contact des particules de TiO₂, produisent des ROS capables d'induire un stress oxydatif et une toxicité au niveau des mitochondries induisant l'apoptose cellulaire (Proquin *et al.*, 2017). Comme il a été expliqué précédemment dans ce manuscrit, les CCR ont une incidence plus élevée dans les pays industrialisés. L'alimentation dans ces pays contient de nombreux d'additifs alimentaires et elle est également enrichie en sucres et en gras (ce régime est appelé le *Western Diet* ou WD). Lorsqu'un régime WD est administré dans des modèles murins de CCR (chimio-induit par un traitement l'azoxyméthane (AOM) couplé à des cycles de DSS ou de souris génétiquement modifiées *Apc^{Min/+}*), ces derniers présentent des marqueurs de tumorigenèse plus importants que les souris ayant reçu une alimentation standard (Benninghoff *et al.*, 2020). De plus, les souris sous WD qui sont supplémentées avec de la vitamine D et du calcium, montrent une réduction du nombre et du volume tumoral, soulignant l'importance de l'alimentation et de la complémentation alimentaire dans la prise en charge des patients CCR. Ces micro-nutriments, que l'on peut trouver dans les fruits et les légumes mais aussi dans les produits laitiers, ont été reportés comme protecteurs dans de nombreuses

études prospectives et expérimentales (Han *et al.*, 2015; Na *et al.*, 2022). En matière de prévention, une alimentation riche en fibres et pauvre en sucres et graisses est conseillée en post et pré-traitements (Aykan, 2015). L'alimentation est donc un facteur de risque mais également une **stratégie thérapeutique** potentielle (Leeming *et al.*, 2019; Wong and Yu, 2023).

Le microbiote intestinal

Il a été suggéré que la survenue du CCR pouvait être influencée par le microbiote intestinal puisque le tube digestif est en constante exposition avec ce dernier. De plus, le cancer au niveau de l'intestin touche préférentiellement le côlon, où la densité bactérienne est la plus forte (10^{12} bactéries versus 10^2 bactéries par ml de contenu intestinal dans l'intestin grêle) (Tjalsma *et al.*, 2012). Plusieurs études ont mis en évidence une modification de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique chez les patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles (Chen *et al.*, 2012a; Lu *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017). Une étude réalisée dans un modèle de CCR (génétiquement induit) a montré, que les souris *Apc^{Min/+} Il10^{-/-}* axéniques ne développaient que très peu de tumeurs comparativement aux souris *Apc^{Min/+} Il10^{-/-}* portant un microbiote conventionnel, indiquant le rôle prépondérant du microbiote dans le CCR associé à une colite (Tomkovich *et al.*, 2017). Ces données suggèrent que le microbiote intestinal est un acteur important dans la carcinogenèse colorectale.

II-6 Cancer et microbiote

En condition physiologique, la composition du microbiote intestinal est à l'état d'équilibre grâce aux différents acteurs de notre organisme qui maintiennent **l'homéostasie intestinale**. Le microbiote intestinal agit comme un organe à part entière qui contribue à cette homéostasie. Néanmoins quand cet équilibre est rompu à la suite de paramètres qui influencent sa composition (prise d'antibiotiques, alimentation ...), une **dysbiose microbienne** apparaît. L'apparition d'une dysbiose est associée à de nombreuses pathologies, digestives comme les MICI ou le CCR (Marchesi *et al.*, 2011; Pagnini *et al.*, 2011; Sears and Garrett, 2014; Ni *et al.*, 2017). Beaucoup plus récemment, une étude a mis en lumière la relation microbiote-cancer (Wong *et al.*, 2017). Dans cette étude, une transplantation du microbiote fécal issu de personnes saines ou de patients atteints de CCR était réalisée chez des souris C57BL/6 préalablement sensibilisées par l'AOM / DSS. Les souris recevant le

microbiote des patients ayant un CCR développaient plus de polypes intestinaux que celles transplantées avec les selles de personnes saines. Cette observation était associée avec une élévation des dysplasies, de la prolifération intestinale, et des marqueurs d'inflammation dans le côlon. Les altérations du microbiote intestinal semblent donc fortement associées au CCR et elles ne seraient donc pas une conséquence de la maladie.

II-6-1 Dysbiose chez les patients CCR

Les avancées de ces dernières années dans le domaine du séquençage ont permis d'étudier plus en profondeur la composition du microbiote intestinal chez des personnes présentant des pathologies gastro-intestinales telles que le cancer colorectal (Sobhani *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012a; Dai *et al.*, 2018).

Les travaux de Sobhani *et al.*, ont permis de mettre en évidence les changements dans la composition du microbiote intestinal des patients atteints d'un CRC et les potentiels impacts sur la réponse immunitaire mucoale. Ils ont utilisé les techniques de pyroséquençage pour analyser les populations bactériennes de 60 selles de patients atteints de CRC comparativement à 119 patients contrôles (Sobhani *et al.*, 2011). L'analyse en composantes principales a permis d'identifier une prédominance des bactéries *Bacteroides*, *Prevotella* chez les patients atteints d'un CRC comparativement au groupe contrôle.

En 2012, Chen *et al.*, utilise ces mêmes techniques de pyroséquençage pour analyser les séquences codantes pour l'ARN16S bactériens extraits de différents compartiments intestinaux chez 46 patients atteints de CCR et 56 volontaires sains. Ils comparent ainsi le microbiote luminal avec celui associé à la muqueuse mais ils prélèvent également des échantillons au niveau des tissus tumoraux et de la marge saine (non tumorale). Les auteurs ont pu mettre en évidence que la diversité microbienne était réduite dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus non-tumoraux mais que la composition restait similaire (Chen *et al.*, 2012a). Viljoen *et al.*, ont néanmoins montré une augmentation des *Fusobacteries* dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus de la muqueuse adjacente saine. Cette augmentation semble corrélée avec les stades plus tardifs du CCR (Viljoen *et al.*, 2015). De plus, en comparant les bactéries retrouvées dans les tissus des patients atteints d'un CCR par rapport aux patients contrôles, Chen *et al.*, observent une réduction des espèces *Feacalibacteries*, *Blautie*, *Lachnospire*, *Bifidobacteries* et *Anaerostipes*. À l'inverse, les tissus des patients atteints d'un CCR étaient enrichis en *Fusobacteries*, *Porphyromonas*,

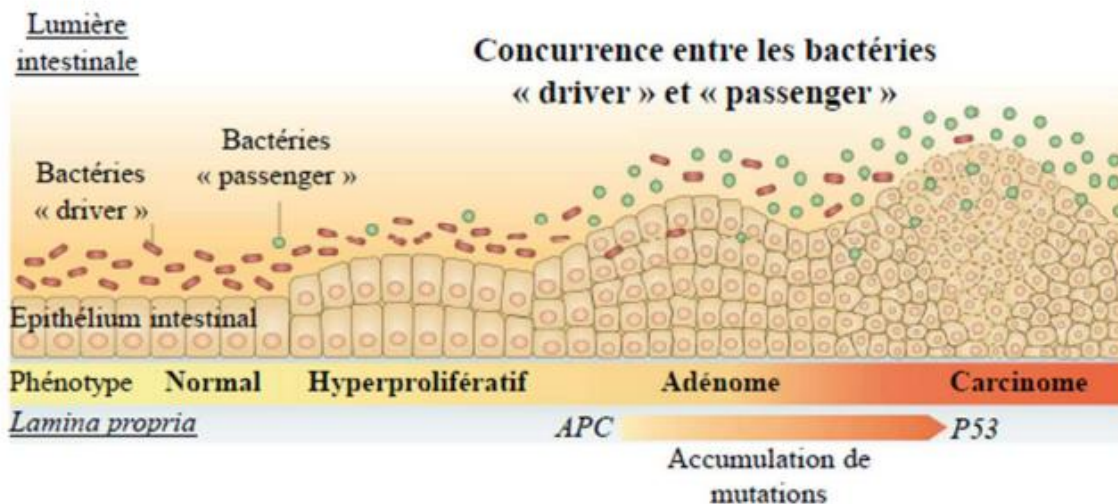


Figure 23 : Théorie des bactéries « drivers-passengers » impliquées dans le développement du CCR

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

Illustration modifiée d'après (Tjalsma *et al.*, 2012)

Peptostreptocoque, *Gemella*, *Mogibacteries* et *Klebsiella* comparativement aux patients contrôles (Chen *et al.*, 2012a).

Plus récemment, une analyse métagénomique sur 526 échantillons fécaux issus de patients atteints de CCR dans plusieurs cohortes de Chine, Autriche, Amérique, Allemagne et France, a mis en évidence une prédominance de 7 espèces bactériennes : *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Alistipes finegoldii*, et *Thermanaerovibrio acidaminovorans* (Dai *et al.*, 2018).

Toutefois, bien que des différences de composition entre le microbiote intestinal de patients CCR et de personnes saines aient été notées au travers de différentes études (Lu *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020), il est délicat de déterminer globalement quels micro-organismes sont sur-représentés ou sous-représentés dans le CCR. Ceci pourrait être dû à la variabilité inter-individuelle du microbiote qui est également une limite pour établir l'entité correspondant à un microbiote « sain ». Néanmoins, en 2019, une méta-analyse regroupant le microbiote de 768 patients ayant un CCR et provenant de 8 régions géographiques différentes a permis d'identifier un groupe de 29 espèces significativement surreprésentées dans le CCR ; *eg. Anaerococcus* et *Fusobacterium nucleatum* (Wirbel *et al.*, 2019).

En plus de ces études taxonomiques, les analyses métagénomiques ont permis de révéler l'enrichissement de **gènes de virulence** (codant pour des protéines impliquées dans la mobilité, l'invasion ou des toxines bactériennes) dans le microenvironnement tumoral de patients atteints de CCR (n=44) comparativement aux patients contrôles (n=44) (Burns *et al.*, 2015; Wirbel *et al.*, 2019).

II-6-2 Théorie driver-passenger

Parallèlement à ces études globales, la quantification des bactéries dans les selles, associées à la muqueuse intestinale de patients atteints de CCR, a permis d'identifier des bactéries candidates qui pourraient interagir avec les cellules humaines et participer à la cancérogenèse. À partir des données de la littérature, un modèle a été proposé et deux groupes ont été distingués : les **drivers** qui joueraient un rôle dans la promotion tumorale et les **passengers** dont le rôle serait plus tardif dans la tumorigenèse (Tjalsma *et al.*, 2012) (**Figure 23**). Les bactéries *drivers* sont enrichies dans les tissus de patients atteints de CRC aux stades précoces, et rapidement concurrencées par la colonisation des bactéries *passengers* au cours de la tumorigenèse

colique. Les bactéries *passengers* sont des bactéries opportunistes ou commensales, probablement mieux adaptées au microenvironnement tumoral et qui, pour certaines, pourraient participer à la croissance de la tumeur.

II-6-3 Bactéries candidates dans le cancer

II-6-3-1 Mécanismes carcinogènes des bactéries intestinales

Tout au long du développement d'un CCR, les bactéries dites *drivers* ou *passengers* peuvent agir sur l'inflammation, la transcription d'oncogènes, les marques épigénétiques, la production de ROS. Elles peuvent aussi produire des génotoxines. La **carcinogénèse et l'inflammation** sont deux mécanismes intrinsèquement associés. En effet des souris axéniques $Apc^{Min/+} Il10^{-/-}$ (dont la réponse inflammatoire est altérée) développent significativement plus de tumeurs que des souris $Apc^{Min/+}$ (Tomkovich *et al.*, 2017). L'inflammation chronique peut conduire à des dysplasies au niveau du côlon favorisant l'apparition de colites de manière directe ou indirecte (Shah and Itzkowitz, 2022). Un déséquilibre entre la production de molécules pro-oxydantes et les systèmes anti-oxydants aboutit à un stress oxydatif (Klaunig *et al.*, 2010). Celui-ci peut être déclenché par la cellule comme mécanisme de défense contre un pathogène mais également par le microbiote intestinal et être délétère pour l'organisme (Irrazábal *et al.*, 2014). La **génération de ROS** induit des dommages et des instabilités dans l'ADN des cellules épithéliales coliques notamment car les systèmes de défenses antioxydantes sont altérés dans le CCR (Favier, 2006). Les radicaux hydroxyyles induisent des dommages à l'ADN qui peuvent s'avérer mutagènes s'ils ne sont pas réparés. La **production de toxines** bactériennes qui sont dommageables pour l'ADN (génotoxine) fait également partie des mécanismes de la carcinogénèse colorectale (Lucas *et al.*, 2017; Wong and Yu, 2019; Dougherty and Jobin, 2023). Par exemple, récemment, Liu *et al.* ont démontré que la bactérie *Citrobacter rodentium* et les EHEC produisaient une génotoxine **UshA** (*UDP-sugar hydrolase*) qui est sécrétée dans les cellules par le système T3SS et qui induit une augmentation du nombre de tumeurs en modèle murin $Apc^{Min\Delta716/+}$ (Liu *et al.*, 2022). Dans cette étude, UshA clive l'ADN, ce qui déclenche la réponse DDR qui, si elle est inefficace, aboutit à l'apparition de mutations. La

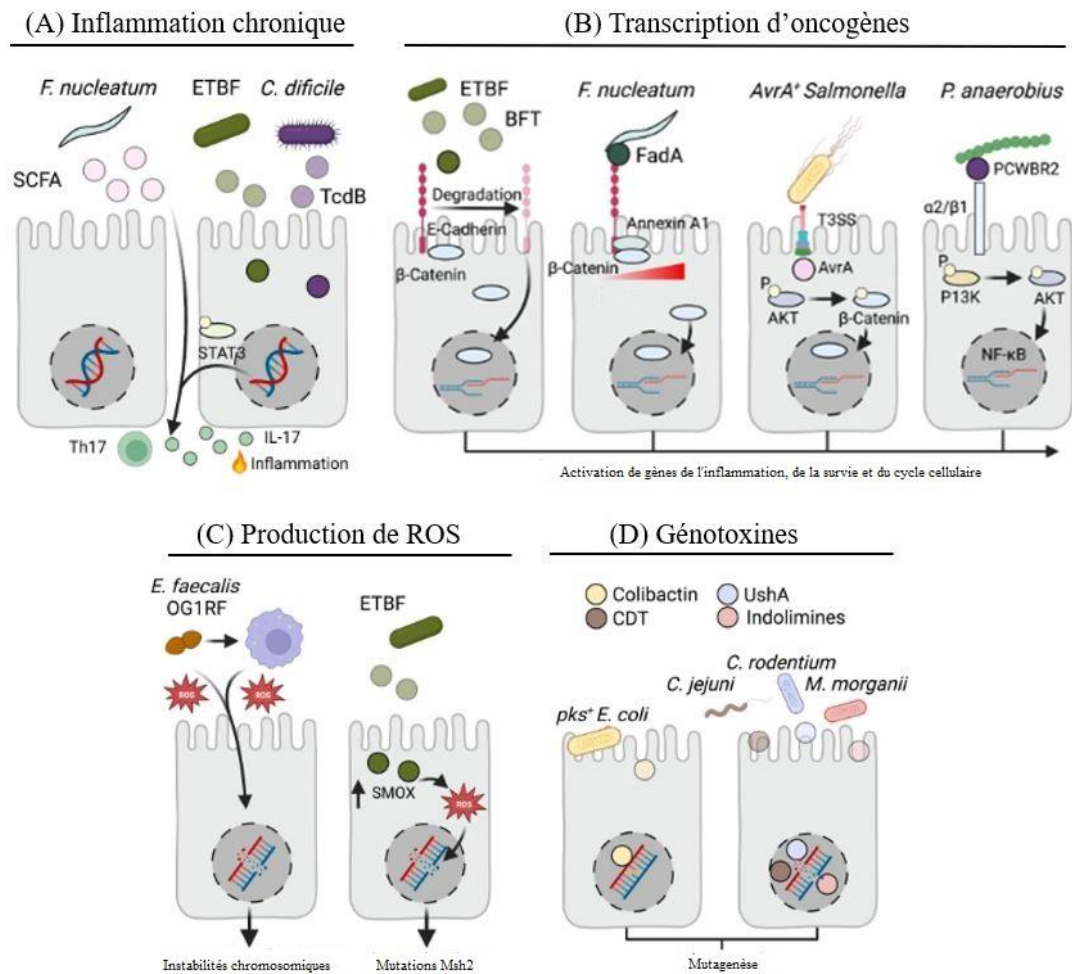


Figure 24 : Mécanismes carcinogènes des bactéries intestinales

(A) *Fusobacterium nucleatum* produit des acides gras à chaîne courte (AGCC) qui se lient aux récepteurs *free fatty acid receptor 2* (Ffar2) des macrophages T helper 17 (Th17). Certaines souches de *Bacteroides fragilis* (les souches ETBF) et *Clostridium difficile* sécrètent des toxines : BFT et TcdB respectivement qui favorisent la phosphorylation du transducteur de signal et activateur de la transcription 3 (STAT3) ainsi que le recrutement des cellules Th17 productrices d'IL-17. Dans les deux cas, ces bactéries favorisent une inflammation médiée par l'IL-17 qui contribue à la transformation néoplasique. (B) Les souches ETBF, dégradent aussi l'E-cadhérine, favorisant la translocation nucléaire de la β -Caténine et l'activation des voies de signalisation qui promeuvent la formation de tumeurs. *F. nucleatum* produit une protéine (FadA) qui se lie à l'E-cadhérine et augmente l'expression du complexe Annexin A1/ β -Caténine, ce qui active les voies de signalisation impliquées dans la promotion de la tumeur. *Salmonella* spp. et *Peptostreptococcus anaerobius* sont deux autres exemples de bactéries qui induisent la transcription de gènes promouvant la prolifération cellulaire. (C) L'agent pathogène humain *Enterococcus faecalis* producteur de superoxyde (OG1RF) provoque des instabilités chromosomiques, résultant de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). À droite, l'infection par l'ETBF augmente l'expression d'une spermine oxydase qui génère des ROS et des dommages à l'ADN dans les cellules épithéliales du côlon. (D) Les *E. coli pks+* produisent la colibactine, qui induit des liaisons inter-brins dans les cellules hôtes, ce qui entraîne des mutations de l'ADN. D'autres exemples de génotoxines microbiennes sont aussi décrites : CDT (*cytolethal distending toxin*) sécrétée par *Campylobacter jejuni*, UshA par la bactérie murine *Citrobacter rodentium* et les indolimines isolées d'une souche de *Morganella morganii* prélevée chez des patients souffrant de MICI.

Illustration modifiée d'après (Dougherty *et al.*, 2023)

signature mutationnelle qui est générée par cette toxine est également retrouvée dans les séquences des tumeurs de patients CCR.

Les mécanismes ci-dessus sont détaillés en **figure 24** pour un certain nombre de bactéries candidates dans le CCR (**Figure 24**). Certaines bactéries ont été plus étudiées, nous les détaillons ci-dessous.

II-6-3-2 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum est une bactérie à Gram négatif, strictement anaérobie de la flore commensale et parodontale qui a été associée à diverses pathologies comme l'appendicite, les MICI ou encore le CCR (Han, 2015). D'après les analyses métagénomiques et transcriptomiques, elle est notamment retrouvée enrichie dans les tissus des patients atteints de CCR par rapport aux tissus issus de patients sains mais aussi dans la cavité buccale de ces patients (Chen *et al.*, 2012a; Castellarin *et al.*, 2012; Komiya *et al.*, 2019). Ce pathobionte coloniserait les tissus tumoraux au niveau de l'intestin en traversant les barrières oraux-intestinales à la suite d'une lésion.

Fusobacterium nucleatum est observé chez les patients présentant un CCR dans les stades tardifs d'avancement de la maladie (Kostic *et al.*, 2012) et semble être associé à une moins bonne survie des patients atteints de CCR (Mima *et al.*, 2016). Cette bactérie peut être considérée comme une bactérie *passenger* qui profite du microenvironnement tumoral pour coloniser la tumeur.

Dans un modèle murin de CCR (souris *Apc^{Min/+}*), l'administration par voie orale de *F. nucleatum* accélère le développement tumoral en induisant, notamment, l'expression de cytokines pro-inflammatoires. La bactérie produit des AGCC qui se lient aux récepteurs FFAR2 (*free fatty acid receptor 2*) présents à la surface des macrophages, favorise leur infiltration et stimule la production d'IL-17 (Brennan *et al.*, 2021a) (**Figure 24A**). Ce mécanisme favorise l'inflammation au niveau du microenvironnement tumoral (Kostic *et al.*, 2013). Grâce à ses facteurs d'adhésion (FadA et Fap2), cette bactérie peut également adhérer aux cellules de l'épithélium intestinal colique et promouvoir l'inflammation et la prolifération cellulaire (**Figure 24B**) (Guo *et al.*, 2020). L'administration d'aspirine en dose physiologique inhibe chez des souris *Apc^{Min/+}* l'expression de ces protéines d'adhésion (Brennan *et al.*, 2021b). *F. nucleatum* promeut aussi le phénotype métastatique des cellules épithéliales coliques en modèle *Transwell* (Chen *et al.*, 2020b).

II-6-3-3 *Bacteroides fragilis*

Certaines souches de *Bacteroides fragilis* sont productrices d'une toxine (les souches ETBF), nommée la fragilysine (*bft*). Les souches de ***B. fragilis* productrices de fragilysine** sont enrichies dans les selles de patients atteints de CCR et positivement corrélées à l'avancement dans les stades tumoraux (Kostic *et al.*, 2012; Viljoen *et al.*, 2015; Boleij *et al.*, 2015).

Ces souches, contrairement aux souches non toxigènes, sont capables d'induire une inflammation et la formation de tumeurs coliques dans un modèle murin de CCR (les souris *Min^{Apc716+/-}* qui expriment un gène mutant codant la protéine Apc tronquée en position 716) (Wu *et al.*, 2009). En effet, la fragilysine est capable d'augmenter la phosphorylation et l'activation de STAT3, responsable de la transcription *il-17* qui promeut la tumorigenèse colorectale (Chung *et al.*, 2018) (**Figure 24A**). Le potentiel carcinogène de ces souches proviendrait d'une part de leur propriété pro-inflammatoire et d'autre part, elles stimuleraient la prolifération de l'épithélium intestinal en inactivant un suppresseur de tumeur, la E-cadhérine (Wu *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2009a) (**Figure 24B**). La fragilysine des ETBF est responsable de la dégradation des E-cadhérines, ce qui active la translocation de la β -caténine au niveau nucléaire (Rhee *et al.*, 2009a). L'expression des gènes régulés par la β -caténine comme *c-myc* et la *cyclineD1* est donc augmentée, ce qui favorise la prolifération et l'avancement du cycle cellulaire (Chen *et al.*, 2017).

La fragilysine est également responsable de modifications épigénétiques qui vont moduler l'expression de certaines histones déméthylases et faciliter l'accessibilité de la chromatine. La chromatine étant plus accessible, elle peut également être plus exposée à l'action de molécules génotoxiques (Allen *et al.*, 2019). L'ouverture de la chromatine permet également l'expression de gènes impliqués dans la prolifération comme *c-myc* et favorise la croissance des tumeurs en modèles de xénogreffes murines (Wu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2020). Ces modifications épigénétiques peuvent être limitées par l'utilisation d'inhibiteurs du catabolisme des polyamines dans des souris *Apc^{Min/+}* (Goodwin *et al.*, 2011).

Dans un modèle d'infection de cellules HT29, cette bactérie augmente également les dommages à l'ADN qui sont objectivés par une augmentation du marqueur γ -H2AX (phosphorylation de l'histone H2AX) (Goodwin *et al.*, 2011). En effet, les *Bacteroides fragilis* productrices de fragilysine possèdent des enzymes comme la spermine oxydase qui sont responsables de la production de ROS au fort pouvoir génotoxique (**Figure 24C**).

II-6-3-4 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis est l'entérocoque le plus abondamment retrouvé dans l'intestin de l'Homme. Des études ont mis en évidence une association entre *E. faecalis* et le CCR puisque cette bactérie a été trouvée enrichie dans les fèces des patients atteints de CCR comparativement aux individus sains (Balamurugan *et al.*, 2008) ainsi qu'au niveau des tumeurs ou du tissu adjacent sain des patients atteints de CCR comparativement à la muqueuse des individus sains (Zhou *et al.*, 2016). Cette bactérie est capable de générer des ions superoxydes (ROS) qui induisent des instabilités chromosomiques dans les cellules infectées (Wang and Huycke, 2007). Ces cellules présentent une augmentation des foci γ -H2AX et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. D'après les travaux de Wang *et al.*, l'action d'*E. faecalis* semble passer également par un effet indirect de la bactérie à travers les macrophages infectés. Wang *et al.*, ont exposé des cellules primaires épithéliales issues du côlon de souris à des macrophages infectés par *E. faecalis*. Ces macrophages exposés sont polarisés en macrophages de type M1 pro-inflammatoires, qui sont capables d'entraîner une reprogrammation des cellules de l'épithélium colique (augmentation de plusieurs marqueurs des cellules souches intestinales comme DclK1) (Wang *et al.*, 2017). Ce mécanisme permet également l'activation de la voie WNT/ β -caténine. Les effets de la bactérie sont abrogés en utilisant une superoxyde dismutase qui séquestre les ROS et empêche leur action toxique sur la molécule d'ADN (Wang *et al.*, 2008) (**Figure 24C**). Chez les souris *Il10^{-/-}*, *E. faecalis* est capable d'induire et de maintenir une colite, d'induire une dysplasie et la formation de carcinomes rectaux (Balish and Warner, 2002). Cette bactérie pourrait donc avoir une action *driver* dans la cancérogenèse colique (Gaines *et al.*, 2020).

II-6-3-5 *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* a également été retrouvée enrichie dans les selles et les tissus des patients atteints de CCR (55-67%) comparativement aux tissus de patients contrôles (20-21%) d'après plusieurs études cliniques (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013; Bonnet *et al.*, 2014a). Ce commensal du tube digestif colonise le tube digestif dès le plus jeune âge et persiste tout au long de la vie chez de nombreuses personnes sans induire de pathologies. Néanmoins de nombreuses souches ont acquis des **facteurs de virulence** qui leur ont permis de s'implanter et de coloniser l'épithélium intestinal. Certaines souches de *E. coli* sont capables de produire des génotoxines (**Figure 24D**).

TROISIEME PARTIE : Les *Escherichia coli* associés au CCR

***Escherichia coli*, d'une souche commensale à une souche pathobionte, l'acquisition de facteurs de virulence**

La bactérie *Escherichia coli* est l'une des bactéries les plus étudiées dans l'histoire des sciences. En effet, sa diversité génétique fait qu'elle a un rôle bivalent. Elle est initialement une bactérie de la flore commensale mais de nombreuses pathologies et infections sont associées à des *E. coli* pathogènes. Certaines souches commensales possèdent également des facteurs de virulence et elles peuvent devenir potentiellement pathogènes ou pro-inflammatoires en fonction des conditions environnementales telles qu'une dysbiose. De telles souches sont appelées pathobiontes (Delmas *et al.*, 2015).

III-1 *Escherichia coli*

III-1-1 Généralités sur les *E. coli*

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie est retrouvée chez l'Homme et les mammifères à sang chaud. La colonisation intestinale par les *E. coli* se fait dès la naissance par contact avec la flore périnéale de la mère (Wall *et al.*, 2009; Payros *et al.*, 2014). Bien que cette espèce ne représente que 0,1% du microbiote total, elle domine la microflore anaérobie facultative du côlon tout au long de la vie de l'individu et participe à l'homéostasie intestinale. Cette espèce bactérienne a su s'adapter à de nombreux environnements grâce, notamment, à l'acquisition de gènes ou d'îlots génomiques entiers (Calhau *et al.*, 2015; Desvaux *et al.*, 2020; Auvray *et al.*, 2021).

III-1-2 Phylogénie des *E. coli*

Le premier séquençage entier du génome de cette bactérie a été réalisé en 1997, sur la souche de laboratoire *E. coli* K12. Son génome est composé de 4,6 millions de paires de bases codant pour 4 200 protéines (Blattner *et al.*, 1997). Depuis, les dernières estimations ont évalué le pangénome (ensemble des gènes des génomes) à 25 000 gènes avec un core génome (c'est-à-dire le génome commun présent chez tous les *E. coli*) de 3 000 gènes (Tantoso *et al.*, 2022). L'analyse comparative des génomes de *E. coli* a permis de mettre en évidence une

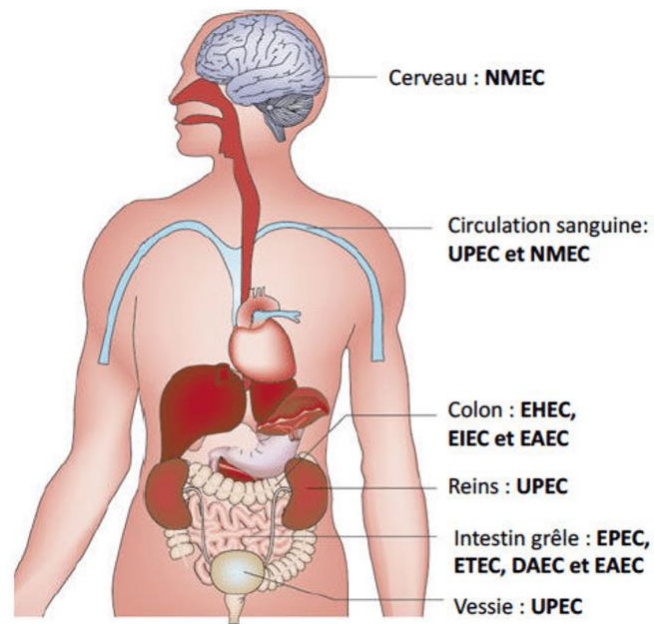


Figure 25 : Pathotypes d'*Escherichia coli*

Nomenclatures des espèces bactériennes :

- EAEC = enteroaggregative *E. coli*
- EHEC = enterohaemorrhagic *E. coli*
- EIEC = enteroinvasive *E. coli*
- EPEC = enteropathogenic *E. coli*
- ETEC = enterotoxigenic *E. coli*
- NMEC = neonatal meningitis-causing *E. coli*
- UPEC = uropathogenic *E. coli*

Illustration modifiée d'après (Croxen and Finlay, 2010)

grande variabilité de taille au sein de l'espèce. Les souches commensales ont un génome plus petit que la plupart des souches pathogènes issues d'isolats cliniques. Ceci est expliqué notamment par l'acquisition de gènes codant des facteurs de virulence qui donnent un avantage à ces souches pour s'implanter et coloniser les niches écologiques comme l'intestin. La plasticité du génome des *E. coli* facilite l'acquisition de nouveaux gènes par transferts génétiques d'un gène ou d'îlots génomiques entiers.

Les analyses phylogénétiques ont montré que l'espèce *E. coli* pouvait être divisée en 8 grands phylogroupes : A, B1, B2, C, D, E, F et G (Clermont *et al.*, 2013). Les *E. coli* commensaux humains sont typiquement associés au phylogroupe A (Escobar-Páramo *et al.*, 2006) alors que les *E. coli* causant des infections extra-intestinales, mais qui peuvent coloniser l'intestin, appartiennent majoritairement aux phylogroupes B2 et D (Chakraborty *et al.*, 2015).

Les *E. coli* sont classiquement classés en trois groupes : les commensaux, les pathogènes intestinaux et les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) qui comprennent notamment les *E. coli* responsables d'infections urinaires (uropathogenic *E. coli* ou UPEC) (**Figure 25**) (Pakbin *et al.*, 2021). Toutefois, certaines souches ont des caractéristiques qui les situent entre les commensaux et les ExPEC.

III. 2 Les facteurs de virulence produits par les *E. coli*

L'implication des *E. coli* en pathologies infectieuses a été largement étudiée et deux types d'infections sont caractérisées : intestinales ou extra-intestinales (Croxen and Finlay, 2010). À côté de ces souches, les *E. coli* pathobiontes ont été caractérisés dans des pathologies intestinales chroniques humaines. Parmi eux, les *E. coli* adhérent et invasif (AIEC) présentent, comme leur nom l'indique, des capacités d'adhérence et d'invasion qui sont absentes chez les *E. coli* commensaux. Les patients atteints de maladie de Crohn sont colonisés avec une fréquence anormale par ces souches qui peuvent aggraver l'inflammation intestinale de ces patients. L'implication de *E. coli* pathobiontes dans le CCR est de description plus récente.

Les études cliniques réalisées sur plusieurs cohortes de patients atteints de CCR ont retrouvé en quantité plus importante au niveau des selles et de la muqueuse intestinale des *E. coli* producteurs de cyclomodulines (Buc *et al.*, 2013). Les **cyclomodulines** sont des toxines qui interfèrent avec le cycle cellulaire (Nougayrède *et al.*, 2005). Bonnet *et al.* ont observé un enrichissement des *E. coli* producteurs de cyclomodulines dans les biopsies coliques de

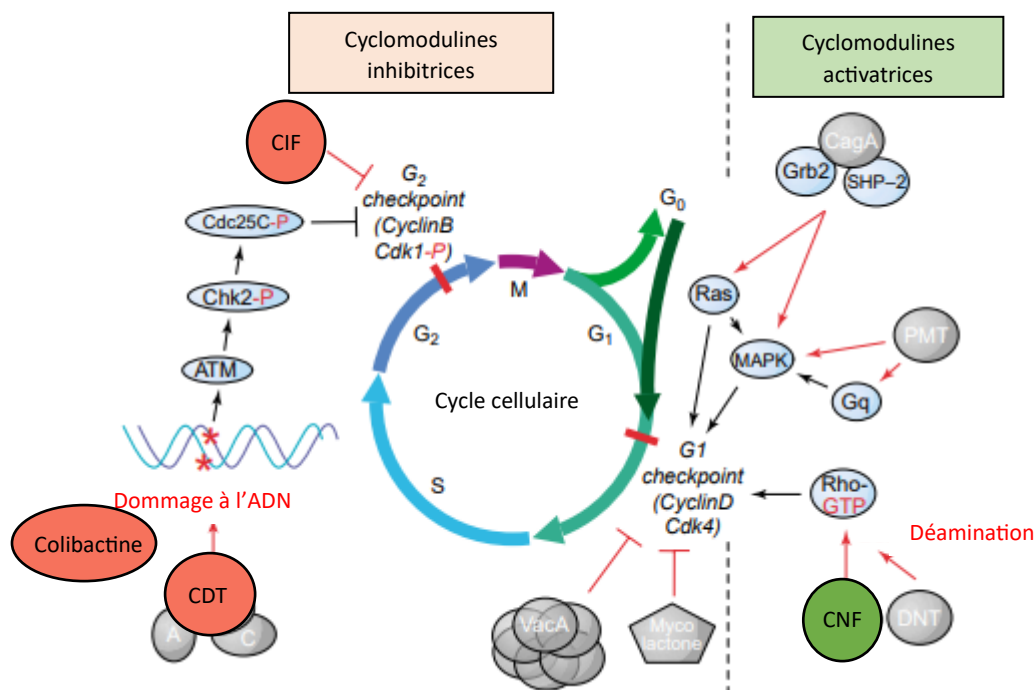


Figure 26 : Cyclomodulines produites par les *E. coli* agissant sur le cycle cellulaire

Les cyclomodulines bactériennes sont une famille de facteurs qui agissent sur le cycle cellulaire, certaines sont « **activatrices** » et favorisent la prolifération cellulaire comme CNF, alors que d'autres vont bloquer sa progression, elles sont dites « **inhibitrices** ». La toxine **CIF** est injectée par la bactérie à l'intérieur de la cellule et va entraîner la phosphorylation de Cdk et l'arrêt du cycle en phases G₁/S et G₂/M. La **colibactine** induit indirectement des cassures doubles brins et conduit au blocage du cycle cellulaire en phase G₂/M. **CDT** est une holotoxine qui induit des dommages à l'ADN et une accumulation des cellules en phase G₂. **CNF** est une cyclomoduline qui active l'avancement du cycle cellulaire en désaminant les protéines RhoGTPases.

Illustration modifiée d'après (Oswald *et al.*, 2005)

patients ayant un CCR de stade avancé (stade TNM III/IV) par rapport au stade précoce (stade TNM I) (Bonnet *et al.*, 2014).

Quatre cyclomodulines sont décrites chez les *E. coli* : la **colibactine**, la toxine **Cdt** (*cytotoxic distending toxin*), le facteur **Cif** (*cycle-inhibiting factor*) et le facteur cytotoxique nécrosant ou toxine **Cnf1** (**Figure 26**).

III-2-1 Cdt

Identifiée en 1988 à partir de souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de diarrhées, la toxine Cdt est la première toxine pour laquelle une activité de blocage du cycle cellulaire ait été décrite sur des cultures de cellules HeLa (Pérès *et al.*, 1997). La prévalence de cette toxine au sein des patients atteints de CCR est de 15,8% *versus* 0% chez les patients contrôles (Buc *et al.*, 2013).

Cdt est une holotoxine composée de trois sous-unités distinctes : Cdt-A, Cdt-B et Cdt-C (Lai *et al.*, 2021). Les sous-unités A et C permettent la liaison à la membrane plasmique de la cellule de l'hôte, alors que la sous-unité B code l'enzyme qui génère des CDB de l'ADN. Cette sous-unité est internalisée par endocytose et transloquée jusqu'à l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, avant d'atteindre sa cible nucléaire. L'accumulation des CDB au niveau de l'ADN entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M, en inhibant la déphosphorylation du complexe cdc2-cycline B (Comayras *et al.*, 1997) (**Figure 26**).

III-2-2 Cif

La cyclomoduline inhibitrice du cycle cellulaire Cif a été décrite en 1997 pour la première fois pour son action cytopathique sur les cellules HeLa (De Rycke *et al.*, 1997). Elle est produite essentiellement par des entéropathogènes tels que, les EPEC et les EHEC. La prévalence de cette toxine au sein des patients atteints de CCR est de 7,9% *versus* 0% chez les patients contrôles (Buc *et al.*, 2013).

Elle est composée d'un domaine N-terminal, qui porte un peptide d'adressage au système de sécrétion de type (T3SS), lui permettant d'être injectée directement dans la cellule hôte. Le domaine C-ter porte l'activité enzymatique et permet la synthèse de la toxine qui a une activité désaminase : elle est capable de désaminer la glutamine en position 40 de l'enzyme E2 du système d'ubiquitination et d'inhiber ainsi la voie ubiquitine/protéasome

(Taieb *et al.*, 2011). Une fois injectée dans la cellule, Cif va empêcher la dégradation des inhibiteurs des cyclines p21^{WAF1} et p27^{Kip1}. La stabilisation de ces protéines a pour conséquence de maintenir la protéine Cdk1 dans un état phosphorylé inactif et de bloquer le cycle cellulaire en phases G1/S et G2/M (**Figure 26**) (Samba-Louaka *et al.*, 2008).

III-2-3 Cnf

La toxine Cnf1 a été découverte et purifiée en 1983 par Caprioli *et al.* à partir d'une souche *E. coli* isolée d'un enfant présentant une diarrhée aiguë sévère (Caprioli *et al.*, 1983). Après injection sous-cutanée de la toxine à des lapins, Caprioli *et al.* ont remarqué une nécrose de la peau des animaux d'où son nom : facteur cytotoxique nécrosant.

Il existe trois isoformes connues de Cnf : Cnf1, Cnf2 et Cnf3. Chez l'Homme, Cnf1 est retrouvée surtout chez les souches responsables d'infection urinaires (UPEC) et est décrite dans le cas de méningites liées à la présence de souches *E. coli* associées aux méningites, les NMEC (*neonatal meningitis-causing Escherichia coli*) (Bonacorsi *et al.*, 2001). Les isoformes Cnf2 et Cnf3 sont moins fréquemment retrouvées par rapport à Cnf1. La toxine Cnf2 qui a 85% d'homologie avec CNF1, est produite par des souches d'*E. coli* isolées chez des animaux et en particulier des porcelets ou des veaux présentant des diarrhées ou des septicémies (Rycke, 1990; Oswald and De Rycke, 1990; Oswald *et al.*, 1994). La toxine Cnf3 présente 70% d'homologie de séquence protéique avec Cnf1 ; elle est principalement retrouvée chez des souches d'*E. coli* d'origine animale (serpents et moutons) (Orden *et al.*, 2007; Knust and Schmidt, 2010).

III-2-3-1-Prévalence du gène *cnf* dans le génome des *Escherichia coli*

Une étude récente a permis d'évaluer, grâce à l'outil Enterobase qui intègre une large base de données de génomes bactériens, la représentation du gène *cnf* parmi l'espèce *Escherichia coli* (Tsoumtsa Meda *et al.*, 2022). Dans cette étude, au sein d'une cohorte de 141 234 génomes d'*E. coli*, principalement d'Amérique et d'Europe, le gène *cnf* a été retrouvé dans 4.5% des génomes. Le gène *cnf1* est majoritaire (88%) alors que les gènes *cnf2* et *cnf3* sont bien moins fréquents (9 et 3%, respectivement). Le gène *cnf1* est préférentiellement associé au groupe phylogénique B2 (24%) et au sein de ce groupe.

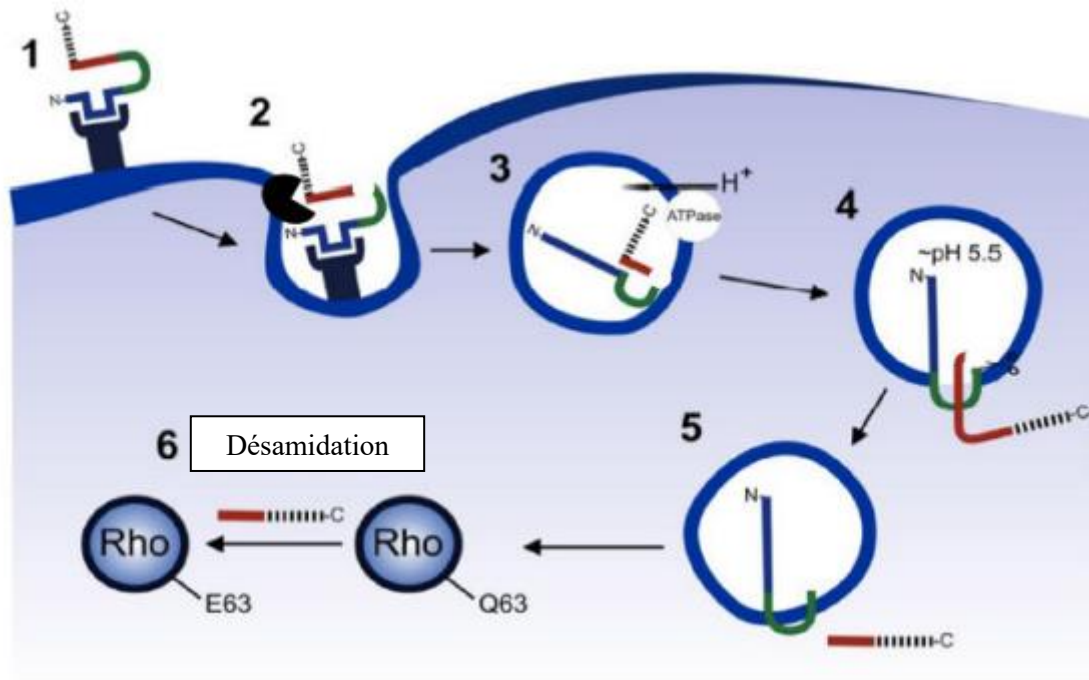


Figure 27 : Endocytose de la toxine Cnfl et translocation du domaine catalytique dans le cytosol de la cellule

Après fixation à ses récepteurs membranaires (1/2), Cnfl est ensuite clivée en deux à la surface de la cellule (2) puis internalisée dans une vésicule d'endocytose (3). L'acidification du compartiment endosomal tardif entraîne l'insertion de Cnfl dans la bicouche lipidique de l'endosome (4). Ce phénomène serait responsable de la translocation du domaine C-terminal portant l'activité enzymatique dans le cytosol (5). Cette région catalyse alors la désamidation de la glutamine 63 de Rho A ou de la glutamine 61 de Rac1 et Cdc42 (6).

Illustration modifiée d'après (Knust and Schmidt, 2010)

III-2-3-2 Support génétique, régulation de l'expression de Cnf1

Le gène *cnf1* est localisé sur le chromosome bactérien et se trouve sur un îlot de pathogénicité à la suite de l'opéron *hlyCABD* (Landraud et al., 2003). Cet opéron code l'hémolysine A, qui a un effet cytotoxique sur une grande variété de cellules humaines notamment les cellules épithéliales du tractus urinaire et les cellules immunitaires (Johnson, 1991). Cnf1 est transcrit sur un seul ARN messager avec les gènes de l'hémolysine (Lemonnier *et al.*, 2007). Au niveau génique, il existe une co-régulation transcriptionnelle de l'opéron *hlyCABD* et du gène *cnf1* sous le contrôle du facteur RfaH (Landraud *et al.*, 2003). La fixation de RfaH en aval du promoteur de *hlyCABD* permet la transcription concomitante des gènes et l'inactivation du gène *rfaH* diminue également la production de la toxine Cnf1.

III-2-3-3 Entrée de Cnf1 dans la cellule

Cnf1 rentre dans la cellule par endocytose. Ce mécanisme passerait notamment par l'activation par Cnf1 du récepteur des laminines LRP présent à la surface de nombreuses cellules (Chung *et al.*, 2003). L'association aux récepteurs entraîne l'internalisation de la toxine dans la cellule par une voie d'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (Contamin *et al.*, 2000). Sous l'action de l'acidification du compartiment endosomal tardif, Cnf1 est insérée dans la bicouche lipidique, ce qui induirait la translocation de la partie C-terminale possédant l'activité enzymatique de la protéine dans le cytosol de la cellule (Pei *et al.*, 2001) (**Figure 27**).

III-2-3-4 Mécanisme d'action de Cnf1

Cnf1 a une action post-traductionnelle sur la désamidation des protéines de la famille des RhoGTPases (Flatau *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1997). Quand les protéines RhoGTPases sont liées à une molécule de GDP, elles sont sous forme inactive. La liaison avec une molécule de GTP rend ces protéines actives. Les RhoGTPases comme Rho, Rac1 et Cdc42 sont des protéines qui contrôlent un grand nombre de processus cellulaires. Cnf1 désamine le résidu de la glutamine 63 sur les protéines RhoA ou celui de la glutamine 61 pour les protéines Cdc42 et Rac1. Cette modification post-traductionnelle entraîne l'activation permanente des RhoGTPases.

L'action de Cnf1 sur l'activation constitutive des RhoGTPases peut être régulée par un rétrocontrôle actif : un haut taux de protéines RhoGTPases activées peut être un signal de

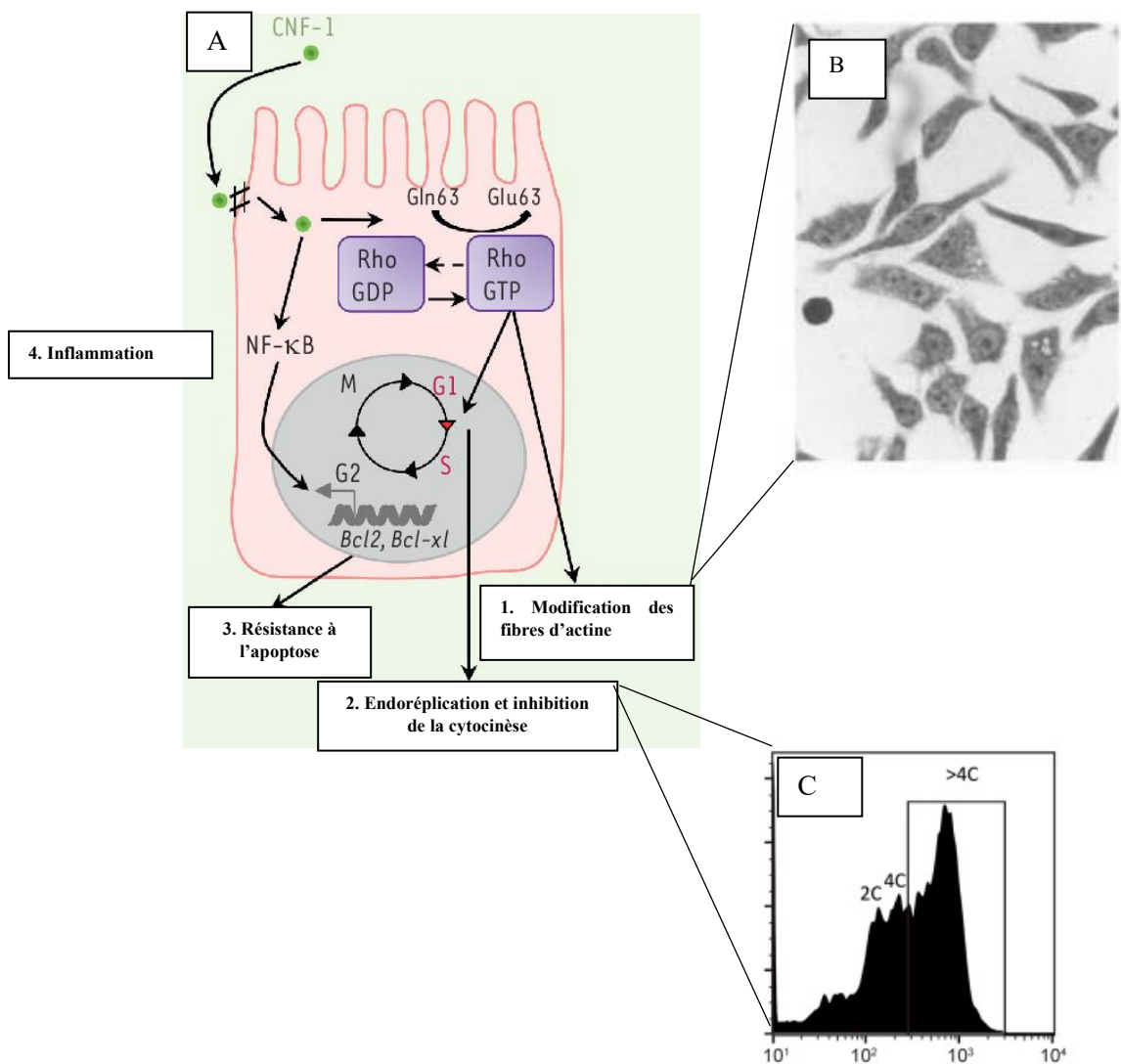


Figure 28 : Action de Cnf1 sur la cellule

L'activation constitutive des protéines RhoGTPases par Cnf1 a des conséquences sur les processus médiés par les protéines RhoGTPases (A). Cnf1 médie la modification du cytosquelette d'actine. Des cellules Véro infectées présentent une morphologie atypique en « colibri » (B). Les cellules infectées sont également multinucléées, conséquences de l'endoréplication et de l'inhibition de la cytokinèse (C).

Illustration modifiée d'après (Raisch *et al.*, 2016), (Caprioli *et al.*, 1983) et (Zhang *et al.*, 2018)

déclenchement des mécanismes de dégradation du contenu cellulaire. Les protéines RhoGTPases vont être ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome de la cellule. L'analyse transcriptomique de cellules endothéliales stimulées pendant des temps différents avec Cnf1 (incubation des cellules avec du milieu contenant de la protéine pendant 3h ou 24h), révèle le déclenchement des mécanismes de défense de la cellule hôte et notamment l'augmentation des marqueurs inflammatoires comme l'*IL-8* et l'*IL-6* (Munro *et al.*, 2004). La dégradation par le protéasome des protéines RhoGTPases surnuméraires pourrait permettre de diminuer la réponse inflammatoire cellulaire induite par l'activation constitutive des RhoGTPases par Cnf1. Ceci pourrait faciliter également la survie des bactéries productrices de Cnf1 dans la cellule hôte (Munro and Lemichez, 2005).

L'activation constitutive de ces protéines par Cnf1 a pour conséquences sur la cellule la polymérisation des fibres d'actine, la dérégulation du cycle cellulaire et la modulation de processus inflammatoires (**Figure 28A- 1 à 4**).

1. Cnf1, activation des RhoGTPases et polymérisation de l'actine.

Le cytosquelette d'actine permet à la cellule de maintenir une plasticité morphologique qui lui est nécessaire pour sa migration et l'adaptation à son environnement. Les protéines RhoGTPases comme Rac1 et Cdc42 contrôlent le réarrangement du cytosquelette d'actine. Rac1 induit la polymérisation de l'actine corticale pour former les protrusions membranaires que l'on appelle lamellipodes. Rac1 couplé à une molécule de GTP (activé notamment par Cnf1) est responsable de la formation de nouveaux polymères d'actines branchés et de l'inhibition de la cofiline, ce qui stabilise l'actine filamenteuse (Amann and Pollard, 2001). Ces deux mécanismes sont nécessaires pour la formation des lamellipodes. Cdc42 permet quant à lui la formation des filopodes (Jaffe and Hall, 2005).

Les cellules infectées par Cnf1 ont une morphologie atypique comme conséquence des modifications des fibres d'actine. Les cellules sont allongées et sous forme multinucléées (**Figure 28B**). La toxine induit également une mobilité des cellules infectées dès 6h post-infection des cellules endothéliales HUVEC (Doye *et al.*, 2002). Cnf1 permet ainsi le remodelage du cytosquelette d'actine et favorise l'internalisation de la bactérie dans la cellule de l'hôte comme l'ont démontré Doye *et al.* Ceci peut favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques au niveau de l'épithélium urinaire voire intestinal.

2. *Cnf1, activation des RhoGTPases, cytokinèse et blocage du cycle cellulaire*

La cytokinèse correspond à la division de la cellule mère en deux cellules filles. Les premiers travaux menés sur Cnf1 ont démontré que la toxine était capable d'inhiber la cytokinèse des cellules HEp-2 et HeLa et d'induire leur multinucléation *via* l'activation des protéines RhoGTPases (Caprioli *et al.*, 1984; Falbo *et al.*, 1993). Cnf1 va également induire le blocage du cycle cellulaire en phase G2/M (Falzano *et al.*, 2006). Les travaux de Zhang *et al.*, ont mis en évidence que des cellules traitées avec la protéine Cnf1 avaient un phénotype endoréplicatoire, c'est-à-dire qu'elles continuent à dupliquer leur matériel génétique mais sans se diviser, ce qui aboutit à un cytogramme à n=8,16,32 noyaux (**Figure 28-C**) (Zhang *et al.*, 2018). Les cellules HCT-116 traitées avec la protéine Cnf1 pendant 72h présentaient aussi pour 38% d'entre-elles au moins deux noyaux.

3. *Cnf1, activation des RhoGTPases et inhibition de l'apoptose*

Les protéines GTPases Rac1 activées par Cnf1 participent à la résistance à l'apoptose (**Figure 28A**). Une inhibition des mécanismes apoptotiques par Cnf1 a été décrite dans des modèles cellulaires (Mills *et al.*, 2000). Néanmoins ce mécanisme ne semble pas si simple et CNF1 peut montrer un phénotype pro ou anti-apoptotique en fonction du type cellulaire utilisé et du degré de transformation des cellules (Carlini *et al.*, 2021). Par exemple, dans les cellules épithéliales HEp-2, Cnf1 active NF- κ B *via* la voie de survie Rac1/PI3K/Akt/IKK avec pour conséquence la modulation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, alors qu'elle induit une apoptose des cellules uroépithéliales (Mills *et al.*, 2000; Fiorentini *et al.*, 2001).

4. *Cnf1 et inflammation*

Cnf1 induit également une reprogrammation des macrophages en macrophages de type M1 à la suite d'une infection par les UPEC (Sun *et al.*, 2022). L'activation des macrophages de type M1 aboutit à l'activation des fonctions pro-inflammatoires et antimicrobiennes de l'organisme. Ils induisent l'expression de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires tels que les IL-6, IL-8, IL-12, IL-1 β , et TNF- α et la production d'iNos (Munro *et al.*, 2004).

Les travaux de Sun *et al.*, mettent en évidence la double action de la toxine Cnf1, qui a, en parallèle de son action directe sur la famille des RhoGTPases (comme Rac1), une action indirecte sur la voie JAK-STAT. En formant un complexe Cnf1-JAK1/JAK2, Cnf1 induit une cascade de phosphorylation des protéines JAK1 et 2 puis STAT1. Le dimère de STAT1

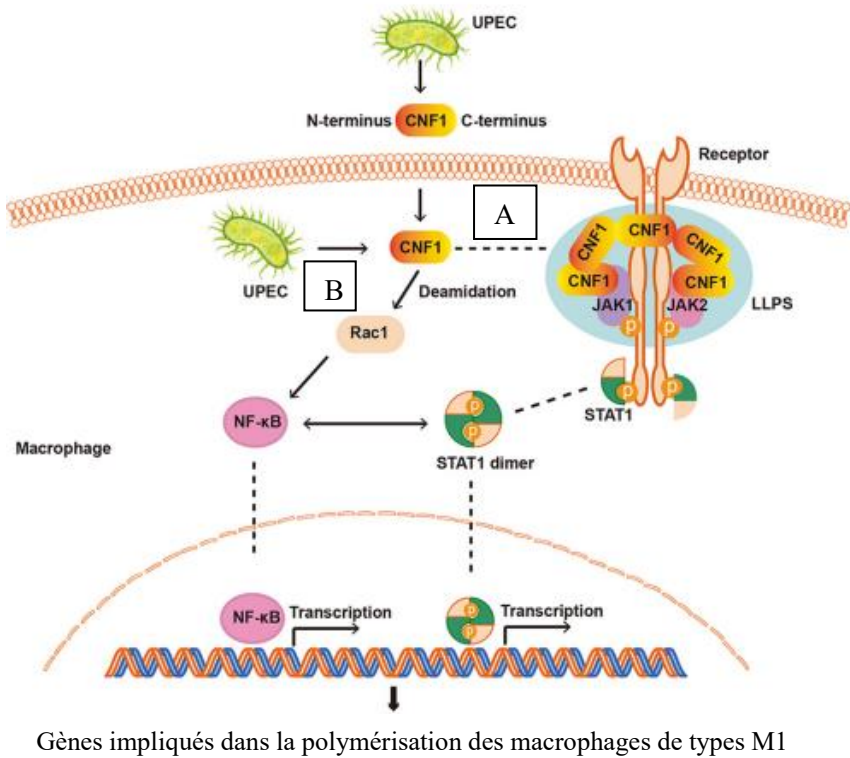


Figure 29 : Mode d'action de Cnf1 sur les mécanismes inflammatoires

Cnf1 produite par les UPEC favorise la polarisation des macrophages M1 en régulant les voies de signalisation NF-κB et JAK1/2-STAT1. Cnf1 interagit directement avec JAK1 et JAK2 pour former un complexe protéique (A). Ce complexe induit la phosphorylation de JAK1/2 et l'activation de STAT1. Cependant, Cnf1 agit aussi directement sur NF-κB en activant les protéines de la famille des RhoGTPases comme Rac1 (B).

Sous ces actions, NF-κB et STAT1 vont être dimérisés et migrés vers le noyau, où ils vont induire la transcription de gènes régulant ainsi la polarisation des macrophages M1.

Illustration modifiée d'après (Sun *et al.*, 2022)

phosphorylé et celui de NF- κ B vont se dimériser et ainsi migrer jusqu'aux noyaux des cellules. Ils vont agir en tant que facteur de transcription en se fixant à l'ADN et permettre l'expression de gènes impliqués dans la reprogrammation des macrophages, en macrophages de type M1 (**Figure 29**).

Les *E. coli* qui produisent Cnf1 peuvent donc moduler la réponse des cellules inflammatoires et pourraient ainsi contribuer à la création d'un microenvironnement pro-inflammatoire propice au développement du CCR (Fabbri and Bracci, 2022).

III-2-3-5 Cnf1 chez les *E. coli* associés au cancer

Les recherches de Buc *et al.*, ont permis d'observer que Cnf1 était présent dans 40% (n=15/38) des *E. coli* isolés des tissus cancéreux de patients atteints de CCR et chez 13% des patients contrôles (n=4/31) (Buc *et al.*, 2013). C'est la 2^{ème} cyclomoduline la plus retrouvée (19%, n=16/116) dans le génome des *E. coli* après la colibactine (28%, n=24/116). Une étude plus récente sur une cohorte de 325 biopsies de patients ayant subi une coloscopie a permis de confirmer ces données épidémiologiques (Piciocchi *et al.*, 2021). Dans cette étude, Cnf1 et la colibactine sont également les deux cyclomodulines les plus fréquemment retrouvées dans le génome des *E. coli* isolés des coloscopies (29%, n=40/325 et 38%, n= 89/325 respectivement). *Cnf1* est présente chez les *E. coli* isolés des tissus issus des patients ayant un adénocarcinome (41%, n=11/29) et chez les patients contrôles (27%, n=42/162), mais aucune association significative n'a pu être trouvée avec les *E. coli* isolés des polypes hyperplasiques ou des stades d'adénomes.

Les mécanismes pro- ou anti- carcinogènes de la toxine Cnf1 ne sont donc encore pas totalement élucidés (Fabbri *et al.*, 2013) et un effet néfaste sur le développement du CCR n'a pas encore été démontré (Carlini *et al.*, 2021).

III-2-3-6 Portée thérapeutique de Cnf1

Cnf1 a notamment été étudiée pour son rôle potentiel en tant qu'**adjuvant** (Munro *et al.*, 2004). En effet, il présente des propriétés immunomodulatrices semblables à celle de la toxine cholérique. Administrée par voie orale à des souris, la protéine Cnf1 favorise la réponse anti-OVA (protéine utilisée pour stimuler le système immunitaire) au niveau systémique et mucosal.

D'autres travaux menés sur la toxine Cnf1 montrent que l'injection de cette toxine au niveau cérébral dans un modèle murin mimant la maladie d'Alzheimer favoriserait aussi la **restauration des capacités cognitives des souris** (Loizzo *et al.*, 2013). Dans leurs travaux, Loizzo *et al.*, les souris traitées avec de la protéine Cnf1 purifiée répondaient plus rapidement aux différents tests proposés par les expérimentateurs (test du labyrinthe, test de mémoire spatiale). Ces souris présentaient une activation plus importante des protéines Rho-GTPases au niveau de l'hippocampe, associée avec une augmentation des niveaux d'ATP.

De plus, les travaux de recherche de Vannini *et al.*, sur des cellules de gliomes (GL261) en culture et traitées avec Cnf1 ont mis en évidence, par des analyses transcriptomiques et protéomiques, une réduction des marqueurs de sénescence (p16, p21) et des facteurs de croissance (EGF, PDGF). Ils ont également démontré que l'administration par voie systémique de la protéine de Cnf1 recombinante à des souris ayant été greffées de cellules tumorales GL261, permettait de réduire le volume tumoral (Vannini *et al.*, 2016). Dans la suite de leurs travaux de recherche, ils ont administré à des souris porteuses d'un gliome, la protéine Cnf1 couplée à une protéine chimérique permettant son passage à travers la membrane hémato-encéphalique. Les souris ainsi traitées présentaient une réduction de la masse tumorale du gliome, associée avec une meilleure survie des animaux, en comparaison à des animaux contrôles (Vannini *et al.*, 2021).

III-2-4 La colibactine

La cyclomoduline la plus étudiée dans le CCR, à ce jour reste, la **colibactine**, dont la genèse des travaux est attribuée à l'équipe toulousaine d'Eric Oswald. L'îlot génomique nommé *pks* responsable de sa synthèse a été découvert dans une souche d'*Escherichia coli* isolée d'un patient atteint de méningite (Nougayrède *et al.*, 2006). Les *E. coli* porteurs de cet îlot et ayant un effet génotoxique sont nommés dans la littérature *E. coli pks+* ou CoPEC pour *Escherichia coli* producteurs de colibactine. Les CoPEC sont capables de persister dans le tube digestif des souris infectées prédisposées au CCR et d'induire une augmentation du nombre de tumeurs et du volume tumoral, suggérant un rôle pro-carcinogène dans ces modèles (Arthur *et al.*, 2012; Dalmasso *et al.*, 2014; Cougnoux *et al.*, 2014; Cougnoux *et al.*, 2014; Tomkovich *et al.*, 2017).

La présence de certains *E. coli* (CoPEC) dans la muqueuse colique de patients atteints de CCR opérés, semble être un facteur de risque de complications sévères post-chirurgicales.

Gènes	Rôle de la protéine dans la production de la colibactine
<i>ClbA</i>	Protéine accessoire : phosphotransférase (active d'autres enzymes) et favorise le recrutement de cofacteur.
<i>ClbR</i>	Protéine activatrice
<i>ClbB</i>	Enzyme de synthèse hybride NRPS-PKS
<i>ClbC</i>	Enzyme de synthèse : PKS
<i>ClbD</i>	Enzyme de synthèse : hydroxyl acyl coA déshydrogénase
<i>ClbE</i>	Enzyme de synthèse : Protéine porteuse d'acyle
<i>ClbF</i>	Enzyme de synthèse : $\alpha\beta$ déshydrogénase
<i>ClbG</i>	Enzyme de synthèse : Acyle transférase
<i>ClbH</i>	
<i>ClbI</i>	Enzyme de synthèse : PKS
<i>ClbJ</i>	Enzyme de synthèse : NRPS
<i>ClbK</i>	Enzyme de synthèse : hybride PKS-NRPS
<i>ClbL</i>	Enzyme de synthèse : amidase
<i>ClbM</i>	Protéine accessoire : pompe à efflux permettant le transport de la protéine à l'extérieur de la cellule
<i>ClbN</i>	Enzyme de synthèse : NRPS
<i>ClbO</i>	Enzyme de synthèse : PKS
<i>ClbP</i>	Protéine accessoire : peptidase <i>fntA</i> permettant le transport de la pré-colibactine du cytoplasme au périplasma et le clivage de la pré-colibactine en colibactine active génotoxique.
<i>ClbQ</i>	Enzyme de synthèse : thioestérase
<i>ClbS</i>	Protéine accessoire : inactive la colibactine afin de protéger la cellule bactérienne

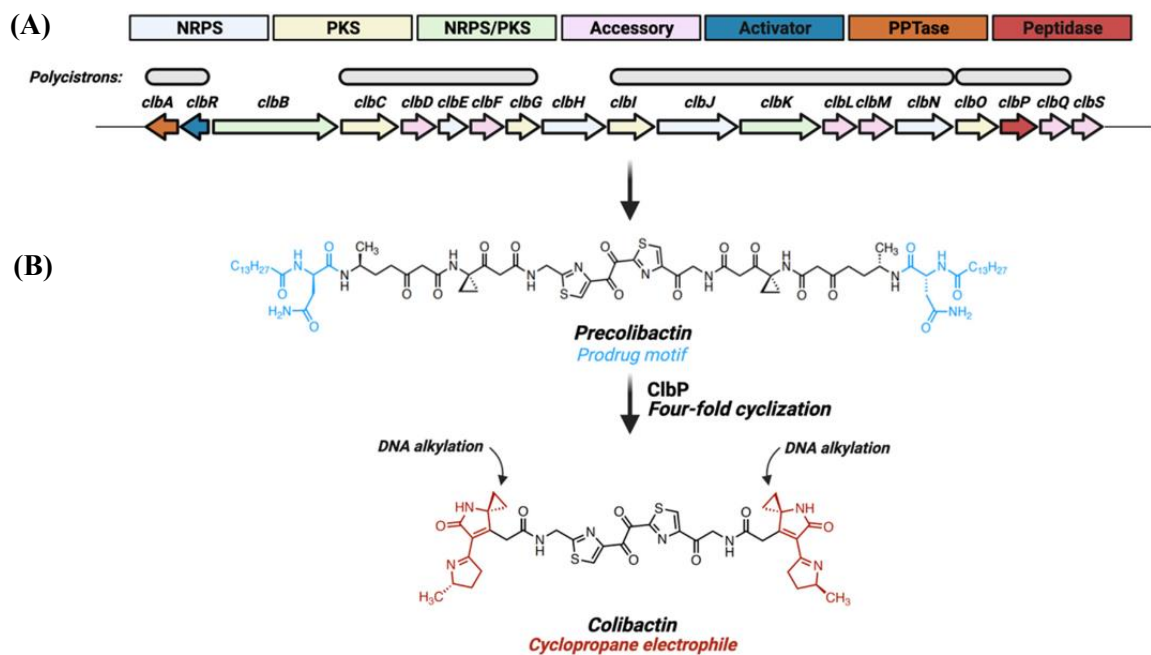


Figure 30 : Représentation schématique de l'îlot *pks*

L'îlot génomique *pks* de 54 kb est un ensemble de 19 gènes qui codent pour des polycétides synthases (PKS), des peptides synthases non-ribosomiques (NRPS), et deux hybrides NRPS/PKS. Il comprend également des gènes accessoires et régulateurs (A). La production de la colibactine au niveau transcriptionnel est régulée par le gène activateur phosphotransférase *ClbR* et *ClbA*. Par la suite, le multi-complexe enzymatique PKS, NRPS et NRPS/PKS, en fonctionnant telle une chaîne d'assemblage où le composé synthétisé est transféré d'un module enzymatique à l'autre qui permet la transcription d'une molécule intermédiaire nommée « pré-colibactine ». Cette molécule présente des motifs N-myristoyl-D-asparagines aux extrémités (en bleu). C'est grâce à l'action de la protéine *ClbP* que la colibactine va être maturée et cyclisée aux extrémités et former les deux cycles de cyclopropanes électrophiles caractéristiques de la molécule bioactive (B).

Illustration modifiée d'après (Faïs *et al.*, 2018) et (Dougherty and Jobin, 2021)

Les études de notre équipe, menées sur un modèle murin ayant reçu une xélogreffe de cellules cancéreuses MC38, ont dévoilé que la colonisation du tractus intestinal par ces CoPEC dans le tube digestif, réduisait la sensibilité au traitement d'immunothérapie anti-PD1 (Lopès *et al.*, 2020).

III-2-4-1 Prévalence de l'îlot *pks*

L'îlot *pks* est essentiellement retrouvé dans des *E. coli* du groupe phylogénique B2 (Desvaux *et al.*, 2020). Il est fortement associé aux souches méningées (75%), mais il est également retrouvé dans les souches responsables de sepsis (environ 50%) et de cystites (33%) (Bakthavatchalu *et al.*, 2018; Auvray *et al.*, 2021). Cet îlot a également été retrouvé occasionnellement chez d'autres membres des *Enterobacteriaceae* comme *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri* (Putze *et al.*, 2009).

Une forte prévalence des *E. coli pks+* a été observée dans les tumeurs des patients atteints de CCR (55-67%) comparativement aux tissus de patients contrôles (20-21%) (Arthur *et al.*, 2012; Buc *et al.*, 2013). Gagnière *et al.*, ont également montré que la présence des *E. coli pks+* était plutôt associée au CCR de type MSS par rapport au CCR de type MSI, au sein d'une étude clinique portant sur 88 patients atteints de CCR sporadique (Gagnière *et al.*, 2017).

III-2-4-2 Production et structure de la colibactine

L'îlot *pks* qui est responsable de la synthèse de la colibactine est un îlot de pathogénicité de 54 kb. Il code entre autres différentes enzymes telles que des polycétides synthases et des peptides synthases non-ribosomiques (Nougayrède *et al.*, 2006).

La biosynthèse de la colibactine nécessite l'activation des mégasynthases PKS/NRPS, organisées en méga-complexes dont le fonctionnement est semblable à une chaîne de montage, dans laquelle le composé synthétisé est transféré d'un module enzymatique au suivant. L'initiation de la chaîne est réalisée par la phosphopantetheinyl transferase ClbA et la protéine activatrice ClbR (**Figure 30A**). Une fois activées, les mégasynthases vont recruter leurs ligands spécifiques (**Figure 31**). La première enzyme intervenant dans la synthèse est ClbN, dont le substrat est l'asparagine (Asn). L'assemblage se poursuit avec l'intervention successive des enzymes ClbB-C-H-I-J-K qui utilisent divers substrats. La pré-colibactine inactive est ensuite exportée au niveau du périplasma grâce à la pompe à efflux ClbM, insérée

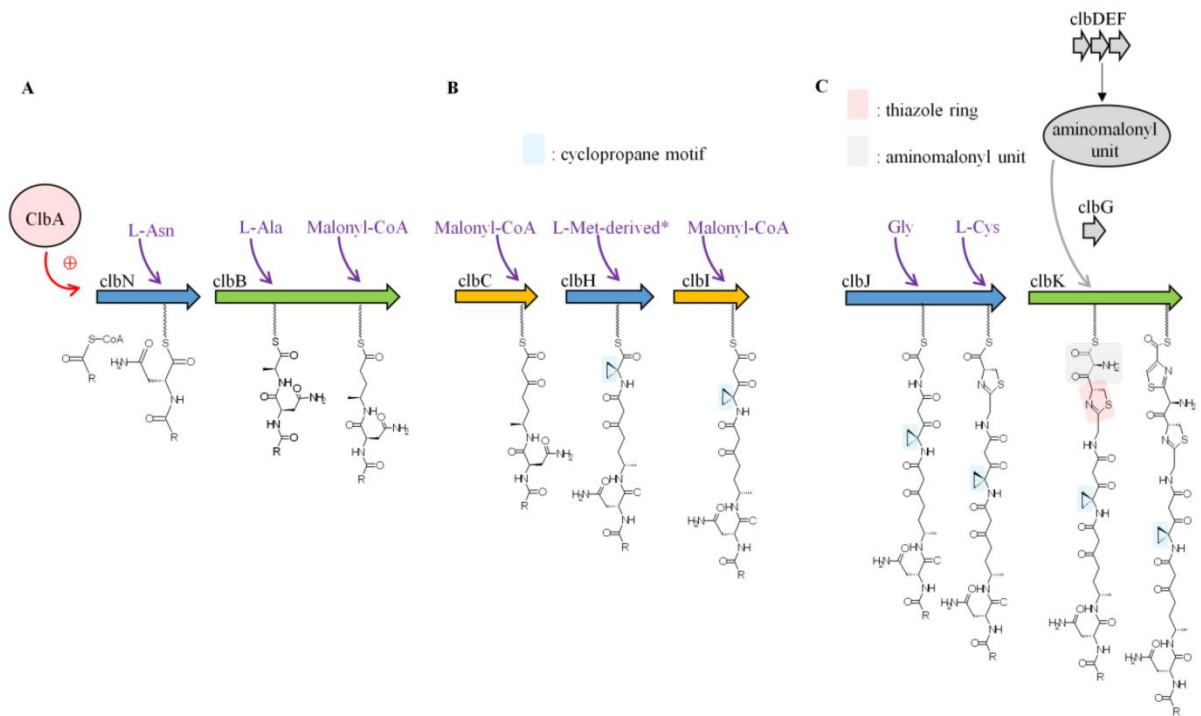


Figure 31 : Représentation de la biosynthèse de la colibactine

Illustration modifiée d'après (Faïs *et al.*, 2018)

dans la membrane interne (Mousa *et al.*, 2016). La pré-colibactine est maturée et hydrolysée, grâce à ClbP, une peptidase insérée dans la membrane de la bactérie, pour former la colibactine finale sous forme active (Cougnoux *et al.*, 2012) (**Figure 30B**). Cette maturation est réalisée par le clivage des groupements N-myristoyl-D-asparagine aux extrémités de la pré-colibactine et la génération de deux noyaux de cyclopropane. Ces derniers peuvent se lier à l'adénine de l'ADN cellulaire et induire des liaisons inter-brins, en partie responsable de l'action génotoxique de la colibactine (Bossuet-Greif *et al.*, 2018). L'activation tardive de la colibactine à l'extérieur de la bactérie pourrait notamment être un mécanisme de défense pour la bactérie contre les effets de ce composé génotoxique. En 2016, une protéine spécifique de l'inhibition de la toxicité de la colibactine a été découverte : ClbS qui permet d'hydrolyser le cycle cyclopropane responsable de l'activité de la colibactine (Bossuet-Greif *et al.*, 2016; Auvray *et al.*, 2021). Ainsi le mutant $\Delta ClbS$ est incapable d'inhiber l'effet génotoxique induit sur des cellules HeLa comparativement à la souche sauvage.

La colibactine a été découverte en 2006 (Nougayrède *et al.*, 2006) mais sa structure n'a été que récemment établie (Xue *et al.*, 2019). Xue *et al.*, ont utilisé des analyses combinées de synthèse chimique et de co-cultures cellulaires pour déterminer la structure terminale de la toxine (**Figure 30B**).

III-2-4-3 Impacts de la colibactine sur l'hôte

Colibactine, dommages à l'ADN et système DDR

La molécule de colibactine présente deux cycles cyclopropanes électrophiles qui peuvent se lier avec les adénines de la molécule d'ADN et former des **adduits** et la création de **ponts inter-brins** (Xue *et al.*, 2019) (**Figure 31A**). Ces dommages à l'ADN vont activer les systèmes DDR de la cellule qui va les prendre en charge en utilisant les voies décrites en *section I-4-2* du manuscrit. L'activation de ces voies a été mise en évidence, notamment dans l'étude de Cueva-Ramos *et al.*, où une analyse cytogénétique a été réalisée sur des cellules CHO (issues d'ovaires de hamsters) non modifiées ou des cellules CHO déficientes dans la réparation des dommages à l'ADN par la voie NHEJ et infectées par des *E. coli pks+* (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010). Les cellules infectées et déficientes présentent des chromosomes dicentriques, des cassures de la chromatine et des ponts anaphasiques non résolus ainsi qu'une polyploidie qui augmente dans le temps, jusqu'à 21 jours post-infection.

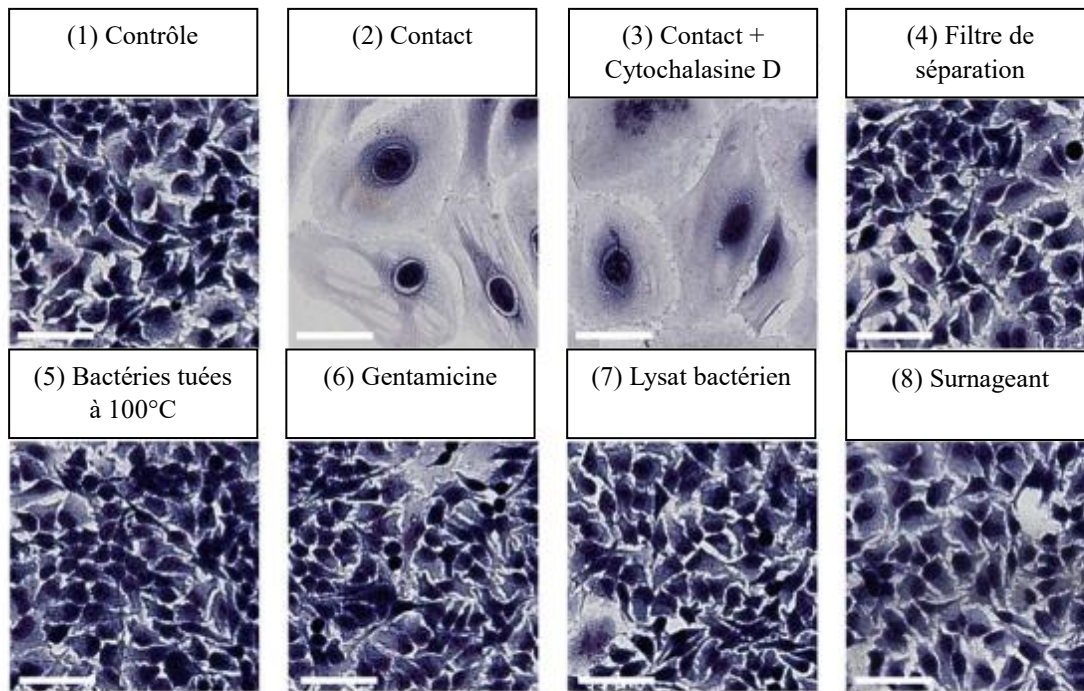


Figure 32 : Changements morphologiques induits par l'interaction d'*E. coli pks+* et de cellules épithéliales

La souche extra-intestinale pathogène *E. coli pks+* SP15 a été mise en contact avec des cellules HeLa pendant 4 heures, puis les cellules ont été lavées et l'aspect macroscopique des cellules a été observé au microscope après coloration au Giemsa (2). En parallèle, ces mêmes bactéries ont été co-incubées avec un inhibiteur de l'internalisation bactérienne, la cytochalasine D ce qui n'a pas eu d'action sur l'effet cytopathogène des bactéries (3). Cependant lorsqu'un filtre de séparation empêchant le contact cellules-bactéries a été utilisé, l'effet cytopathogène n'est plus observé (4), de même que lorsque les bactéries sont tuées par la chaleur (5) ou incubées pendant 72h avec de la gentamicine. Cet antibiotique a une action bactéricide sur les bactéries à Gram négatif dont font partie les *E. coli* (6). L'incubation des cellules avec un lysat bactérien (7) ou le surnageant seul (8) n'a pas d'effet sur les cellules suggérant que pour induire ces effets cytopathogènes **la colibactine doit être libérée par des bactéries vivantes au contact des cellules**. Les bars d'échelle correspondent à 50 µm.

Illustration modifiée d'après (Nougayrède *et al.*, 2006).

Il a également été montré que les cellules intestinales humaines T84 infectées par les CoPEC présentent une expression réduite de la protéine de réparation de l'ADN, MLH1 (Gagnière *et al.*, 2017).

De plus, il a été mis en évidence que les CDB induites par la colibactine se produisaient dans un contexte génomique spécifique, au niveau de régions de l'ADN riche en séquences hexamériques, de type Adénine-Thymine (Dziubańska-Kusibab *et al.*, 2020). D'après une étude menée récemment sur 619 génomes de patients, les mutations détectées chez ces patients sont souvent retrouvées au niveau de telles séquences hexamériques.

La même année Pleguezuelos-Manzano *et al.*, ont publié un article permettant d'associer la signature mutationnelle induite par les CoPEC dans un modèle d'organoïde avec celle retrouvée chez les tumeurs et les métastases de patients atteints de CCR (Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020). Les mutations liées aux CoPEC sont dans 2,4% des cas des mutations activatrices du CCR et 5,4% des mutations sont retrouvées dans le gène *APC*.

Ces travaux viennent renforcer l'hypothèse du rôle *driver* des CoPEC, c'est-à-dire que ces bactéries pourraient être impliquées dans l'initiation des premières étapes du développement du CCR. De plus, ces CoPEC semblent être transmissibles de la mère à l'enfant. L'administration à des rates gestantes de *E. coli pks+*, aboutit à une colonisation stable par la bactérie du tractus intestinal de la progéniture (Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020). Des dommages à l'ADN sont détectés chez les nouveau-nés même si la présence de tumeur n'a pas été observée chez ces souriceaux.

Colibactine, sénescence et prolifération

De par leur génotoxicité, les CoPEC peuvent également induire la sénescence des cellules épithéliales qu'elles infectent. Les cellules qui rentrent en sénescence présentent différentes caractéristiques : une mégalyocytose, une activité β -galactosidase lysosomale à pH 6, une accumulation des protéines p53, p21 et p16 impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi qu'une diminution de la peptidase SENP1 (*sentrin-specific protease 1*) qui contrôle les mécanismes prolifératifs (Lopes-Paciencia *et al.*, 2019; Kumari and Jat, 2021). La présence de mégalyocytes dans les cellules HeLa infectées par une souche *E. coli pks+* a notamment été mise en évidence lors des premières descriptions des effets de la colibactine (Nougayrède *et al.*, 2005) (**Figure 32-(2)**). Cette sénescence pourrait participer au développement tumoral.

Les cellules épithéliales, préalablement infectées par des *E. coli pks+* et devenues sénescents, libèrent dans leur milieu de culture des composés qui favorisent la prolifération des cellules non infectées, alors que les milieux de culture des cellules infectées par des *E. coli pks-* n'ont pas cet effet. Cela a été expliqué par la sécrétion de facteurs de croissance (SASP) par les cellules sénescents (Cognoux *et al.*, 2014).

La **sénescence** peut avoir un **rôle anti- ou pro-tumoral** en fonction du contexte (Rao and Jackson, 2016). Dans le contexte de la sénescence induite par les CoPEC, le ratio bactéries/cellules cancéreuses apparaît déterminant. En effet, en modèle de xéno greffe murin, lorsque les cellules épithéliales greffées sont infectées par des CoPEC avec une multiplicité d'infection (MOI) de 20, il est observé une augmentation du volume des tumeurs et du nombre de cellules Ki67 positives, suggérant que les CoPEC induisent une prolifération cellulaire qui pourrait être expliquée par un effet de la sénescence sur les cellules non infectées (Dalmaso *et al.*, 2014). Avec une MOI de 100, la croissance tumorale était en revanche diminuée. Si la quasi-totalité des cellules sont en sénescence, il ne peut plus y avoir de prolifération. Toutefois, en contexte physiologique, c'est l'effet pro-tumoral qui apparaît dominant comme cela a été montré dans un modèle murin AOM/DSS (Cognoux *et al.*, 2014).

Les CoPEC pourraient donc, *via* le SASP, promouvoir le développement d'un adénocarcinome, classant ces bactéries dans les *passengers*.

CoPEC, autophagie et modulation de l'inflammation

L'autophagie est un processus cellulaire qui permet de maintenir l'homéostasie cellulaire en condition physiologique de stress. L'autophagie consiste en la dégradation lysosomale d'éléments cytoplasmiques, tels que des organites cellulaires endommagés mais aussi des pathogènes intracellulaires. Elle semble nécessaire pour limiter les effets pro-tumoraux et pro-inflammatoires des CoPEC (Lucas *et al.*, 2020).

Néanmoins, les récentes études menées au laboratoire sur le lien entre la présence des CoPEC et les mécanismes de l'autophagie ont démontré que la CoPEC 11G5 était capable d'échapper à l'autophagie (Lucas *et al.*, 2020; Salesse *et al.*, 2021). L'infection de cellules épithéliales HCT116 (Lucas *et al.*, 2020) ou de cellules myéloïdes (Salesse *et al.*, 2021) déficientes pour l'autophagie, par cette souche, induit une augmentation de cytokines pro-inflammatoires comparativement aux cellules présentant une autophagie fonctionnelle.

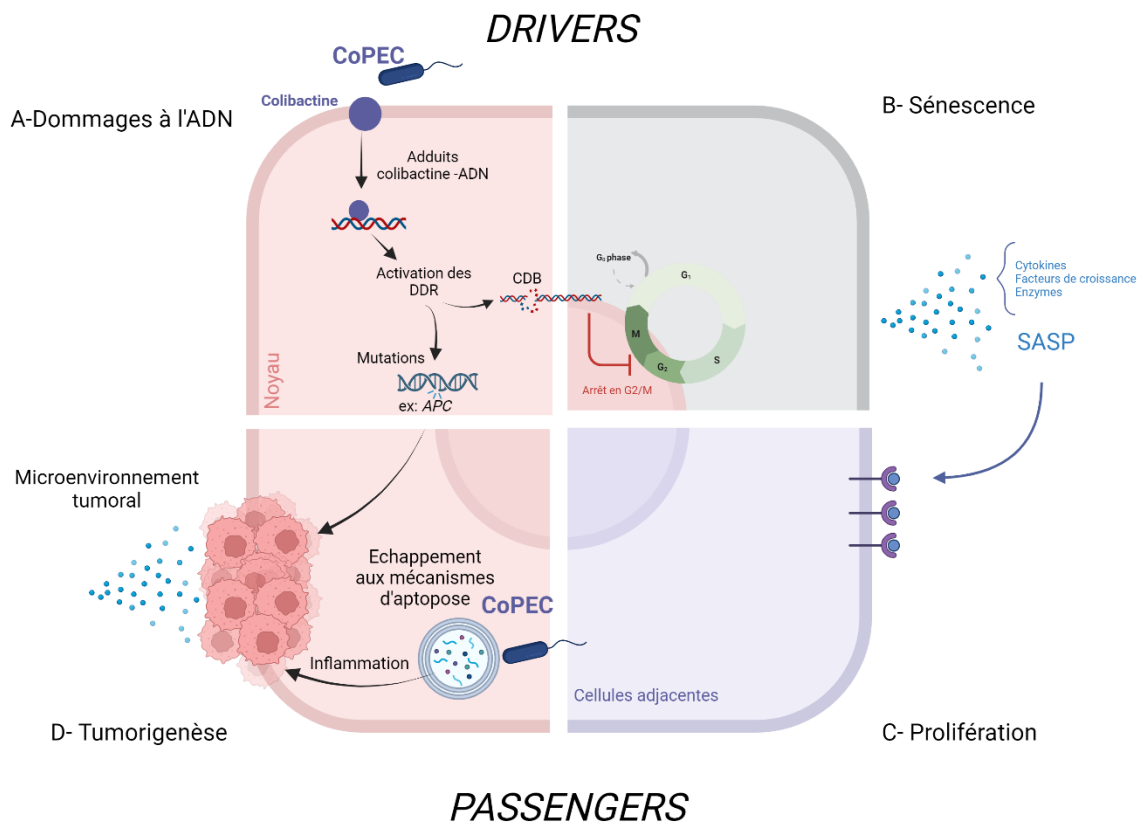


Figure 33 : Effets des *E. coli* productrices de la colibactine sur la cellule

Certains *E. coli* producteurs de colibactine sont également capables de survivre et de se multiplier à l'intérieur des macrophages contrairement aux *E. coli* commensaux qui sont eux rapidement éliminés après infection (Raisch *et al.*, 2015). Dans cette étude, les CoPEC ayant infecté les cellules macrophagiques humaines THP-1, induisent une augmentation de l'expression de la cyclo-oxygénase (COX-2). Cet effet est annulé quand les macrophages infectés sont traités par de l'ofloxacine, un antibiotique qui pénètre dans les macrophages. Néanmoins, d'après ces travaux, cet effet ne semble pas dû à la production de la colibactine car le mutant $\Delta ClbQ$ a le même effet.

Colibactine et carcinogène colorectale

Plusieurs modèles murins de CCR ont été utilisés pour étudier l'effet de la colibactine sur le développement du cancer : soit la cancérogenèse est induite par un agent chimique comme AOM / DSS, soit la cancérogenèse est induite par modification génétique (souris *Apc^{Min/+}*). Dans ces modèles murins, l'administration des CoPEC par gavage augmente le nombre de tumeurs coliques (Arthur *et al.*, 2012; Dalmasso *et al.*, 2014; Cougnoux *et al.*, 2014; Lucas *et al.*, 2020; Salesse *et al.*, 2021). De plus, lorsque des cellules tumorales HCT116 infectées par les CoPEC, sont greffées à des souris « nues », une prolifération accrue au niveau des cellules HCT116 est observée (Cougnoux *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces travaux présentés suggèrent que les CoPEC pourraient être à la fois des *drivers* et des *passengers* (Figure 33).

III-2-4-4 Impact de la colibactine sur le microbiote intestinal

La présence d'une dysbiose intestinale chez les patients atteints de CCR a été largement rapportée dans la littérature (Marchesi *et al.*, 2011; Sobhani *et al.*, 2011) et comme cette dysbiose peut être associée à la présence des CoPEC, les scientifiques ont cherché à savoir si les CoPEC pouvaient être impliquées dans cette dysbiose.

Tronnet *et al.*, ont infecté par voie orale des souris femelles avec des *E. coli* commensaux, un mélange de *E. coli* commensaux et de *E. coli pks+* ou un mélange de *E. coli* commensaux et de *E. coli pks+ $\Delta clbP$* (Tronnet *et al.*, 2020). Ils ont analysé le microbiote des souriceaux nés de ces souris. Seulement 15 jours après leur naissance, les souriceaux dont les

mères avaient été infectées par le mélange de *E. coli* commensaux et de *E. coli pks+* montrent une réduction significative des *Proteobacteria*. Les auteurs avancent l'idée que certains produits métaboliques intermédiaires de la synthèse de la colibactine ont des propriétés antibactériennes qui permettent aux CoPEC de créer une niche écologique. Une fois l'implantation des CoPEC au sein de la niche, l'action génotoxique de la colibactine pourrait permettre leur expansion en réduisant l'abondance d'autres bactéries.

Ces effets antibactériens sont appuyés par deux publications. Il a été montré que les CoPEC avaient potentiellement une activité antibiotique, mais cet effet n'a été mis en évidence que sur l'espèce *Staphylococcus aureus* qui n'est pas un hôte habituel de l'intestin (Faïs *et al.*, 2016).

Toutefois, les CoPEC pourraient aussi avoir un effet antibactérien original qui passerait par l'induction de prophages. En effet, Silpe *et al.*, ont démontré récemment que la colibactine pouvait cibler des bactéries du microbiote contenant des prophages lysogéniques et induire leur cycle lytique (Silpe *et al.*, 2022). Ces prophages sont capables de cibler les bactéries et de les détruire. Néanmoins, ces bactéries sont protégées si elles possèdent le gène de résistance à la colibactine, *ClbS*. Cette immunité permet ainsi aux CoPEC de résister à l'induction de prophages, alors que les bactéries non-porteuses de *ClbS* sont détruites.

III-2-4-5 Modulation de la synthèse de la colibactine

Inhibition des gènes de l'îlot pks.

La synthèse de la colibactine nécessite la présence de l'ensemble des gènes de l'îlot *pks* pour permettre une synthèse correcte de la toxine (à l'exception de *ClbS*). Ainsi les mutants $\Delta ClbA$ $\Delta ClbP$, $\Delta ClbB$ et $\Delta ClbQ$ sont utilisés dans de nombreuses études pour étudier l'absence d'effet de la colibactine (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; Dalmasso *et al.*, 2014; Bossuet-Greif *et al.*, 2018; Iftekhhar *et al.*, 2021; Dougherty *et al.*, 2023). Cibler l'inactivation de ces gènes pourrait donc être une potentielle stratégie thérapeutique pour empêcher la production de la colibactine. C'est l'hypothèse avancée lors des travaux de Tang-Fichaux *et al.*, qui ont proposé l'utilisation de mésalamine, utilisée comme traitement anti-inflammatoire des MICI, comme stratégie préventive contre les CoPEC. En effet, cette molécule inhibe les enzymes de la famille des polyphosphates kinases (PKK) qui sont nécessaires à l'activité du

promoteur de *ClbB*. La quantité de foci γ -H2AX de cellules HeLa infectées par une souche CoPEC est réduite de manière proportionnelle à l'augmentation de la concentration de mésalamine administrée (2 à 8 nM) (Tang-Fichaux *et al.*, 2020). Des inhibiteurs de ClbP (enzyme permettant la maturation de la pré-colibactine) ont également montré un effet *in vitro* pour prévenir de la génotoxicité de la colibactine (Cougoux *et al.*, 2016). Ces composés permettaient également de diminuer la sénescence, la sécrétion de facteurs de croissance et la prolifération induites par les CoPEC.

Importance des conditions de culture : agitation et oxygénation.

La synthèse de la colibactine est sensible à de nombreux facteurs du milieu dans lequel la bactérie se trouve. En effet, Homburg *et al.*, ont mis en évidence que la culture sous agitation augmente la transcription des gènes *ClbA, B, C, D, E, F, G et H* (Homburg *et al.*, 2007) et que la culture des bactéries en condition aérobie semble réduire la production de colibactine (Bossuet *et al.*, 2023). Les *E. coli* Δ *ClbS* ne sont plus capables de se protéger de l'action génotoxique de la colibactine. Au cours de leurs travaux, Bossuet *et al.*, utilisent ces mutants pour observer de manière indirecte la synthèse de la colibactine (Bossuet *et al.*, 2023). Ils ont démontré que la culture de ces souches Δ *ClbS* en tubes à vis entrouverts donc oxygénés réduisait de 10 fois le nombre d'UFC bactérien (unité formant des colonies) par rapport aux *E. coli* Δ *ClbS* cultivés en tubes à vis fermés. De plus, dans cette étude, les cellules HeLa infectées par des *E. coli* *pks+* cultivées avec 21% d'O₂ présentaient moins de dommages à l'ADN (observés grâce aux foci γ -H2AX) par rapport à des bactéries cultivées avec 4% d'O₂.

Régulation par le fer.

ClbA est un gène de l'îlot *pks* nécessaire pour produire la colibactine, cependant il contribue également à la production des sidérophores. La production de ces sidérophores est aussi conditionnée par la présence de fer dans le milieu. Tronnet *et al.*, ont émis l'hypothèse que la concentration ferrique pouvait moduler la production de la colibactine. Ainsi, ils ont démontré que la régulation transcriptionnelle de *ClbA* était dépendante de la disponibilité du fer dans le milieu de la bactérie *via* le régulateur ferrique *ryhB*. Une augmentation du nombre de mégaloctes est observée chez les cellules HeLa infectées avec une souche CoPEC Δ *ryhB*, incapable de réguler la concentration de fer (Tronnet *et al.*, 2016).

Importance de l'inflammation.

En 2014, Arthur *et al.*, ont mis en évidence, en utilisant des souris AOM/ *Il10*^{-/-} prédisposées à développer un CCR et monocolonisées par une souche de CoPEC, que les expressions des gènes *ClbG*, *C*, *H*, *L*, *M* et *S* de l'îlot *pks* étaient augmentées lors du développement tumoral de manière dépendante de l'inflammation (Arthur *et al.*, 2012). Les souris AOM/ *Il10*^{-/-} monocolonisées par une souche de CoPEC présentaient un nombre accru de tumeurs comparé à des souris AOM/ *Il10*^{-/-} / *Rag2*^{-/-} elles-mêmes colonisées (Arthur *et al.*, 2014). *Rag2* permet la synthèse d'une recombinaison impliquée dans la formation de lymphocytes B et T matures. Des souris déficientes pour ce gène ont une réponse inflammatoire réduite (Shinkai *et al.*, 1992). La tumorigenèse induite par les CoPEC dans le modèle de Arthur *et al.*, semble donc dépendante d'une inflammation fonctionnelle (Arthur *et al.*, 2014).

Ainsi, ces travaux soulignent que les changements du microenvironnement tumoral au cours de la carcinogenèse colorectale pourraient influencer la synthèse de la colibactine.

III -2-4-6 Une toxine contact-dépendant

Lors de la description des premiers effets de la colibactine par Nougayrède *et al.*, des changements morphologiques ont été observés sur des cellules HeLa au contact de bactéries *E. coli pks*⁺ (**Figure 32-(2)**) (Nougayrède *et al.*, 2006). Or, ces effets sont dépendants de la présence de bactéries viables. Lorsque les cellules étaient mises en contact avec un lysat bactérien, des bactéries tuées à 100°C ou par un traitement antibiotique (**Figure 32-(5 à 7)**), ces changements morphologiques ne sont plus observés. De plus, l'utilisation de surnageant (absence de bactéries) ou la séparation du contact cellules - bactéries par un filtre annule également les effets cytopathogènes (**Figure 32-(4 à 8)**). Les auteurs ont aussi mis en évidence que les cellules HeLa séparées par un filtre des *E. coli pks*⁺ ne présentaient plus de dommages de l'ADN liés à la présence de la colibactine (Nougayrède *et al.*, 2006). Ainsi, la colibactine est une **toxine contact-dépendant**.

Au niveau intestinal, la couche de mucus intestinal, s'avère être une barrière naturelle qui limite le contact entre les bactéries et la surface des cellules épithéliales.

III-2-5 La sécrétion de sidérophores

Le fer est une molécule essentielle aux fonctionnements de nombreuses enzymes du métabolisme bactérien (Andrews *et al.*, 2013). Dans l'environnement digestif, il est notamment retrouvé sous deux états redox interchangeable, la forme réduite Fe^{2+} (fer ferreux) et la forme oxydée Fe^{3+} (appelée fer ferrique). Les sidérophores sont des chélateurs de fers, qui permettent aux bactéries de séquestrer le fer ferrique Fe^{3+} présent dans leur environnement (Vaulont and Schalk, 2015). Chez les *E. coli*, quatre sidérophores ont été décrites : yersiniabactine, l'aérobactine, l'entérobactine et les formes glycosylées de cette dernière, les salmochélines. L'entérobactine est produite par tous les *E. coli*, contrairement aux autres sidérophores qui appartiennent au répertoire variable des *E. coli* et qui sont codées par des îlots de pathogénicité, portés notamment par certaines souches du phylogroupe B2 dont les CoPEC. De nombreuses études ont démontré le rôle crucial de ces sidérophores dans la multiplication des *E. coli* et la colonisation de l'environnement digestif (Caza *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2016). De plus ces sidérophores, en captant le fer, participent à la régulation de la production de la colibactine comme évoqué préalablement (Tronnet *et al.*, 2016).

III-2-6 Protéines d'adhésion à la muqueuse épithéliale

L'expression d'appendices extracellulaires comme les flagelles, les fimbriae ou les pili jouent un rôle majeur dans l'adhésion à la muqueuse épithéliale. Les **flagelles** sont composés de plusieurs sous-unités de flagellines (Juge, 2012). Elles ont été décrites notamment chez les EHEC et les EPEC leur fournissant des propriétés adhérentes pour se lier aux mucus bovins (Erdem *et al.*, 2007). Les **fimbriae** permettent également à certains *E. coli* d'adhérer aux protéines et aux cellules de l'hôte. Ces structures peuvent s'étendre jusqu'à 2 μm de la paroi bactérienne. Les adhésines fimbriales K88, K99, F41 et F17 sont impliquées dans l'adhésion au mucus des souches ETEC responsables de diarrhées (Jin *et al.*, 2000). Les **pili** sont plus longs que les fimbriae et sont composés de sous-unités de type protéique (pillines) qui forment un tube permettant le passage de matériel génétique. Pour maximiser le contact avec l'environnement, des adhésines sont souvent présentes à l'extrémité de ces structures. Les **adhésines** sont des protéines qui reconnaissent des molécules oligosaccharides comme celles qui sont présentes dans la couche de mucus, mais également exprimées à la surface des cellules épithéliales et des cellules immunitaires (Klemm and Schembri, 2000). Fim H est une

Table 2 : Sérine-protéases auto-transporteurs décrites chez les *Enterobacteriaceae* (SPATEs)

Nom	Souches	Activités enzymatiques	Références
EatA	ETEC	Mucinase, favorise la colonisation, cytopathogène, entérotoxigène.	(Kumar <i>et al.</i> , 2014)
EpeA	EHEC	Mucinase, clive la pepsin A	(Leyton <i>et al.</i> , 2003)
Esp C	EPEC	Hémoglobine protéase,	(Mellies <i>et al.</i> , 2001)
Esp P	EHEC	Cytotoxicité	(Khan <i>et al.</i> , 2011)
Hbp / Tsh	APEC, EPEC	Mucinase, structure cristallographique déterminée.	(Dozois <i>et al.</i> , 2000; Otto <i>et al.</i> , 2005)
Pet	EAEC	Mucinase, cytotoxicité	(Eslava <i>et al.</i> , 1998)
Pic	EAEC, UPEC, EPEC	Mucinase, favorise la colonisation, stimule la sécrétion de mucus, immuno-modulation, adhésion leucocytes.	(Henderson <i>et al.</i> , 1999; Parham <i>et al.</i> , 2004; Harrington <i>et al.</i> , 2009; Navarro-Garcia <i>et al.</i> , 2010; Abreu <i>et al.</i> , 2016)
Sat	UPEC	Cytotoxicité	(Guyer <i>et al.</i> , 2000)
Sha	UPEC APEC	Autoagrégation, hémagglutination, cytopathogénicité, formation de biofilm, mucinases et élastase.	(Habouria <i>et al.</i> , 2019)
Tag B	UPEC APEC	Autoagrégation, hémagglutination, cytopathogénicité	(Habouria <i>et al.</i> , 2019)
Tag C	UPEC APEC	Autoagrégation, hémagglutination, cytopathogénicité	(Habouria <i>et al.</i> , 2019)
Vat et Vat-AIEC	APEC, AIEC	Décrite en premier chez les APEC pour son activité cytotoxique et vacuolisante. Liaison aux protéines o-glycosylées.	(Parreira and Gyles, 2003) Cette protéine a aussi été décrite chez les AIEC avec une séquence légèrement différente et favorise la traversée du mucus et la colonisation des AIEC (Gibold <i>et al.</i> , 2016).

Liste non-exhaustive

Nomenclatures enzymatiques : Eat A = ETEC autotransporteurs A ; Epe A = EHEC plasmid-encoded autotransporteurs ; Esp C = EPEC secreted protein C ; Esp P = extracellular serine protease plasmid-encoded ; Hbp = hemoglobin binding protein ; Pet = plasmid-encoded-toxin ; Pic = protease involved in intestinal colonisation ; Sat = secreted autotransporteur toxin, Sha = serine-protease hemagglutinin autotransporteur ; TagB et TagC = tandem autotransporter genes B et C.

Nomenclatures des espèces bactériennes : APEC = avian pathogenic E. coli ; EAEC = enteroaggregative E. coli ; UPEC = uropathogenic E. coli ; EHEC = enterohaemorrhagic E. coli ; EPEC = enteropathogenic E. coli

adhésine qui permet aux AIEC d'interagir avec le récepteur CEACAM6 exprimé à la surface des cellules épithéliales intestinales (Dreux *et al.*, 2013).

L'expression accrue de molécules d'adhésion par les *E. coli* pathogènes peut favoriser l'attachement et la colonisation de mucus intestinal. Une étude récente est venue démontrer que l'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de FimH bloque l'adhésion des CoPEC à la surface des cellules épithéliales coliques HCT116 et réduit le nombre de foci γ -H2AX dans les cellules HT29 (Jans *et al.*, 2023). En modèle murin, l'utilisation de cette molécule permet de réduire l'accès des bactéries à la surface de l'épithélium et de diminuer le nombre de foci γ -H2AX dans les cellules épithéliales des cryptes coliques.

III-2-7 Les mucine-protéases des *E. coli*

La colonisation du mucus intestinal par des *E. coli* pathogènes peut aussi être favorisée par leur capacité à utiliser différentes sources d'énergie (sucres simples ou structures O-glycanniques) (Tailford *et al.*, 2015), mais aussi par leur capacité à dégrader le squelette protéique du mucus. Les *E. coli* qui possèdent des protéases peuvent avoir un avantage certain pour pénétrer la couche de mucus et donc accéder à l'épithélium colique. Ces protéases peuvent être considérées comme un **facteur de colonisation**.

➤ Les **métallo-enzymes** (qui utilisent un ion métallique pour activer la molécule d'eau catalytique) sont principalement décrites chez les *E. coli* pathogènes intestinaux. Au sein de ce groupe, on recense StcE et EpeA présentes chez les EHEC (Grys *et al.*, 2005; Hews *et al.*, 2017) et Yghj/SslE retrouvée chez les EPEC et les entérotoxigènes (ETEC) (Nesta *et al.*, 2014; Tapader *et al.*, 2017). StcE et Yghj/SslE favorisent l'adhésion des bactéries à l'épithélium colique en dégradant MUC2 (Valeri *et al.*, 2015; Hews *et al.*, 2017).

➤ Les **sérines protéases** (qui utilisent un résidu sérine pour l'activation) sont aussi présentes en grand nombre dans le génome des entérobactéries (**Table 2**). Elles appartiennent à une famille particulière de protéines appelée les **autotransporteurs** (Desvaux *et al.*, 2004). Ce nom provient du fait que toutes les informations nécessaires à leur sécrétion sont présentes dans un seul polypeptide.

Elles sont constituées de trois domaines fonctionnels : (1) la séquence signal, située dans la partie N-terminale, permet d'adresser la protéine au périplasme de la bactérie ; (2) le *passenger domain* ou domaine effecteur correspond à la partie sécrétée de la protéine et

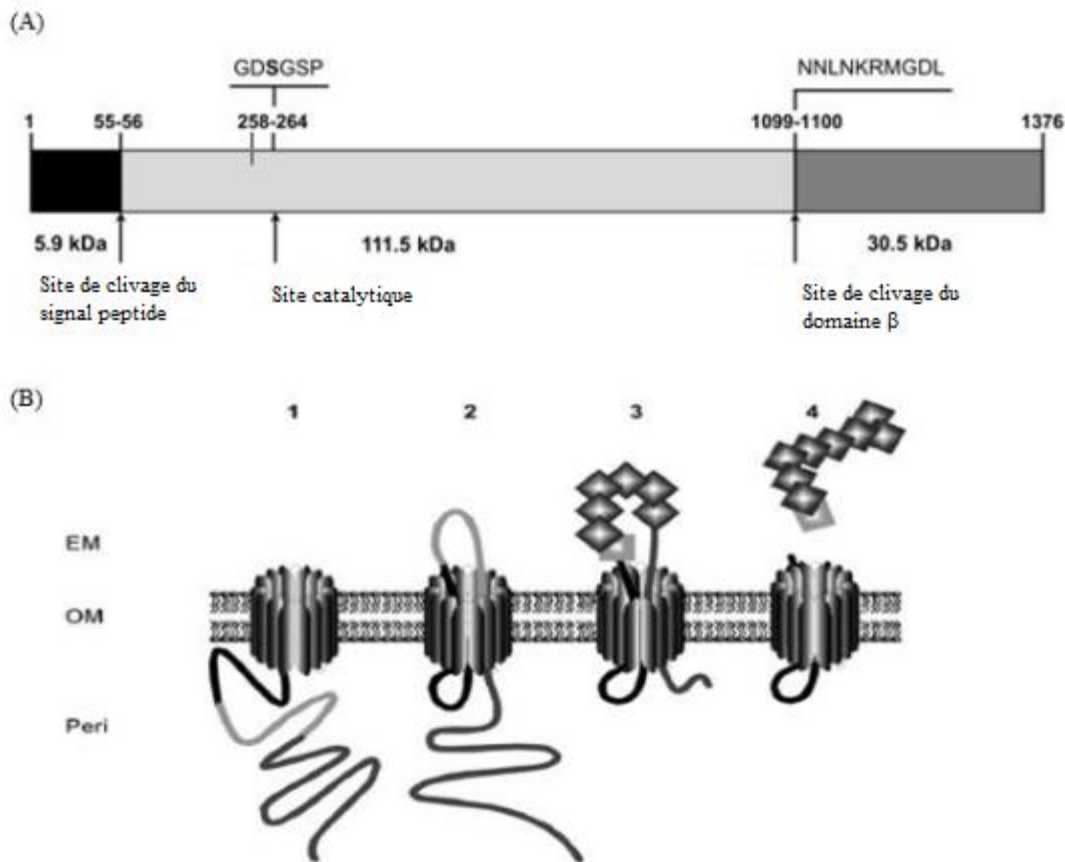


Figure 34 : Représentation de la structure et de l'organisation des auto-transporteurs à activité sérine protéase des *Enterobacteriaceae* (SPATE) : exemple de la structure de Vat

(A) Structure primaire de l'auto-transporteur à activité sérine protéase décrite chez les entérobactéries. Toutes les informations nécessaires pour la sécrétion de la protéine sont portées par le polypeptide. La séquence signale en N-terminal (acides aminés (AA) 1 à 55-56 en noir) permet d'adresser la protéine à la membrane interne de la bactérie. Le domaine effecteur ou *passenger domain* (AA55-56 à 1099-1100 en gris clair) correspond à la partie catalytique de la protéine qui sera transloquée à travers la membrane externe via une structure en tonneau β . Ce domaine contient la séquence consensus de clivage (AA258 à 264 soulignées) avec la sérine 260 qui pourra être activée par une molécule d'eau. L'unité de translocation en C-terminal (AA1099-1100 à 1376 en gris foncé) va former le pore transmembranaire, une fois adressée à la membrane externe.

(B) Organisation spatiale de la protéase à sérine : sécrétion du domaine effecteur à travers la membrane externe de la bactérie. (1) Insertion du domaine β dans la membrane externe et formation du pore en tonneau β . (2) La région d'ancrage ou « linker domain » permet de guider le domaine sécrété à travers le pore. (3) Le domaine « autochaperonne » prend en charge le domaine excrété du pore. (4) La protéine mature, exposée à la surface cellulaire de la bactérie, est clivée au niveau de la séquence consensus GDSGSP, par l'activité protéase. EM, milieu extracellulaire ; OM : membrane externe ; Peri : périplasm.

Illustration modifiée (Desvaux *et al.*, 2004; Gibold *et al.*, 2016)

possède l'activité protéase à sérine ; (3) le domaine de translocation situé en C-terminal et appelé β -domaine forme un pore transmembranaire permettant la translocation du domaine effecteur dans le milieu extracellulaire. Le domaine effecteur contient un motif consensus (GDSGSP) comprenant la sérine active (**Figure 34A**).

Les principales protéases à sérine des *E. coli* sont **Vat**, **Pic** et **Hbp/Tsh** (Henderson *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2015; Gibold *et al.*, 2016). La **protéine Pic** a été identifiée chez les EAEC mais a également été décrite chez *Shigella flexneri* (Henderson *et al.*, 1999). Il a été montré qu'elle dégrade les mucines *in vitro* qui pourraient servir de substrat aux bactéries environnantes (Harrington *et al.*, 2009). Elle favorise la colonisation intestinale des bactéries en modèle murin (Navarro-Garcia *et al.*, 2010). Sa prévalence dans les souches d'*E. coli* isolées de l'Homme varie beaucoup : 0 à 23% des *E. coli* isolés dans les selles de personnes saines et 14 à 40% des *E. coli* uropathogènes (UPEC) (Desvaux *et al.*, 2020). La **protéine Hbp** possède 50% d'identité avec la mucinase Pic. Hbp a été retrouvée chez les EPEC (Otto *et al.*, 2005). Elle est à 99,9% identique à **Tsh**, une mucine-protéase décrite chez 50% des *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) impliquée dans la colonisation trachéale des volailles (Dozois *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2004). En revanche, Hbp est rarement trouvée dans les *E. coli* isolés des selles de personnes saines (1 à 5%) et sont également peu retrouvées parmi les UPEC (4 à 18%) (Desvaux *et al.*, 2020).

Vat est une mucine-protéase qui appartient aux systèmes de sécrétion de type 5 (T5SS), les **autotransporteurs**. Les sérine-protéases auto-transporteurs ont été décrites chez les *Enterobacteriaceae* (SPATE) et permettent d'exporter des molécules intracellulaires à travers la double membrane caractéristique des bacilles à Gram négatif. Il est composé d'une séquence **peptide signal** en queue N-terminale qui est clivée à l'exportation de la protéine (**Figure 34**). Il permet d'adresser la protéine dans l'espace périplasmique de la bactérie. La partie fonctionnelle (**passenger domain**) de 111,5 kDA est sécrétée à l'extérieur du périplasma de la bactérie. La partie C-terminale qui forme l'**unité de translocation** permet la sécrétion de la partie fonctionnelle de la protéine Vat mature. Elle est composée d'une courte région de liaison ayant une structure secondaire hélicoïdale et d'un domaine- β qui permet de former la structure en tonneau β qui va s'insérer dans la membrane externe bactérienne, nécessaire à la translocation protéique. Cette étape se fait sans apport énergétique extérieur ou facteur accessoire, mais par insertion spontanée d'une structure hydrophobe dans la membrane. Certains auteurs ont avancé que le passage du *passenger domain* dans la structure en tonneau β pouvait même se faire au niveau du périplasma avant même son adressage à la membrane

externe (Veiga *et al.*, 1999). On parle de « pré-pro-protéine » quand la protéine se trouve dans la partie cytoplasmique, de « pro-protéine » quand elle se trouve dans le périplasme. La protéine obtient sa forme finale mature lors de la translocation vers le milieu extra-cellulaire.

La **protéine Vat** présente, 79% de similarité avec l'enzyme Tsh et 49% avec Pic (Restieri *et al.*, 2007). Vat a été particulièrement étudiée à partir de la souche AIEC de référence LF82, isolée d'un patient ayant la maladie de Crohn (Gibold *et al.*, 2016). Outre sa capacité mucinolytique, il a été mis en évidence *in vitro* que cette mucinase permettait à la souche productrice de franchir une couche de mucus en diminuant sa viscosité. En modèle murin, la souche AIEC LF82 sauvage était capable d'atteindre les cellules épithéliales coliques contrairement à un mutant délété du gène *vat* et la colonisation intestinale par la souche AIEC LF82 en était facilitée. Dans cette même étude, la prévalence du gène *vat* parmi les souches AIEC isolées de biopsies de patients atteints de la maladie de Crohn était significativement plus importante (43%) que celle des souches non AIEC (12%). Elle est également retrouvée dans les *E. coli* isolés de selles de personnes saines et chez les UPEC avec des prévalences très variables suivant les études : 4 à 16% pour des souches *E. coli* isolées des selles et 26 à 96% pour les UPEC (Desvaux *et al.*, 2004).

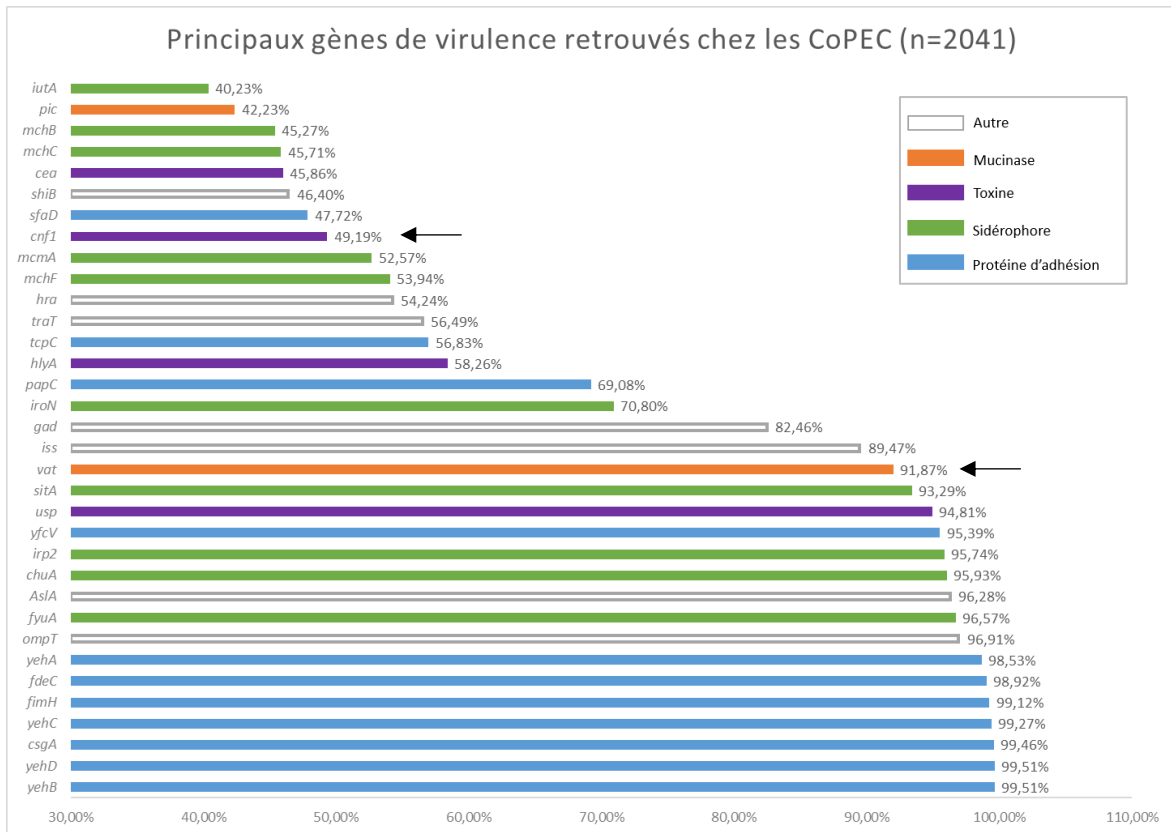


Figure 35 : Gènes de virulences retrouvés dans le génome des CoPEC

À partir de 2041 génomes de CoPEC (souches possédant le gène *ClbQ*) de la base de données RefSeq (v1.214 databases), les gènes de virulence ont été identifiés à partir de l'outil VirulenceFinder 2.0. La figure ci-dessus représente les gènes de virulence les plus fréquemment retrouvés (>40%) au sein des CoPEC.

~Travail expérimental~

Objectif du travail de recherche

Le microbiote intestinal apparaît depuis quelques années comme un nouveau facteur favorisant le développement du cancer colorectal (CCR). Plusieurs études ont mis en évidence une modification de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique chez les patients atteints de CCR comparativement aux sujets contrôles avec notamment une prévalence augmentée des *Escherichia coli* porteurs de l'îlot *pks*. Cet îlot est à l'origine de la production d'une génotoxine, la colibactine. Ainsi, les *E. coli* producteurs de colibactine (CoPEC) induisent des cassures double-brin de l'ADN sur les cellules eucaryotes, ayant pour conséquences l'apparition de mutations ou la sénescence des cellules infectées (Nougayrède *et al.*, 2006; Cougnoux *et al.*, 2014; Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020). Cette sénescence est accompagnée par la sécrétion de médiateurs inflammatoires et de facteurs de croissance qui vont promouvoir la prolifération des cellules adjacentes non-infectées (Dalmaso *et al.*, 2014; Cougnoux *et al.*, 2014). Il a également été montré que les CoPEC augmentent le nombre de tumeurs dans des modèles murins prédisposés au cancer : (Arthur *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2014a; Cougnoux *et al.*, 2014). Si de nombreuses études ont participé à élucider le rôle de la colibactine dans le CCR, peu ont étudié l'implication des autres facteurs de virulence associés à ces souches. Les gènes de virulence des CoPEC ont été recherchés au laboratoire par analyse bio-informatique en interrogeant la base de données RefSeq (v1.214 databases) et VirulenceFinder 2.0. À partir de 2041 génomes de CoPEC (souches possédant le gène *ClbQ*), les gènes de virulence les plus fréquents étaient ceux des protéines d'adhésion comme les gènes *yehB-D-C*, *csgA*, *fimH* (99%), des sidérophores tels que *fyuA*, *chuA* ou *irp2* (96%), le gène *usp* (94%), le gène **Vat (92%)**, l'hémolysine A (58%) et le gène impliqué dans la synthèse de la toxine **Cnf1 (49%)** (**Figure 35**). Le rôle des protéines d'adhésion chez les *E. coli* a déjà été bien étudié et l'étude des sidérophores au sein des souches CoPEC a également fait l'objet de publications (Caza *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2016). Nous nous sommes donc intéressés au cours de cette thèse **aux facteurs de virulence Cnf1 et Vat** qui du fait de leurs propriétés pourrait avoir un rôle dans la tumorigénèse induite par les CoPEC.

Travail expérimental de l'axe 1 :

Impact de la cyclomoduline Cnf1 sur le pouvoir tumorigène des CoPEC

L'étude de Buc *et al* montre que les *E. coli* colonisent plus fortement la muqueuse colique de patients atteints d'un CCR comparativement à celle des patients contrôles atteints de diverticulose (Buc *et al.*, 2013). Soixante-six pour cent de ces *E. coli* étaient producteurs de cyclomodulines, des toxines qui perturbent le cycle cellulaire et/ou induisent des dommages d'ADN. Parmi celles retrouvées chez les patients ayant un CCR, la colibactine était la plus fréquente (55%), suivi par la cyclomoduline Cnf1 (40%).

Le gène *cnf1* est situé dans l'îlot de pathogénicité II (PAI-II) fréquemment observé chez les *E. coli* du phylogroupe B2 (Auvray *et al.*, 2021). Il se situe en aval de l'opéron *hlyCABD* qui code la production et permet la sécrétion de l'hémolysine α (Lemonnier *et al.*, 2007). Cnf1 entraîne la désamidation spécifique d'une glutamine présente sur les petites GTPases Rac1, RhoA et Cdc-42 (Flatau *et al.*, 1997). Cette modification post-traductionnelle entraîne l'activation permanente de ces molécules clés de la signalisation intracellulaire, ce qui induit notamment un réarrangement du cytosquelette d'actine, une nécrose et une multinucléation des cellules. Cnf1 va aussi activer diverses voies de signalisation telles que des voies anti-apoptiques (Fiorentini *et al.*, 1998) ou la voie NF- κ B induisant l'expression de COX2 (Hahn *et al.*, 2002), un gène majeur de la carcinogénèse rectale (Kunzmann *et al.*, 2013). Il a également été rapporté que Cnf1 pouvait favoriser l'EMT (Fabbri *et al.*, 2020). Au regard de ces effets, Cnf1 pourrait donc jouer un rôle majeur dans le développement du CCR (Travaglione *et al.*, 2008). Les deux cyclomodulines (colibactine et Cnf1) étant fréquemment retrouvées dans les souches *E. coli* isolées de la muqueuse intestinale des patients présentant un CCR (55% et 40%). Nous avons voulu étudier la combinaison de leur effet.

Dans cette étude, nous avons évalué la prévalence du gène *cnf1* et de l'îlot *pks* dans le génome des *E. coli* isolés des tissus cancéreux de patients atteints d'un CCR. Nous n'avons observé aucune différence significative entre la prévalence de *cnf1* chez les patients ayant un CCR (25%) et celle trouvée chez les patients du groupe contrôle (14%). **Cependant, notre étude relève que la majorité (95%) des *E. coli* porteurs du gène *cnf1* possède l'îlot *pks*. Tout l'enjeu de cette étude était de déterminer si l'association de Cnf1 avec la colibactine pouvait potentialiser l'effet tumorigène des *E. coli*.**

Les résultats de ce travail de recherche ont fait l'objet d'un article publié dans le journal **Gut Microbes**. 2023;15(1):2229569. doi: 10.1080/19490976.2023.2229569.

“Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in *Apc*^{Min/+} mice.”

Héloïse Chat, Guillaume Dalmaso, Catherine Godfraind, Virginie Bonnin, Racha Beyrouthy, Mathilde Bonnet, Nicolas Barnich, Amel Mettouchi, Emmanuel Lemichez, Richard Bonnet et Julien Delmas



Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in *Apc^{Min/+}* mice

Héloïse Chat, Guillaume Dalmaso, Catherine Godfraind, Virginie Bonnin, Racha Beyrouthy, Mathilde Bonnet, Nicolas Barnich, Amel Mettouchi, Emmanuel Lemichez, Richard Bonnet & Julien Delmas

To cite this article: Héloïse Chat, Guillaume Dalmaso, Catherine Godfraind, Virginie Bonnin, Racha Beyrouthy, Mathilde Bonnet, Nicolas Barnich, Amel Mettouchi, Emmanuel Lemichez, Richard Bonnet & Julien Delmas (2023) Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in *Apc^{Min/+}* mice, Gut Microbes, 15:1, 2229569, DOI: [10.1080/19490976.2023.2229569](https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2229569)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2229569>



© 2023 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



[View supplementary material](#)



Published online: 07 Jul 2023.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 9

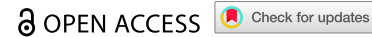


[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

RESEARCH PAPER



Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in *Apc*^{Min/+} mice

Héloïse Chat^a, Guillaume Dalmasso^a, Catherine Godfraind^{a,b}, Virginie Bonnin^a, Racha Beyrouthy^a, Mathilde Bonnet^{a,c}, Nicolas Barnich^{a,c}, Amel Mettouchi^d, Emmanuel Lemichez^d, Richard Bonnet^{a,e}, and Julien Delmas^{a,e}

^aCentre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, University Clermont Auvergne, Inserm U1071, INRAE USC 1382, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), Clermont-Ferrand, France; ^bNeuropathology Unit, University Hospital of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France; ^cInstitut Universitaire de Technologie, University Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ^dInstitut Pasteur, University of Paris, CNRS UMR2001, Paris, France; ^eDepartment of Bacteriology, University Hospital of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) patients are frequently colonized by colibactin-producing *Escherichia coli* (CoPEC) (>40%), which enhances tumorigenesis in mouse models of CRC. We observed that 50% of CoPEC also contains the *cnf1* gene, which encodes cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF1), an enhancer of the eukaryotic cell cycle. The impact of its co-occurrence with colibactin (Clb) has not yet been investigated. We evaluated the impact of CNF1 on colorectal tumorigenesis using human colonic epithelial HT-29 cells and CRC-susceptible *Apc*^{Min/+} mice inoculated with the CoPEC 21F8 clinical strain (Clb+Cnf+) or 21F8 isogenic mutants (Clb+Cnf-, Clb-Cnf+ and Clb-Cnf-). Infection with the Clb+Cnf- strain induced higher levels of inflammatory cytokines and senescence markers both *in vitro* and *in vivo* compared to those induced by infection with the Clb+Cnf+ strain. In contrast, the Clb+Cnf- and Clb+Cnf+ strains generated similar levels of DNA damage in HT-29 cells and in colonic murine tissues. Furthermore, the *Apc*^{Min/+} mice inoculated with the Clb+Cnf- strain developed significantly more tumors than the mice inoculated with the Clb+Cnf+ strain or the isogenic mutants, and the composition of their microbiota was changed. Finally, rectal administration of the CNF1 protein in *Apc*^{Min/+} mice inoculated with the Clb+Cnf- strain significantly decreased tumorigenesis and inflammation. Overall, this study provides evidence that CNF1 decreases the carcinogenic effects of CoPEC in *Apc*^{Min/+} mice by decreasing CoPEC-induced cellular senescence and inflammation.

ARTICLE HISTORY

Received 24 January 2022
Revised 12 May 2023
Accepted 21 June 2023

KEYWORDS

Colorectal cancer; *Escherichia coli*; colibactin; CNF-1; CoPEC




Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the world, causing significant morbidity and mortality.¹ CRC is a multifactorial disease involving both genetic and environmental factors. Among the genomic changes associated with CRC, loss-of-function mutations in the *Apc* (adenomatous polyposis coli) gene are the most prevalent and are considered the initiating event in approximately 80% of CRC cases.² Among the environmental factors linked to CRC, the gut microbiota is increasingly thought to be a key player in CRC pathogenesis.^{3,4} Modification of the composition of the gut microbiota, or dysbiosis, has been reported in patients with CRC, with an increase in the abundance of bacteria such as *Bacteroides fragilis* or *Fusobacterium nucleatum* and

a decrease in the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*.⁵⁻⁹

The involvement of the gut microbiota in CRC has been established using murine models of CRC. Germ-free *Apc*^{Min/+} mice display a lower number of intestinal and colorectal tumors than microbiota-bearing *Apc*^{Min/+} mice.¹⁰ A recent study showed that germ-free mice that received fecal samples from patients with CRC exhibited an increase in number of polyps, intestinal dysplasia, and levels of cellular proliferation markers as well as inflammation compared with those of germ-free mice that received fecal samples from healthy individuals.¹¹

At the taxonomic level, analysis of the human CRC microbiome has identified potential

CONTACT Julien Delmas  julien.delmas@uca.fr  Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, University Clermont Auvergne, Inserm U1071, INRAE USC 1382, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), Bâtiment CBRV, 28 place Henri Dunant, Clermont-Ferrand 63001, France
 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2229569>.

© 2023 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

microbial candidates implicated in CRC pathology, including *Escherichia coli*, *F. nucleatum*, and enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF).⁸ ETBF induced chronic inflammation and tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice and led to high levels of interleukin-17 (IL-17) production, which disrupted normal myelopoiesis and resulted in the accumulation of pro-carcinogenic myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment.¹² In *Apc^{Min/+}* mice, *F. nucleatum* increased tumor development without inducing colitis, accompanied by increased infiltration of myeloid cells into tumors.⁷

Recent studies have shown that pathogenic *E. coli* synthesizes toxins known as cyclomodulins, such as cytolethal distending toxins, cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF1), cycle-inhibiting factor, and colibactin, which interfere with the cell cycle.^{13,14} Cyclomodulin-encoding genes, especially the colibactin-encoding *pks* island and CNF1-encoding gene (*cnf1*), are overrepresented in CRC patients colonized by *E. coli* strains.^{15,16}

Colibactin-producing *E. coli* (CoPEC) strains have been identified in the colonic mucosa of approximately 55–67% of patients with CRC versus 19–21% of control patients.^{15,16} CoPEC has been shown to induce DNA double-strand breaks (DSB), chromosomal instability, genomic mutations and cell cycle arrest.^{17–21} CoPEC induces senescence of infected cells, accompanied by secretion of inflammatory mediators and growth factors, thus promoting proliferation of adjacent uninfected cells.²² Importantly, CoPEC promotes colon tumorigenesis in multiple murine models of CRC, including *Apc^{Min/+}* mice, AOM-treated *Il-10^{-/-}* mice, AOM/DSS-treated mice and *Apc^{Min/+}*; *Il-10^{-/-}* mice.^{16,22–24} Notably, inflammation enhances the development of colon cancer in the *Apc^{Min/+}* model, which was established by specifically deleting the *APC* gene in epithelial cells,²⁵ as seen with the use of dextran sulfate sodium (DSS)²⁶ and by genetically introducing defective IL-10 signaling.^{27,28}

The prevalence of *cnf1*-harboring *E. coli* is significantly higher in patients with CRC (37%) than in control patients (13%).¹⁵ Nevertheless, the involvement of *cnf1*-harboring *E. coli* in CRC has not been determined. CNF1 is a 115 kDa protein toxin that activates Rho GTPases, leading to cytoskeletal and cell cycle alterations

with subsequent macropinocytosis and the formation of megalocytic, multinucleated cells.²⁹ In addition, CNF1-induced activation of Rho GTPases triggers cellular events not directly linked to the actin cytoskeleton, such as the activation of NF- κ B³⁰ and the production of cytokines, such as IL-6 and IL-8,^{31,32} and provides protection against apoptosis.^{33,34} It also promotes quiescent cell entry into the cell cycle.³⁵ Recently, Fabbri *et al.* showed, *in vitro*, that CNF1 induces epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a crucial step in malignant tumor conversion and invasiveness, in intestinal epithelial cells.³⁶ A separate study has shown that CNF1 promotes the migration and invasion of prostate cancer cells *in vitro*.³⁷ Therefore, it appears that many of the cellular activities induced by CNF1 might participate in carcinogenesis. Despite the overrepresentation of the *cnf1* gene in *E. coli* strains isolated from patients with CRC, the effect of the CNF1 toxin has not been studied in CRC.

In this study, we determined the prevalence of *E. coli* harboring the *pks* and *cnf1* genes in CRC patients and investigated the tumorigenic properties of *E. coli* strain 21F8 isolated from a human colon cancer biopsy and producing both colibactin and CNF1 in comparison with those of isogenic mutants using human intestinal epithelial HT-29 cells and an *Apc^{Min/+}* mouse model of CRC.

Results

Most *E. coli* strains harboring the *cnf1* gene possess a *pks* island

The patient data used come from previous studies.^{23,38} The prevalence of *pks* was significantly higher in CRC patients (46%, $n = 37/80$) than in patients with diverticulosis (21%, $n = 6/28$; $p = 0.037$) (Table 1), which is in accordance with previously reported data.^{15,16} In contrast, the difference in the prevalence of *cnf1* in CRC patients (25%, $n = 20/80$) and diverticulosis patients (14%, $n = 4/28$; $p = 0.363$) was not significant. The majority of *E. coli* strains harboring the *cnf1* gene also carried the *pks* island: 95% ($n = 19/20$) and 100% ($n = 4/4$), in CRC patients and in healthy patients respectively, showing a strong association between the *cnf1* gene and the *pks* genomic island.

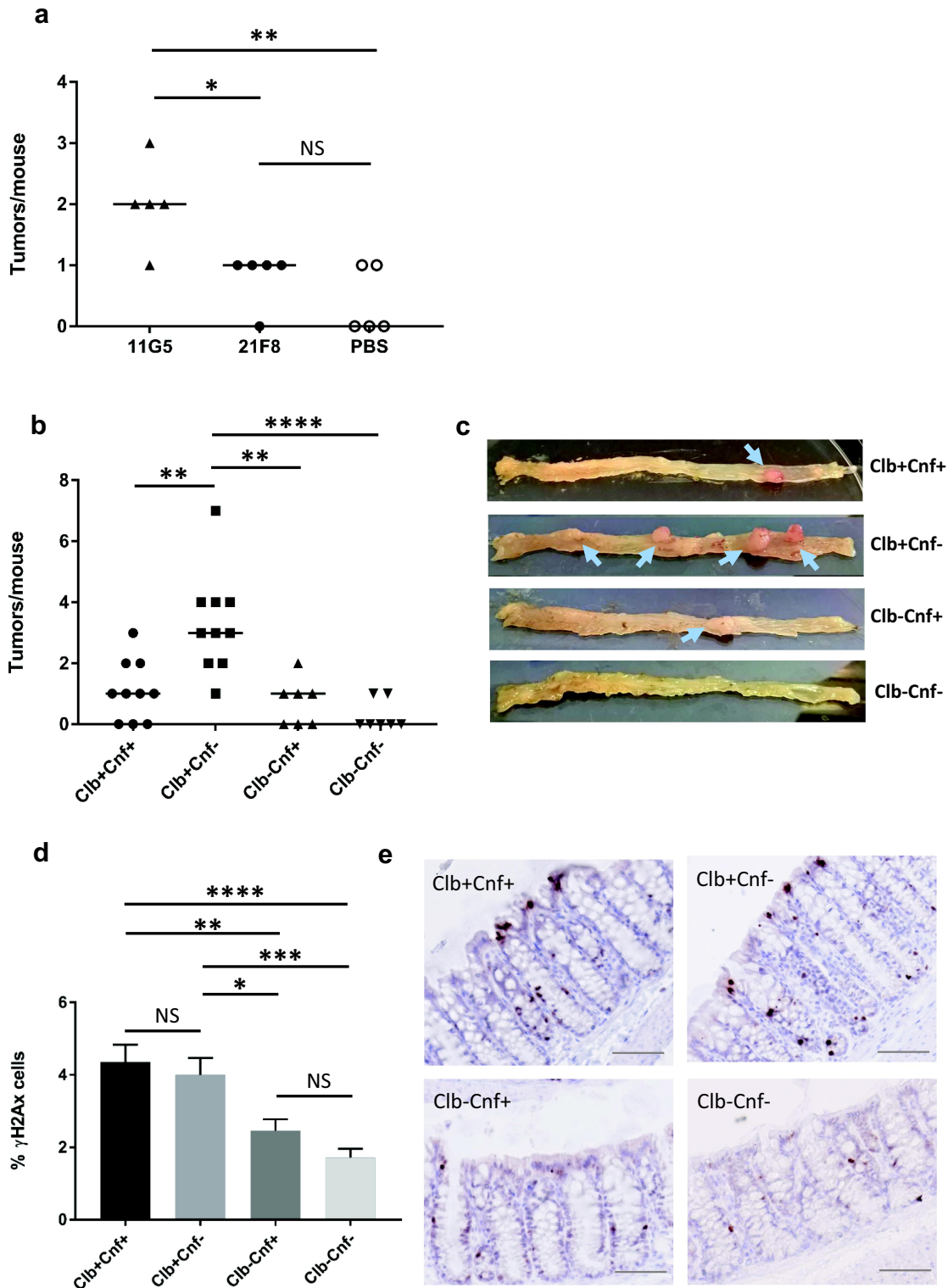


Figure 1. The absence of *cnf1* in CoPEC increases tumor development in *Apc^{Min/+}* mice. *Apc^{Min/+}* mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 hours. (a) Mice orally received PBS (Day 0) or 10^9 colony-forming units (CFU) of 11G5 or 10^9 CFU of wild-type 21F8 (Clb+Cnf+) bacteria. (b–e) *Apc^{Min/+}* mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 hours. Mice were orally inoculated with wild-type 21F8 (Clb+Cnf+) or 21F8 mutants: Clb+Cnf-, Clb-Cnf+ or Clb-Cnf-. (a–e) Mice were killed at 50 days post-infection. (a, b) the number of colorectal tumors was determined using a dissecting microscope. The data points represent actual values for each individual mouse, and the bars indicate median values. Data were combined from two independent experiments. (c) Representative images of the colons of the inoculated mice. Arrows show macroscopic tumors. (d) Representative images of γ H2AX immunohistochemical staining of nontumoral colonic mucosa (scale bars: 50 μ m) and (e) quantification of γ H2AX-positive cells determined from nontumoral colonic mucosa. Data are presented as means \pm SEMs. Statistical analysis: Kruskal–Wallis ANOVA (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001).

Table 1. Distribution of *E. coli* harboring *cnf1* and/or the *pks* genomic island producing colibactin (Clb) among CRC and control patients (percent in brackets).

Disease	Patients ³	Clb+Cnf+	Clb+Cnf-	Clb-Cnf+	Clb-Cnf- ⁴
CRC ¹	80	19 (23.8)	18 (22.5)	1 (1.3)	42 (52.5)
Control ²	28	4 (12.0)	2 (8.0)	0 (0)	22 (80.0)

¹CRC = patients with colorectal cancer.

²Control = patients with diverticulosis.

³Number of patients carrying a mucosa-associated *E. coli* that produces cyclomodulins (colibactin or CNF1).

⁴Number of patients carrying a mucosa-associated *E. coli* that does not produce cyclomodulins (colibactin or CNF1).

Analysis of the virulome of CoPEC strains 11G5 and 21F8

We selected two CoPEC strains, 11G5 and 21F8, from CRC patients. Previous studies have reported that the 11G5 reference strain, which harbors only the *pks* island, increased the number of tumors in mice.^{22,23,39} The 21F8 strain possesses both *pks* and *cnf1*. We analyzed the virulome of these two CoPEC strains (11G5 and 21F8). Both of them belong to phylogenetic Group B2 and share 130 genes associated with virulence (Supplemental Figure S1). *In silico* analysis revealed major virulence factors belonging to the following five categories: adherence (type 1 fimbriae, FC1/S fimbriae, YadA fimbriae, and curli fiber), toxins (colibactin and Vat), iron uptake (enterobactin, ChuA, Sit, and yersiniabactin), protectin (*iss*), and motility and chemotaxis (*che*, *flg*, *fliA*, and *flh*). Virulence genes missing in 21F8 but present in the 11G5 genome were those involved in glutathionylspermidine amidase activity (*gsp* genes), resistance to mercury (*mer* genes), adhesion (*ehaB* and *espI*), invasion (*ibeA*) and iron uptake (*iro* genes). Virulence genes missing in 11G5 but present in the 21F8 genome were *pap* genes, which encode P fimbriae, adhesin genes (*iha*, *upaG*) and the *pic* gene, which encodes a colonization factor. Likewise, pathogenicity island II (PAI II), which harbors the *hlyCABD* operon and the *cnf1* gene, was present in *E. coli* strain 21F8 but absent in strain 11G5. Thus, the only cyclomodulin present in the 21F8 strain and absent in the 11G5 strain was the CNF1 toxin.

The *E. coli* 21F8 strain lacking *cnf1* promotes colonic tumorigenesis

C57BL/6 *Apc*^{Min/+} mice were gavaged with the 21F8 or 11G5 strain to assess the protumorigenic roles of the CoPEC strains. As expected, the number of

colonic tumors increased in mice infected with the 11G5 strain compared to that in the uninfected mice (Figure 1a). Surprisingly, the number of tumors in the mice colonized with the 21F8 strain did not increase relative to that in the uninfected mice (Figure 1a). To evaluate the role of CNF1 in intestinal tumorigenesis, we generated isogenic mutants defective in CNF1 and/or colibactin (Clb) production, which were designated Clb+Cnf- for the mutant defective in CNF1, Clb-Cnf+ for the mutant defective in colibactin, and Clb-Cnf- for the mutant defective in CNF1 and colibactin. The wild-type CoPEC 21F8 strain (Clb+Cnf+) and the three mutants were administered orally by gavage to *Apc*^{Min/+} mice (Figure 1b, c). Mice inoculated with Clb+Cnf- developed a significantly higher number of colonic tumors than mice inoculated with the isogenic mutants devoid of colibactin (Clb-Cnf+ and Clb-Cnf-). As an increase in the number of tumors may be due to an overabundance of Clb+Cnf- in the gut microbiota, the abundance of 21F8 wild-type or isogenic mutant strains in feces and colon biopsies was determined. We did not observe a significant increase in the bacterial load in the *Apc*^{Min/+} mice fed Clb+Cnf- (Supplemental Figure S2).

To test whether Clb+Cnf+ and Clb+Cnf- expressed colibactin and induced DNA damage *in vivo*, we assessed the occurrence of DSB in colonic epithelial cells by detecting the S139 phosphorylation on the histone H2AX (γ H2AX), a well-known DSB marker⁴⁰. Colonic biopsies revealed a significant increase in the number of γ H2AX-positive cells in the mice exposed to the CoPEC strains Clb+Cnf+ and Clb+Cnf- compared to that in the mice exposed to the isogenic mutants Clb-Cnf+ and Clb-Cnf- (Figure 1d, e), showing that the *pks* island was functional and induced DNA damage of colonic epithelial cells. No significant differences in γ H2AX staining in the colon of the mice inoculated with Clb+Cnf+ and Clb+Cnf- were observed (Figure 1d, e).

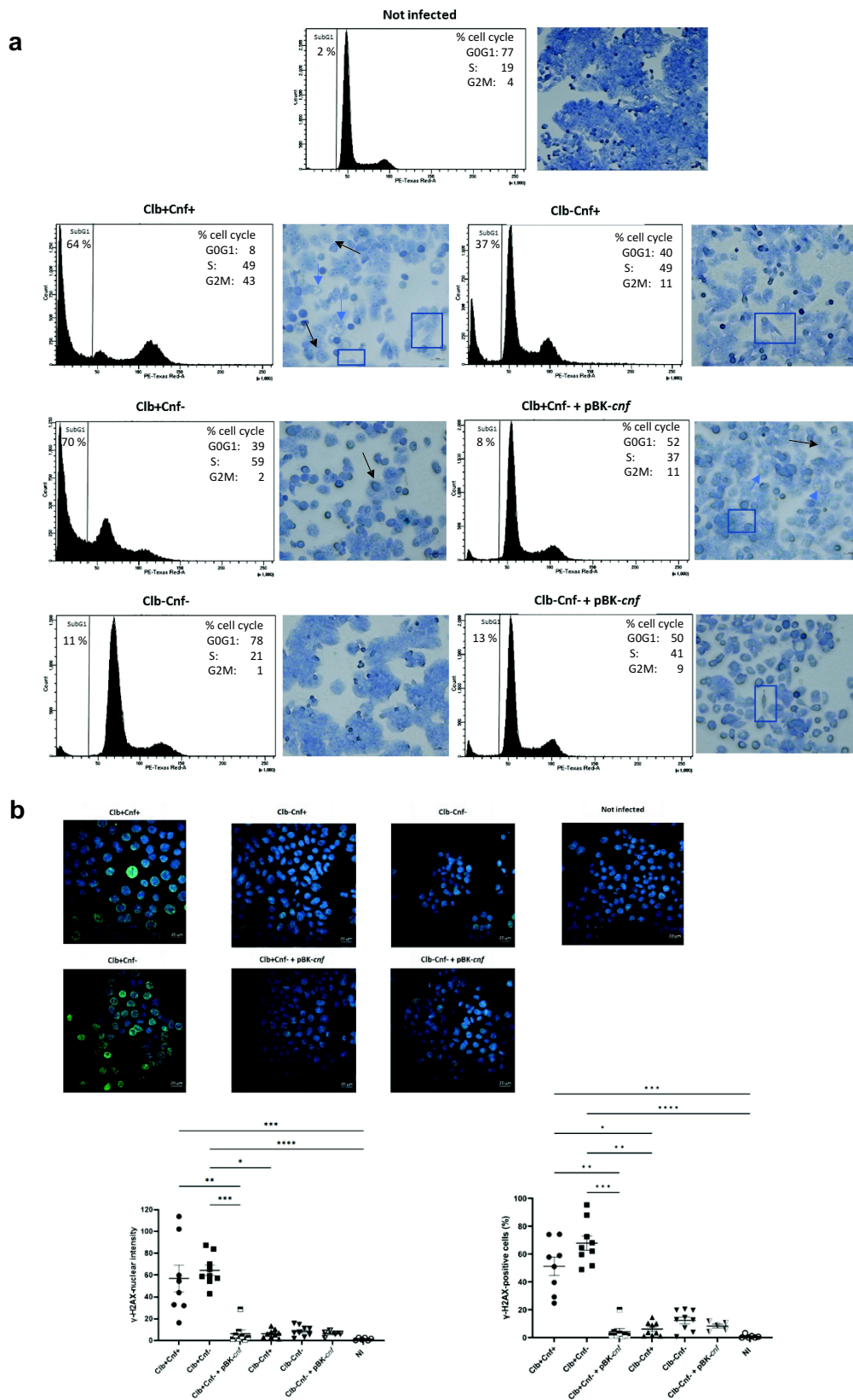


Figure 2. The *cnf1* gene modulates the genotoxic effect of CoPEC. HT-29 cells were infected for 3.5 h. (a) Cell cycle distribution and cytopathic effects were observed 72 h post-infection. Data are representative of two experiments. The dark and blue arrows show some megalocytes and multinucleated cells respectively as example, and rectangle surrounds the elongated cells. (b) Immunofluorescence of γ H2AX indicating double strand breaks was assessed 24 h post-infection. The percentage of γ H2AX-positive cells were counted from > 100 cell nuclei per well; the data points represent values for each individual cell wells. Alternatively, the average values of the measured nuclear fluorescence intensities was determined. Data are representative of two or three independent experiments and values are represented in mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis tests (NS, not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001).

The CoPEC 21F8 strain induces colibactin-dependent cytotoxicity in human colon cancer cells

We next investigated the mechanisms by which CNF1 limits 21F8-induced colorectal tumorigenesis using cell cultures. To test whether *E. coli* 21F8 expresses the *pks* and *cnf1* genes and induces cytotoxicity, we infected human colon epithelial HT-29 cells with Clb+Cnf+ (21F8 strain), Clb-Cnf+, Clb+Cnf-, Clb-Cnf-, or with the corresponding trans-complemented mutants Clb+Cnf- +pBK-*cnf* and Clb-Cnf- +pBK-*cnf*. Colibactin and CNF1 are known to dysregulate cell cycle and induce cytopathic phenotypes. Transient infection with colibactin-producing bacteria (Clb+Cnf+ and Clb+Cnf-) caused cell cycle arrest, apoptosis induction and megalocytosis in HT-29 cells (Figure 2a, as expected.^{19,41,42} Clb-Cnf+ and Clb-Cnf- +pBK-*cnf* were able to induce accumulation of cells in both the S and G2/M phases compared to uninfected cells (Figures 2a and Supplemental Figure S3A). This was also found when cells infected with Clb+Cnf- were incubated with the purified toxin CNF1 (Supplemental Figure S3a). Infection with Clb-Cnf+, Clb-Cnf- +pBK-*cnf* and Clb+Cnf+ resulted in more flattened cells, elongated cells or cells spreading out compared with infection with Clb-Cnf- (Figure 2a), which are hallmarks of CNF1 cytopathic effects in epithelial cells.^{34,41} Only HT-29 cells infected with Clb+Cnf+ and Clb+Cnf- +pBK-*cnf* exhibited both megalocytosis and elongated cell morphologies. However, the cytopathic phenotype induced by Clb+Cnf- +pBK-*cnf* appears to be lower than those of Clb+Cnf+ (Figure 2a). Intriguingly, cells infected with this trans-complemented mutant exhibited a cell cycle similar to that of cells infected by Clb-Cnf+ or Clb-Cnf- +pBK-*cnf*. We quantified the transcription of three key *clb* genes involved in colibactin production in response to HT-29 cell infection. The mRNA levels of these genes were similar for Clb+Cnf+ and Clb+Cnf- (Supplemental Figure S4a), suggesting that the deletion of *cnf1* does not modify the production of colibactin.

Because the effects of colibactin results from DSB, γ H2AX staining was monitored 24 hours post-infection (Figure 2b)⁴³. Cells infected with

strains not producing colibactin exhibited normal background levels of γ H2AX (0.8 to 12%), whereas cells infected with Clb+Cnf+ or Clb+Cnf- showed strong γ H2AX staining (51 vs 70%; Figure 2b). The γ H2AX levels were not significantly different between those cells infected with Clb+Cnf+ or Clb+Cnf-. However, the incubation of purified CNF1 with HT-29 cells during Clb+Cnf- infection resulted in a ~50% reduction in γ H2AX levels (Supplemental Figure S3d). Additionally, we unexpectedly found a drastic reduction in the number of γ H2AX-positive cells infected by the trans-complemented mutant Clb+Cnf- +pBK-*cnf* in comparison with those infected with Clb+Cnf- (Figure 2b). The mRNA levels of *clbC*, *clbM* and *clbP* genes were significantly reduced ($\geq 50\%$) for Clb+Cnf- +pBK-*cnf* compared to the parent strain (Supplemental Figure S4b). However, deletion of the *cnf* gene did not modify mRNA levels of the colibactin-synthesis gene (Supplemental Figure S4a). These results therefore suggest that the reduction of γ H2AX levels observed with the trans-complemented mutant may be due to the action of CNF1 combined with a modified production of colibactin. To confirm this effect of CNF1 on γ H2AX levels, we incubated HT-29 cells with bleomycin, a well-known chemotherapy drug that induces DNA damage, including DSB. We observed that the level of γ H2AX induced by bleomycin was reduced when CNF1 was concurrently added. In conclusion, in our experimental conditions, the presence of the *cnf1* gene did not appear to affect the genotoxicity of the 21F8 strain. However, we show that the CNF1 toxin is able to reduce the levels of γ H2AX induced by DSB.

Deletion of the *cnf1* gene increases CoPEC-induced cellular senescence and IL-8 production

CoPEC induces senescence of infected cells, leading to the secretion of inflammatory mediators and growth factors, which promote the proliferation of nearby uninfected cells.^{22,44} We infected HT-29 cells with Clb+Cnf+, Clb-Cnf+, Clb+Cnf-, Clb-Cnf-, or with the corresponding trans-complemented mutants Clb+Cnf- +pBK-*cnf* and Clb-Cnf- +pBK-*cnf* and detected senescent cells by staining for β -galactosidase at pH 6, a well-

accepted senescence marker.⁴⁵ Clb+Cnf+ infection increased the number of β -galactosidase-positive cells compared to that among uninfected cells or cells infected with colibactin-defective mutants (Clb-Cnf+, Clb-Cnf- and Clb-Cnf- +pBK-cnf) (Figure 3a,b). Although senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity observed with Clb-Cnf+ (11%) was much lower than that of Clb+Cnf+ (37%), this activity was significantly increased compared to uninfected cells (0.4%), suggesting that CNF1 induces senescence as has been shown in other models.⁴⁶ If we independently

compare cells infected by Clb+Cnf- and Clb+Cnf+, the number of β -galactosidase-positive cells markedly increased when infected with Clb+Cnf- (72% vs 37%; $p = 0.0022$; Mann-Whitney test). The incubation of CNF1 with HT-29 cells during Clb+Cnf- infection also decreased the number of positive cells (Supplemental Figure S3c). P16 is a cell cycle gene that negatively regulates cell proliferation and is involved in pathways regulating senescence-mediated arrest. The number of p16-positive cells markedly increased when cells were infected with Clb+Cnf- compared to that observed in Clb

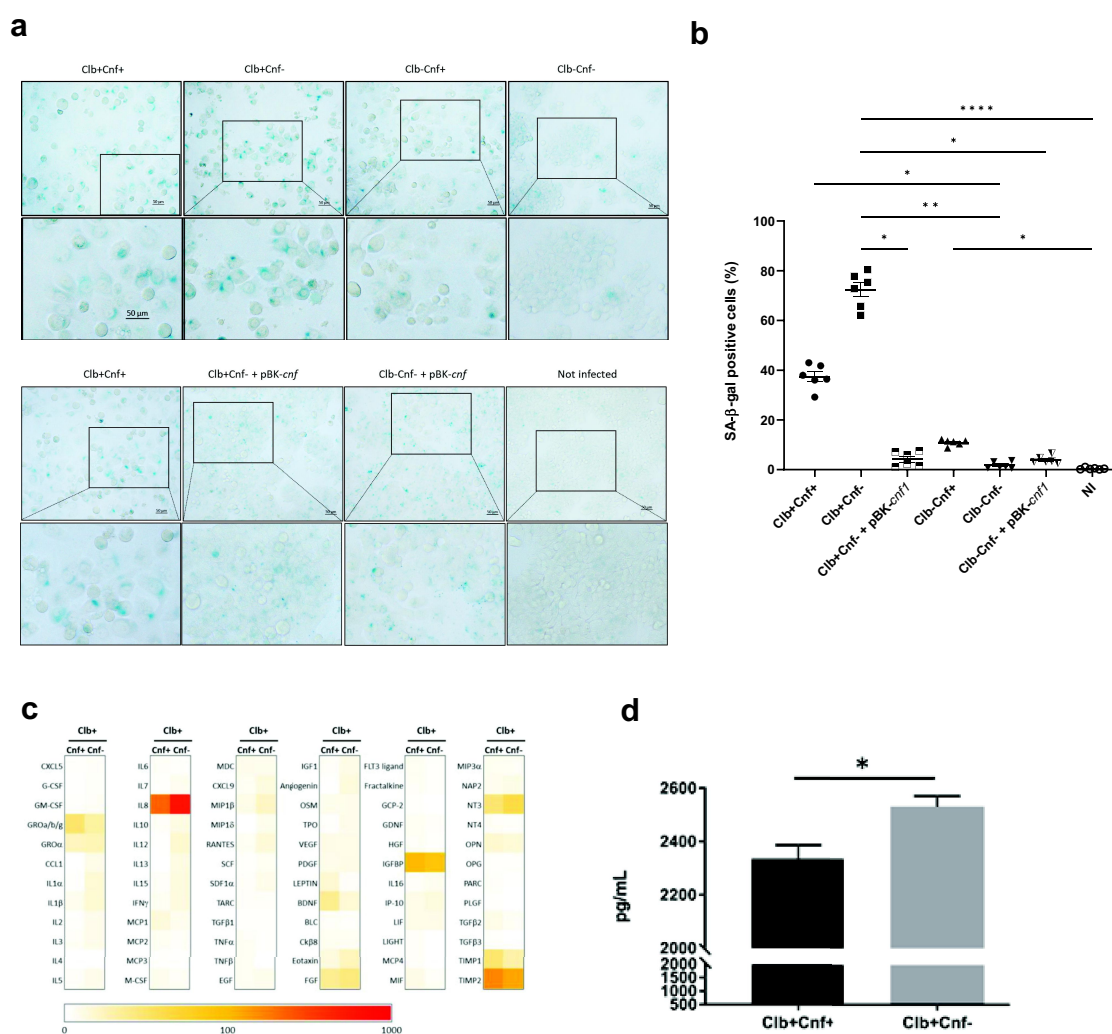


Figure 3. The *cnf1* gene decreases CoPEC-induced cellular senescence and IL-8 production. HT-29 cells were infected for 3.5 h. (a) on Day 3 post-infection, senescent cells were detected by β -galactosidase staining at pH 6. Representative images are shown (b) the percentage of senescence-associated β -galactosidase-positive cells was determined. The data points represent values the mean of fields with 100 to 200 cells for each individual cell wells ($n = 3$). Data are representative of two independent experiments and values are represented in mean \pm SEM. (c) Heatmaps showing the relative rates of senescence-associated factors secreted by cells infected with Clb+Cnf+ or with the Clb+Cnf- mutant. Control values were set to 0 (negative control) and 100 (positive control). Orange-red indicates the predominant secreted factors. (d) IL-8 amounts secreted in culture supernatant by cells infected with Clb+Cnf+ or with the Clb+Cnf- mutant. The quantification of IL-8 was performed by ELISA. Data are representative of two independent experiments from three different conditioned media. Values represent means \pm SEMs. Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.0001$).

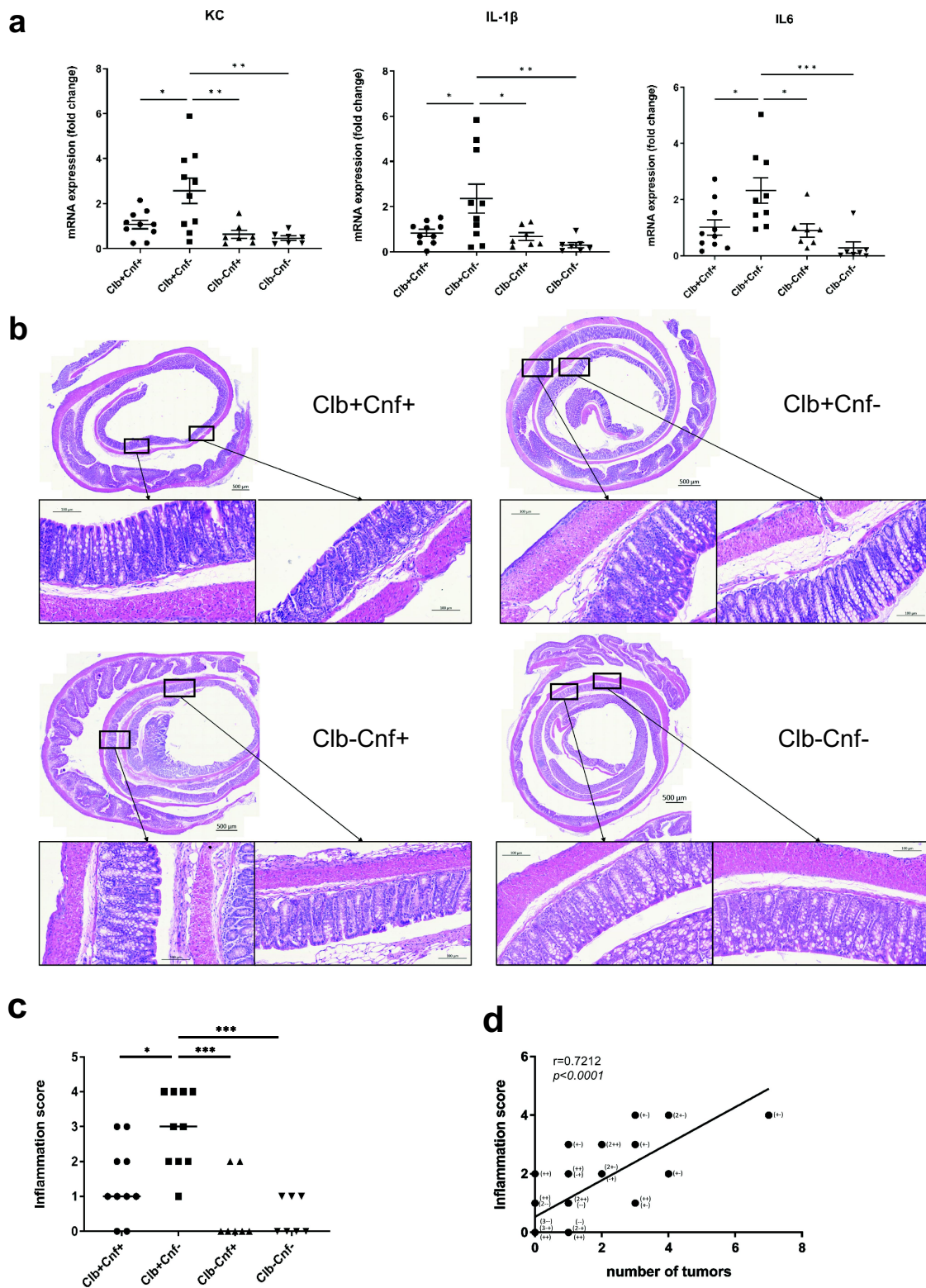


Figure 4. The *cnf1* gene limits CoPEC-induced colonic inflammation in *Apc^{Min/+}* mice. *Apc^{Min/+}* mice were orally administered 10^9 colony-forming units (CFU) of wild-type *E. coli* 21F8 (Clb+cnf+) or 10^9 (CFU) of its isogenic mutants: Clb+Cnf-, Clb-Cnf+ and Clb-Cnf-. Mice were killed on Day 50 after administration. (a) *Kc*, *Il-6*, *Tnf- α* , and *Il-1 β* mRNA levels in the colonic mucosa were quantified by Qrt-PCR. The data points represent values for each individual mouse. Data are presented as means \pm SEMs. (b) Representative images of H&E-stained colonic sections showing submucosal edema and inflammatory cell infiltration. (c) Inflammation score for each individual mouse, with the bars indicating median values. (d) Correlation between the inflammation score and the number of tumors [Clb+cnf+ (++, n = 10); Clb+Cnf- (+ -, n = 10); Clb-Cnf+ (- +, n = 7) and 7 Clb-Cnf- (- -, n = 10)]. The given *r* values indicate Spearman's rank correlation, and the *P* value represents the significance of the test result. Statistical analysis was performed by the Kruskal-Wallis test (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001).

+Cnf+ infected cells (Supplemental Figure S5). These results showed that the presence of CNF1 limited CoPEC-induced cellular senescence.

Next, we analyzed the senescence-associated secretory phenotype (SASP), which is known to underlie the pro-proliferative effect of colibactin.²² As expected, conditioned medium derived from cells infected with Clb+Cnf+ or Clb+Cnf- enhanced the proliferation of uninfected cells compared with conditioned medium derived from cells infected with Clb-Cnf+ or Clb-Cnf- (Supplemental Figure S6). However, we observed no significant difference in the pro-proliferative effect of conditioned medium derived from cells infected with Clb+Cnf+ or Clb+Cnf-, showing that *cnf1* did not modify the pro-proliferative effect mediated by CoPEC-induced cellular senescence *in vitro* (Supplemental Figure S6). Conditioned medium derived from HT-29-infected cells was then probed using an antibody array targeting 72 senescence-associated secreted factors (Figure 3c). In agreement with the results regarding the pro-proliferation effect, the production of growth factors was similar in the cells infected with Clb+Cnf+ and Clb+Cnf-. Interestingly, IL-8 production levels were the highest in cells infected with the Clb+Cnf-mutant. The difference in IL-8 production in the Clb+Cnf- infected cells was confirmed by ELISA (Figure 3d).

Overall, the presence of *cnf1* did not significantly modify the pro-proliferative effect of the colibactin-induced SASP in uninfected cells. However, it affected the induction of senescence mediated by colibactin and induced a subtle modification of the SASP, notably a decrease in the secretion of the proinflammatory cytokine IL-8.

The *E.coli* 21F8 strain lacking *cnf1* induces an increase in colonic inflammation and senescence in *Apc*^{Min/+} mice

Given the differences in senescence and SASP observed in our *in vitro* assays, we investigated inflammatory responses in infected *Apc*^{Min/+} mice. We analyzed the expression of several pro-inflammatory factors by qRT – PCR in the colon of

Apc^{Min/+} mice. Pro-inflammatory gene mRNA levels, including those of *KC*, the murine homolog of human IL-8, were significantly higher in mice inoculated with Clb+Cnf- than in those inoculated with Clb+Cnf+, Clb-Cnf+, or Clb-Cnf- (Figure 4a). These results were corroborated by histological analyses of colonic biopsies from *Apc*^{Min/+} mice. Colon sections from the Clb+Cnf- inoculated *Apc*^{Min/+} mice showed submucosal edema and cellular infiltration (neutrophils and mononuclear cells), whereas colon sections from the Clb+Cnf+ inoculated *Apc*^{Min/+} mice showed only few inflamed areas with weak inflammatory cellular infiltrate (Figures 4b and Supplemental Figure S7). Accordingly, the colonic inflammation score was significantly increased in *Apc*^{Min/+} mice inoculated with Clb+Cnf- compared to that in those inoculated with Clb+Cnf+ or mutants defective in colibactin production (Clb-Cnf+ and Clb-Cnf-) (Figure 4c). The degree of inflammation induced by Clb+Cnf- remained low, with no ulcers or extensive crypt damage. The increase in inflammation was in accordance with the increase in the tumor number observed in the mice inoculated with the Clb+Cnf- strain compared to that of the mice inoculated with the Clb+Cnf+ and Clb-Cnf+ mutants (Figure 1b). We observed a significant positive correlation between the inflammation score and the number of colonic tumors in the *Apc*^{Min/+} mice (Figure 4d), suggesting that CNF1 decreased colibactin-mediated colon tumorigenesis by inhibiting inflammation.

Next, we investigated whether the presence of the *cnf1* gene limited CoPEC-induced senescence *in vivo*. A PCR array designed to analyze a panel of 84 genes associated with senescence was performed with RNA extracted from colonic biopsy samples of mice colonized by Clb+Cnf+ or by its mutant Clb+Cnf-. Twelve genes were ≥ 2 -fold upregulated in the Clb+Cnf- inoculated group compared to the group inoculated with Clb+Cnf+ (Figure 5a). qRT – PCR tests confirmed the upregulation of the most deregulated genes (Figure 5b), including *Creg-1*, an enhancer of the p16^{INK4a}-dependent senescence pathway.⁴⁷ Accordingly, there was a significant decrease in p16^{INK4a}-positive cells in the murine colonic tissues colonized with Clb+Cnf+ compared to those in the murine colonic tissues colonized with Clb+Cnf- (Figure 5c), with only

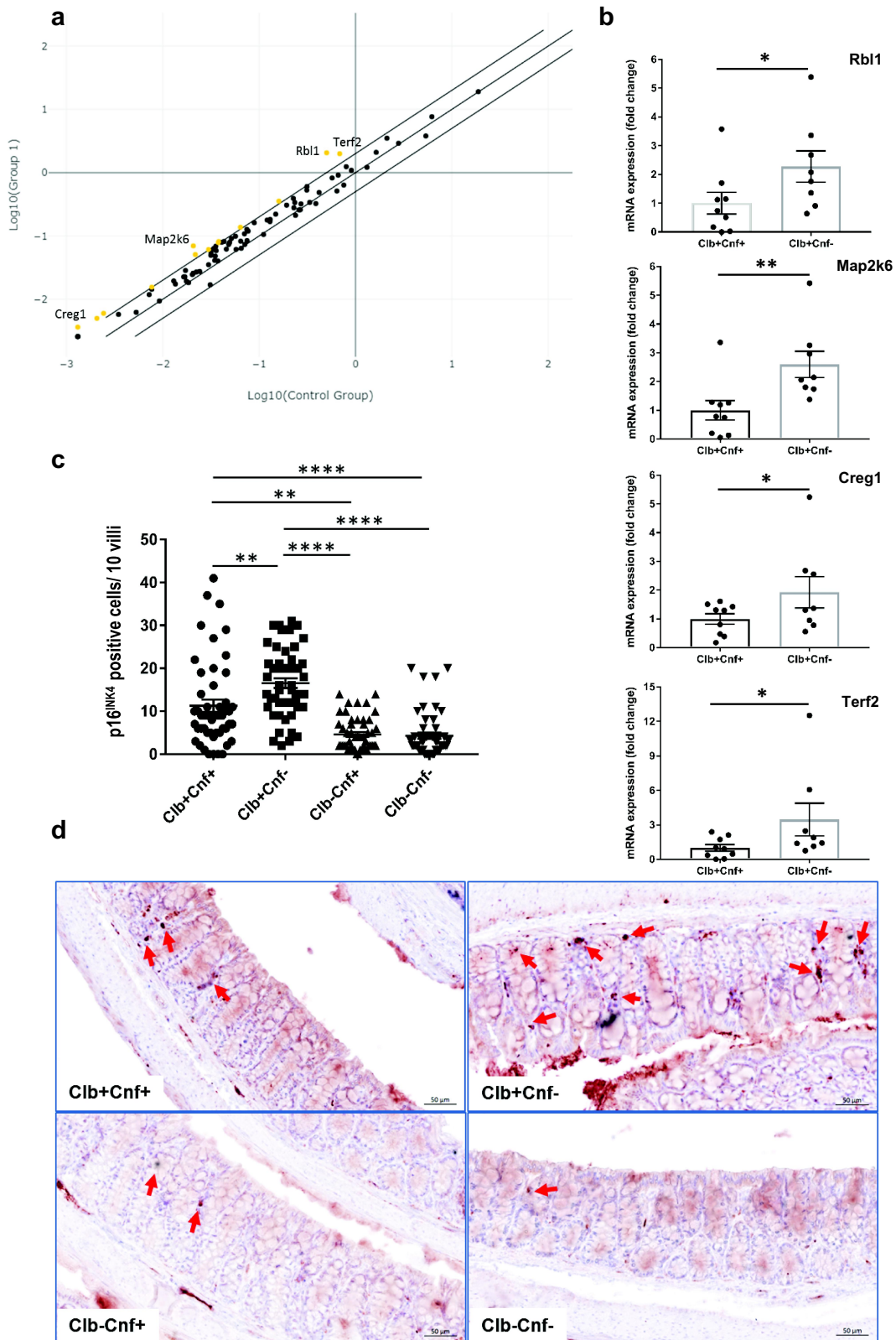


Figure 5. The *cnf1* gene limited CoPEC-induced senescence in the colon of *Apc*^{Min/+} mice. *Apc*^{Min/+} mice were orally administered 10^9 colony-forming units (CFU) of wild-type *E. coli* 21F8 (Clb+Cnf+) or 10^9 (CFU) of its isogenic mutants: Clb+Cnf-, Clb-Cnf+ and Clb-Cnf-. Mice were killed on Day 50 after administration. (a) Scatter plot of differential gene expression in the colonic mucosa of mice inoculated with Clb+Cnf- and Clb+Cnf+ determined using a cellular senescence RT2 Profiler PCR Array (the conditioned medium used was a mix of 3 replicates of mice infected by Clb+Cnf+ or Clb+Cnf- strains). The yellow circles show ≥ 2 -fold upregulated genes in the mice inoculated with Clb+Cnf- compared to those in mice inoculated with Clb+Cnf+. (b) Relative *Rbl1*, *Map2k6*, *Creg1* and *Terf2* mRNA levels quantified by Qrt-PCR (RT2 Profiler PCR) in the colonic mucosa of mice inoculated with Clb+Cnf- or Clb+Cnf+. The data points represent values for each individual mouse (c) Quantification of p16^{INK4a}-positive cell number/10 villi determined from 100 villi/mouse and 5 mice/group. Data are presented as means \pm SEMs. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$). (d) Representative images of immunohistochemical expression of p16^{INK4a} in *Apc*^{Min/+} colonic mucosa of infected mice. The arrowheads show positive cells (scale bars: 20 μm).

a few p16^{INK4a}-positive cells detected in the colonic epithelium of the mice inoculated with the mutants defective in colibactin production (Figure 5d). Overall, these results suggested that CoPEC induces senescence in the colon of *Apc*^{Min/+} mice and that CNF1 limits this process.

We investigated the fecal microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. In addition to increases CoPEC-induced cellular senescence and inflammation, the deletion of *cnf1* gene was associated with a change in intestinal microbiota composition (these results are detailed in the supplementary data).

The CNF1 toxin impairs the development of colon tumors in *Apc*^{Min/+} mice

To confirm the importance of CNF1 in preventing the tumorigenic activity of colibactin, we investigated the impact of weekly rectal administration of the CNF1 protein on the development of colonic tumors in *Apc*^{Min/+} mice colonized by pro-tumorigenic Clb+Cnf-. We observed no difference in intestinal colonization by Clb+Cnf- between the mice treated with CNF1 and the mice treated with a saline solution (PBS) (Supplemental Figure S8). The mice treated with CNF1 had significantly fewer tumors than the PBS-treated mice (Figure 6a). The decrease in tumor number was associated with a reduction in both inflammation and senescence marker levels (Figure 6b–e). Inflammatory cell infiltration and submucosal edema were significantly less pronounced in mice treated with CNF1 than in PBS-treated mice (Figure 6d). Accordingly, there was a significant decrease in the histological colonic inflammation score of the *Apc*^{Min/+} mice colonized with *E. coli* Clb+Cnf- and treated with CNF1 in comparison to that of PBS-treated mice (Figure 6c). As shown in (Figure 6f, g) the histological inflammation score and KC rate were significantly and positively correlated with the number of tumors in the *Apc*^{Min/+} mice. The mice with the highest number of tumors and the highest level of colonic inflammation were those that did not receive CNF1. This observation was found with *Apc*^{Min/+} mice colonized by pro-tumorigenic 11G5 (Supplemental Figure S9). Overall, these results demonstrated that CNF1 limited the development of colonic tumors in CoPEC-

infected *Apc*^{Min/+} mice, like by decreasing senescence and/or chronic low-grade inflammation induced by CoPEC.

Discussion

Colibactin and CNF1, two common toxins of *E. coli* that affect the eukaryotic cell cycle, are putative pro-tumorigenic factors.^{20,22,29,36,37,48} Our epidemiological data demonstrated that CNF1 is almost always associated with colibactin in *E. coli* strains isolated from CRC patients. We thus hypothesized that coproduction of these two cyclomodulins might enhance colorectal carcinogenesis. However, our results show that a human CoPEC strain coproducing colibactin and CNF1 did not exhibit pro-tumorigenic activity in *Apc*^{Min/+} mice, unlike human *E. coli* strain 11G5, which produces only colibactin. We constructed isogenic mutants defective for CNF1 and/or colibactin production from the clinical strain 21F8. We observed independent impacts of CNF1 and colibactin on eukaryotic cells in terms of cytopathic effects that were in agreement with their production from independent genetic structures.⁴⁹ Interestingly, isogenic deletion of *cnf1* in 21F8 revealed the pro-tumorigenic activity of the strain, and rectal administration of CNF1 in *Apc*^{Min/+} mice colonized by the 21F8 mutant defective in *cnf1* decreased colonic tumor development. Counterintuitively, these results revealed that CNF1 hinders tumorigenesis induced by colibactin-producing *E. coli* in the *Apc*^{Min/+} CRC model. Further analyses highlighted the underlying mechanisms.

The carcinogenic effect of CNF1 has previously been linked to its ability to promote Rho GTPase-dependent cellular effects, proinflammatory NF-κB pathway activation, cell growth and apoptosis suppression, tumor invasiveness, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and metastasis.^{30,32,36,37,48,50,51} However, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the anti-proliferative and cytotoxic effects of CNF1 in cancer cell lines,^{52–55} suggesting a two-sided paradigm of CNF-1 impact.⁴⁸ In the present study, isogenic *E. coli* 21F8 producing only CNF1 did not induce metastasis or enhance colonic tumorigenesis in the

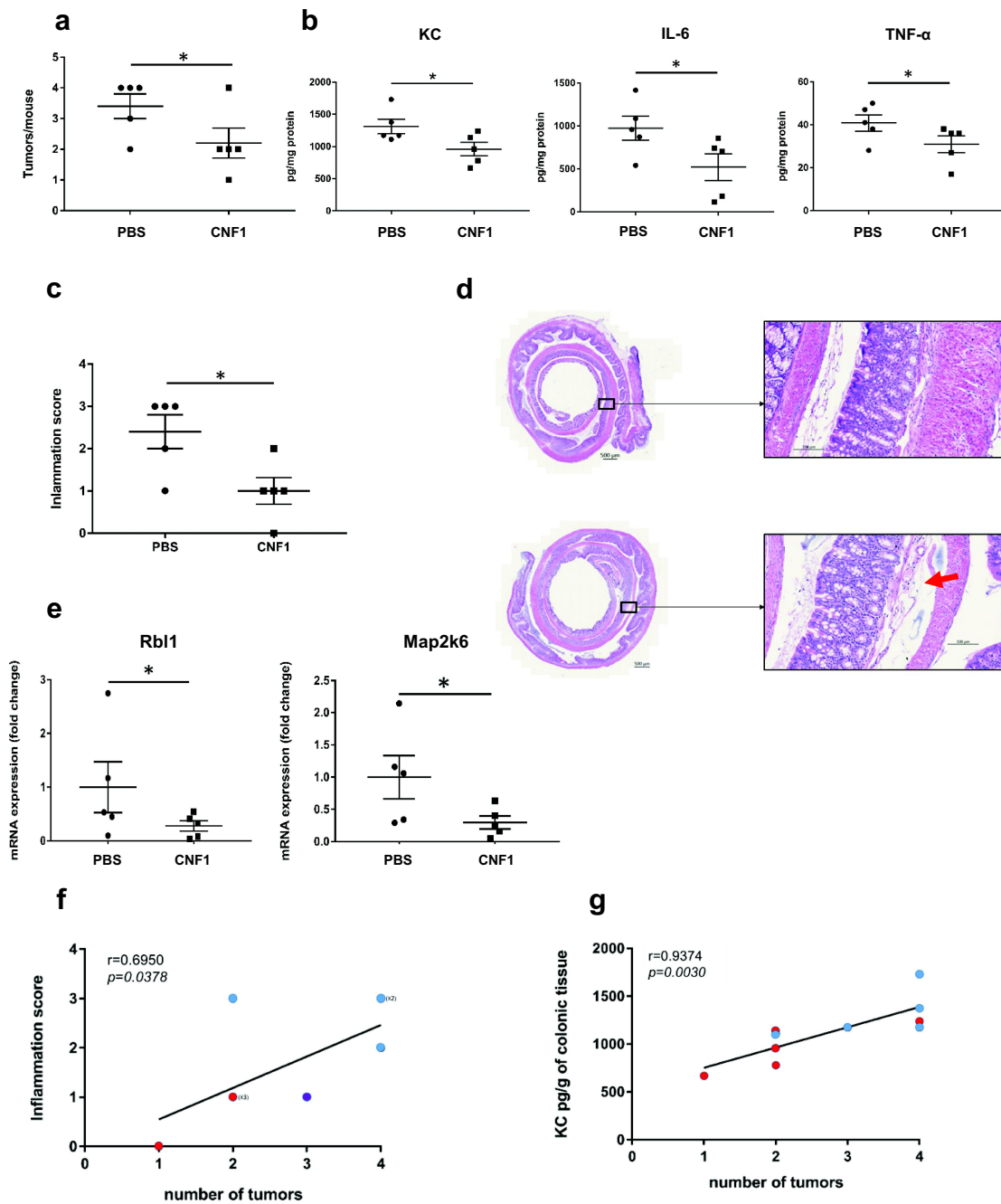


Figure 6. In CoPEC-infected *Apc*^{Min/+} mice, intrarectal administration of CNF1 impedes the development of colon tumors and decreases inflammation. *Apc*^{Min/+} mice were orally administered 10⁹ colony-forming units of the *E. coli* 21F8 mutant producing colibactin but defective in *cnf1*. Two days post-infection, the mice received an intrarectal injection of 10 μ g of CNF1 protein or PBS every 7 days for 7 weeks. (a) the number of colorectal tumors by mouse was determined using a dissecting microscope. The data points represent actual values for each individual mouse, and the bars indicate median values. (b) the levels of secreted cytokines (KC, IL-6 and TNF- α) in colonic tissue were quantified by ELISA. (c) Inflammation score is presented as the mean \pm SEM. (d) Representative images of H&E-stained colonic mouse sections of PBS- or CNF1-treated mice. The red arrow shows submucosal edema. (e) *Rbl1* and *Map2k6* mRNA relative levels in colonic mucosa were quantified by Qrt – PCR (RT2 Profiler PCR). (f) Correlation between the inflammation score and the tumor number. (g) Correlation between the KC levels in colonic tissue and the tumor number. Blue dots represent mice treated with PBS (n = 5) and red dots represent those treated with CNF1 (n = 5). Statistical comparisons were carried out by unpaired t test (* P < 0.05) after normality testing. Spearman correlation analysis was performed between the inflammation score or KC concentration and the tumor number. The given r values indicate Spearman's rank correlation, and the P value represents the significance of the test result.

Apc^{Min/+} murine model of colon cancer. CNF1 behaved therefore less as an anti-tumorigenic factor than as a protective factor against colibactin.

We observed both *in vitro* and *in vivo* that CNF1 reduced colibactin-induced (i) inflammatory cell infiltration, (ii) senescence, and (iii) senescence-associated secretion of the key pro-inflammatory cytokine, KC/IL-8. Senescence and the resulting SASP have been identified as cellular processes sustaining tumor development in a xenograft model.^{22,56} Chronic inflammation is known to be an important risk factor for numerous forms of cancer, including CRC,⁵⁷ and inflammation has also been identified as a key player in colibactin tumorigenic activity *in vivo*.^{16,22,58} In addition, several studies have implicated IL-8 in the progression of various types of cancer,^{59–63} including CRC.^{64,65} CNF1 has pro-inflammatory activity in acute infections, such as urinary tract infections.⁶⁶ In contrast, it may also counteract the overexpression of proinflammatory cytokines such as IL-8 during chronic colonization, as reported by Loizzo *et al.* in the context of the chronic inflammation associated with Alzheimer's disease.⁶⁷ Therefore, the impact of CNF1 on colibactin-induced tumorigenesis can be explained in the context of the tissue organization field theory. According to this theory, alterations in tissue organization by cellular processes such as inflammation or senescence lead to carcinogenesis.⁶⁸ Additionally, the bacterium-engulfing activity of CNF1, linked to the activation of Rho GTPases by deamidation,^{50,69} could contribute to the observed phenotype. Upon expressing CNF1, the bacteria may acquire invasive capacities and thereby shelter from the host immune system, generating less inflammation.^{29,69} Thus, CNF1 appears to function as a protective factor against colibactin, impeding the emergence of a microenvironment and inflammatory cell infiltration promoting tumorigenesis in the *Apc^{Min/+}* mouse model.

On the other hand, double-strand DNA breaks are the primary effect of colibactin and induce oncogenic mutations in human CRC.^{18,20} Our results showed that the presence of *cnf1* gene under normal conditions, *i.e.* when not overexpressed, does not modify the intensity of colibactin-induced DNA damage. However, the capacity

to repair injury may be different in presence of CNF1. In this regard, the level of γ H2AX was considerably reduced when the cells were infected with the Clb+Cnf- strain trans-complemented with *cnf1*. Rho GTPases such as Rho and Rac proteins, that are involved the regulation of DNA repair systems,⁷⁰ are the target of CNF1, which induces their constitutive overactivation through the deamidation of a specific glutamine residue in the infected cells. A high Rho GTPases activity have been directly correlated with a high level of DNA repair, and inhibition of Rho GTPases dramatically reduces γ H2AX and the formation of DNA damage foci.⁷⁰ Furthermore, CNF1-induced Rac1 activation positively regulates RhoB expression cultures of epithelial cell lines, including HT-29 cells.⁷¹ CNF1 may therefore enhance DNA repair and then weaken the carcinogenic effect of colibactin.

In addition, there is emerging evidence for a cancer suppressive role for RhoB through inhibitory effects on cell proliferation, survival, invasion and metastasis.⁷² These *in vitro* observations were supported by *in vivo* findings. RhoB-depleted cells form tumors more efficiently than cells expressing RhoB when injected intraperitoneally into mice.⁷³ Cells transfected with RhoB and subcutaneously implanted into nude mice suppress tumor growth.⁷⁴ CNF1-induced activation of Rho GTPases may thereby hinder colon tumorigenesis induced by colibactin-producing *E. coli*. However, Rho GTPases interact with a wide range of effectors and cellular signaling cascades. Their role in cancer is dependent of cellular context and they can also contribute to tumor formation.⁷² Further studies are required to decipher the features that determine the impact of Rho GTPases in carcinogenesis.

The findings of this study underline the strong epidemiological link between CNF1 and colibactin in *E. coli* strains associated with human CRC. In this study, more than 90% of *E. coli* strains harboring the *cnf1* gene carried the genomic island *pks* producing colibactin. This finding is in accordance with previous reports that demonstrated this association in uropathogenic *E. coli* (83%) and *E. coli* isolated from fecal samples of different animals (62–100%).^{41,75,76} Thus, the association of CNF1 and colibactin is common in *E. coli*, which is the predominant aerobic organism observed in the gastrointestinal tract and common in the human

intestinal microbiota (i.e., >90%).⁷⁷ The prevalence of patients colonized with strains of *E. coli* bearing both the *pks* genomic island and *cnf1* gene (Table 1) was not significantly higher in CRC patients than in controls (24%, $n = 19/80$ versus 14%, $n = 4/28$; $p = 0.432$). Thus, the frequent association of CNF1 with colibactin in *E. coli*, an extremely common bacterium in the gut, does not result in higher incidence of CRC.

In conclusion, we found that the *pks* island and *cnf1* gene are frequently co-harbored in *E. coli*. Our work showed for the first time that CNF1 hinders CoPEC-induced colorectal carcinogenesis by decreasing CoPEC-induced cellular senescence and inflammation. The presence of *E. coli* strains producing only colibactin might represent a higher risk of CRC than the presence of strains producing both CNF1 and colibactin. Another finding that emerges from this study is the need to consider the genetic diversity of bacteria colonizing CRC patients and especially their virulome to understand microbiota-induced carcinogenesis and to determine whether the bacterium is deleterious to the host.

Materials and methods

Information on the bacterial strains, cell culture, infection assays, CoPEC colonization, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT – PCR), antibody array chips, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), senescence-associated β -galactosidase staining, immunofluorescence microscopy, histological observations, and immunohistochemical staining appears in the Supplementary materials.

Bacterial strains and construction of isogenic mutants

The clinical *E. coli* 11G5 and 21F8 strains were isolated from tumors of patients with CRC. The following isogenic mutants of the 21F8 strain were generated using the method described by Datsenko *et al.*⁷⁸ and modified by Chaveroche *et al.*⁷⁹ 21F8 Δ *cnf* (Clb+Cnf-) with deletion of the *cnf1* gene, 21F8 Δ *clbQ* (Clb-Cnf+) with deletion of the *clbQ* gene of the *pks* island and 21F8 Δ *cnf* Δ *clbQ* (Clb-Cnf-) with deletion of the

cnf1 and *clbQ* genes. The ClbQ thioesterase regulates colibactin synthesis and consequently its genotoxic activity. CoPEC strains deficient in *clbQ* are unable to produce functional colibactin.²² In brief, the method consisted of the replacement of the gene of interest by a selective antibiotic cassette (kanamycin) generated by PCR using primers reported in the Table S1 from supplementary materials. The hemolysin A (*hlyA*) was deleted from the 21F8 strain and its isogenic mutants with the same method to avoid lysis of the HT-29 cells. The presence of deletions and the absence of additional genetic modifications were verified by sequencing the clinical 21F8 strain and its isogenic mutants. With the In-Fusion[®] HD Cloning (Takara), *cnf1* gene was cloned into the pBK-CMV plasmid (Table S1). The 21F8 Δ *hlyA* Δ *cnf* and 21F8 Δ *hlyA* Δ *cnf* Δ *clbQ* was electroporated with sequenced pBK-CMV-*cnf1* plasmid. For experiments, strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth overnight at 37°C with 110 rpm agitation. All the strains for this study were summarized in Table S2.

Colonization of the *Apc*^{Min/+} murine model

C57BL/6 *Apc*^{Min/+} females (6–7 weeks of age) were used. The mice were inoculated as previously described.²³ All the mice were sacrificed 50 days post-infection. Colonic tumor number and tumor volume ($[\text{width}^2 \times \text{length}]/2$) were determined using a dissecting microscope. Colonic tissue adjacent to tumors were fixed in buffered 4% formalin and embedded in paraffin. Non-tumoral colonic mucosa was frozen at -80°C for protein and RNA extraction. For the experiment employing rectal administration of the CNF1 protein, *Apc*^{Min/+} mice were inoculated as previously described²³ and then received an intrarectal injection of 10 μg of CNF1 protein or PBS under anesthesia with isoflurane. The injections were administered 2 days post-infection and then once per week for 7 weeks. CNF1 was purified as described previously.⁵¹

Ethical statement

Animal protocols were in accordance with French and European Economic Community guidelines

(86–60, EEC) for the care of laboratory animals. The study was approved by the French Ministry of Higher Education Research and Innovation (Aparis no. 22798).

Biological samples were collected from CRC patients (ethical approval for human study no. DC-2017–2972). All patients underwent surgery for resectable CRC in the Digestive and Hepatobiliary Surgery Department of the University Hospital of Clermont-Ferrand.³⁸ All patients were adult volunteers and signed an informed consent form before inclusion in the study. The exclusion criteria included clinically suspected hereditary CRC based on the revised Bethesda criteria, neoadjuvant chemotherapy receipt, a history of previous colonic resection, emergency surgery, and use of antibiotics within 4 weeks before the surgery.

RT² Profiler PCR Array

Eighty-four genes or biological pathways involved in cellular senescence were analyzed using the RT² Profiler PCR Array Mouse Cellular Senescence system (PAMM-050Z; Qiagen, Maryland, USA). According to the manufacturer's protocol, real-time PCR was performed using RT² Profiler PCR Arrays in combination with RT² SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Maryland, USA) using a mixture of cDNA obtained from three colonic biopsy samples of mice colonized by 21F8 (Clb+Cnf+) or its mutant Clb+Cnf-. The expression levels of the 84 genes were quantified relative to the values obtained for housekeeping genes (*ACTB*, *B2M* and *GAPDH*). Data analyses were performed using web-based analysis software (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). In addition, we further performed a similar RT² Profiler PCR assay using custom plates including four genes (*RBL1*, *MAP2K6*, *CREG1* and *TERF2*) in addition to the housekeeping genes (*ACTB*, *B2M* and *GAPDH*). The analysis included five or six mice in each group (mice with intrarectal injection of CNF1 protein or PBS or mice colonized by Clb+Cnf+, Clb+Cnf-, Clb-Cnf+ or Clb-Cnf-).

Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for all statistical calculations. Data comparisons with multiple

groups were analyzed by one-way Kruskal – Wallis test. Data comparisons between 2 groups were performed with unpaired t test or a Mann-Whitney U-test depending on the normality test. Spearman's correlation analysis was performed for correlation testing. A value of $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Acknowledgments

We thank Laurent Guillouard for providing technical assistance. We thank the CLIC (Clermont-Ferrand Imagerie Confocale, Université Clermont Auvergne) with help from Caroline Vachias and Anipath histology technical platforms (GReD, Université Clermont Auvergne) for assistance with tissue preparation and immunohistochemical staining. We also thank Christelle Blavignac from the CICS for cell cycle analysis.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie; Inserm (UMR 1071); INRAe (USC-1382), Région Auvergne Rhône Alpes; the French government's IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25 project of the University of Clermont Auvergne); and the National Program "Microbiote" Inserm."

ORCID

Julien Delmas  <http://orcid.org/0000-0002-9579-0660>

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available in Mendeley data at <http://doi.org/10.17632/zwck97zw4k.1>.

References

1. Global Cancer Observatory [Internet]. 2021 [accessed 2021 Jan 4]. <https://gco.iarc.fr/>
2. Zhang L, Shay JW. Multiple roles of APC and its therapeutic implications in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2017;109(8). doi:10.1093/jnci/djw332.
3. Gagnière J. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *WJG*. 2016;22(2):501. doi:10.3748/wjg.v22.i2.501.

4. Schmidt TSB, Raes J, Bork P. The human gut microbiome: from association to modulation. *Cell*. 2018;172(6):1198–1215. doi:10.1016/j.cell.2018.02.044.
5. Boleij A, Hechenbleikner EM, Goodwin AC, Badani R, Stein EM, Lazarev MG, Ellis B, Carroll KC, Albesiano E, Wick EC, et al. The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis*. 2015;60(2):208–215. doi:10.1093/cid/ciu787.
6. Feng Q, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, Zhang D, Xia H, Xu X, Jie Z, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Nat Commun*. 2015;6(1):6528. doi:10.1038/ncomms7528.
7. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe*. 2013;14(2):207–215. doi:10.1016/j.chom.2013.07.007.
8. Lucas C, Barnich N, Nguyen NH. Microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1310. doi:10.3390/ijms18061310.
9. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(6):954–964. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.004.
10. 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;33:1231–1238. doi:10.1093/carcin/bgs137.
11. Wong SH, Zhao L, Zhang X, Nakatsu G, Han J, Xu W, Xiao X, Kwong TNY, Tsoi H, WKK W, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice. *Gastroenterology*. 2017;153(6):1621–1633.e6. doi:10.1053/j.gastro.2017.08.022.
12. Orberg ET, Fan H, Tam AJ, Dejea CM, Destefano-Shields CE, Wu S, Chung L, Finard BB, Wu X, Fathi P, et al. The myeloid immune signature of enterotoxigenic bacteroides fragilis-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunol*. 2017;10(2):421–433. doi:10.1038/mi.2016.53.
13. Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, Oswald E, Nougayrède J-P, Galan JE, Sansonetti PJ. The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *mBio*. 2018;9(2):e02393–17. doi:10.1128/mBio.02393-17.
14. Nougayrède J-P, Taieb F, De Rycke J, Oswald E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol*. 2005;13(3):103–110. doi:10.1016/j.tim.2005.01.002.
15. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, Raisch J, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Pezet D, Bonnet R, Battista JR. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One*. 2013;8(2):e56964. doi:10.1371/journal.pone.0056964.
16. 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(6103):120–123. doi:10.1126/science.1224820.
17. Cuevas-Ramos G, Petit CR, 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(25):11537–11542. doi:10.1073/pnas.1001261107.
18. Iftekhar A, Berger H, Bouznad N, Heuberger J, Boccellato F, Dobrindt U, Hermeking H, Sigal M, Meyer TF. Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing *E. coli* transform primary colon epithelial cells. *Nat Commun*. 2021;12(1):1003. doi:10.1038/s41467-021-21162-y.
19. 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(5788):848–851. doi:10.1126/science.1127059.
20. 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;580:269–273.
21. Dziubańska-Kusibab PJ, Berger H, Battistini F, Bouwman BAM, Iftekhar A, Katainen R, Cajuso T, Crosetto N, Orozco M, Aaltonen LA, et al. Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat Med*. 2020;26(7):1063–1069. doi:10.1038/s41591-020-0908-2.
22. 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(12):1932–1942. doi:10.1136/gutjnl-2013-305257.
23. 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(4):859–867. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1343.
24. 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(10):2620–2632. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3472.
25. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, Taniguchi K, Yu G-Y,

- Osterreicher CH, Hung KE, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254–258. doi:10.1038/nature11465.
26. Cooper HS, Everley L, Chang W, Pfeiffer G, Lee B, Murthy S, Clapper ML. The role of mutant Apc in the development of dysplasia and cancer in the mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1407–1416. doi:10.1053/gast.2001.29609.
 27. Dennis KL, Wang Y, Blatner NR, Wang S, Saadalla A, Trudeau E, Roers A, Weaver CT, Lee JJ, Gilbert JA, et al. Adenomatous polyps are driven by microbe-instigated focal inflammation and are controlled by IL-10-producing T cells. *Cancer Res*. 2013;73(19):5905–5913. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1511.
 28. Huang EH, Park JC, Appelman H, Weinberg AD, Banerjee M, Logsdon CD, Schmidt AM. Induction of inflammatory bowel disease accelerates adenoma formation in Min +/- mice. *Surgery*. 2006;139(6):782–788. doi:10.1016/j.surg.2005.11.005.
 29. Ho M, Mettouchi A, Wilson BA, Lemichez E. CNF1-like deamidase domains: common Lego bricks among cancer-promoting immunomodulatory bacterial virulence factors. *Pathog Dis*. 2018;76(5):fty045. doi:10.1093/femspd/fty045.
 30. Boyer L, Travaglione S, Falzano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, Fiorentini C, Fabbri A. Rac GTPase instructs nuclear factor- κ B activation by conveying the SCF complex and I κ B α to the ruffling membranes. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):1124–1133. doi:10.1091/mbc.e03-05-0301.
 31. Falzano L, Quaranta MG, Travaglione S, Filippini P, Fabbri A, Viora M, Donelli G, Fiorentini C. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect Immun*. 2003;71(7):4178–4181. doi:10.1128/IAI.71.7.4178-4181.2003.
 32. Munro P, Flatau G, Doye A, Boyer L, Oregioni O, Mege J-L, Landraud L, Lemichez E. Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35849–35857. doi:10.1074/jbc.M401580200.
 33. Fiorentini C, Fabbri A, Matarrese P, Falzano L, Boquet P, Malorni W. Hinderance of apoptosis and phagocytic behaviour induced by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: two related activities in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(2):341–346. doi:10.1006/bbrc.1997.7723.
 34. Fiorentini C, Matarrese P, Straface E, Falzano L, Donelli G, Boquet P, Malorni W. Rho-dependent cell spreading activated by *E. coli* cytotoxic necrotizing factor 1 hinders apoptosis in epithelial cells. *Cell Death Differ*. 1998;5(11):921–929. doi:10.1038/sj.cdd.4400422.
 35. Falzano L, Filippini P, Travaglione S, Miraglia AG, Fabbri A, Fiorentini C. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G2/M transition in uroepithelial cells. *Infect Immun*. 2006;74(7):3765–3772. doi:10.1128/IAI.01413-05.
 36. Fabbri A, Travaglione S, Rosadi F, Ballan G, Maroccia Z, Giambenedetti M, Guidotti M, Ødum N, Krejsgaard T, Fiorentini C. The *Escherichia coli* protein toxin cytotoxic necrotizing factor 1 induces epithelial mesenchymal transition. *Cell Microbiol*. 2020;22(2):e13138. doi:10.1111/cmi.13138.
 37. Guo Y, Zhang Z, Wei H, Wang J, Lv J, Zhang K, Keller ET, Yao Z, Wang Q. Cytotoxic necrotizing factor 1 promotes prostate cancer progression through activating the Cdc42-PAK1 axis. *J Pathol*. 2017;243(2):208–219. doi:10.1002/path.4940.
 38. 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*. 2017;131(6):471–485. doi:10.1042/CS20160876.
 39. 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(5):1373–1388. doi:10.1053/j.gastro.2019.12.026.
 40. Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis TC. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. 2010;24(4):679–686. doi:10.1038/leu.2010.6.
 41. Feng Y, Mannion A, Madden CM, Swennes AG, Townes C, Byrd C, Marini RP, Fox JG. Cytotoxic *Escherichia coli* strains encoding colibactin and cytotoxic necrotizing factor (CNF) colonize laboratory macaques. *Gut Pathog [Internet]*. 2017;9(1). 10.1186/s13099-017-0220-y
 42. Fiorentini C, Arancia G, Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Donelli G. Cytoskeletal changes induced in HEp-2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of *Escherichia coli*. *Toxicon*. 1988;26(11):1047–1056. doi:10.1016/0041-0101(88)90203-6.
 43. Bouquet F, Muller C, Salles B. The loss of γ H2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle*. 2006;5(10):1116–1122. doi:10.4161/cc.5.10.2799.
 44. Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède J-P, Sherman M. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLOS ONE*. 2013;8(10):17. doi:10.1371/journal.pone.0077157.
 45. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of

- senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798–1806. doi:10.1038/nprot.2009.191.
46. Zhang Z, Aung KM, Uhlin BE, Wai SN. Reversible senescence of human colon cancer cells after blockage of mitosis/cytokinesis caused by the CNF1 cyclomodulin from *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2018;8(1):17780. doi:10.1038/s41598-018-36036-5.
 47. Moolmuang B, Tainsky MA. CREG1 enhances p16INK4a-induced cellular senescence. *Cell Cycle.* 2011;10(3):518–530. doi:10.4161/cc.10.3.14756.
 48. Fabbri A, Travaglione S, Ballan G, Loizzo S, Fiorentini C. The cytotoxic necrotizing factor 1 from *E. coli*: a janus toxin playing with cancer regulators. *Toxins (Basel).* 2013;5(8):1462–1474. doi:10.3390/toxins5081462.
 49. Desvaux M, Dalmaso G, Beyrouthy R, Barnich N, Delmas J, Bonnet R. Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2020;11:2065. doi:10.3389/fmicb.2020.02065.
 50. Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clément R, Buisson-Touati C, Flatau G, Gagnoux L, Piechaczyk M, Boquet P, Lemichez E. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell.* 2002;111(4):553–564. doi:10.1016/S0092-8674(02)01132-7.
 51. Falzano L, Fiorentini C, Donneli G, Michel E, Kocks C, Cossart P, Cabanié L, Oswald E, Boquet P. Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor type 1. *Mol Microbiol.* 1993;9(6):1247–1254. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01254.x.
 52. Fabbri A, Travaglione S, Fiorentini C. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, *in Vivo* applications and therapeutic potential. *Toxins (Basel).* 2010;2(2):283–296. doi:10.3390/toxins2020282.
 53. Vannini E, Panighini A, Cerri C, Fabbri A, Lisi S, Pracucci E, Benedetto N, Vannozzi R, Fiorentini C, Caleo M, et al. The bacterial protein toxin, cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) provides long-term survival in a murine glioma model. *Bmc Cancer.* 2014;14(1):449. doi:10.1186/1471-2407-14-449.
 54. Colarusso A, Maroccia Z, Parrilli E, Germinario EAP, Fortuna A, Loizzo S, Ricceri L, Tutino ML, Fiorentini C, Fabbri A. Cnf1 variants endowed with the ability to cross the blood–brain barrier: a new potential therapeutic strategy for glioblastoma. *Toxins (Basel).* 2020;12(5):E291. doi:10.3390/toxins12050291.
 55. Vannini E, Mori E, Tantillo E, Schmidt G, Caleo M, Costa M. CTX-CNF1 recombinant protein selectively targets glioma Cells in vivo. *Toxins (Basel).* 2021;13(3):194. doi:10.3390/toxins13030194.
 56. Dalmaso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes.* 2014;5(5):675–680. doi:10.4161/19490976.2014.969989.
 57. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(11):759–771. doi:10.1038/nrc3611.
 58. 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(9):2060. doi:10.3390/cancers13092060.
 59. Dominguez C, McCampbell KK, David JM, Palena C. Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer. *JCI Insight [Internet].* 2021 Jan 18;2(21). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752275/>.
 60. Alfaro C, Teijeira A, Oñate C, Pérez G, Sanmamed MF, Andueza MP, Alignani D, Labiano S, Azpilikueta A, Rodriguez-Paulete A, et al. Tumor-produced interleukin-8 attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clin Cancer Res.* 2016;22(15):3924–3936. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2463.
 61. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial–mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res.* 2011;71(15):5296–5306. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0156.
 62. Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the epithelial–mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol.* 2012;8(6):713–722. doi:10.2217/fon.12.59.
 63. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, Wicinski J, Cabaud O, Charafe-Jauffret E, Birnbaum D, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest.* 2010;120(2):485–497. doi:10.1172/JCI39397.
 64. Dominguez C, McCampbell KK, David JM, Palena C. Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer. *JCI Insight.* 2017;2(21):e94296. doi:10.1172/jci.insight.94296.
 65. Najdaghi S, Razi S, Rezaei N. An overview of the role of interleukin-8 in colorectal cancer. *Cytokine.* 2020;135:155205. doi:10.1016/j.cyto.2020.155205.
 66. Rippere-Lampe KE, O'Brien AD, Conran R, Lockman HA, Barbieri JT. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor Type 1 (cnf1) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2001;69(6):3954–3964. doi:10.1128/IAI.69.6.3954-3964.2001.

67. Loizzo S, Rimondini R, Travaglione S, Fabbri A, Guidotti M, Ferri A, Campana G, Fiorentini C, Ginsberg SD. CNF1 increases brain energy level, counteracts neuroinflammatory markers and rescues cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(5):e65898. doi:10.1371/journal.pone.0065898.
68. The Society of Cells – Cancer and control of cell proliferation. C. Sonnenschein and A. M. Soto. Bios Scientific, Oxford, 1999. No. of pages: 154. Price: £18.95. ISBN: 1 85996 276 9 (US Publisher: SpringerVerlag, New York. Price: US \$34.95. ISBN 0 387 91583 4.). *J Pathol*. 2000; 190:518–9. No. of pages: 154. Price: £18.95. ISBN: 1 85996 276 9 (US Publisher: SpringerVerlag, New York. Price: US \$34.95. ISBN 0 387 91583 4.). *J Pathol*. 2000; 190:5189. No. of pages: 154. Price: £18.95. ISBN: 1 85996 276 9 (US Publisher: SpringerVerlag, New York. Price: US \$34.95. ISBN 0 387 91583 4.). *J Pathol*. 2000; 190:5189
69. Visvikis O, Boyer L, Torrino S, Doye A, Lemonnier M, Lorès P, Rolando M, Flatau G, Mettouchi A, Bouvard D, et al. *Escherichia coli* producing CNF1 toxin hijacks tollip to trigger Rac1-dependent cell invasion. *Traffic*. 2011;12(5):579–590. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01174.x.
70. Magalhaes YT, Farias JO, Silva LE, Forti FL. GTPases, genome, actin: a hidden story in DNA damage response and repair mechanisms. *DNA Repair (Amst)*. 2021;100:103070. doi:10.1016/j.dnarep.2021.103070.
71. Huelsenbeck SC, Roggenkamp D, May M, Huelsenbeck J, Brakebusch C, Rottner K, Ladwein M, Just I, Fritz G, Schmidt G, et al. Expression and cytoprotective activity of the small GTPase RhoB induced by the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(8):1767–1775. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.020.
72. Ju JA, Gilkes DM. RhoB: team oncogene or team tumor suppressor? *Genes (Basel)*. 2018;9:67. doi:10.3390/genes9020067.
73. Liu A-X, Rane N, Liu J-P, Prendergast GC. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21(20):6906–6912. doi:10.1128/MCB.21.20.6906-6912.2001.
74. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti SM. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem*. 2000;275(24):17974–17978. doi:10.1074/jbc.C000145200.
75. Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, Bonnet R. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2122–2129. doi:10.1128/JCM.02365-09.
76. Fabian NJ, Mannion AJ, Feng Y, Madden CM, Fox JG. Intestinal colonization of genotoxic *Escherichia coli* strains encoding colibactin and cytotoxic necrotizing factor in small mammal pets. *Vet Microbiol*. 2020;240:108506. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108506.
77. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Micro*. 2010;8(3):207–217. doi:10.1038/nrmicro2298.
78. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(12):6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297.
79. Chaverocche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(22):97e–97. doi:10.1093/nar/28.22.e97.

Supplementary figures

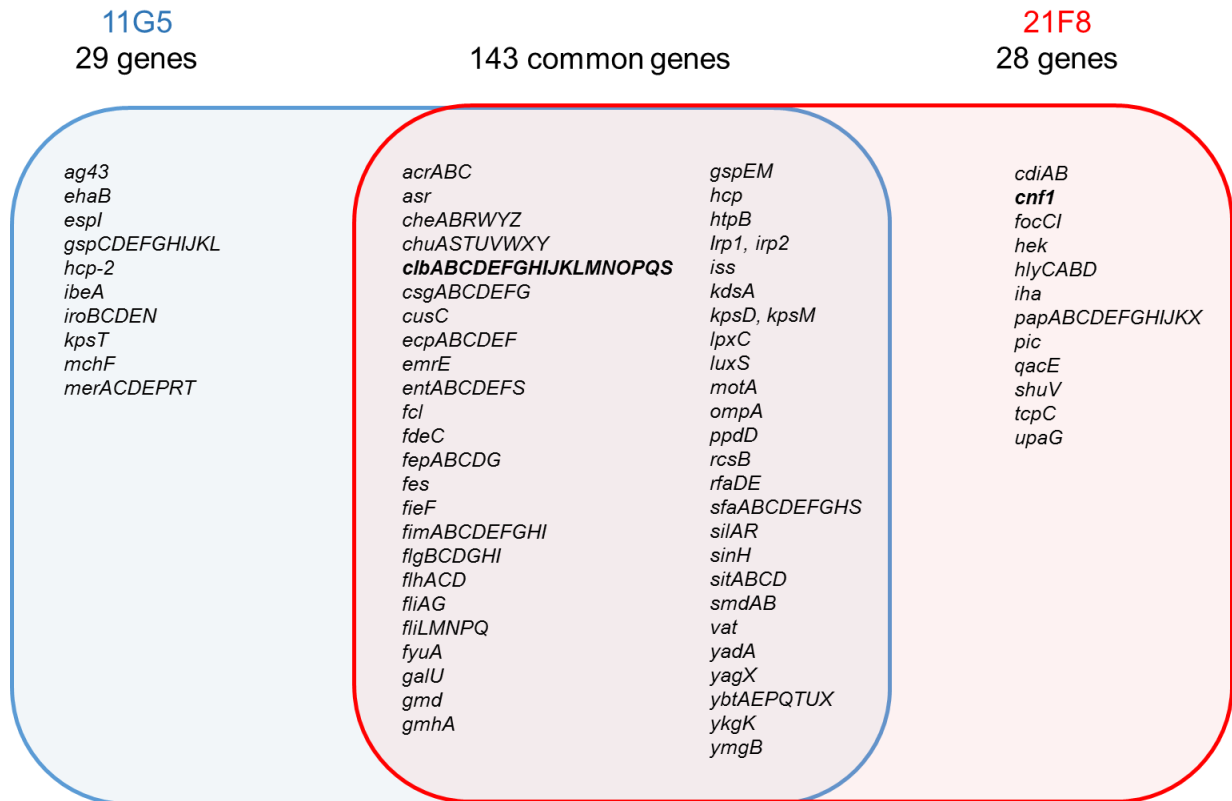


Figure S1: Virulomes of the 11G5 and 21F8 strains extracted from whole genome sequences.

The virulome was analysed with VirulenceFinder 2.0 (Joensen *et al.*, 2014). Diagrams indicate the overlapping genes between the 11G5 and 21F8 strains. The red line indicates the virulence genes of 21F8, and the blue line indicates the virulence genes of 11G5.

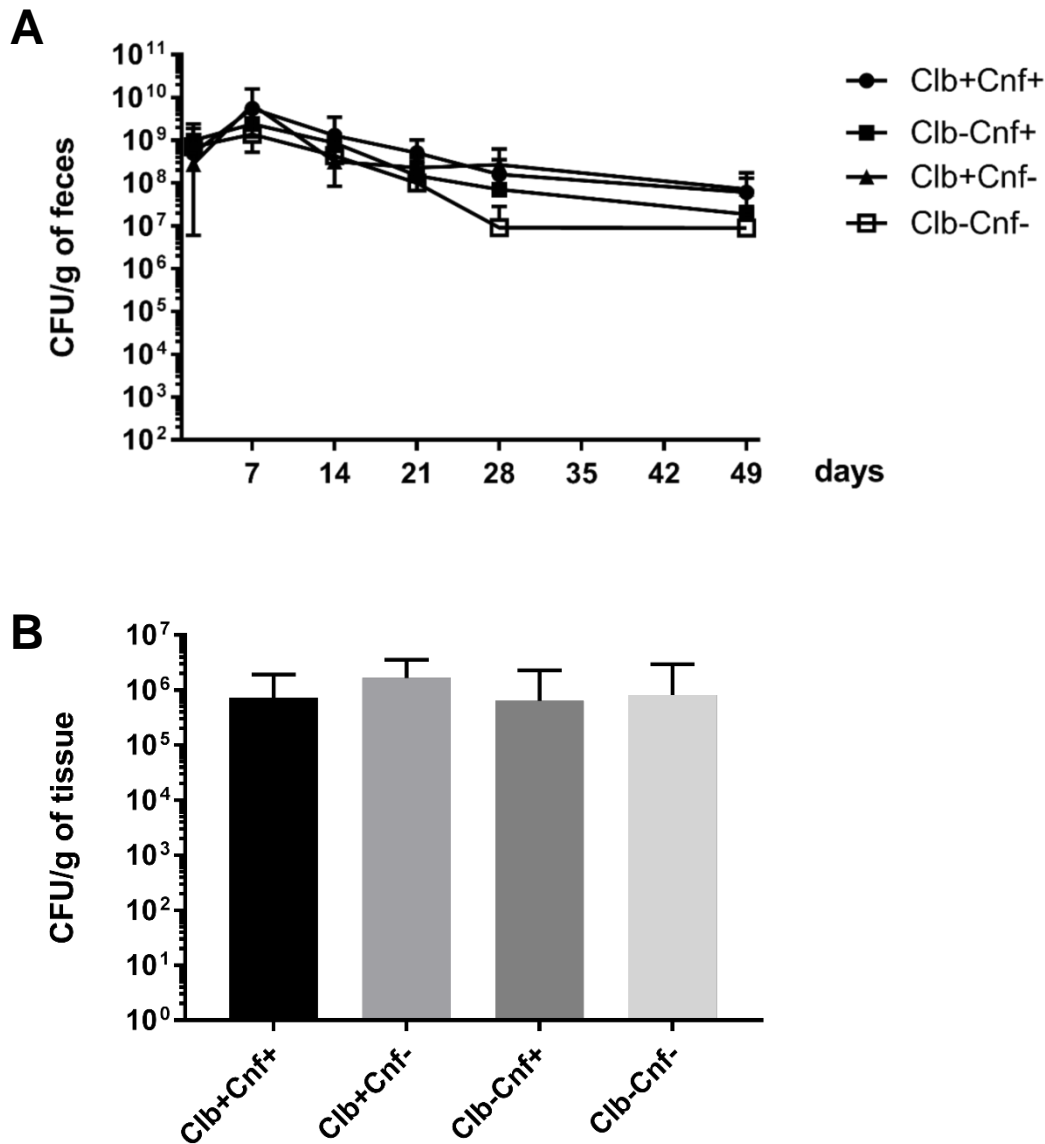


Figure S2: No difference in colonization of $Apc^{Min/+}$ mice between the wild-type and mutant strains. $Apc^{Min/+}$ mice were treated with streptomycin for 3 days and then received water for 24 hours. Mice were orally gavaged with wild-type 21F8 (Clb+Cnf+) or 21F8 isogenic mutants: 21F8 $\Delta CnfI$ (Clb+Cnf-), 21F8 $\Delta clbQ$ (Clb-Cnf+) or 21F8 $\Delta clbQ\Delta CnfI$ bacteria (Clb-Cnf-). Mice were killed 50 days post-infection. (A) Bacterial colonization in the stools of mice from 2 to 49 days post-infection. (B) *E. coli* 21F8 or 21F8 isogenic mutant colonization associated with nontumoral colonic tissue assessed at 50 days post-infection. Colonization data are presented as the means \pm standard deviations. (A-B) are representative of 2 independent experiments.

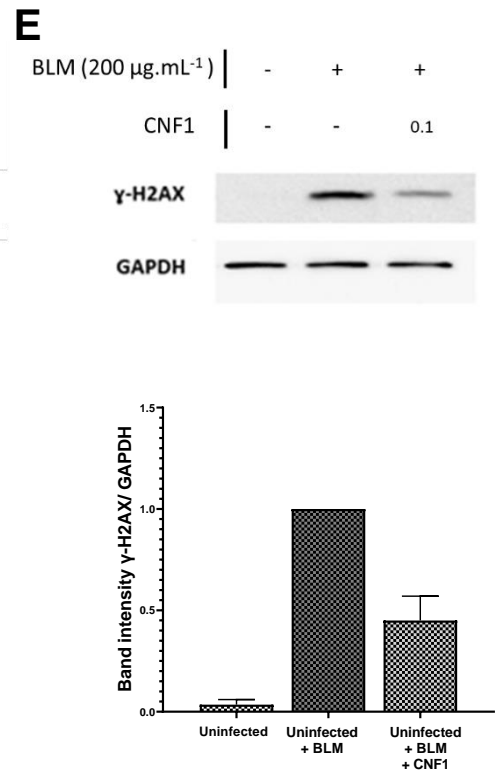
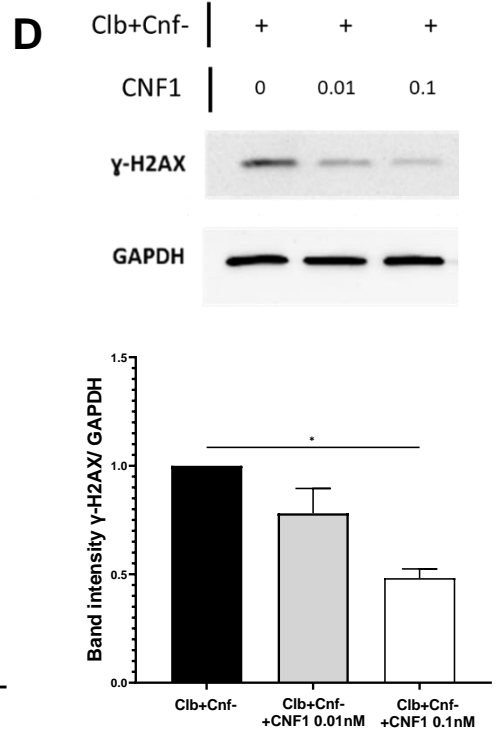
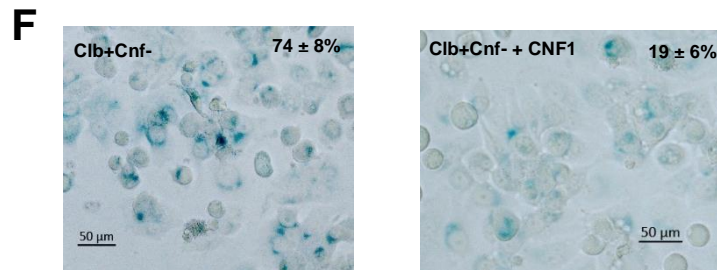
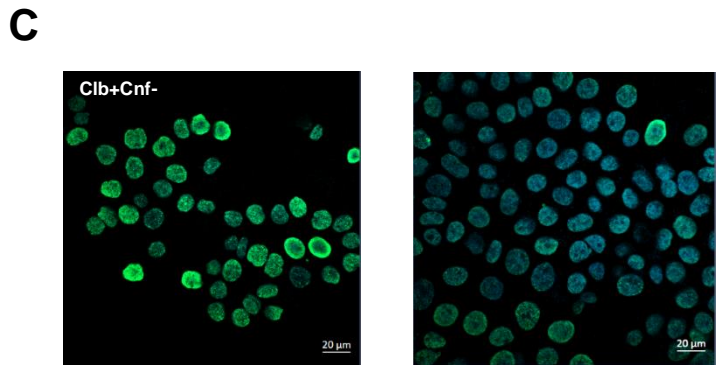
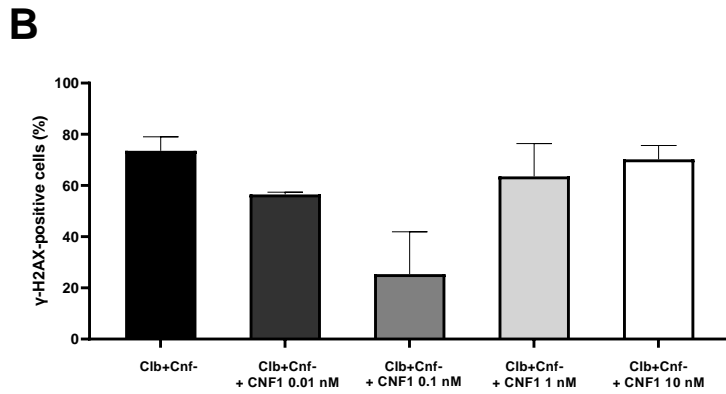
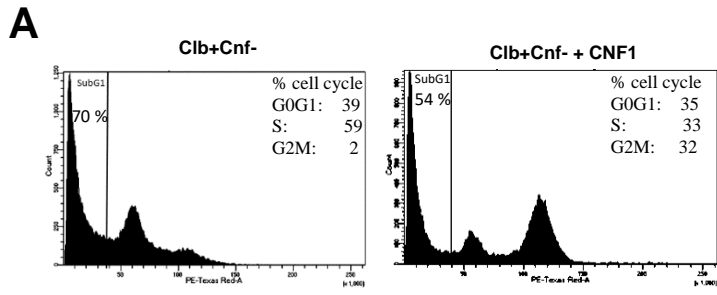


Figure S3: CNF1 can modulate the toxic effect of CoPEC. HT-29 cells were infected with Clb+Cnf- and incubated with the CNF1 toxin for 3.5 h. (A) Cell cycle distribution were observed 72 h after infection of HT-29 cells incubated with 0.1 nM CNF. (B) γ H2AX-positive cells were assessed 24 h after infection of HT-29 cells incubated with different concentration of CNF1 (0.01 to 10 nM); means and standard error of the mean of results from at least two independent experiments are shown. (C) Representative images of γ H2AX immunostaining in HT-29 cells infected for 3.5 h incubated or not with CNF1 (0.1 nM). (D-E) Immunoblot analysis of cell lysates extracted 24 h post infection. GAPDH was used as a loading control for cell lysates. Signal intensities of bands were measured using ImageLab software. γ H2AX signals were corrected to account for any variation in loading using GAPDH signal intensity. (D) Experimental signal normalized to the “Clb+Cnf-” condition was set to 1 for each experiment. Data represents means \pm SEMs corresponding to two experiments with two replicates. (E) HT-29 cells were incubated with bleomycin (BLM) at 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with or without CNF1 (0.1 nM). Experimental signal normalized to the “BLM-treated” condition was set to 1 for each of the two experiments performed. (F) Cellular senescent were detected by β -galactosidase staining at pH 6 three days after infection of HT-29 cells incubated or not with CNF1 (0.1 nM).

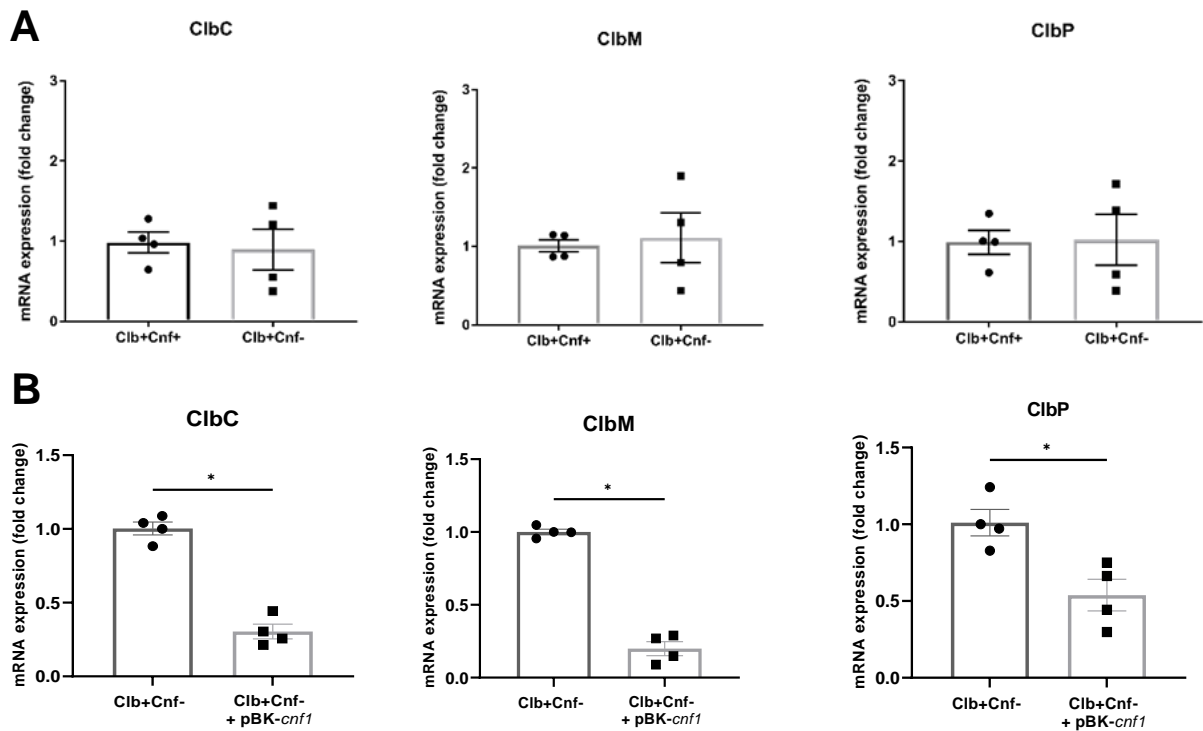


Figure S4: Deletion of *cnf1* gene does not significantly impacted transcription of colibactin genes in the 21F8 strain.

mRNA expression of *clbC*, *clbM* and *clbP* genes involved in colibactin production was analysed from bacteria having infected the HT-29 cells. RT-qPCR were performed for 21F8 Δ *hlyA* (Clb+Cnf+) and 21F8 Δ *hlyA* Δ *cnf* (Clb+Cnf-) (A) or 21F8 Δ *hlyA* Δ *cnf* (Clb+Cnf-) and 21F8 Δ *hlyA* Δ *cnf* + pBK-*cnf1* (B). The data points represent values for each replicate. Data are presented as means \pm SEMs. Statistical comparisons were carried out by Mann-Whitney U-test ($*P < .05$).

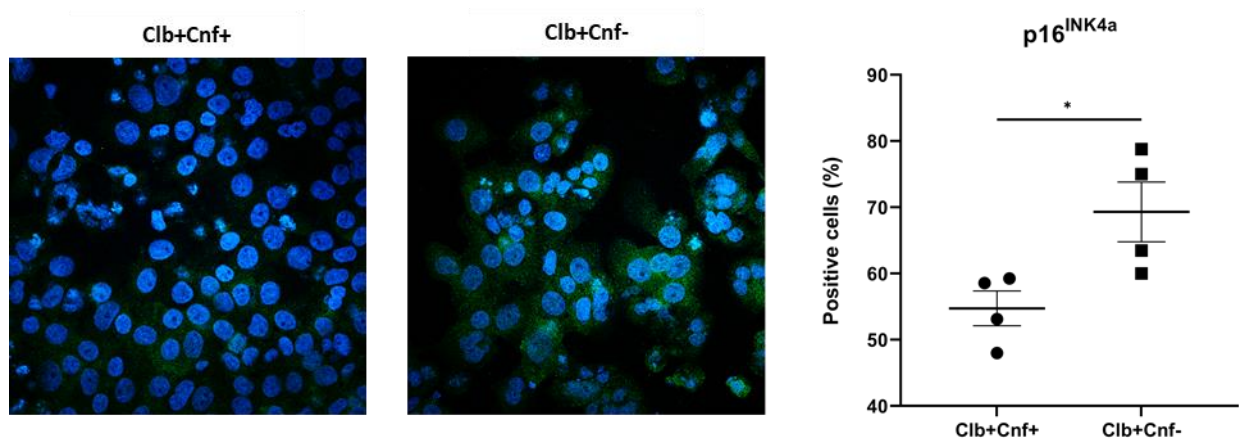


Figure S5: CNF1 decreases the CDKN2A/p16^{INK4a}-senescence marker following CoPEC infection. HT-29 cells were infected with the indicated *E. coli* 21F8 (Clb+Cnf+) or isogenic mutants (Clb+Cnf-) for 3.5 h. At day 3 post-infection, anti p16^{INK4a} immunofluorescence was performed to evaluate the percentage of p16^{INK4a}-expressing cells were counted with QuPath software. Data are representative of two independent experiments with two replicates. Values represent means \pm SEMs. The significance of differences was assessed by Kruskal–Wallis tests (NS, not significant; * $P < .05$; **** $P \leq .0001$).

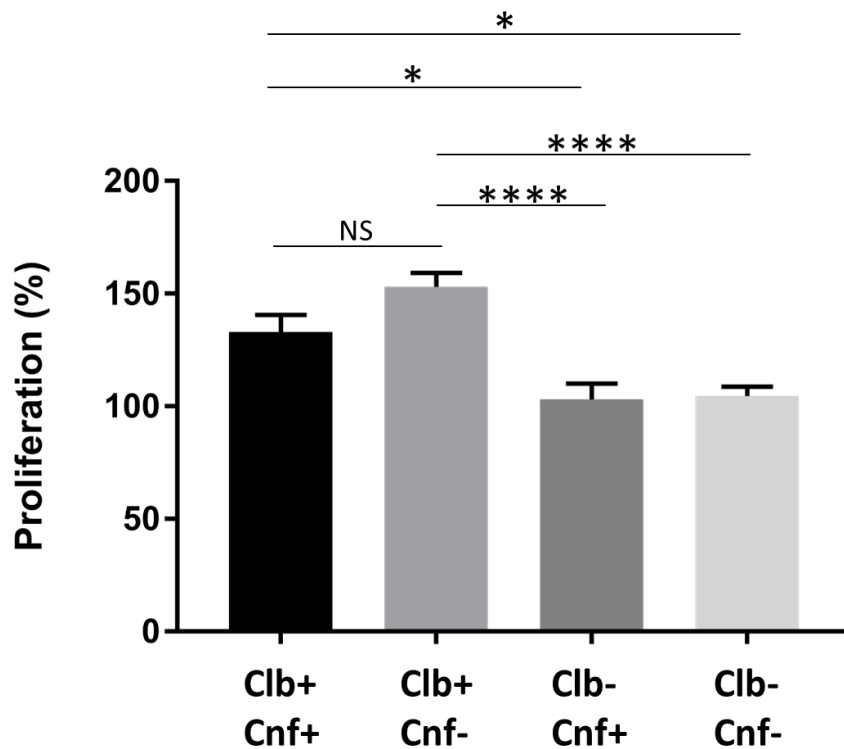


Figure S6: The *Cnf1* gene is not involved in the pro-proliferative effect of conditioned medium derived from CoPEC-infected cells. HT-29 cells were infected with the indicated *E. coli* 21F8 (wild-type or isogenic mutants) for 3.5 h. At day 5 post-infection, uninfected HT-29 cells were cultured in the presence of conditioned medium derived from *E. coli*-infected HT-29 cells. Cellular growth was assessed by MTT assay after 24 h of incubation. HT-29 cells cultured for 24 h in the presence of serum-free medium were set as 100% proliferation for normalization. Values represent means \pm SEMs. The significance of differences was assessed by Kruskal–Wallis tests (NS, not significant; * $P < .05$; **** $P \leq .0001$).

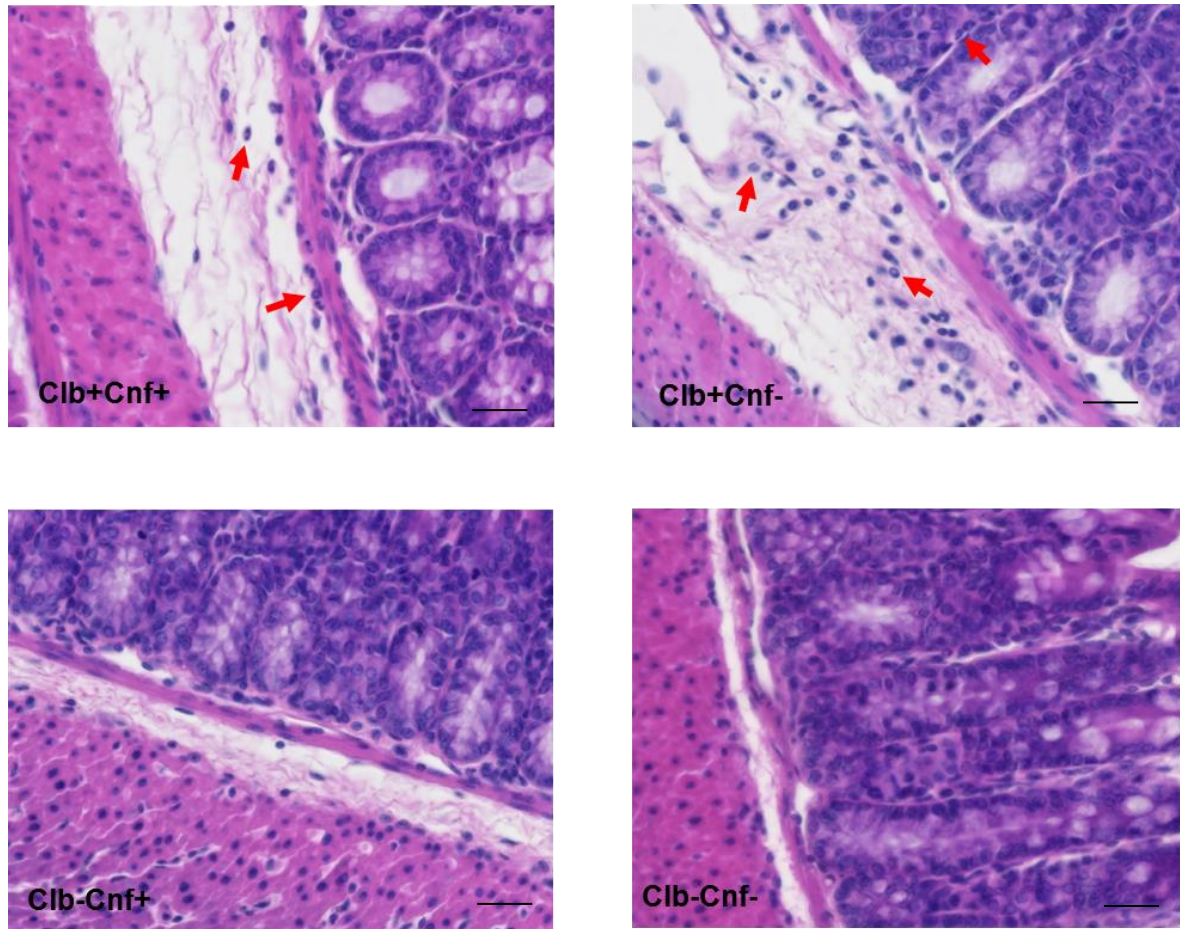


Figure S7: The *cnf1* gene limits CoPEC-induced colonic inflammation in *Apc^{Min/+}* mice. Representative images of H&E-stained colonic sections showing submucosal oedema and inflammatory cell infiltration (scale bars: 20 μ m). The arrowheads show polymorphonuclear neutrophils (with ring-shaped nuclei).

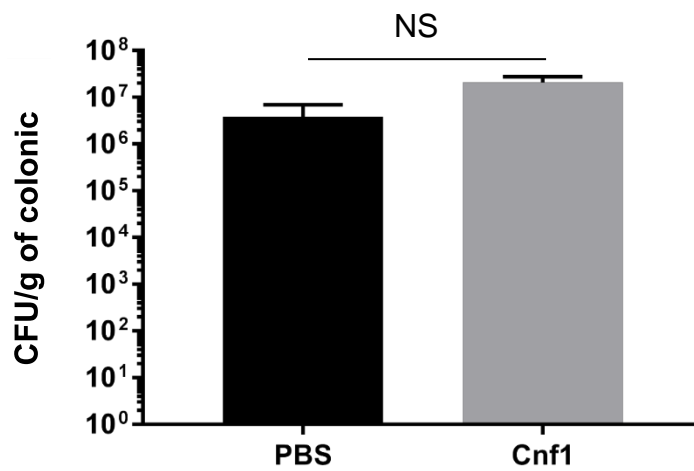


Figure S8: Administration of CNF1 protein does not modify colonic colonization of Clb+Cnf- *E. coli* in *Apc^{Min/+}* mice. *Apc^{Min/+}* mice received an intrarectal injection of CNF1 protein or PBS two days post-infection with the Clb+Cnf- strain and then every 7 days. The number of *E. coli* 21F8 associated with nontumoral colonic tissue at 50 days post-infection was determined. Colonization data are presented as means \pm SEMs. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test (NS, not significant).

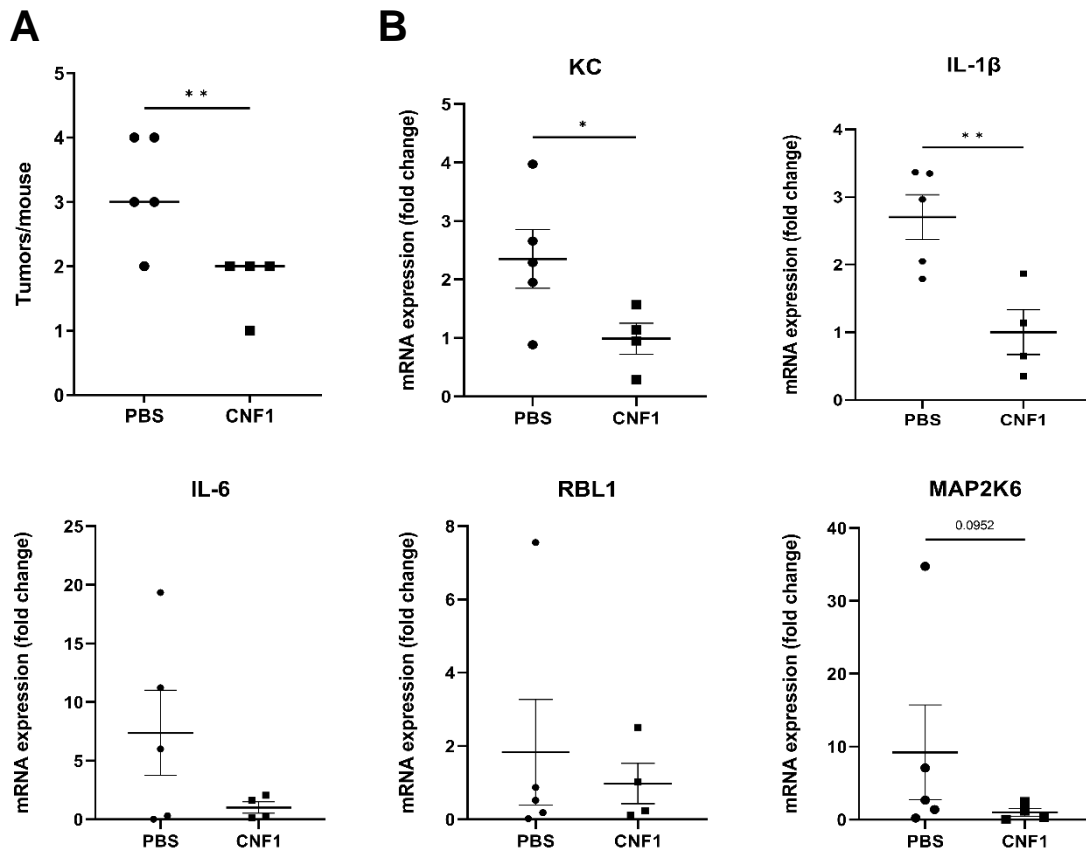


Figure S9: In 11G5-infected *Apc*^{Min/+} mice, intrarectal administration of CNF1 impedes the development of colon tumours and decreases inflammation. *Apc*^{Min/+} mice were orally administered 10⁹ colony-forming units of the *E. coli* 11G5. Two days post-infection, the mice received an intrarectal injection of 10 μ g of CNF1 protein or PBS every 7 days for 7 weeks. The data points represent values for each individual mouse. (A) The number of colorectal tumours by mouse was determined using a dissecting microscope. The bars indicate median values. (B) *Kc*, *Il-6*, *Il-1 β* , *Rbl1* and *Map2k6* mRNA relative levels in the colonic mucosa were quantified by qRT-PCR. Data are presented as means \pm SEMs. Statistical comparisons were carried out by Mann-Whitney U-test.

Table S1. Primers and plasmids used in this study

Primer	Sequence (5'→ 3')	Use
MIClbQaadA 7	F: CATTAAATCATCAAATTAACGAATTCTATTACACAACA AGGAGTGGGACGCACTGGCATTTAATAACGCGTC R: GATGATGGAACAGCCATATCTATTGCTCCTTGTATAGT TACACAAC TATTTTTAATCACTTTACTTTTATC	construction of isogenic mutant
MIcnf1	F: TCATATCCTGTTTCAATGTCCACTTCATAGTAGATGCC GCTCAGAGAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG R: ATGGGTAACCAATGGCAACAAAATATCTTCTTGAGTA CAATGAGTTGGTCATATGAATATCCTCCTTAG	construction of isogenic mutant
TufA	F: GACATGGTGATGACGAAGA R: GCTCTGGTCCGGAATGTA	detection of <i>tufA</i>
CibQ	F: GACGGCATCCACCATCGTAA R: TAAATGGCGTAGCGTGCTGT	detection of <i>clbQ</i>
CNF1	F: CGCAGTTTCAGTGATGGTGTA R: TCGCCAAACCAGGTATAGCA	detection of <i>cnf-1</i>
clbP	F: ACCGTGACTGATGTAAGGGC R: GGCGATGAGTAACAGTTGGC	qRT-PCR amplification
clbM	F: ATTTACCAACGCCCCCAACA R: TTATTCGCTGCTGACCGTGT	qRT-PCR amplification
clbC	F: TGGCAATAAGCGGGTGGAAAT R: TACTTACGCACAGTGGCTGG	qRT-PCR amplification
36B4	F: TCCAGGCTTTGGGCATCA R: CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA	qRT-PCR amplification
IL-6	F: TGAACAACGATGATGCACCTTGCAGA R: GGAGAGCATTGGAAATTGGGGTAGG	qRT-PCR amplification
TNF- α	F: CTTCCAGAACTCCAGGCGGTGC R: CGGGGCAGCCTTGTCCCTTGA	qRT-PCR amplification
KC	F: TGCACCCAAACCGAAGTCAT R: TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC	qRT-PCR amplification
IL1- β	F: TGCTGGTGTGTGACGTTCCC R: TGCTGGTGTGTGACGTTCCC	qRT-PCR amplification
CNF-pBK	F: CGAGAAGCTTTTTGATCAAAATTTTTTGAAAATACCTTC R: CGACACTAGTGGATCATGGGTAACCAATGGCAAC	Clonage of <i>cnf</i> gene in pBK-CMV plasmid
PlasmidRe v	F: GATCCACTAGTGTGACCTGCAG R: TCAAAAAGCTTCTCGAGAGTACTTC	Clonage of <i>cnf</i> gene in pBK-CMV plasmid

Plasmid	Description	Use	Reference
pKOBEG	pBAD cloning vector harboring a λ phage <i>red$\gamma$$\beta$$\alpha$</i> operon; chloramphenicol resistant.	Deletion of <i>hlyA</i> , <i>cnf1</i> and <i>clbQ</i> gene.	Chaverroche <i>et al</i> (2000)
pCPC20	<i>FLP</i> ⁺ , λ <i>cI857</i> ⁺ , λ , ρ_R Rep ^{ts} , AP ^R , Cm ^R	Excision of kanamycin cassette.	Cherepanov and Wackernagel (1995)
pBK-CMV- <i>cnf</i>	pBK-CMV plasmid with <i>cnf1</i> -gene, kanamycin resistant.	Clonage of <i>cnf1</i> gene.	This study

Table S2. Strains used in this study

<i>In vivo</i> strains	Description	Strain reference
11G5	Clinical isolated from tumours of CRC patients harbouring <i>pks</i> island (colibactin production).	Clb+Cnf+
21F8	Clinical isolated from tumours of CRC patients harbouring <i>pks</i> island (colibactin production) and <i>cnf1</i> (CNF1 production).	Clb+Cnf+
21F8 Δ <i>cnf</i>	21F8 strains deleted for <i>cnf1</i> gene.	Clb+Cnf-
21F8 Δ <i>clbQ</i>	21F8 strains deleted for <i>clbQ</i> gene.	Clb-Cnf+
21F8 Δ <i>cnf</i> Δ <i>clbQ</i>	21F8 strains deleted for <i>cnf1</i> gene and <i>clbQ</i> gene.	Clb-Cnf-
<i>In vitro</i> strains	Description	Strain reference
21F8 Δ <i>hlyA</i>	21F8 strains deleted for <i>hemolysin A</i> gene.	Clb+Cnf+
21F8 Δ <i>hlyA</i> Δ <i>cnf</i>	21F8 strains deleted for <i>hemolysin A</i> gene and <i>cnf1</i> gene.	Clb+Cnf-
21F8 Δ <i>hlyA</i> Δ <i>clbQ</i>	21F8 strains deleted for <i>hemolysin A</i> gene and <i>clbQ</i> gene.	Clb-Cnf+
21F8 Δ <i>hlyA</i> Δ <i>cnf</i> Δ <i>clbQ</i>	21F8 strains deleted for <i>cnf1</i> gene, <i>hemolysin A</i> gene and <i>clbQ</i> gene.	Clb-Cnf-

Supplementary results

The *E. coli* 21F8 *cnf1*-deleted strain was associated with alteration of the overall microbiota community structure in *Apc*^{Min/+} mice.

As both bacterial inoculation and intestinal tumour burden can affect the gut microbiota, we investigated the faecal microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing using Illumina technology in *Apc*^{Min/+} mice 50 days post-infection with wild-type 21F8 *E. coli* or its mutants. Differences in the α -diversity of the microbial communities were assessed using Shannon, InvSimpson, richness and evenness indices. There was a significant decrease in all α -diversity index values (Supplemental Fig. S10) in mice inoculated with the protumorigenic Clb+Cnf- mutant (pairwise Kruskal–Wallis tests, FDR-adjusted P value: 0.015) compared to the values in the other mice. In contrast, there was no significant difference in the α -diversity indices between the other groups (pairwise Kruskal–Wallis tests, FDR-adjusted P values: 0.130 to 0.754)

Principal coordinate analysis and hierarchical clustering based on Bray–Curtis, Jaccard and weighted UniFrac distances were performed to uncover differences in the structure of the gut microbiota of the various groups (i.e., relative abundance) at the genus taxonomic level (Supplemental Fig. S11). In agreement with the α -diversity data, the results revealed two major clusters. The first cluster included mice inoculated with protumorigenic *E. coli* Clb+Cnf-, and the second cluster, which consisted of partially overlapping subclusters, included mice inoculated with the three other *E. coli* mutants. These differences in gut microbiota composition were supported by Adonis tests, which revealed a significant difference between these groups of mice (P value of the overall test: <0.001; FDR-adjusted P values of pairwise tests: 0.014 to 0.016), with no difference in microbiota composition dispersion within the groups (Permdisp2 test, P values 0.575 to 0.748).

Networks connecting co-occurring bacteria and mutually exclusive bacteria (Supplemental Fig. S12) revealed two distinct subnetworks according to the *E. coli* genotype inoculated into mice. A well-structured subnetwork with numerous co-occurring links connecting *Bacteroides*, *Blautia*, *Anaerotruncus*, *Erysipelotrichaceae* genus, *Robinsoniella*, *Flavonifractor* and *Escherichia* was specifically associated with the mice inoculated with the protumorigenic *E. coli* Clb+Cnf-. This bacterial community shared dense negative correlations with the network associated with the mice inoculated with the other mutants, which were linked by a sparse network. These results were consistent with the significant changes in taxon abundance observed among the murine groups (Supplementary Fig. S13). Thus, dysbiosis was not observed in the mice inoculated with the wild-type strain 21F8, which produces both CNF1 and colibactin, whereas it was detected in the mice colonized by the protumorigenic *cnfI*-deleted isogenic mutant. Mice infected with 21F8 Clb+Cnf- strain also developed the most tumours, which was associated with an increase in the abundance of *Bacteroides* and *Anaerotruncus*, genera previously linked with CRC (Chen *et al.*, 2012b; Feng *et al.*, 2015). A previous metagenome-wide association study on stools from patients with advanced adenoma and CRC showed overrepresentation of *Bacteroides* and *E. coli* compared to those in stools from healthy subjects (Feng *et al.*, 2015). Based on a comparison of intestinal lumen samples collected from CRC patients and healthy individuals, previous studies have proposed that *Anaerotruncus* is a key phylotype that contributes to differences in the composition of the intestinal lumen microbiota in CRC patients and healthy individuals (Lau *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012b). The congruence between microbiota composition changes and tumorigenesis mediated by colibactin-producing *E. coli* supports the hypothesis of a role for these bacteria in CRC and emphasizes the importance of the *Apc*^{Min/+} murine model in investigations of the microbiota in the context of CRC.

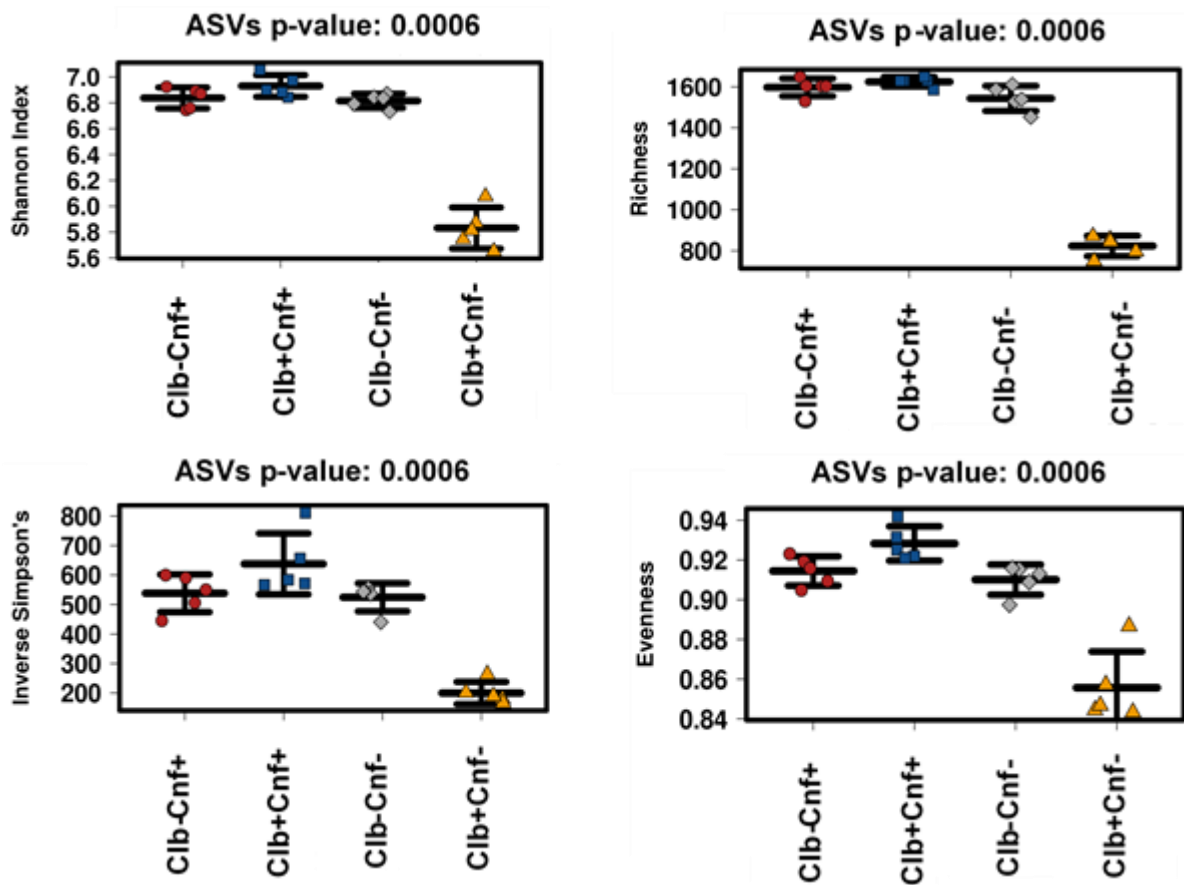


Figure S10: *E. coli* Clb+Cnf- triggered a decrease in α -diversity compared to that with the isogenic *E. coli* Clb+Cnf+, Clb-Cnf+ and Clb-Cnf-. *Apc^{Min/+}* mice were orally gavaged with 10^9 colony-forming units of isogenic *E. coli* 21F8 Clb+Cnf+, Clb+Cnf-, Clb-Cnf+ or Clb-Cnf-. Genomic DNA was extracted from faeces collected at 50 days post-infection, and the microbiota composition was inferred from 16S rRNA sequencing. The Shannon, Simpson richness and evenness α -diversity indices were calculated from counts of the 16S rRNA ASVs. The significance of differences was assessed by Kruskal–Wallis tests.

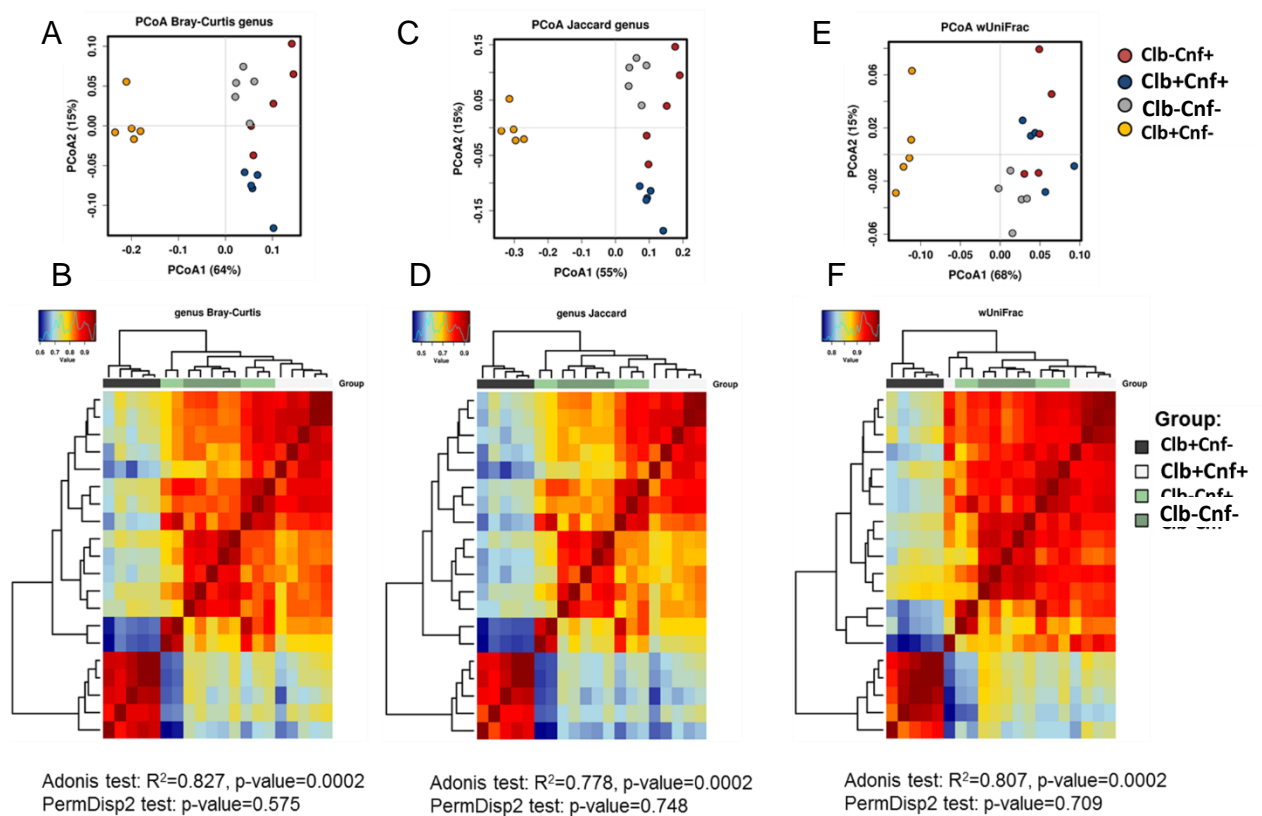


Figure S11: The microbiota composition in mice inoculated with *E. coli* Clb+Cnf- significantly differs from that in mice infected with the wild-type strain (Clb+Cnf+) or with the isogenic mutants (Clb-Cnf+ and Clb-Cnf-). *Apc*^{Min/+} mice were orally gavaged with 10⁹ CFU of *E. coli* 21F8 Clb+Cnf+, Clb+Cnf-, Clb-Cnf+ or Clb-Cnf-. Genomic DNA was extracted from faeces collected at 50 days post-infection, and the microbiota composition was inferred from 16S rRNA sequencing. The dissimilarity in microbiota composition was assessed at the genus taxonomic level using (A, B) Bray–Curtis, (C, D) Jaccard and (E, F) weighted UniFrac indices. They are reported via principal coordinates analysis (PCoA) plots (panels A, C and E) and heatmaps including unsupervised hierarchical clustering (panels B, D and F), showing two major clusters supported by Adonis and PermDisp2 statistical tests.

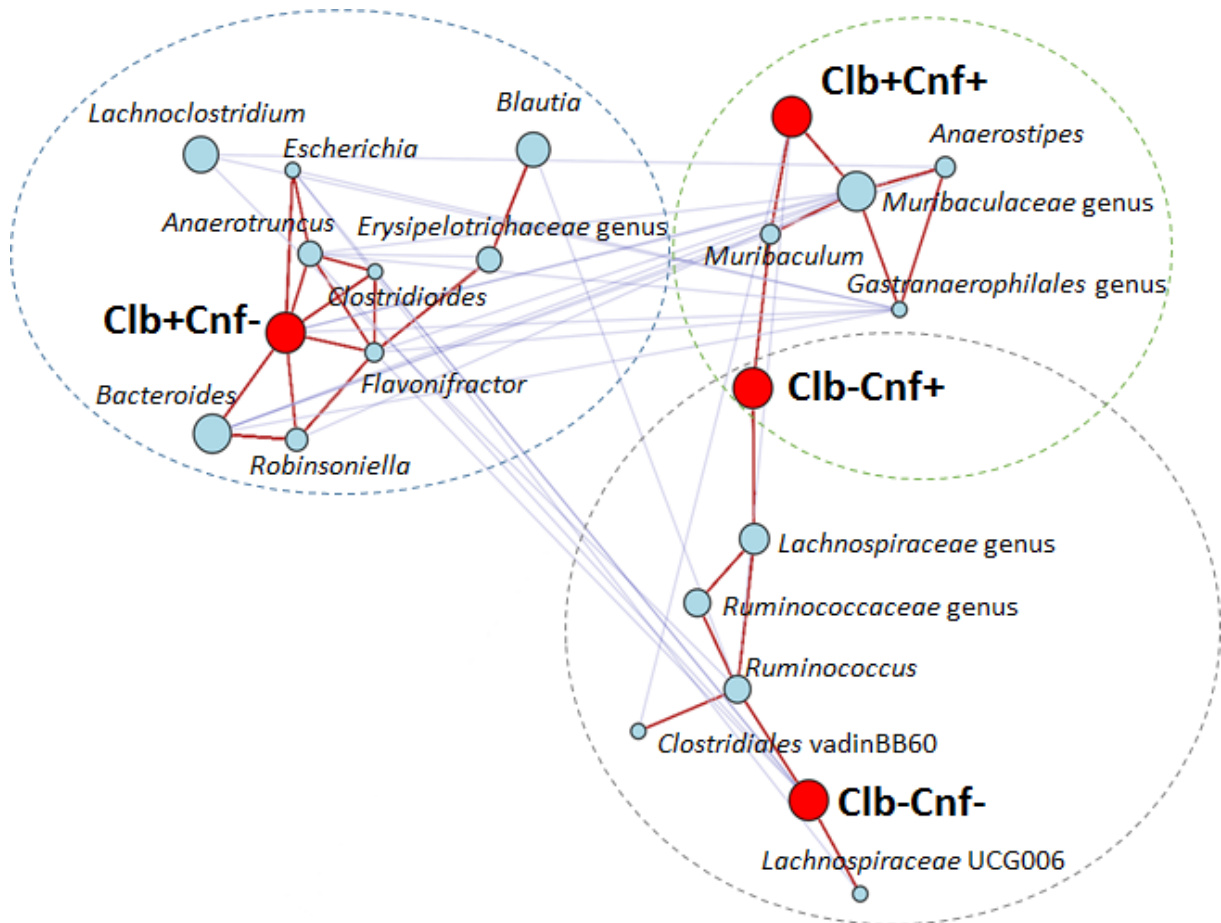


Figure S12: Network analysis of co-occurring bacteria and mutually exclusive bacteria in the intestinal microbiota of mice inoculated with the *E. coli* 21F8 wild-type strain (Clb+Cnf+) or inoculated with the isogenic mutants Clb-Cnf+, Clb-Cnf-, and Clb+Cnf-. Taxa and *E. coli* genotypes are represented as blue and red nodes, respectively; taxon abundance is represented as node size; and edges represent positive (dark red) and negative (blue) significant associations assessed by the ensemble method. Significant associations with *E. coli* genotypes are indicated, as well as clusters of co-occurring bacteria (dashed circles). The significance of associations was assessed by 1000-fold permutation tests, and the P values were adjusted for multiple testing by the FDR procedure.

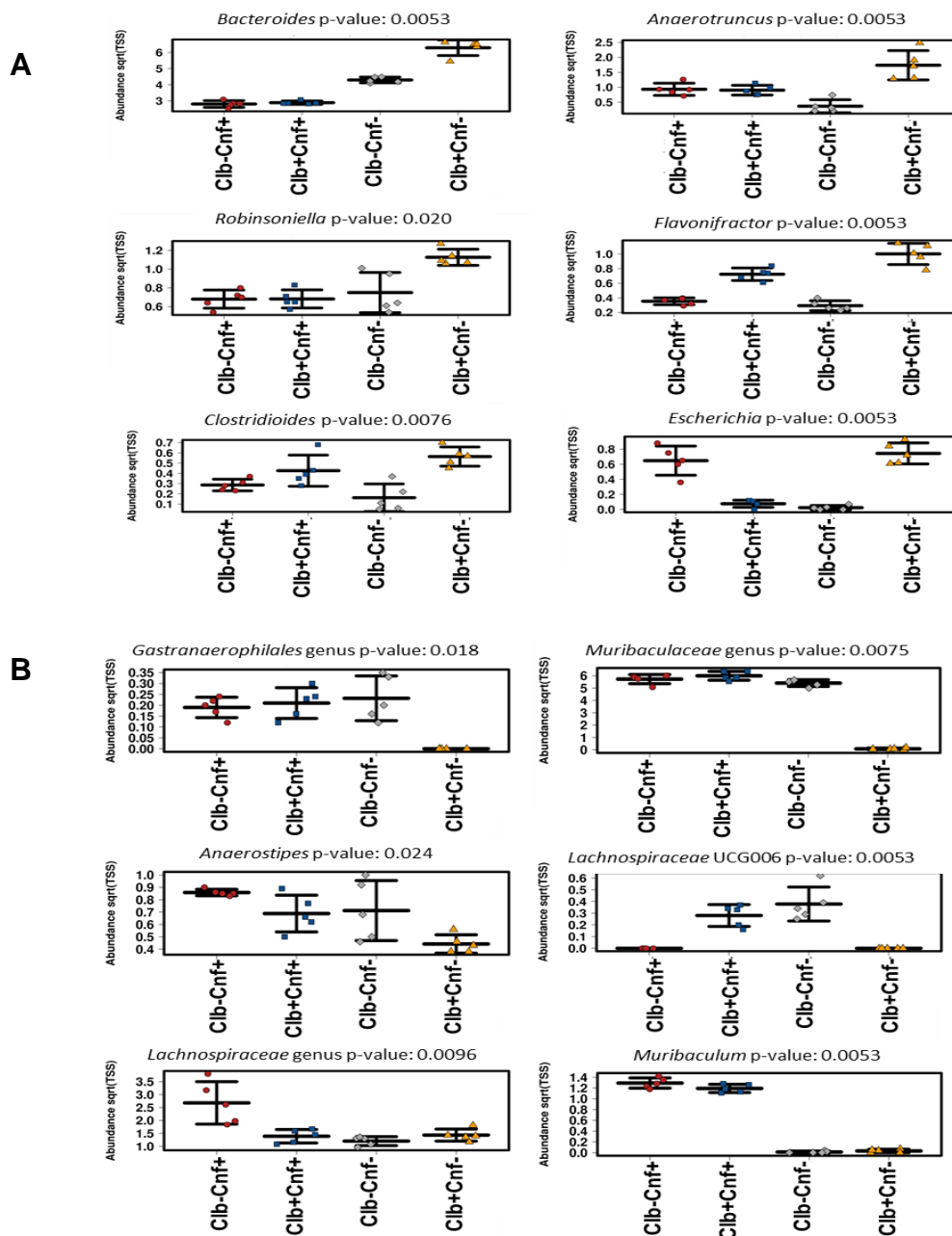


Figure S13: Taxon abundance (spare root) in the intestinal microbiota of *Apc*^{Min/+} mice inoculated with the *E. coli* 21F8 wild-type strain (Clb+Cnf+) or inoculated with the isogenic mutants Clb+Cnf-, Clb-Cnf+, and Clb-Cnf-. Taxa over- and underrepresented in the microbiota of mice inoculated with *E. coli* Clb+Cnf- compared to those in mice inoculated with other *E. coli* mutants are reported in panels A and B, respectively. The abundances were compared by Kruskal–Wallis tests, and P values were adjusted for multiple testing by the FDR procedure.

Supplementary Materials and Methods

Construction of isogenic mutants

E. coli 21F8 was transformed with pKOBEG, a plasmid encoding the Red proteins that protect linear DNA from degradation in bacteria. The plasmid was maintained in bacteria at 30°C with 25 mg/L chloramphenicol and induced by 1 mM L-arabinose. The Flp recognition target-flanked cassette harbouring the kanamycin resistance cassette was generated by PCR from *E. coli* BW25141 with specific primers (Table S1) and high-fidelity Platinum Taq polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The PCR products were electroporated in *E. coli* 21F8 cells previously washed with ice-cold water. The resulting 21F8 Δ *cnf* and 21F8 Δ *clbQ* isogenic mutants (Km^R) were selected on Mueller-Hinton agar containing 50 mg/L kanamycin. The replacement of genes by the kanamycin resistance cassette was confirmed by PCR (Table S1). The kanamycin resistance cassette was then removed from 21F8 Δ *cnf*, 21F8 Δ *clbQ* and 21F8 Δ *hlyA* Δ *cnf* bacteria by transient expression of the Flp recombinase from the pCP20 plasmid (Table S1), creating the sensitive-kanamycin strains used in the study. The 21F8 Δ *cnf* Δ *clbQ* and 21F8 Δ *hlyA* Δ *cnf* Δ *clbQ* mutant was generated with the same method (Table S2). Genes deletions and absence of additional genetic modifications were checked by analysis of whole genome sequences (2 × 15-base pairs as paired-end reads with mean sequencing depth >50x) generated by the Illumina MiSeq system (Illumina) from genomic DNA extracted with a DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen) and libraries prepared with a Nextera XT Kit (Illumina).

Cell culture

Human colon adenocarcinoma HT-29 cells were cultured following ATCC guidelines. HT-29 cells (~75% confluent) were infected with *E. coli* at a multiplicity of infection (MOI) of 100 for 3.5 h. After infection cells were washed using PBS and culture with regular medium

supplemented with gentamycin (200 µg/mL). For cell cycle analysis (72h post-infection), cells were trypsinized for 5 min. Then cells were centrifuged for 7 min at 600 rpm and washed with PBS before fixation with 95°C ethanol at -20°C for a minimum of 30 min. After centrifugation, fixed pellet of cells was resuspended in PBS containing 15 µg/mL propidium iodide (Sigma) and 100 µg/mL RNase (ThermoFisher). Immediately after staining the cells were analysed on a LSR II Flow Cytometer ® (BD Biosciences) with at least 30,000 events and cell distribution in cell cycle phases was analyzed by FlowLogic software (Miltenyi Biotec). For γ -H2AX (24h post-infection) and p16^{INK4a} immunofluorescence staining (72 post-infection), cells were fixed with PBS with 4% formaldehyde for 10 min, permeabilized in PBS with 0.25% Triton X-100 for 10 min, and blocked with PBS with 5% foetal calf serum for 30 min. Anti- γ H2AX primary antibodies (Cell Signaling, 9718) were diluted 1/400 or anti-p16^{INK4a} antibody (1/500, ab54210, Abcam) and incubated overnight at 4°C. The secondary antibody used was Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit (ThermoFisher, A-21206) and A488-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 715-545-150) with a 1/400 dilution. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, B2261). Coverslips were mounted using Eukitt mounting solution (Dutscher, 045799). Images were taken using a Zeiss LSM 980 microscope. To evaluate the percentage of γ H2AX- and p16^{INK4a}-expressing cells, approximately 100 to 200 cells for individual wells were counted with QuPath software (Bankhead *et al.*, 2017). Thresholds for optimal detection of DAPI and 488- p16^{INK4a} signal were fixed at 10 and for 488- γ H2AX, a 30-threshlod was accepted. CNF1 was purified thanks to LeMichez teams (Institute Pasteur) as described previously⁶. HT-29 infection was processed as previously with 21F8(Clb+Cnf-) strain and incubated with CNF1 purified protein (from 0.01 to 10 nM) and/or bleomycin sulfate (Sigma-Aldrich, B8416) at 200 µg/mL. The specific cytopathic effect of toxins on cultured epithelial HT-29 cells was observed with Giemsa staining. Briefly, cells were washed with PBS and fixed for 7 min at room temperature

using methanol. Cells were incubated 25 min with 10-fold-diluted-Giemsa solution, washed using distilled water and observed under Zeiss LSM 980 microscope.

Senescence-associated β -galactosidase staining (SA β -gal), MTT assay and senescence-associated secretory phenotype (SASP) analysis.

HT-29 cells were infected as described above and grown in complete cell culture medium supplemented with 200 μ g/mL gentamycin for 3 days, and SA β -gal staining was performed using a Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The cells were counted, and the proportion of positive (blue) cells was expressed as a percentage of the total. In order to assess pro-proliferative effect of SASP, at 5 days post-infection, cells were washed twice with PBS and further incubated for 24h in serum-free culture medium. Conditioned media derived from uninfected and infected HT-29 cells were used to culture uninfected cells for 24 h. For proliferation analysis, cells were processed with an MTT Cell Viability Assay Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

An antibody array chip (Human Cytokine Array C5, RayBiotech Life) was used to evaluate 72 secreted inflammatory factors in the conditioned medium according to the manufacturer's instructions. The conditioned medium used was a mix of 3 replicates of cell culture infected by Clb+Cnf+ or Clb+Cnf- strains. The intensity of the signal on the array membranes was quantified by densitometry using ImageJ software and normalized to positive control signals.

Western blot

Proteins of treated HT-29 cells were extracted with the addition of 300 μ L/well of lysis buffer (20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, NP-40 1% (v/v), 0.3%, 10 nM Sodium fluoride

(NaF), 20 mM Na_3VO_4 , cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche; pH 7.4). Briefly cells were washed with 1X cold PBS, 60 μl of lysis buffer was added and cells were collected with cell scrapers (Fisher), centrifuged at 10,000 rcf for 5 min at 4°C. Before to conserve supernatants to -20°C, proteins was quantified with Bio-Rad DC protein Assay. Proteins were loaded in a 15% SDS-PAGE gel for electrophoresis migration and were transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot® Transfer System, Bio-Rad). After 1 h of incubation in blocking buffer (PBS-Tween 20 0.05%, 5% BSA), membranes were blotted with the primary antibodies anti- γH2AX primary antibodies (Cell Signaling, 9718) or anti-GAPDH (1/4000, 2118, Cell Signaling) overnight at 4°C. Membranes were washed 3 times with PBS-Tween 20 0.05% and then incubated with appropriate HRP- conjugated secondary antibodies diluted in blocking buffer (1/10000) for 1 h at room temperature. Membranes were washed 3 times and proteins were detected using ECL substrate (Enhanced ChemiLuminescence, Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad). Bands intensities were quantified using Image Lab software (Bio-Rad).

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)

The amount of IL-8 secreted in the supernatants from cell culture at 24 h post-infection and the amounts of KC, IL-6 and TNF- α released by mouse colonic tissues were determined by ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Colonization of the *Apc*^{Min/+} mouse model and quantification of *E. coli* in stools and of *E. coli* associated with colonic mucosa

Animal protocols were in accordance with French and European Economic Community guidelines (86-60, EEC) for the care of laboratory animals. Female C57BL/6j-

Apc^{Min/+} mice (6-7 weeks of age) were randomized using the standard “= RAND()” function in Microsoft Excel. Same litter mates were housed together in individually ventilated cages with three to five mice per cage. All mice were maintained on a regular diurnal lighting cycle (12:12 light:dark) with ad libitum access to food and water. Mice were infected with the clinical *E. coli* 11G5 or 21F8 strains or with the isogenic mutants of the 21F8 strain. To reduce the levels of endogenous gut bacteria, we administered streptomycin (2.5 g/L) for 3 days prior to oral inoculation with bacteria ($\sim 1 \times 10^9$ bacteria in PBS). To enhance *E. coli* strain colonization, 3 days after oral inoculation, we administered vancomycin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) for 3 days. We periodically assessed faecal bacterial colonization. Faeces were collected, crushed (Ultra-Turrax, IKA) in PBS and spread on chromID CPS Elite agar (BioMérieux) plates, which allowed the detection of *E. coli*. A random selection of 10 *E. coli*/mouse was analysed by PCR using specific primers located in the *clbQ* gene of the *pks* island and in the *cnf1* gene. Colonic tissues were treated as faeces.

Total RNA extraction, cDNA synthesis and qRT-PCR

Bacterial total RNA was extracted using a Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) and treated with a Turbo DNA-Free Kit (Ambion) to remove any contaminating genomic DNA following the manufacturer’s instructions. DNase-treated RNA samples were purified with RNA Clean and Concentrator-25 (Zymo Research). The RNA quality was assessed by a bioanalyzer, and the RNA concentration was determined using a Qubit 2.0 fluorimeter (Thermo Fisher Scientific). mRNAs were reverse transcribed using a PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) following the manufacturer’s instructions. qRT-PCR was performed using 2 μ l of cDNA SYBR Green Master Mix (BioRad) and 100 nM specific primers (Table S1). The mouse *36B4* gene was used as an endogenous control to normalize the target gene

expression. For analysis, the fold change for the target gene was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method after normalization to the control. For qRT-PCR on bacteria culture, the *E.coli tufA*, *ClbP*, *ClbM*, *ClbC* genes 95 °C for 5 min, and 50 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 40 s, followed by melting curve protocols with +0.5°C/s from 65°C to 95°C. For relative qRT-PCR, each gene expression was normalized to *tufA* using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Histological examination, scoring and immunohistochemical staining

The colons of the animals were prepared as “Swiss rolls” and fixed with Methacarn’s solution for 24h before being embedded in paraffin. The paraffin-embedded colons were cut into 5 µm sections with a microtome, and the colonic sections were stained with haematoxylin and eosin. All tumours were histologically determined to be adenocarcinomas. The histological evaluation of the colonic sections was performed under blinded conditions by an expert pathologist using four easily identifiable pathological criteria: the extent of cellular infiltration (0-5), declining crypt architecture (crypt damage, 0-5), size and relative extent of ulceration (0-3), and absence or presence of oedema (0 and 1, respectively).

For immunohistochemical staining, the sections were deparaffinized in HistoClear® for 30 min, rehydrated in an ethanol gradient (100%, 95%, and 70%: 1 min each) and then incubated for 20 min at 95°C in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH 9). Using an *in situ* hybridization and immunohistochemistry automated InSitu Pro VSi (Intavis), the sections were incubated with blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS) for 1 h at room temperature and then with the anti-p16^{INK4a} antibody (1/500, ab54210, Abcam) or anti-phospho-γH2AX antibody (1/560, #9718, Cell Signaling) overnight at 4 °C. After several washes with PBS, the sections were incubated for 2 h at room temperature with the corresponding biotin-SP-secondary antibody coupled with peroxidase (1/500, Jackson

ImmunoResearch). Development was performed using 3,3'-diaminobenzidine (Clinisciences). The sections were then counterstained with Mayer haematoxylin (Diapath) for 10 sec, rinsed under running water, dehydrated and mounted in Eukitt mounting solution. Microscopic images were acquired using a Zeiss Axioscan Z1 Scanner (Zeiss) and analysed using ZEN 2 software. To evaluate the percentage of γ H2AX- and p16-expressing cells, approximately 20 to 100 crypts were assessed in each specimen.

Whole-genome sequencing

Genomic DNA (gDNA) was used as input for library preparation using the Illumina Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Genome assembly was performed using CLC Genomics Workbench v12 (Qiagen, Les Ulis, France).

Microbiota composition analysis

DNA was extracted from frozen (-80°C within 1 h) mouse faecal samples using the HMS DNA extraction protocol Q as previously described⁷. DNA samples and quality controls (ZymoBIOMICS microbial standards and a negative control) were used for sequencing the V3-V4 variable region of 16S rRNA genes using Illumina technology (2x300 paired-end reads on a MiSeq) according to Klindworth *et al*⁸ and the manufacturer's guidelines. Sequence data were joined with PEAR⁹ and then processed using the current recommended protocol for UPARSE¹⁰ (https://drive5.com/usearch/manual/uparse_pipeline.html, accessed 20th November 2020) with the UNOISE3 algorithm to generate an amplicon sequence variant (ASV) table. Singletons and any ASVs present at $<0.01\%$ relative abundance across all samples were removed before further analyses. Taxonomy assignment was performed with the SILVA database 132 (<https://www.arb-silva.de/>) and SINTAX80 classifier (Edgar, 2018). Subsequent analyses of diversity were performed in R using the Vegan and Phyloseq packages (McMurdie

and Holmes, 2013); R package version 2.5-6, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>] with >10,000 sequences per sample. The data were normalized by total sum scaling and square root transformation as previously described (Paulson *et al.*, 2013). Taxon association networks were determined according to the ensemble method as previously reported (Lima-Mendez *et al.*, 2015). This method assesses the associations by combining Bray–Curtis dissimilarities with Pearson’s correlation and Spearman’s rho. The *P values* were computed from 1000-fold permutation tests and were adjusted for multiple testing by the FDR procedure. Significant associations (FDR-adjusted *P values* <0.05) are presented as edges in the resulting networks.

References

1. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52:1501–10.
2. Feng Q, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, Zhang D, Xia H, Xu X, Jie Z, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Nature Communications* 2015; 6:6528.
3. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One* [Internet] 2012 [cited 2021 Feb 1]; 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386193/>
4. Lau SKP, Woo PCY, Woo GKS, Fung AMY, Ngan AHY, Song Y, Liu C, Summanen P, Finegold SM, Yuen K. Bacteraemia caused by *Anaerotruncus colihominis* and emended description of the species. *J Clin Pathol* 2006; 59:748–52.
5. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017; 7:16878.
6. Falzano L, Fiorentini C, Donneli G, Michel E, Kocks C, Cossart P, Cabanié L, Oswald E, Boquet P. Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor type 1. *Mol Microbiol.* 1993; 6:1247–54.
7. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, Tramontano M, Driessen M, Hercog R, Jung F-E, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol* 2017; 35:1069–76.
8. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:e1.
9. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 2014; 30:614–20.
10. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 2013; 10:996–8.
11. Edgar RC. Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences. *PeerJ* 2018; 6:e4652.
12. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 2013; 8:e61217.
13. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Robust methods for differential abundance analysis in marker gene surveys. *Nat Methods* 2013; 10:1200–2.
14. Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, Decelle J, Colin S, Carcillo F, Chaffron S, Ignacio-Espinosa JC, Roux S, Vincent F, et al. Ocean plankton. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science* 2015; 348:1262073.

Commentaires de la publication n°1 & perspectives

1) Cnf1 contrecarre l'activité cancérogène des CoPEC

Les *E. coli pks+* provoquent des CDB des cellules hôte pouvant conduire à un taux élevé de mutations et favorisant l'émergence de tumeurs intestinales (Dougherty and Jobin, 2021). Cnf1 est pro-inflammatoire (Fabbri and Bracci, 2022). Nous avons donc émis l'hypothèse que la co-production de ces deux toxines pourrait exacerber la tumorigenèse colorectale induite par les CoPEC. Cependant, de manière surprenante, les souris *Apc^{Min/+}* colonisées par la souche 21F8 (CoPEC produisant Cnf1) avaient un nombre de tumeurs coliques significativement inférieur à celui des souris colonisées par la souche CoPEC 11G5 (souche CoPEC de référence du laboratoire non productrice de Cnf1). Pour comprendre ce résultat, des mutants isogéniques de la souche 21F8 ont été générés : délétion de *cnf1* (Clb+Cnf-), de *clbQ* (Clb-Cnf+) et double délétions (Clb-Cnf-). Les souris *Apc^{Min/+}* colonisées par la souche Clb+Cnf- développaient significativement plus de tumeurs que les souris infectées par la souche 21F8 sauvage (Clb+Cnf+), qui n'en développaient pas plus que les souris colonisées par la souche Clb-Cnf-. Aucune différence de colonisation entre les souches n'a pu être mise en évidence. Ainsi, contrairement à ce que nous attendions, Cnf1 semblait limiter la tumorigenèse induite par la colibactine dans notre modèle de souris prédisposées au CCR.

Pour vérifier que l'effet observé n'était pas lié à un défaut de production de la colibactine en présence de *cnf1*, différentes expérimentations ont été réalisées. Nous avons réalisé des qPCR des gènes *ClbC*, *ClbM* et *ClbP* répartis sur l'îlot *pks*. La délétion de *cnf1* n'impactait pas la transcription de ces gènes. Nous avons vérifié que les effets des deux toxines étaient bien retrouvés lors de l'infection de culture cellulaire par la souche 21F8 et par ses mutants. Les cellules épithéliales coliques HT29 ont été infectées par les souches Clb+Cnf+, Clb+Cnf- et par la souche Clb+Cnf- transcomplémentée avec le gène *cnf1* à l'aide du plasmide pBK-CMV (Clb+Cnf- +pBK-*cnf1*). Les phénotypes obtenus (modifications morphologiques des cellules, altération du cycle cellulaire, présence de CDB objectivée par le marquage γ -H2AX) ont démontré que les souches pouvaient produire les toxines, validant que l'effet observé sur la réduction du nombre de tumeurs en présence de Cnf1 n'était probablement pas dû à un défaut de production.

Nous avons injecté par voie rectale la protéine Cnf1 à des souris *Apc^{Min/+}* colonisées par la souche 11G5 sauvage ou 21F8 mutée (Clb+Cnf-). Les souris ayant reçu régulièrement

Cnf1 présentait un nombre de tumeurs significativement réduit par rapport aux souris ayant reçu du PBS à la place, confirmant l'effet de la toxine Cnf1 sur la tumorigénèse induite par les CoPEC.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que Cnf1 entrave l'activité cancérogène des CoPEC dans un modèle murin de prédisposition au cancer colorectal.

2) Cnf1 diminue la génotoxicité induite par les CoPEC

Pour expliquer le rôle préventif de Cnf1 sur la tumorigénèse induite par les CoPEC, une diminution de la génotoxicité des CoPEC en présence de *cnf1* a été recherchée *in vitro* et *in vivo*. Nous n'avons pas observé de différence significative entre le marquage γ -H2AX de la muqueuse colique des souris colonisées par la souche Clb+Cnf+ et celui des souris colonisées par la souche Clb+Cnf-. De même, aucune différence en termes de marquage γ -H2AX n'a été observée en culture cellulaire entre ces deux souches. Toutefois, nous avons constaté une diminution drastique du marqueur γ -H2AX dans les cellules HT29 infectées par la souche transcomplémentée Clb+Cnf- +pBK-*cnf1*. Le gène *cnf1* étant plasmidique dans cette souche et chromosomique dans la souche sauvage, nous avons émis l'hypothèse que la production de Cnf1 était plus importante dans la souche transcomplémentée et, qu'avec une dose plus forte, Cnf1 pourrait agir sur la capacité génotoxique de la bactérie. Ainsi, pour confirmer cette hypothèse, nous avons infecté les cellules HT29 avec la souche Clb+Cnf- en présence de la protéine Cnf1 et nous avons pu observer une diminution du marquage γ -H2AX démontrant que Cnf1 a la capacité de réduire partiellement la génotoxicité de la colibactine. Toutefois, à fortes concentrations, l'effet protecteur de Cnf1 sur les dommages de l'ADN était abrogé.

Même si cela n'a pas été observé dans nos modèles avec la souche sauvage, nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse que les CoPEC puissent, dans certaines conditions, produire plus de Cnf1 et donc limiter la génotoxicité de la colibactine. Cet effet pourrait passer par les systèmes de réparation de l'ADN et être en partie expliqué par l'action directe de Cnf1 sur l'activation des protéines Rho GTPases (Fiorentini *et al.*, 1997). Les protéines Rho et Rac de la famille des RhoGTPases sont activées en réponse à différents agents endommageant l'ADN, notamment les CDB (Magalhaes *et al.*, 2021). Puisque la colibactine provoque des CDB dans les cellules de mammifères, nous pouvons supposer que ces enzymes soient activées dans les cellules infectées. De plus, une forte activité des Rho GTPases est directement corrélée à une

haute capacité de réparation de l'ADN des cellules (Magalhaes *et al.*, 2021). Ainsi, nous pouvons imaginer que Cnf1, en activant de façon constitutive ces enzymes, pourrait faciliter une réparation efficace de l'ADN et ainsi limiter l'effet cancérigène de la colibactine. D'autre part, Huelsenbeck *et al.* ont découvert que l'activation de Rac1 induite par Cnf1 régule positivement l'expression de RhoB dans les lignées de cellules épithéliales, y compris les cellules HT29 (Huelsenbeck *et al.*, 2013). Or, il est intéressant de noter que des études révèlent un rôle suppressif de RhoB dans le cancer grâce à des effets inhibiteurs sur la prolifération cellulaire, la survie, l'invasion et les métastases (Ju and Gilkes, 2018). Ces observations *in vitro* ont été étayées par des découvertes *in vivo* selon lesquelles les cellules déplétées en RhoB formaient des tumeurs plus efficacement que les cellules exprimant RhoB lorsqu'elles étaient injectées par voie intrapéritonéale à des souris (Liu *et al.*, 2001). De plus, des cellules transfectées avec différentes constructions (ajout d'un groupement farnésyl-pyrophosphate ou géranylgeranyl-pyrophosphate) de RhoB et implantées en sous-cutanée à des souris *nude* ne développaient pas de tumeurs contrairement à des souris infectées par des cellules non transfectées (Chen *et al.*, 2000). Toutefois, des études ont également montré que RhoB contribue à la formation de tumeurs et que ses fonctions dans le cancer dépendent fortement du contexte et sont spécifiques du type cellulaire (Mazieres *et al.*, 2004). Plusieurs études suggèrent que RhoB joue deux rôles distincts et opposés dans le contexte de l'initiation de la tumorigenèse par rapport à la progression et à l'agressivité de la tumeur (Ju and Gilkes, 2018). Pour compléter notre travail, il serait donc intéressant de déterminer si l'activité de RhoB est augmentée dans notre modèle d'infection mais également dans d'autres modèles de CCR. Nous pourrions également analyser les effecteurs en aval des voies activées par les RhoGTPases comme par exemple, évaluer le niveau du facteur de transcription p53 ou de la protéine Chk2 (activées suite à la détection de CDB) qui favorisent la réparation des dommages par la voie NHEJ/HR (Magalhaes *et al.*, 2021). Nous pourrions réaliser ces expériences en modèle cellulaire HCT116 qui n'est pas muté pour p53 contrairement aux cellules HT29.

En conclusion, Cnf1 pourrait améliorer la réponse aux dommages de l'ADN induits par l'action de la colibactine. Toutefois, cette action ne semble pas à elle seule expliquer la diminution du nombre de tumeurs observée dans notre modèle de souris *Apc^{Min/+}*.

3) **Cnf1 impacte le phénotype sécrétoire associé à la sénescence cellulaire induite par les CoPEC**

Nous avons observé *in vitro* et *in vivo* que les CoPEC possédant *cnf1* induisent moins de sénescence que le mutant délété de *cnf1*. Nous avons donc analysé le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP), puisque celui-ci a été associé au développement tumoral induit par les CoPEC (Dalmaso *et al.*, 2014; Cougnoux *et al.*, 2014). L'analyse du profil sécrétoire des cellules HT29 a seulement révélé une légère augmentation de la production d'IL-8 lorsque *cnf1* était délété et aucune différence sur la production de facteurs de croissance et sur la prolifération cellulaire n'a été observée. Toutefois, bien que faible *in vitro*, nous avons voulu savoir si cette différence d'IL-8 était retrouvée *in vivo*.

Les niveaux d'ARNm de *Kc*, l'analogue murin de l'IL-8, étaient significativement plus élevés dans les tissus intestinaux de souris colonisées par le mutant *Clb+Cnf-* que ceux colonisés par la souche sauvage ou par les autres mutants (*Clb-Cnf+* et *Clb-Cnf-*). Cette augmentation était associée à celle d'autres cytokines. Le score histologique des souris colonisées par le mutant *Clb+Cnf-* dévoilait une inflammation plus importante, caractérisée essentiellement par une infiltration des cellules inflammatoires. Toutefois, même si une différence était bien notée, cette inflammation restait à bas bruit. Ce résultat peut sembler paradoxal car dans les modèles d'infection aiguë par des UPEC, *Cnf1* a été associé à une activité pro-inflammatoire après avoir été injecté dans la vessie des souris (Rippere-Lampe *et al.*, 2001). Cependant, il a également été montré en modèle murin mimant la maladie d'Alzheimer que *Cnf1* permet de limiter la surexpression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 en cas d'infection chronique (Loizzo *et al.*, 2013).

L'interleukine-8 est une chimiokine qui permet le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes. Elle a été associée à la progression de nombreux cancers dont le CCR (Ginestier *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2016; Dominguez *et al.*, 2017).

Par son action pro-inflammatoire elle pourrait participer à l'inflammation chronique qui est un facteur de risque du cancer (Elinav *et al.*, 2013). De plus, la stimulation de cellules coliques HT29, CaCo2 et HCT116A par de l'IL-8 recombinante accroît la prolifération de ces cellules alors que la neutralisation de l'effet de l'IL-8 endogène permet de réduire la croissance de ces cellules (Brew *et al.*, 2000).

Par son activité chimiokine, elle attire les polynucléaires neutrophiles qui peuvent exercer une action pro-tumorale (Zhang *et al.*, 2016). En effet, les neutrophiles libèrent des

substances microbicides comme les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), la NO-synthase ou des protéases particulièrement destructrices pour les tissus de l'hôte qui pourraient être source d'instabilité génétique (Haqqani *et al.*, 2000). Il a également été montré que l'exposition aux neutrophiles activés augmente le nombre d'erreurs de réplication dans les cellules épithéliales du côlon (Campregher *et al.*, 2008). Dans le modèle murin de CCR associé à la colite (CAC), la déplétion des neutrophiles réduit nettement le nombre et la taille des tumeurs, indiquant le rôle crucial des neutrophiles dans l'initiation et la progression du CAC (Wang *et al.*, 2014).

Pour étudier et valider ou non l'implication de l'IL-8 dans la tumorigenèse des CoPEC, nous pourrions utiliser notre modèle de souris *Apc^{Min/+}* colonisées par la souche Clb+Cnf- et injecter aux souris des anticorps anti-KC (homologue de l'IL-8 humaine). Toutefois, l'impact de la colibactine semble plus global (génétoxicité, stress oxydatif, sénescence) et il a été rapporté par Arthur *et al.* dans le modèle murin AOM/*Il10^{-/-}* mono-colonisé par une souche de CoPEC, que la suppression de l'îlot *pks* diminue la multiplicité tumorale sans altérer l'inflammation intestinale (Arthur *et al.*, 2012). Néanmoins, dans notre modèle murin *Apc^{Min/+}*, nous observons une inflammation à bas bruit lorsque nous infectons les animaux avec les souches CoPEC 21F8 Clb+Cnf- ou 11G5 (Clb+Cnf-). La colibactine pourrait en effet avoir un léger rôle pro-inflammatoire dans ce modèle murin (Lucas *et al.*, 2017; Dougherty *et al.*, 2023).. L'importance du modèle choisi semble donc être à prendre en compte pour étudier l'effet inflammatoire des CoPEC.

Le modèle murin *Apc^{Min/+}* que nous avons choisi est un des modèles de susceptibilité au CCR couramment utilisé notamment dans le contexte d'infection au CoPEC (Li *et al.*, 2012; Lucas *et al.*, 2020). Néanmoins ces souris ont été génétiquement modifiées pour permettre le développement spontané de tumeurs intestinales. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet protecteur de Cnf1 sur la tumorigenèse induite par les CoPEC dans d'autres modèles de CCR où le microenvironnement tumoral peut être différent. Le modèle AOM/DSS qui utilise l'association du DSS pour induire une inflammation associée à l'agent carcinogène AOM pourrait être utilisé (Robertis *et al.*, 2011). Toutefois, l'utilisation du DSS en induisant une forte inflammation pourrait masquer l'effet modulateur de Cnf1 sur l'inflammation à bas bruit et la sénescence induite par les CoPEC.

Pour conclure, nos travaux ont montré que Cnf1 pouvait potentiellement entraver la carcinogenèse colorectale induite par les CoPEC en empêchant l'émergence d'un microenvironnement favorable au développement tumoral.

Travail expérimental de l'axe 2 :

Implication de la mucine-protéase Vat dans la colonisation et la tumorigenèse des CoPEC

Pour que la colibactine agisse, il est nécessaire que les *E. coli* qui la produisent (CoPEC) soient en contact avec la cellule de l'hôte (Nougayrède *et al.*, 2006). La sécrétion d'une couche de mucus par différents types de cellules humaines de l'épithélium colique permet d'atténuer les effets génotoxiques de la colibactine (Reuter *et al.*, 2018). Cet effet protecteur du mucus a également été récemment mis en évidence en modèle murin (Harnack *et al.*, 2023). Dans des conditions physiologiques, les souris colonisées par des CoPEC avaient un microbiote luminal tenu à distance de l'épithélium intestinal par une couche de mucus. En revanche, lorsque les souris consommaient de l'eau contenant du DDS à 2,5%, la muqueuse épithéliale intestinale était altérée, comme cela avait déjà été rapporté (Chassaing *et al.*, 2014). De plus, après traitement au DSS, les bactéries du microbiote étaient plus proches des cellules épithéliales que ce soit chez les souris colonisées avec des CoPEC ou chez des souris colonisées avec des *E. coli* non producteurs de colibactine ($\Delta clbR$). Toutefois, il est dommage que dans cette étude, les *E. coli* ne soient pas spécifiquement marqués afin d'observer leur localisation par rapport à l'épithélium. Pénétrer la barrière de la couche de mucus intestinale semble donc être une condition nécessaire pour que les bactéries *E. coli pks+* induisent des effets génotoxiques sur les cellules de l'épithélium colique.

Certaines bactéries possèdent des enzymes capables de cliver la partie protéique des mucines ; elles sont nommées mucine-protéases. Les bactéries produisant des mucine-protéases ont essentiellement été décrites chez des bactéries responsables de diarrhées chez l'Homme telles que *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, et certains pathotypes d'*E. coli* comme les EPEC et les EHEC (Silva *et al.*, 2003; Parham *et al.*, 2004; Dautin, 2010). Elles permettraient aux pathogènes de traverser la couche de mucus. D'autres mucine-protéases Pic, Hbp/Tsh et Vat, appartenant à la famille des SPATE, ont été retrouvées chez les UPEC et elles permettraient aux souches de coloniser les muqueuses (Henderson *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2020). La protéine Vat a également été retrouvée chez les *E. coli* adhérent-invasifs (AIEC) ; elle diminuerait la viscosité du mucus favorisant une pénétration des bactéries en profondeur dans le mucus (Gibold *et al.*, 2016).

Le fait que Vat, Pic et Hbp aient été décrites dans plusieurs souches d'*E. coli* qui sont associées au phylogroupe B2, nous nous sommes demandé **si les CoPEC (majoritairement retrouvées dans le phylogroupe B2) pouvaient posséder de telles enzymes facilitant leur accès à l'épithélium intestinal colique et favorisant ainsi la tumorigenèse colorectale.**

Les résultats de ce travail de recherche vont faire l'objet d'un article, qui sera prochainement publié.

“The mucin-protease Vat increases colonisation and colorectal tumorigenesis of colibactin-producing *Escherichia coli*.”

Héloïse Chat, Léa Girondier, Guillaume Dalmaso, Vachias Caroline, Laurent Guillouard, Virginie Bonnin, Devon Kavanaugh, Aurélien Birer, Mathilde Bonnet, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Julien Delmas

Short communication

The mucin-protease Vat increases colonisation and colorectal tumorigenesis of colibactin-producing *Escherichia coli*.

Héloïse Chat^{1*}, Léa Girondier¹, Guillaume Dalmasso¹, Vachias Caroline², Laurent Guillouard^{1,3}, Virginie Bonnin¹, Devon Kavanaugh^{1,4}, Aurélien Birer^{1,3}, Mathilde Bonnet^{1,4}, Nicolas Barnich^{1,4}, Richard Bonnet^{1,3}, Julien Delmas^{1,3}

¹ University Clermont Auvergne, Inserm U1071, INRAE USC 1382, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), Clermont-Ferrand, 63001, France

² Institut « Génétique Reproduction & Développement », UMR CNRS 6293 - Inserm U1103 - Université Clermont Auvergne, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France.

³ Department of Bacteriology, University Hospital of Clermont-Ferrand, France

⁴ University Clermont Auvergne, Institut Universitaire de Technologie Génie Biologie, Aubière, 63172, France

* **Corresponding author:** Héloïse Chat, E-mail: heloise.chat@gmail.com,

Conflict of interest: None to declare

Abstract

The colonic mucosa of colorectal cancer patients is abnormally colonized by colibactin toxin-producing *Escherichia coli* (*pks+* *E. coli*). These strains induce DNA damage leading to cell cycle arrest when *pks+* *E. coli* are in close contact with the cells of the intestinal epithelium. Therefore, the integrity of the mucus layer in the intestinal epithelial mucosa is crucial for counteracting the effect of colibactin. The Vat protein is a mucin protease capable of degrading MUC2 mucus proteins, previously described in an adherent and invasive *Escherichia coli* strain. Our work showed that the *vat* gene is found in the genome of all *pks+* *E. coli* strains isolated from patients with colon cancer. The *E. coli pks+vat-* mutant has a limited ability to cross mucus compared to the *E. coli pks+vat+* wild-type. Cells infected with the *E. coli pks+vat-* strain show a reduction in the γ -H2AX staining, a DNA damage marker. Infection of C57BL/6 *Apc*^{Min/+} mice with either the *E. coli pks+vat+* strain or the *E. coli pks+vat-* mutant, revealed that Vat enhances the ability of *pks+* *E. coli* to colonize the intestinal mucosa. Tumorigenesis was reduced in mice infected with the *E. coli pks+vat-* strain. This study reveals that Vat promotes crossing of the intestinal mucus layer, colonisation, and carcinogenicity of *pks+* *E. coli*.

KEYWORDS: colorectal cancer - *Escherichia coli* - colibactin - mucin - *pks*

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide¹. Sporadic CRC (~85% of CRC) is associated with Western lifestyle and microbiota dysbiosis². Gut microbiota could drive initiation and/or progression of CRC, through direct and indirect mechanisms as exacerbated inflammation, senescence of cell-infected, DNA damaging, cell cycle alterations and tumour proliferation³. CRC-promoting bacteria has been described as “drivers” capable of promoting the early stages of tumours development as *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* or some strains of *Escherichia coli*⁴. Colonic-mucosa-associated *E. coli* isolated from CRC patients were associated with a high percentage of cyclomodulin-producing *E. coli* belonging to B2 phylogroup and most of them possessed *pks* island (*pks+* *E. coli*) that encodes the genotoxin colibactin⁵. Cohort studies have identified enrichment in *pks+* *E. coli* of CRC colon tissues (55-67%) compared to control group tissues (20-21%)⁶⁻⁸. Moreover, *pks+* *E. coli* increased number of tumours in various CRC mouse models^{7,9,10}. These *E. coli* induce double-strand DNA breaks (DSB), DNA mutations and cell cycle arrest^{5,11}. Distinct mutational signature of *pks+* *E. coli* was found after human organoids infection, which was also detected in a subset of CRC patients¹². However, the genotoxic effects of *pks+* *E. coli* occur only upon direct contact between live bacteria and epithelial cells⁵. If the *E. coli* were inactivated by heat or gentamicin or spatially separated from mammalian cells by a 0.2 µm permeable membrane, no effect is observed⁵. Therefore, the effect of colibactin appears to be contact-dependant and may be reduced by the presence of the protective mucus layer covering the digestive tract^{13 14}. Recently, Harnack *et al.*, have shown that a thick mucus layer separated the luminal microbiota from the healthy colonic epithelium of mice infected with a *pks+* *E. coli*¹⁵. However, when the protective mucus layer of mice is disrupted by dextran sulfate sodium (DSS), the distance between *pks+* *E. coli* and epithelial cells is shorter compared to infected mice without DSS¹⁵. In addition, the disruption

of the mucus barrier was associated with an increase of DNA damage and extensive injury to the colon epithelium. Thus, the integrity of mucus layer seems to be primordial to prevent tumorigenesis induced by *pks+* *E. coli*.

Pathogens have developed specific mechanisms to subvert and penetrate the mucus barrier. Some bacteria can directly act on the mucin through a mucinase activity. StcE is a metallo-protease described in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 that contributes to the attachment of these bacteria to the intestinal epithelium^{16,17}. The EatA autotransporter found in enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) is involved in mucin degradation allowing the delivery of *E. coli* toxins to the cell surface¹⁸. Another example is the autotransporter Pic found in enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and *Shigella flexneri*. Pic protease can degrade a variety of mucins (MUC2 and MU5AC) and enhances mice colonisation by EAEC¹⁹. The adherent and invasive *E. coli* strain LF82 (AIEC) produces a protease called Vat that is implicated in the degradation of mucins and therefore decreases mucus viscosity²⁰. The Hbp/Tsh proteases harbour also *in vitro* a mucinase activity^{21,22}. Nevertheless, the presence of *pic*, *vat* and *Tsh/Hbp* genes was positively associated to phylogroup B2 and extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). We wondered whether these proteases were present in *pks+* *E. coli* and could play a role in their pathogenesis.

Materials and methods

Bacterial strains and construction of isogenic mutants

The clinical *E. coli* POP198 and 11G5 strains were isolated from patients of Clermont-Ferrand's hospital (**Table S1, supplemental data**). Strains were isolated as described previously⁶. *vat* isogenic mutants were generated using the method described by Datsenko *et al.*²³ and modified by Chaveroche *et al.*²⁴. Briefly, *E. coli* POP198 and 11G5 were transformed with pKOBEG, a plasmid encoding the Red proteins that protect linear DNA from degradation in bacteria. The plasmid was maintained in bacteria at 30°C with 34 µg/L chloramphenicol and induced by 1 mM L-arabinose. The *Flp* recognition target-flanked cassette harbouring the spectinomycin resistance cassette was generated by PCR from *Klebsiella CH404* strain with specific primers (**Table S2**). The PCR products were electroporated in *E. coli* POP198 or 11G5 cells previously washed with ice-cold water. The resulting POP198 Δ *vat* and 11G5 Δ *vat* isogenic mutants (Sp^R) were selected on Mueller-Hinton agar containing 50 µg/L spectinomycin. The replacement of genes by the spectinomycin resistance cassette was confirmed by PCR (**Table S2**). *Vat* deletion was double-checked by PCR using internal primers (**Table S2**).

To obtain transcomplemented strains, *vat* gene was cloned into the pBAD33.1 plasmid (**Table S2**) using the In-Fusion[®] HD Cloning system (Takara). A histidine-tag was added in the C-terminal part of *vat*. The POP198 Δ *vat* and 11G5 Δ *vat* were electroporated with sequenced pBAD33.1-*vat* plasmid. For experiments, strains were grown in Lysogenic Broth (LB) overnight at 37°C with 110 rpm agitation. All the strains used for this study are summarised in **Table S1**.

Screening of *vat* and *pks* genes

PCR were performed using the primers listed in **Table S2**. to screen the presence of *vat* or *pks* island in *E. coli* from patients Clermont-Ferrand's hospital (n=112).

Vat-(6X His-tag) cloning

With the In-Fusion[®] HD Cloning (Takara), *vat* gene (accession no. CAP748833.1) was amplified with a 6X Histidine-tagged sequence using the primers listed in **Table S2**. PCR product was inserted into XbaI and HindIII-digested pBAD33.1 plasmid, then ligation steps were processed thanks to T4 DNA ligase (NEB) and transformed into NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli*, according to the supplier's protocol. Bacteria that have received pBAD33.1 plasmid were selected on LB agar plates supplemented with 34 µg/ml chloramphenicol. Plasmid was extracted from bacteria cells with NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA (Macherey-Nagel) and sequenced with primers described listed in **Table S2**. Once the sequence pBAD33.1-*vat* (6X His-tag) was checked, plasmid was inserted into POP198Δ*vat* and 11G5Δ*vat* isogenic mutants, as in *E. coli* BL21(DE3) competent cells (ThermoFisher) for Vat protein purification.

Purification of Vat-histidine protein

2 mL of an overnight culture of *E. coli* BL21(DE3) containing the pBAD33.1-*vat*-6His were added to 200 mL in LB medium containing 34 µg/ml chloramphenicol and 0,2% L-arabinose (Sigma-Aldrich) and grown with shaking of 110 rpm at 37°C until OD_{600nm} = 0.8. Then, the cells were collected by centrifugation at 2,400 rpm for 10 minutes at 4°C. Supernatant was filtered and conserved at 4°C until SDS-PAGE analysis. Cell pellet was

resuspended in 200 μ L of solution buffer (10 mM Tris-Hcl at pH 8.0, 7 M Urea, 100 mM NaH_2PO_4) and centrifuged for 1 hour at 15,000 rpm at 4°C before supernatant and pellet SDS-PAGE analysis.

SDS-PAGE analysis

Proteins were loaded in a 12% SDS-PAGE gel for electrophoresis migration and were transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot® Transfer System, Bio-Rad). After 1 h of incubation in blocking buffer (PBS, 0.05% Tween 20, 5% BSA), membranes were blotted overnight at 4°C with a primary antibody directed against the 6 \times His tag (MA121315, Invitrogen, diluted in blocking buffer to 1/1000). Membranes were washed 3 times with PBS-0.05%-Tween 20, incubated 1 h in blocking buffer (PBS-0.05% Tween 20, 5% milk) and then incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (7076S, Cell Signalling, diluted in blocking buffer to 1/10000) for 1 h at room temperature. Membranes were washed 3 times and proteins were detected using ECL substrate (Enhanced ChemiLuminescence, Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad).

Monolith X interaction assays

Purified Vat (6X His-tag) was labelled according to Monolith protein Kit RED-NHS 2nd Generation kit and 20 nM of labelled protein were used with several dilution of mucin (18.8 μ M to 0.58 μ M, bovine submaxillary gland (Sigma-Alrich)).

Mucin gel penetration assay

The mucin gel penetration assay was used as previously described²⁰. Briefly, a solution containing 10% mucin of porcine respiratory tract (Sigma) and 0.3% agarose in HBSS was loaded into a 1.2-mL injection syringe, creating a mucous column. A 0.1 mL prepared

bacterial cells (10^9 cells/mL) was layered onto the mucin. The columns were incubated for 3 h at 37°C in a vertical position. Afterwards, four fractions (each one contains 0.3 mL) were collected from the button by applying gentle pressure. Each fraction was serially diluted and plated to the columbia blood medium for CFU (Colony-Forming Unit) enumeration.

Vat qRT-PCR

Bacterial total RNA was extracted using a Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) and treated with a Turbo DNA-Free Kit (Ambion) to remove any contaminating genomic DNA following the manufacturer's instructions. DNase-treated RNA samples were purified with RNA Clean and Concentrator-25 (Zymo Research). The RNA quality was assessed by a bioanalyzer, and the RNA concentration was determined using a Qubit 2.0 fluorimeter (Thermo Fisher Scientific). mRNAs were reverse transcribed using a PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) following the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed using 2 μl of cDNA, the SYBR Green Master Mix (BioRad) and 100 nM specific primers (**Table S1**). The bacteria *TufA* gene was used as an endogenous control to normalize the target gene expression. For analysis, the fold change for the target gene was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method after normalization to the control.

Cell culture

Human colon adenocarcinoma HT29 cells and HT29-16E (with mucus-production) were cultured as previously described²⁵. Cells were maintained in an atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (Lonza), 1% L-glutamine (Life Technologies), 200 U penicillin, 50 mg of streptomycin and 0.25 mg of amphotericin B per litre. For infection experiments, cells were seeded at a density of 2×10^5 cells per square centimetre in 24-well culture plates with cover

slides for 21 days in order to allow them to produce mucin. Cells were infected with *E. coli* at a multiplicity of infection (MOI) of 10 or 100 for 45 or 90 min or 3 h.

For the adhesion assays, cells were infected for 3 h at a MOI of 100. At the end of the infection, cells were washed in PBS then lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water. Finally, the samples were diluted and plated on LB agar plates to determine the number of CFU/mL corresponding to the total number of cell-associated bacteria.

Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)

To visualize *E. coli* at the end of 45 min of infection, HT29-16E infected cell wells were directly fixed for 24 h with a fixative solution of Poloxamer 407 (Sigma-Aldrich, 16758) to 20% (w/w) in 10% NBF (Neutral Buffered Formalin, Sigma-Aldrich, HT501128) solution to enhance mucus structure integrity during fixation and to initiate polymerization at room temperature as published by *Macedonia et al.*²⁶. Cover slides were washed in 100 % methanol and conserved at -20°C or directly used with the following procedures. Cells were washed with PBS with hybridization solution (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.9 M NaCl, 0.1% (w/v) SDS), before to be incubated with 5 ng.µL⁻¹ of Cy3-*E. coli* probes (**Table S2**). Paraffin was used to prevent drying and cover slides were incubated at 46°C for 3 h in a humidified chamber. Slides were washed in PBS 3X for 5 min, before nuclei staining with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, B2261) and mucus with 647-Wheat Germ Agglutinin (ThermoFisher, W32466). Coverslips were mounted using Mowiol preparation (Dutscher, 494338). Images were taken using a Zeiss LSM 980 microscope. To evaluate the distance between bacteria and epithelial cells, Imaris software was used, and bacteria count was determined for each 1 µm layer in each field counted.

Immunofluorescence

For γ -H2AX immunofluorescence staining, following infection, cells were washed using PBS, then post-infection media was added: DMEM culture media supplemented with gentamicin (200 μ g/mL). After 24 h in post-infection media, cells were fixed with PBS with 4% formaldehyde for 10 min, permeabilized in PBS with 0.25% Triton X-100 for 10 min, and blocked with PBS with 5% foetal calf serum for 30 min. Anti- γ H2AX primary antibodies (Cell Signaling, 9718) were diluted 1/400 and incubated overnight at 4°C. The secondary antibody used was conjugated to Alexa 488 (ThermoFisher, A-21206). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, B2261), mucus was stained with Wheat Germ Agglutinin (Alexa Fluor™ 647 Conjugate, ThermoFisher, W32466). Coverslips were mounted using Mowiol's preparation (Dutscher, 494338). Images were taken using a Zeiss LSM 980 microscope. To evaluate the percentage of γ H2AX-expressing cells, fluorescence intensity of γ H2AX foci was determined with Imaris software and expressed on DAPI fluorescence intensity for each field counted.

Colonization of the *Apc*^{Min/+} mouse model and quantification of *E. coli* in stools and of *E. coli* associated with colonic mucosa

Animal protocols were in accordance with French and European Economic Community guidelines (86-60, EEC) for the care of laboratory animals. The study was approved by the French Ministry of Higher Education Research and Innovation (Apafis no. 22798). Same litter mates were housed together in individually ventilated cages with seven to eight mice per cage. All mice were maintained on a regular diurnal lighting cycle (12:12 light:dark) with *ad libitum* access to food and water. C57BL/6 *Apc*^{Min/+} females (7 to 8 animals by groups) of 6 weeks of age were inoculated with oral administration of 10⁹ CFU of *E. coli* *pks+**vat+* (POP198 or 11G5 strains) or *E. coli* *pks+**vat-* mutants+ (POP198 Δ *vat* or 11G5 Δ *vat*

strains). For control group, a saline solution (PBS) was administered to the mice. In order to facilitate implantation of *E. coli*, streptomycin (2.5 g/L) was administered for 3 days prior to oral inoculation with bacteria. We periodically assessed faecal bacterial colonization. Briefly, faeces were collected, crushed (Ultra-Turrax, IKA) in PBS and spread on chromID CPS Elite agar (BioMérieux) plates, which allowed the detection of *E. coli*. A random selection of 10 *E. coli*/mouse was analysed by PCR using specific primers located in the *clbQ* gene of the *pks* island and in the *vat* gene. *E. coli* isogenic mutant was detected with spectinomycin resistance (this resistance gene was inserted into *E. coli* genome when *vat* was deleted) in LB plates. Colonic tissues were treated as faeces. All the mice were sacrificed 44 days post-infection. Colonic tumour number and tumour volume ($[\text{width}^2 \times \text{length}]/2$) were determined using a dissecting microscope.

Histological examination, scoring and immunohistochemical staining

The colons of the animals were prepared as “Swiss rolls” and fixed with Methacarn solution for 24 h before being embedded in paraffin. The paraffin-embedded colons were cut into 5 μm sections with a microtome. For immunohistochemical staining, the sections were deparaffinized in HistoClear® for 30 min, rehydrated in an ethanol gradient (100%, 95%, and 70%: 1 min each) and then incubated for 20 min at 95°C in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH 9). Using an automated *in situ* hybridization and immunohistochemistry InSitu Pro VSi (Intavis), the sections were incubated with blocking buffer (1% BSA in PBS) for 1 h at room temperature and then with the anti-phospho- γ -H2AX antibody (1/560, #9718, Cell Signaling) overnight at 4 °C. After several washes with PBS, the sections were incubated for 2 h at room temperature with the corresponding biotin-SP-secondary antibody coupled with peroxidase (1/500, Jackson ImmunoResearch). Development was performed using 3,3'-diaminobenzidine (Clinisciences). The sections were

then counterstained with Mayer haematoxylin (Diapath) for 10 sec, rinsed under running water, dehydrated and mounted in Eukitt mounting solution. Microscopic images were acquired using a Zeiss Axioscan Z1 Scanner (Zeiss) and analysed using ZEN 2 software. To evaluate the percentage of γ -H2AX-expressing cells, approximately 20 to 100 crypts were assessed in each specimen.

Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for statistical analysis. Data comparisons with multiple groups were analysed by one-way Kruskal–Wallis’s test nonparametric analysis followed by the Dunn post’s test. Unpaired Student t tests and Mann–Whitney tests were used for comparisons of 2 groups where appropriate (normality verified by the Shapiro–Wilk test and homoscedasticity by the FisherSnedecor test). Chi-square statistics were performed for gene prevalence. A value of $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results and Discussion

***Vat* gene predominates in *E. coli* isolated from mucosal biopsies associated with tumors of colorectal cancer patients**

To explore the presence of mucinases in *E. coli* populations associated with colorectal cancer patients, we performed PCR detection against the *pic*, *hbp* and *vat* genes. The patient data used come from previous studies^{6,27}. *E. coli* were isolated from tumoral colonic biopsies of CCR (n=87) or control patients (n=25). The prevalence of *vat* was significantly higher in *E. coli* isolated from CRC patients (56%, n=49/87) than those isolated from patients with diverticulosis (24%, n=6/25, $p=0.0044$) (**Figure 1A**). The prevalence of *pic* was not significantly different in CCR patients (19%) compared to control group (3%), and *hbp* was not found in our clinical isolates. We wanted to know whether the prevalence observed with the *vat* gene were usual in *E. coli*. We challenged the Human Gut Microbiome v1.2.0.1 and RefSeq v1.214 databases with *vat* gene (accession no. CAP748833.1) and found *vat* sequence in 12% of *E. coli* (n=962/8,314, HGM) and 10 % of *E. coli* (n=3,348/34,186; RefSeq) and most frequently associated with B2-phylogroup (89%, n=860/962 or 91%, n=3,055/3,348 respectively) (**Table 1**). In our clinical cohort used, CCR-associated *pks+* *E. coli* strains belonged to B2 phylogroup²⁸. Interestingly, *pks* island was always associated with the presence of *vat* gene, none strain *pks+vat-* was found in our clinical cohort (**Figure 1B**). Thus, all strains *E. coli pks+vat+* belong to B2 phylogroup. Among the different scenario of *pks* acquisition, the main one indicated that *pks* was stabilized into certain sequence type (ST) of the B2 phylogroup such as ST73 and ST95²⁹. Thanks to MLST Achtman classification in Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>), we found that the *vat* gene is present in 89 % of ST73 (n=117/132) and 79 % ST95 (n = 88/113). Thus, *vat* gene is highly associated with *pks+* *E. coli* strains and predominantly in ST-73 and ST-95 strains.

Table 1: *Vat* prevalence in *E. coli* and CoPEC (*pks*-positive) in percentage.

CCR cohort ^a		Human Gut Microbiome ^b		RefSeq ^b	
<i>E.coli</i>	CoPEC	<i>E.coli</i>	CoPEC	<i>E.coli</i>	CoPEC
56% (n=49/87)	100 % (n=44/44)	12% (n=962/8,314)	72% (n=467/628)	10 % (n=3,348/34.186)	88 % (n=1797/2041)

^a *E. coli* were isolated and characterized by PCR screening for *vat* and *pks* (*clbQ* screening).

^b *E. coli* sequences in both data bases were obtained from different metagenomic analysis.

The *Vat* protease of *pks*+ *E. coli* interacts with mucin.

To investigate the role of mucin-protease *Vat*, we purified *Vat* protein from a *pks*+ *E. coli* clinical isolate from CRC patient of Clermont-Ferrand's hospital (see **supplemental material and methods**). The soluble expression of *Vat* protein was successfully obtained in supernatant culture (unpublished data) and successfully purified (**Fig. S1A**). The purified *Vat* protein was labelled to measure its interaction with mucin molecule using Monolith X machine. A dissociation constant of $K_d = 907$ nM was determined with a confidence interval of [421-1954 nM] which depicts a strong association between *Vat* and mucin molecule (**Fig. S1B**). As comparison, *StcE* from *E. coli*, a well-described mucin-protease interacts with the cell-surface MUC1 with a $K_d \sim 100$ nM³⁰.

The *Vat* protease promotes crossing of mucus by CoPEC.

To determine whether *Vat* protease promotes the spread of *E. coli* in mucus, we have deleted *vat* gene in a *E. coli pks+vat+* strain (**Table S1**). As described by Gibold *et al.*, the *Vat* mucin-protease enables AIEC strains to penetrate the artificial mucus layer in the column penetration assay²⁰. We achieved column penetration assay with *E. coli pks+vat+* strain POP198, the isogenic mutant *E. coli pks+vat-* and the trans-complemented strain *E. coli*

pks+vat- +*pBAD-vat* (**Figure 2A**). Unlike *E. coli pks+vat-*, wild-type strain and transcomplemented strain penetrated to the bottom of the mucus column (fraction n°1). In the fraction n°2, *E. coli pks+vat-* was about two orders of magnitude less efficient at penetrating the mucus column than the *E. coli pks+vat+* and *E. coli pks+vat-* +*pBAD-vat* strains.

To confirm that Vat enhances the spread of *E. coli pks+* in mucus, we infected human colon epithelial cells HT29-16E, which produce the main mucin of colon, MUC2²⁵. The number of bacteria which have penetrated the mucus layer was counted, and the distance between bacteria and epithelial cell surface was determined. *E. coli pks+vat-* were less abundant in the mucus layer compared to *E. coli pks+vat+* and *E. coli pks+vat-* +*pBAD-vat* (**Figure 2B**). In addition, Vat-producing *E. coli* were closer to the HT29-16E than the *E. coli pks+vat-* (**Figure 2C-D**). The colon cancer-associated *E. coli pks+* strain 11G5 has been used in several studies^{7,28,31,32}. We generated a deletion mutant in this strain and the results obtained were similar to those described above (**Fig. S2A**).

Thus, the Vat protease could promote the spread of *E. coli pks+* in mucus. This result is in accordance with previous studies which reported that Vat degrades mucins and confer to the strains producing it the ability to penetrate deeper into the mucus layer^{20,33}. We next speculated whether Vat, by improving *E. coli pks+* access to epithelial cells, would increase the genotoxicity of bacteria.

The Vat protease enhances the genotoxic effects of *E. coli pks+*

As *pks+* *E. coli* induces DNA damage in cell-infected^{5,11}, we infected the mucin-hyperproducing HT29-16E cells with *E. coli pks+vat+*, *E. coli pks+vat-* and *E. coli pks+vat-* +*pBAD-vat* and measured fluorescence intensity of phosphorylated γ -H2AX foci, a well-known DSB marker³⁴. Cells infected with the wild-type *E. coli pks+vat+* strain had a

significantly increase of fluorescence intensity of phosphorylated γ -H2AX foci compared to uninfected cells and compared to cells infected with *E. coli pks+vat-* (**Figure 2E-F**). Surprisingly, this increase was not observed with the *E. coli pks+vat- +pBAD-vat* strain. The Vat toxin is a serine protease autotransporter³⁵. Autotransport in Gram-negative bacteria denotes the ability of surface-localized proteins to cross the outer membrane autonomously. The hyperproduction of Vat might therefore destabilize the outer membrane of bacteria. To verify that *E. coli pks+vat- +pBAD-vat* strain transcribed *Vat* at a higher level than the wild strain, a RT-qPCR was performed in LB broth. The *vat* mRNA levels were approximately 20-fold increased without induction and approximately 200-fold increased with induction by arabinose when compared with the wild-type strain (**Fig. S3**). However, the Vat production did not appear hinder the growth of transcomplemented when the plasmid was not induced by arabinose (**Fig. S4**). Thus, a default in Vat expression in the transcomplemented strain could not explain the low levels of γ -H2AX observed following infection using this strain. The oncogenic potential of *pks+* *E. coli* critically depends on bacterial adhesion to host epithelial cells and is critically mediated by specific bacterial adhesins at the bacteria membrane³². To investigate the adhesion properties of *E. coli pks+vat- +pBAD-vat*, we infected HT29 cells (non-mucus-producing cells) (**Fig. S5A**). *E. coli pks+vat- +pBAD-vat* present a clear defect in the adhesion capacity to HT29 compared to *E. coli pks+vat+* or *E. coli pks+vat-*, even without arabinose induction. Thus, the hyperproduction of the protease Vat may destabilize the outer membrane and reduce adhesion to intestinal epithelial cells, thereby reducing *pks+* *E. coli*-induced genotoxicity.

Vat mucin-protease contributes to *E. coli pks+* colonisation and tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice.

Apc^{Min/+} mice were orally challenged with 10^9 CFU of *E. coli pks+vat+*, *E. coli pks+vat-* or a saline solution (PBS) (**Figure 3A**). No significant difference in the body weight of mice was observed (**Figure 3B**). *E. coli pks+* faecal colonisation was significantly reduced when *E. coli pks+* was deleted for *vat* gene. We observe a one-log (day-14) to three-log (day-42) decrease in faecal colonisation between mice infected with *E. coli pks+vat-* compared to those infected with *E. coli pks+vat+* (**Figure 3C-D**). At the end of experiment, *E. coli pks+vat-* were five-log fold less isolated from mucosal colon tissue than *E. coli pks+vat+* (**Figure 3E**). It has been previously reported that Vat contributes to gut colonisation of *E. coli*; however, the colonisation has been evaluated on the 3rd day with one-log reduction in *E. coli* deleted of *vat* gene²⁰. Pic is also a serine protease autotransporter that cleaves mucins. Harrington *et al.* have shown that Pic promotes intestinal colonisation of enteroaggregative *E. coli* over a period of 14 days. Our results complete these studies and suggest that Vat, and probably other mucin-proteases, are implicated in the persistence of *E. coli* in the intestine.

This significant decrease in colonisation of the intestine by *E. coli pks+vat-* was associated with a significant reduction in the number of colonic tumours (**Figure 3F**). These results were also observed with the 11G5 CoPEC (**Fig. S5**). Thus, our data demonstrate that Vat improves the ability of *E. coli pks+* to colonize intestine and to promote tumorigenesis.

To evaluate bacteria-induced genotoxicity, we examined γ -H2AX in colonic tissue sections from biopsies. However, no significant difference was observed between the groups: those infected with *E. coli pks+vat+*, *E. coli pks+vat-* and PBS (**Fig. S6**). We hypothesize that, 44 days post-infection, tumorigenesis was too advanced to observe differences between groups. Indeed, the *Apc^{Min/+}* mouse model is unique in that tumours appear spontaneously and relatively rapidly in the gastrointestinal tract. Genotoxic *pks+* *E. coli* are considered as

“drivers” able to induce mutations^{12,36}. Thus, to complete this analysis, it could be interesting to evaluate γ -H2AX staining in a short time experimentation.

Conclusion

In conclusion, our study found that the presence of the *vat* gene was significantly higher in CRC patients compared to control patients. The Vat protease promoted the spread of *pks+* *E. coli* in the mucus layer and enhanced its genotoxic effects. The Vat toxin was also found to contribute to *E. coli* colonisation and tumorigenesis in the intestine of mice predisposed to cancer. In the present study, we show that carriage of the *pks* island is linked to the carriage of the *vat* gene. Therefore, the *pks* island may not in itself confer tumorigenic ability upon *E. coli* strains, but requires the action of mucin-protease Vat which promotes bacterial-cell contact.

Acknowledgements

This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie; Inserm (UMR 1071); INRAe (USC-2018), Région Auvergne Rhône Alpes; the French government's IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25 project of the University of Clermont Auvergne); and the National Program "Microbiote" Inserm. We thank the CLIC (Clermont-Ferrand Imagerie Confocale, Université Clermont Auvergne) and Anipath histology technical platforms (GReD, Université Clermont Auvergne) for assistance with tissue preparation and immunohistochemical staining.

References

1. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, Vignat J, Ferlay J, Murphy N, Bray F. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut* 2023; 72:338–44.
2. Dougherty MW, Jobin C. Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. *Gut Microbes* 2023; 15:2185028.
3. Kim J, Lee HK. Potential Role of the Gut Microbiome In Colorectal Cancer Progression. *Front Immunol* 2022; 12:807648.
4. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10:575–82.
5. 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; 313:848–51.
6. 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* [Internet] 2013 [cited 2020 Mar 19]; 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572998/>
7. 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.
8. Arthur JC, Gharaibeh RZ, Mühlbauer M, Perez-Chanona E, Uronis JM, McCafferty J, Fodor AA, Jobin C. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat Commun* 2014; 5:4724.
9. 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.
10. 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; 63:1932–42.
11. 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* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 8]; 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874909/>
12. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A, van Hoeck A, Wood HM, Nomburg J, Gurjao C, Manders F, Dalmasso G, Stege PB, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* 2020; 580:269–73.
13. Reuter C, Alzheimer M, Walles H, Oelschlaeger TA. An adherent mucus layer attenuates the genotoxic effect of colibactin. *Cell Microbiol* 2018; 20.
14. Payros D, Dobrindt U, Martin P, Secher T, Bracarense APFL, Boury M, Laffitte J, Pinton P, Oswald E, Oswald IP. The Food Contaminant Deoxynivalenol Exacerbates the Genotoxicity of Gut Microbiota. *mBio* 2017; 8:e00007-17.
15. Harnack C, Berger H, Liu L, Mollenkopf H-J, Strowig T, Sigal M. Short-term mucosal disruption enables colibactin-producing *E. coli* to cause long-term perturbation of colonic homeostasis. *Gut Microbes* 2023; 15:2233689.
16. Hews CL, Tran S, Wegmann U, Brett B, Walsham ADS, Kavanaugh D, Ward NJ, Juge N, Schüller S. The StcE metalloprotease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* reduces the inner mucus layer and promotes adherence to human colonic epithelium *ex vivo*. *Cell Microbiol* [Internet] 2017 [cited 2020 Mar 31]; 19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5434857/>
17. Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* 2005; 73:1295–303.

18. Kumar P, Luo Q, Vickers TJ, Sheikh A, Lewis WG, Fleckenstein JM. EatA, an immunogenic protective antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*, degrades intestinal mucin. *Infect Immun* 2014; 82:500–8.
19. Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun* 2009; 77:2465–73.
20. Gibold L, Garenaux E, Dalmaso G, Gallucci C, Cia D, Mottet-Auselo B, Faïs T, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HTT, Barnich N, et al. The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 2016; 18:617–31.
21. Kobayashi RKT, Gaziri LCJ, Venancio EJ, Vidotto MC. Detection of Tsh protein mucinolytic activity by SDS-PAGE. *J Microbiol Methods* 2007; 68:654–5.
22. Sicard J-F, Le Bihan G, Vogeeler P, Jacques M, Harel J. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:387.
23. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:6640–5.
24. Chaverocche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:E97.
25. Augeron C, Labois CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* 1984; 44:3961–9.
26. Macedonia MC, Drewes JL, Markham NO, Simmons AJ, Roland JT, Vega PN, Scurrah CR, Coffey RJ, Shrubsole MJ, Sears CL, et al. Clinically adaptable polymer enables simultaneous spatial analysis of colonic tissues and biofilms. *npj Biofilms and Microbiomes* 2020; 6:1–10.
27. 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.
28. Raisch J, Buc E, Bonnet M, Sauvanet P, Vazeille E, de Vallée A, Déchelotte P, Darcha C, Pezet D, Bonnet R, et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2014; 20:6560–72.
29. Auvray F, Perrat A, Arimizu Y, Chagneau CV, Bossuet-Greif N, Massip C, Brugère H, Nougayrède J-P, Hayashi T, Branchu P, et al. Insights into the acquisition of the pks island and production of colibactin in the *Escherichia coli* population. *Microb Genom* 2021; 7.
30. Pedram K, Shon DJ, Tender GS, Mantuano NR, Northey JJ, Metcalf KJ, Wisnovsky SP, Riley NM, Forcina GC, Malaker SA, et al. Design of a mucin-selective protease for targeted degradation of cancer-associated mucins. *Nat Biotechnol* 2023; :1–11.
31. 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 ApcMin/+ Mice. *Gastroenterology* 2020; 158:1373–88.
32. Jans M, Kolata M, Blancke G, Ciers M, Dohlman AB, Kusakabe T, Sze M, Thiran A, Berx G, Tejpar S, et al. Colibactin-induced genotoxicity and colorectal cancer exacerbation critically depends on adhesin-mediated epithelial binding. *bioRxiv* 2023; :2023.08.16.553526.
33. Pan X, Chen R, Zhang Y, Zhu Y, Zhao J, Yao H, Ma J. Porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* delivers two serine protease autotransporters coordinately optimizing the bloodstream infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2023; 13:1138801.
34. Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis TC. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010; 24:679–86.
35. Habouria H, Pokharel P, Maris S, Garénaux A, Bessaiah H, Houle S, Veyrier FJ, Guyomard-Rabenirina S, Talarmin A, Dozois CM. Three new serine-protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. *Virulence* 2019; 10:568–87.
36. Rosendahl Huber A, Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J. A bacterial mutational footprint in colorectal cancer genomes. *Br J Cancer* 2021; 124:1751–3.

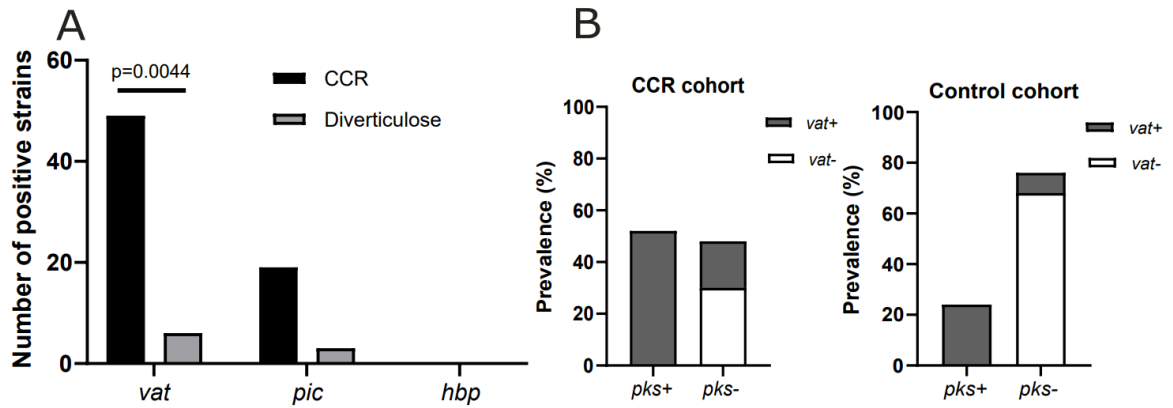


Figure 1. Mucin-protease prevalence in *E. coli* isolated from CRC patients. (A) *Vat*, *pic* and *hbp* mucin-protease encoding-gene were screened by PCR in *E. coli* isolated from tumoral colonic human biopsies (n=112) of CCR (n=87) or normal mucosa for control patients (n=25). Statistic was performed with χ^2 test. (B) *Vat* gene was screened by PCR among *pks*+ or *pks*- *E. coli* isolated from colonic human biopsies. Patient was considered positive as at least one *pks*+ *E. coli* was detected in biopsies.

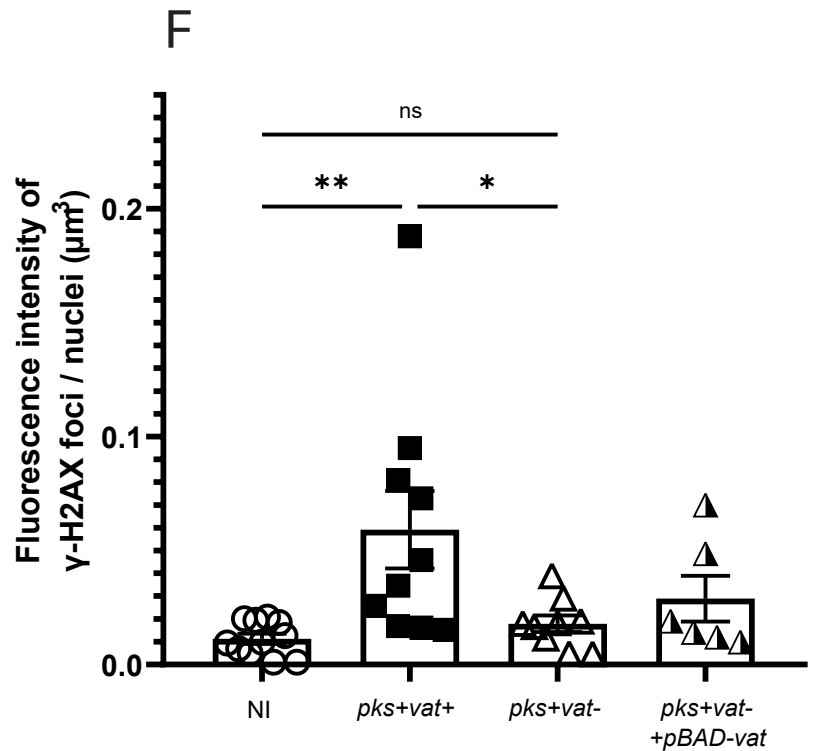
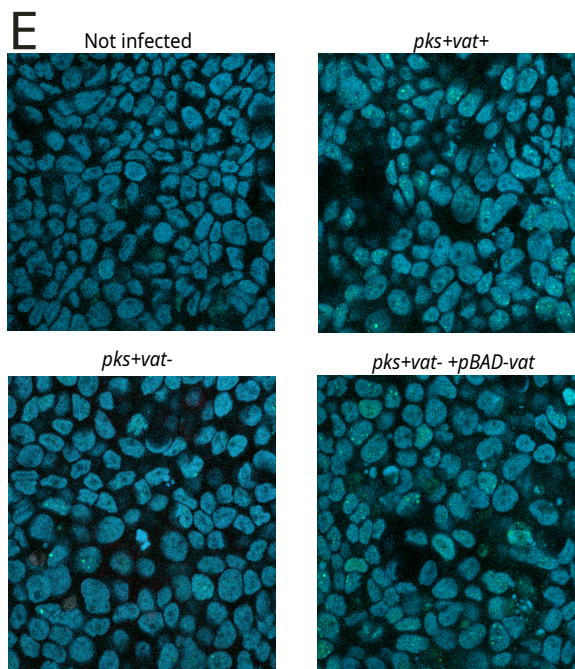
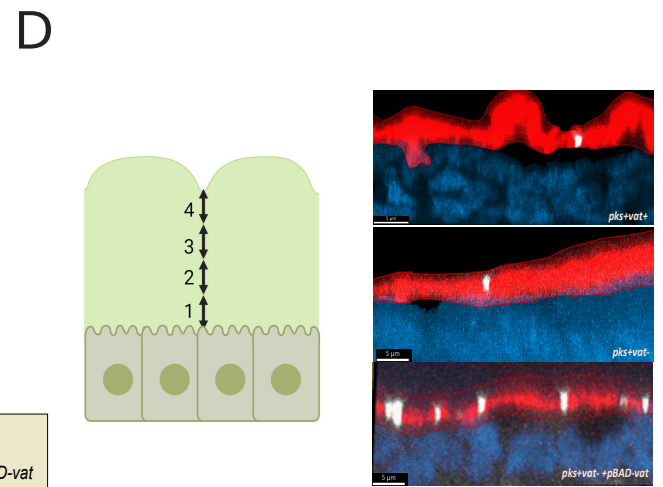
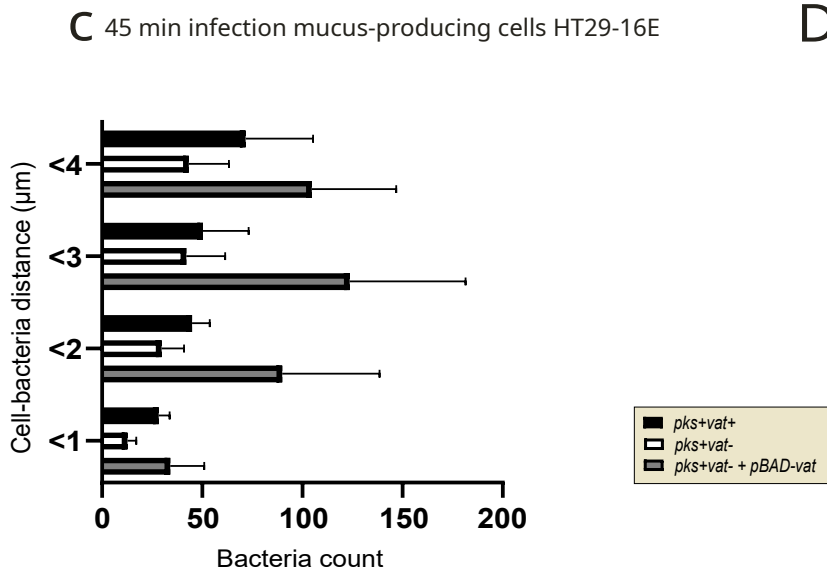
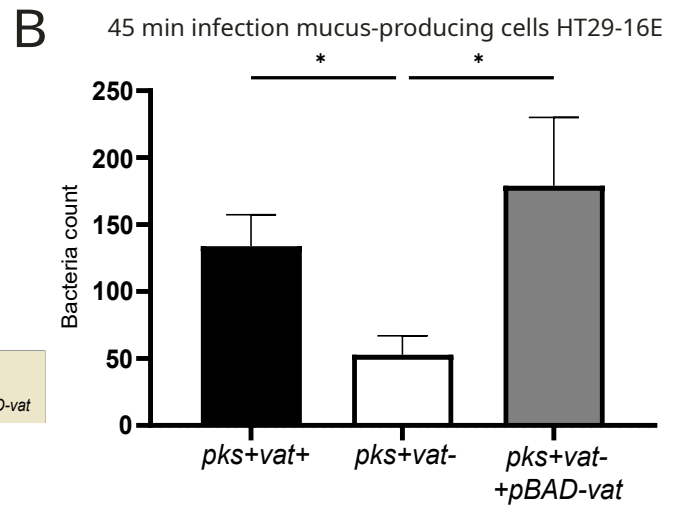
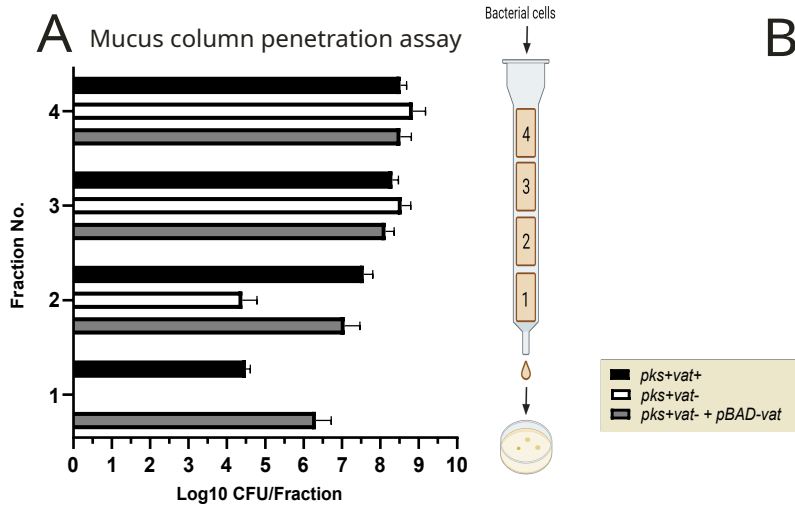
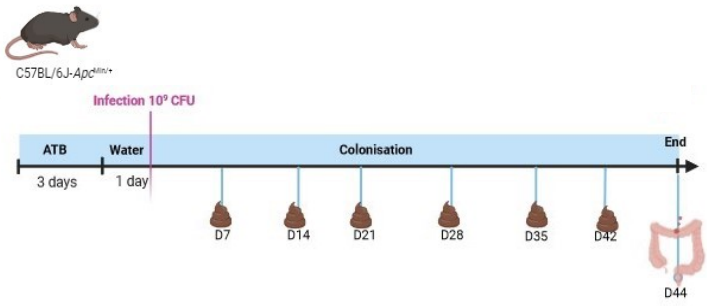
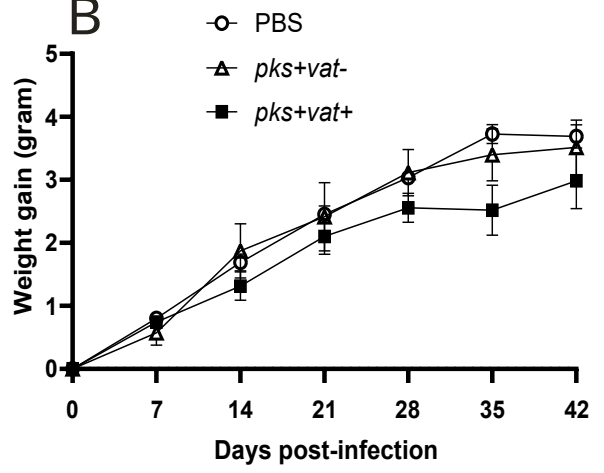


Figure 2. Deletion of *vat* gene from *E. coli pks+* impairs bacteria mucus-crossing and reduces colibactin-dependent genotoxicity. (A) The assessment of mucus crossing by using column penetration assay. Quantification of indicated *E. coli pks+* strains in fractions eluted from columns filled with gel-forming mucus (1 to 4 fractions bottom to top of the column). Data are representative of 3 independent experiments. (B-D) Mucus-producing HT29-16E cells were infected for 45 minutes with a Multiplicity of Infection of 100. For each replicate, three representative fields were analysed, and experiments were performed 3 times. (B) Cells were stained by DAPI (blue), mucus by WGA-leptin (red) and fluorescence in situ hybridization with Cy3-*E. coli pks+* probes was performed. Cy3-*E. coli pks+* were numbered and distance to DAPI-cells were measured (C) Using Imaris software, the distance between bacteria to cell was determined for each field and bacteria was counted in each 1 μ m layer. *E. coli pks+* bacteria were shown in white. (D) Confocal microscopy images of infected HT29-16E in Imaris software. (E-F) Mucus-producing HT29-16E cells were infected for 90 minutes with a Multiplicity of Infection of 100. For each replicate, three representative fields were analysed, and experiments were performed 3 times. Phosphorylated γ -H2AX foci fluorescence intensity was determined by immunofluorescence 24 hours post-infection and expressed on the fluorescence intensity of cell. Data are presented as means \pm SEMs. Statistical comparisons were carried out by one-way Kruskal–Wallis’s test nonparametric for followed by the Dunn post’s tests after normality testing (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns = not significant).

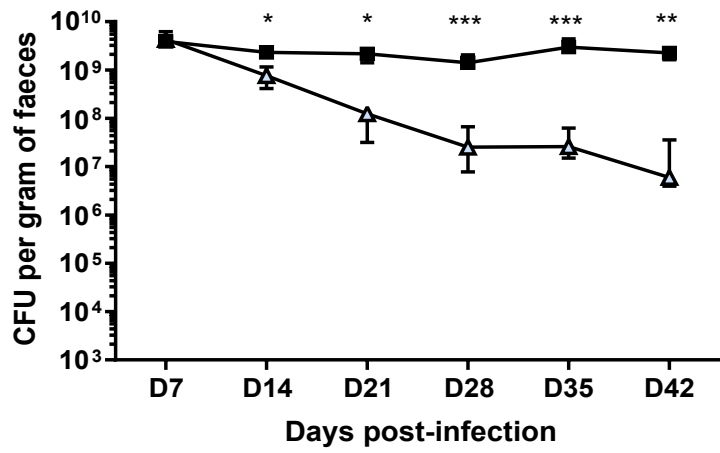
A



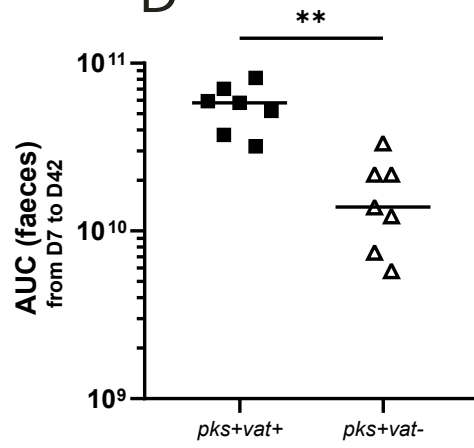
B



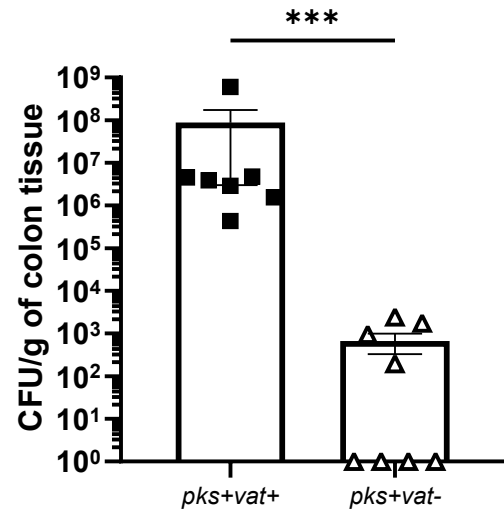
C



D



E



F

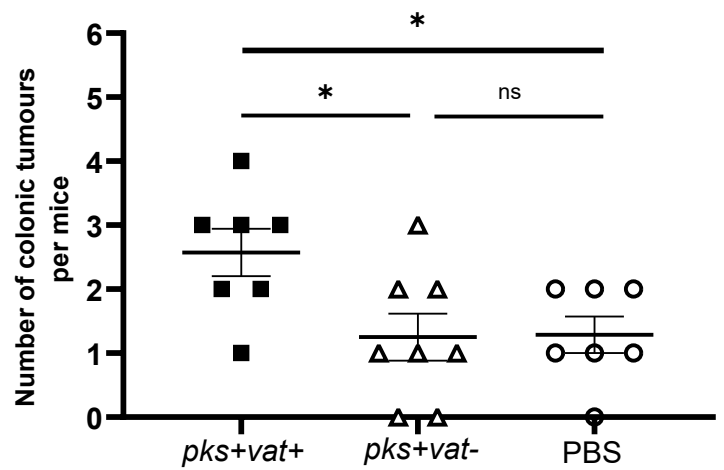


Figure 3. In *E. coli pks+*-infected *Apc^{Min/+}* mice, *Vat* favours colonisation of *E. coli pks+* and increases colonic tumours numbers. (A) *Apc^{Min/+}* mice were orally administered with 10^9 colony-forming units of the *E. coli pks+vat+*, *E. coli pks+vat-* mutant or with PBS. (B) The weight gain of each mouse at different time points was determined compared to weight of the same mouse at day-0. Data are presented as median \pm standard error of the mean. (C) Bacterial colonisation in the stools of mice from 7 to 42 days post-infection. Values represent medians \pm errors. (D) Area Under the Curves (AUC) from bacterial colonisation in the stools of mice from 7 to 42 days post-infection. The data points represent actual values for each individual mouse, and the bars indicate median values. (E) The number of *E. coli* associated with non-tumoral colonic tissue at 44 days post-infection was determined. Colonisation data are presented as means \pm SEMs. (F) The number of colorectal tumours by mouse was determined using a dissecting microscope. Data are presented as means \pm SEMs. Statistical comparisons were carried out by one-way Kruskal–Wallis’s test nonparametric for three groups mice or Mann-Whitney test analysis for two groups mice followed by the Dunn post’s tests after normality testing (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Supplementary data

Table S1. Clinical strains used in this study

Strains	Description	Strain reference
11G5	Clinical isolated from patient harbouring <i>pks</i> island (colibactin production) and <i>vat</i> (Vat production).	<i>pks+vat+</i>
POP198	Clinical isolated from patient harbouring <i>pks</i> island (colibactin production) and <i>vat</i> (Vat production).	<i>pks+vat+</i>
11G5 Δ vat	11G5 strain deleted for <i>vat</i> gene.	<i>pks+vat-</i>
POP198 Δ vat	POP198 strain deleted for <i>vat</i> gene	<i>pks+vat-</i>
11G5 Δ vat + pBADvat	11G5 strain deleted for <i>vat</i> gene and trans-complemented with pBAD33.1 with <i>vat</i> gene.	<i>pks+vat-</i> <i>+pBAD-vat</i>
POP198 Δ vat + pBADvat	POP198 strain deleted for <i>vat</i> gene and trans-complemented with	<i>pks+vat-</i> <i>+pBAD-vat</i>

Table S2. Primers, plasmids and probes used in this study

Primer	Sequence (5'→ 3')	Product size	Use
Vat-F	GGGGCGCCGGATGAGGCATTA	204 bp	Detection of <i>vat</i>
Vat-R	CCTCTTTTGGAGAGGCCGGCGACAGT		
CibQ-F	GACGGCATCCACCATCGTAA	230 bp	Detection of <i>cibQ</i>
CibQ-R	TAAATGGCGTAGCGTGCTGT		
Sp_cat_F	TACCATATTGTGGATCGTAATGAACACAGTTCATCTGATC	1 100 pb	Spectinomycin resistance cassette amplification
Sp_cat_R	TCCACACACCCACTGGCATTTAATAACGCGTC		
VATFor Xba	GCTCTAGAATGAATAAAATATACGCTCT	4,149 bp	<i>vat</i> cloning in pBAD33.1 with His-Tag
VATRev 6HisHind	GCAAGCTTTTCAGTGGTGATGGTGATGATGGAATGAATA ACGAATATTAG		
Pbad33.1 _CmF_F	GGGTACACTTACCTGTGATCGGCACGTAAGAGGTTCC	5.434 bp	pBAD33.1 amplification
Pbad33.1 _CmF_R	ATTTTCCACCCGGGTTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCG		pBAD33.1 amplification
Vat1	ACTCGGCATTCTACAGGC		Verification of <i>vat</i> cloning
Vat2	CAAACGGAAGTACCTGGACCG		

Vat3	ATATGTCGGACATGACCAGA		
Vat4	TCTGGAGAACTCAACGCTGAC		
Vat5	CTGAAGCGACAGCTGATAATC		
Vat6	CACTGTATGCAGGTGCAG		

Plasmid	Description	Use	Reference
pBAD33.1	pBAD cloning vector with an arabinose inducible promoter; chloramphenicol resistant.	Clonage of <i>vat</i> gene.	(Chung and Raetz, 2010)
pKOBEG	pBAD cloning vector harboring a λ phage $red\gamma\beta\alpha$ operon; chloramphenicol resistant.	Deletion of <i>vat</i> gene.	(Chaveroche <i>et al.</i> , 2000)

Probes	Sequence (5'→3')	Use	Reference
Cy3- <i>E. coli</i>	GCAAAGGTATTAACCTTTACTCC CTTCCTCC	Localisation of <i>E. coli</i> bacteria.	(Lee et al. 2022)

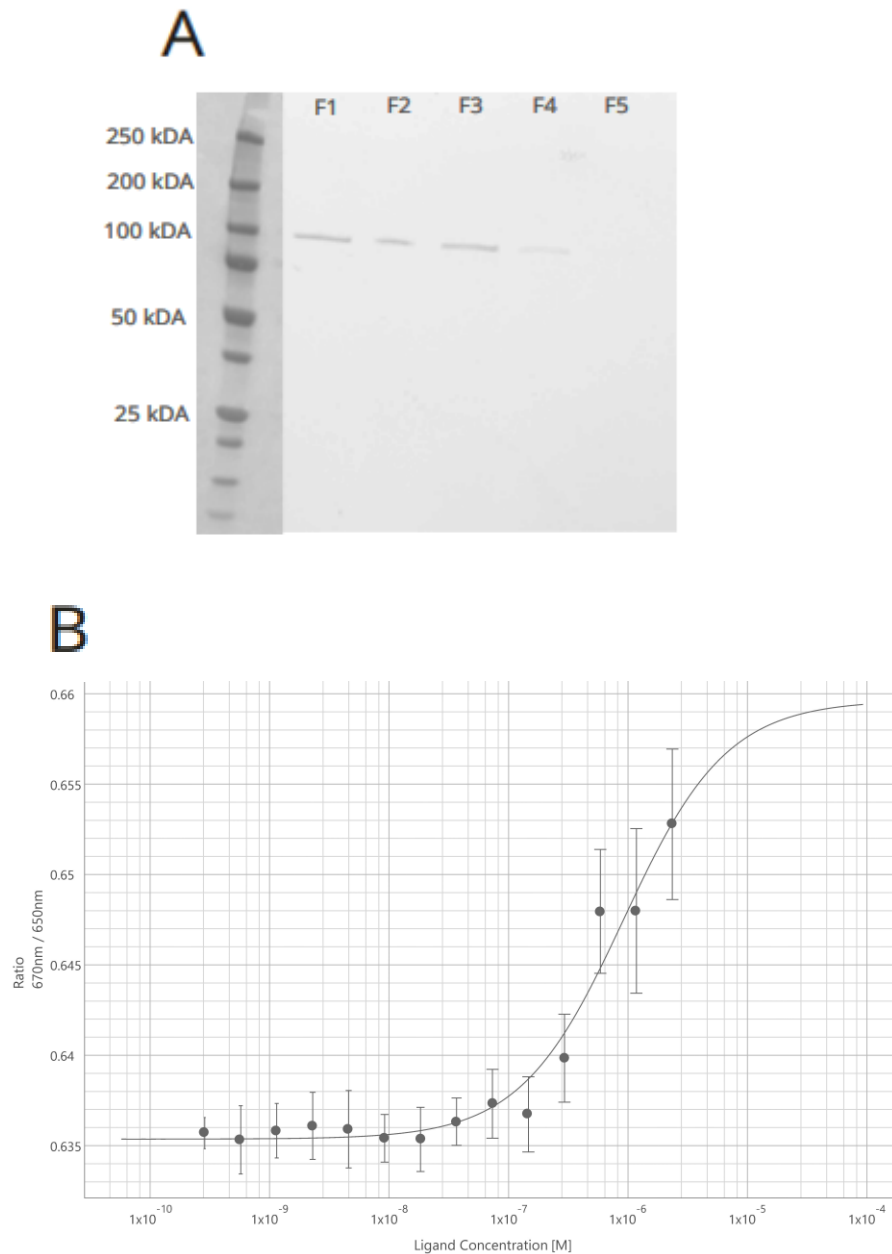


Figure S1: Vat-(6X His-Tag) amino acid sequence, purification, and Monolith X interaction's assay. (A) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of Ni-NTA Agarose purification of protein Vat-(6X His-Tag) cloning *E. coli pks+vat+* isolate from colorectal cancer patients. A 100 kDalton protein (catalytic part of Vat) was detected in fraction n°1 to 3. **(B)** Binding curve of Vat-(6X His-Tag) protein and mucin (bovine submaxillary gland) obtained thanks to Monolith X from Nanotemper.

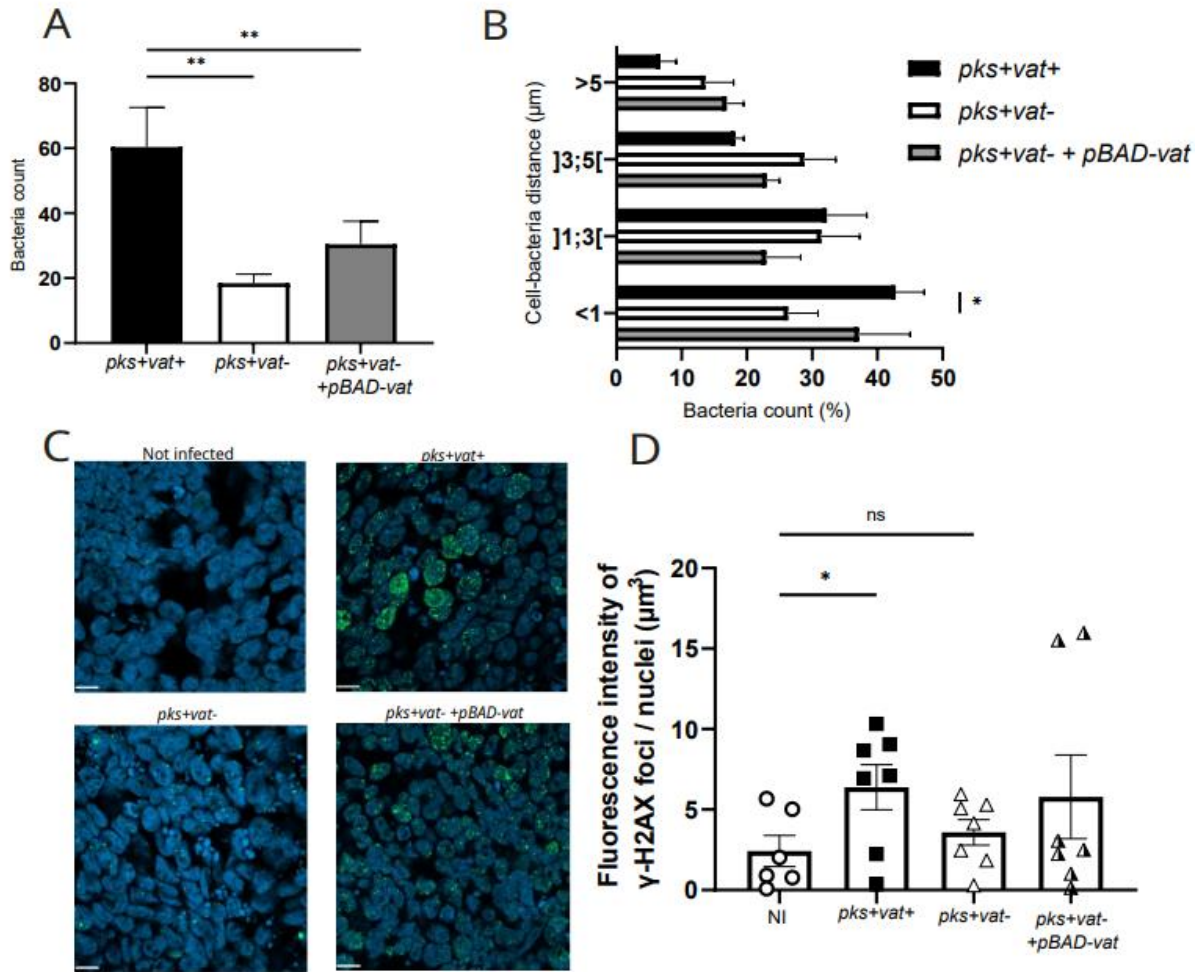


Figure S2: 11G5 *E. coli* deleted for *vat*-gene impairs mucus-crossing and reduces colibactin-dependent genotoxicity. (A-B) Mucus-producing HT29-16E cells were infected for 3 hours with a Multiplicity of Infection of 10 hundred bacteria for 1 cell. For each replicated, three representative fields were analysed, and experiments were performed 3 times. (A) Number of bacteria were determined for each condition. (B) With Imaris software, bacteria-cell distance was determined for each field and bacteria was counted in each 1 μm layer. *E. coli pks+* bacteria were shown in white. (C-D) Mucus-producing HT29-16E cells were infected for 3 hours with a Multiplicity of Infection of 100 hundred bacteria for 1 cell. For each replicate, three representative fields were analysed, and experiments were performed 3 times. Phosphorylated γ -H2AX foci fluorescence intensity was determined by immunofluorescence 24 hours post-infection and expressed on the fluorescence intensity of cell. Data are presented as means \pm SEMs. Statistical comparisons were carried out by one-way Kruskal–Wallis’s test nonparametric for followed by the Dunn post’s tests after normality testing (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns = not significant).

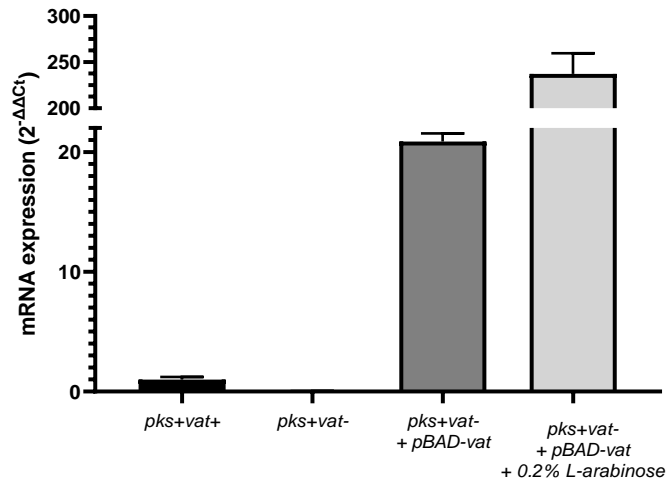


Figure S3: RT-qPCR of *vat* gene. mRNA expression of *vat* genes was analysed from 4 hours bacteria culture in LB. RT-qPCR were performed for POP198 (*pks+vat+*) POP198 Δ *vat* (*pks+vat+*) and POP198 Δ *vat* +*pBAD-vat* (*pks+vat+*) without or with activation by 0.2% of L-arabinose. Experiments were performed 2 times and data are presented as means \pm SEMs.

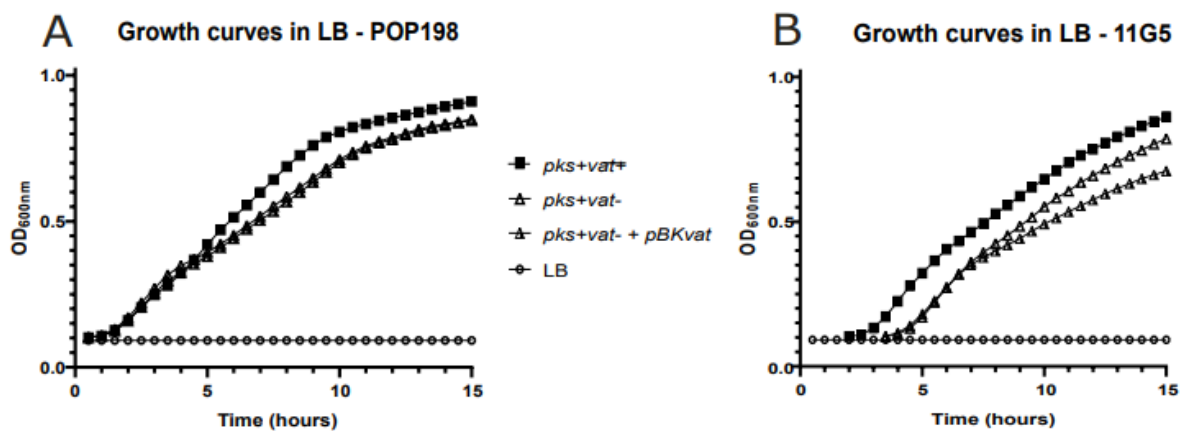


Figure S4: Growth curves of POP198 (A) and 11G5(B) strains, isogenic mutants and trans-complemented strains in Luria-Bertani broth (LB) media. Each strain was cultured overnight in LB before dilution to $OD_{600}=0.1$. Optic Density was measured at 600 nm by microplates multimodes SPARK[®] from 15 hours. Experiments were repeated three time with three replicates for each.

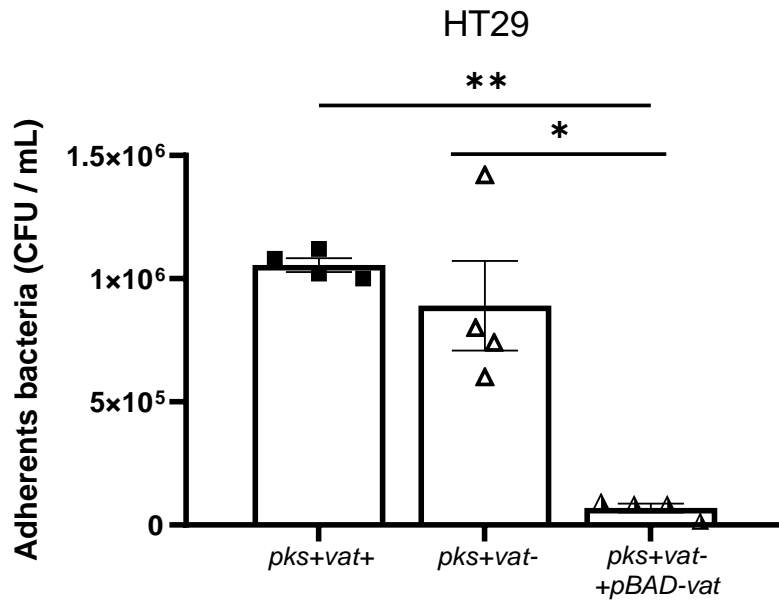


Figure S5: Hyperproduction of Vat impacts adhesion of bacteria to epithelial cells.

Adherents' bacteria were quantified in HT29 after 3h of infection with culture medium with a MOI of 100 bacteria for 1 cell. Experiments were performed 2 times and data are presented as means \pm SEMs. Statistical comparisons were carried out by one-way Kruskal–Wallis's test nonparametric for followed by the Dunn post's tests after normality testing ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

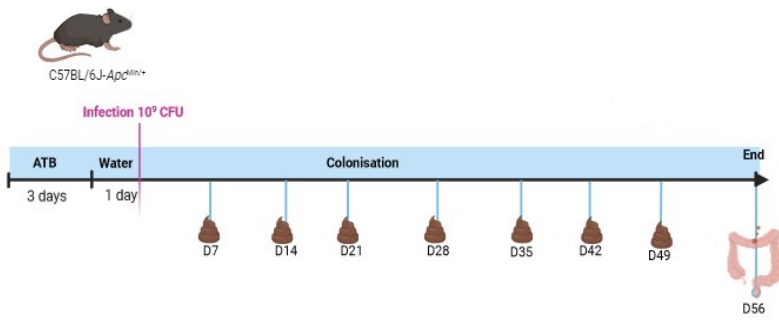
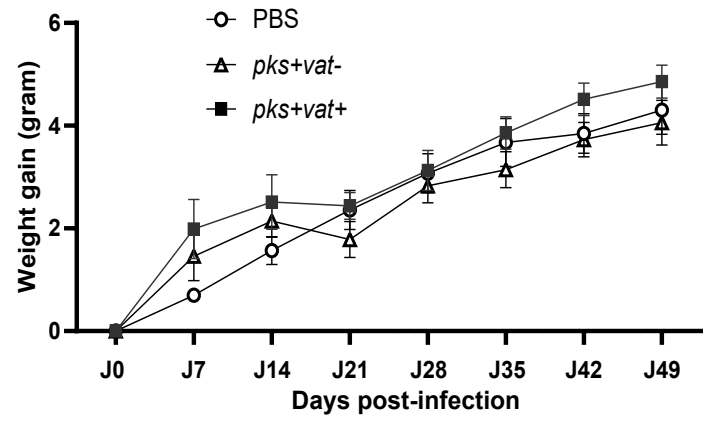
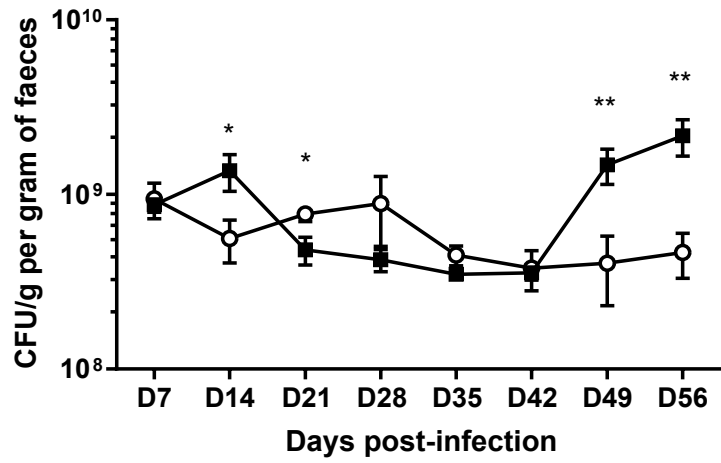
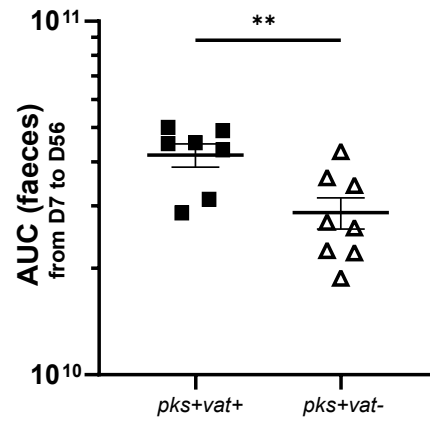
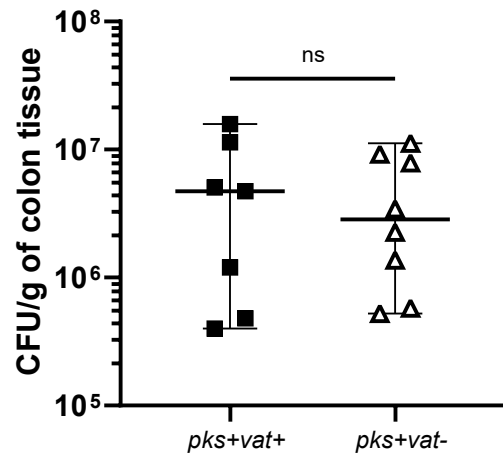
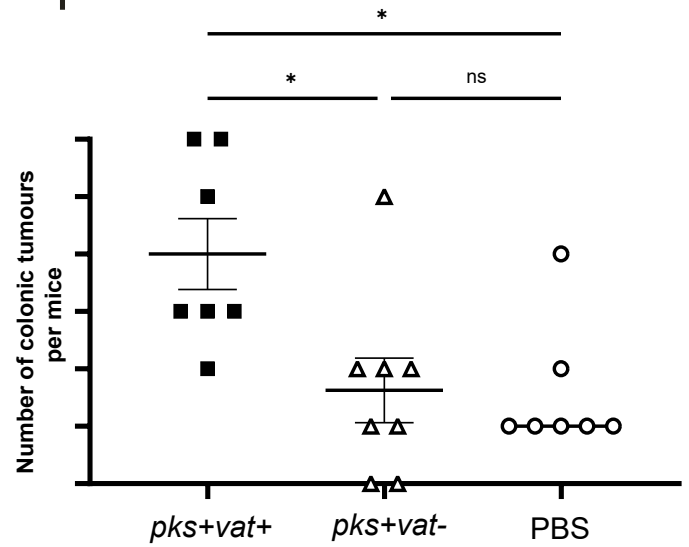
A**B****C****D****E****F**

Figure S6: In 11G5 *E. coli*-infected *Apc*^{Min/+} mice, *Vat* favours colonisation of CoPEC in faeces and colon tissues, increasing colonic tumours numbers. (A) *Apc*^{Min/+} mice were orally administered 10⁹ colony-forming units of the *E. coli pks+vat+*, *E. coli pks+vat-* mutant or with PBS vector. (B) The weight gain (gram) of each mouse at different time points was determined compared to weight of the same mouse at day-0. Data are presented as mean ± standard error of the mean. (C) Bacterial colonisation in the stools of mice from 7 to 49 days post-infection. Values represent medians ± errors. (D) Area Under the Curves (AUC) from bacterial colonisation in the stools of mice from 7 to 49 days post-infection. The data points represent actual values for each individual mouse, and the bars indicate median values. (E) The number of *E. coli* associated with nontumoral colonic tissue at 49 days post-infection was determined. Colonisation data are presented as means ± SEMs. (F) The number of colorectal tumours by mouse was determined using a dissecting microscope. Data are presented as means ± SEMs. Statistical comparisons were carried out by one-way Kruskal–Wallis’s test nonparametric for three groups mice or Mann-Whitney test analysis for two groups mice followed by the Dunn post’s tests after normality testing (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ns = not significant).

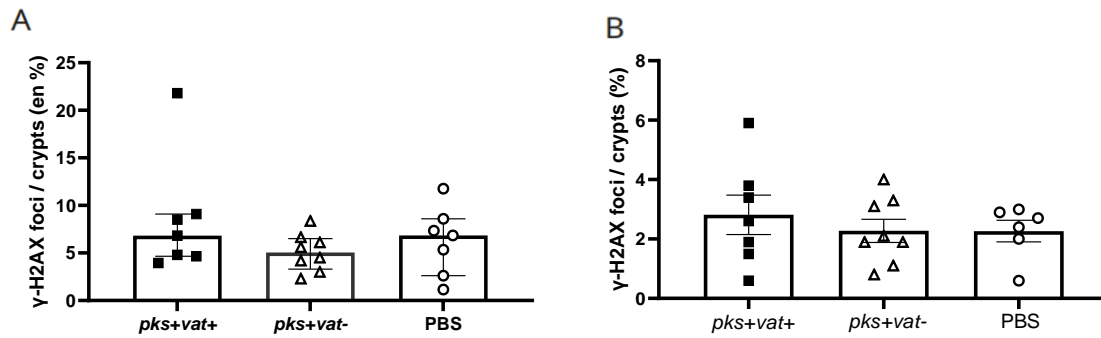


Figure S7: γ -H2AX foci evaluation in colonic tissue sections from biopsies *Apc^{Min/+}* mice.

Quantification of γ -H2AX foci by crypts determined from nontumoral colonic mucosa from colonised *Apc^{Min/+}* mice. Experiments were processed with *E. coli pks+vat+* or isogenic mutant *E. coli pks+vat-* from POP198 strain (A) or 11G5 strain (B). Data are presented as means \pm SEMs. Statistical analysis: Kruskal–Wallis ANOVA.

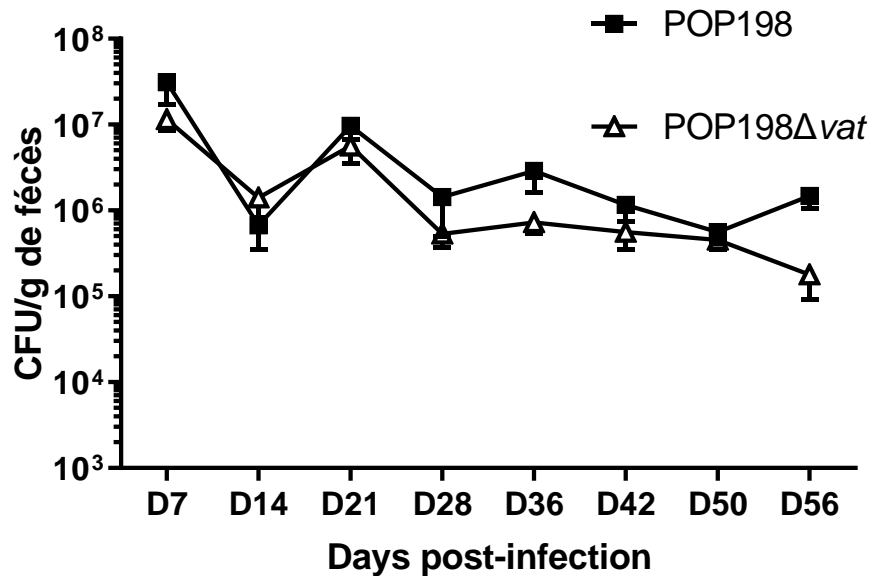
References supp data :

Chaveroche, M. K., J. M. Ghigo, and C. d'Enfert. 2000. 'A Rapid Method for Efficient Gene Replacement in the Filamentous Fungus *Aspergillus Nidulans*'. *Nucleic Acids Research* 28 (22): E97. <https://doi.org/10.1093/nar/28.22.e97>.

Chung, Hak Suk, and Christian R. H. Raetz. 2010. 'Interchangeable Domains in the Kdo Transferases of *Escherichia Coli* and *Haemophilus Influenzae*'. *Biochemistry* 49 (19): 4126–37. <https://doi.org/10.1021/bi100343e>.

Lee, Min Seok, Hwi Hyun, Inwon Park, Sungho Kim, Dong-Hyun Jang, Seonghye Kim, Jae-Kyeong Im, et al. 2022. 'Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) of Magnetically Confined Bacteria Enables Early Detection of Human Bacteremia'. *Small Methods* 6 (3): e2101239. <https://doi.org/10.1002/smt.202101239>.

Résultat complémentaire :



In *E. coli pks+*-infected C57BL/6 WT mice, *Vat* does not impact colonisation of *E. coli pks+*. C57BL/6 WT mice were orally administered with 10^9 colony-forming units of the *E. coli pks+vat+*, *E. coli pks+vat-* mutant. Bacterial colonisation in the stools of mice from 7 to 56 days post-infection. Values represent medians \pm errors. Statistical comparisons were carried out Mann-Whitney test analysis for two groups mice followed by the Dunn post's tests after normality testing for each day.

Commentaire de la publication n°2 & perspectives

1) Prévalence des mucine-protéases des *E. coli* isolés de la muqueuse des patients atteints de CCR.

Au sein de notre laboratoire, nous possédions des souches isolées de biopsies issues de patients ayant un CCR ou des diverticuloses (Gagnière *et al.*, 2017). La présence des gènes codant les mucine-protéases Vat, Pic et Hbp a été recherchée par PCR. Cette étude a révélé que *vat* est plus fréquemment présent chez les *E. coli* isolés des patients atteints de CCR (56%, n=49/87) que ceux isolés des patients contrôles (24%, n=6/25, $p=0,0044$). De plus, toutes les souches *E. coli* qui possédaient l'îlot *pks* possédaient également le gène *vat* sans que ceux-ci soient liés génétiquement. Ce résultat dévoile une forte association entre les deux gènes, qui a été confirmée par l'interrogation des bases de données RefSeq et Human Gut Microbiome. À partir de ces données, nous avons pu observer que l'îlot *pks* et *vat* sont retrouvés majoritairement dans le phylogroupe B2 et plus particulièrement au sein des ST73 et ST95.

Deux isolats cliniques possédant simultanément l'îlot *pks* et *vat* (*E. coli pks+vat+*) ont été utilisés pour étudier l'implication de Vat dans le potentiel tumorigène des CoPEC.

2) Vat favorise la traversée d'une couche de mucus et l'accès aux cellules épithéliales coliques par les *E. coli pks+*

Nous avons mis en évidence sur des colonnes à mucus que les mutants isogéniques *E. coli pks+vat-* avaient une moindre capacité à traverser le mucus en comparaison à des *E. coli* qui possèdent le gène *vat* (*E. coli pks+vat-* et *E. coli pks+vat-* + *pBAD-vat*). Ces résultats ont été confirmés sur des cellules épithéliales coliques hyperproductrices de mucus, les HT29-16E. Ces cellules ont été choisies car elles sécrètent principalement des mucines de type MUC2 (Augeron and Laboisse, 1984). Dès 21 jours de culture, la présence d'une couche de mucus a été confirmée par un marquage au WGA (wheat germ agglutinin) des groupements N-acétyl-D-glucosamine et acide sialique qui composent le mucus. Nous avons pu néanmoins observer que cette couche de mucus n'était pas homogène en termes d'épaisseur, ceci pouvant expliquer, l'hétérogénéité entre certains de nos résultats en Figure 2C. Toutefois, nous avons pu mettre en évidence par un marquage au FISH l'implication de la mucine protéase Vat dans la traversée du mucus.

L'évaluation des dommages à l'ADN par le marqueur γ -H2AX phosphorylé a permis de mettre en évidence sur les cellules HT29-16E que les *E. coli pks+vat+* entraînent plus de dommages à l'ADN que les *E. coli pks+vat-* suggérant que Vat facilite l'accès des *E. coli* aux cellules. Nous pouvons envisager qu'au niveau intestinal si les *E. coli pks+vat+* ont la capacité de traverser la couche de mucus protectrice, cela peut leur permettre d'accéder aux cellules souches situées au fond des cryptes coliques. Ces *E. coli pks+* sont capables d'induire des dommages à l'ADN favorisant leur transformation en cellules tumorales. Bloquer l'action de Vat pourrait probablement limiter les dommages causés par les *E. coli pks+*.

Pour parfaire ces résultats, nous souhaiterions utiliser un modèle proposé par Elzinga *et al.*, basé sur la culture des HT29-MTX-E12 (hyperproductrices de MUC5AC et MUC2) (Elzinga *et al.*, 2021). Ces cellules cultivées sous interface semi-humide avec une légère agitation produiraient plus de mucines conduisant à une couche de mucus plus épaisse, ce qui pourrait permettre d'avoir une différence encore plus nette entre les *E. coli* produisant Vat et ceux ne la produisant pas.

3) La délétion du gène *vat* permet de réduire la colonisation et la tumorigenèse du tractus intestinal murin des *E. coli pks+*

Pour compléter nos travaux, nous avons étudié l'implication de Vat dans la colonisation du tractus murin par les *E. coli pks+*. Nous avons utilisé un modèle de susceptibilité au cancer colorectal, les souris C57BL/6 *Apc^{Min/+}* qui développent spontanément des tumeurs (Yang *et al.*, 2008). Dans ce modèle, nous avons pu mettre en évidence que la colonisation intestinale (par suivi de la colonisation fécale) des *E. coli pks+vat-* était nettement réduite d'un facteur logarithmique (au jour 14) à trois facteurs (au jour 42) par rapport aux *E. coli pks+vat+*. Cette différence à la fin de l'expérience était de cinq logarithmes au niveau des *E. coli pks+* associées à la muqueuse colique dans les biopsies des souris colonisées. Vat est donc impliqué dans la colonisation intestinale des *E. coli pks+*. Son implication dans la colonisation intestinale des souris avait déjà été démontrée lors d'infection aiguës (3 jours) par les AIEC (Gibold *et al.*, 2016). Notre étude montre que Vat favorise la persistance des CoPEC au niveau de l'intestin des souris C57BL/6 *Apc^{Min/+}*. Ces données suggèrent donc que les CoPEC possédant ce facteur de colonisation pourraient persister des années au sein du microbiote intestinal des humains.

Nous gardons à l'esprit que dans ces modèles de susceptibilité au CCR, la couche de mucus peut être déjà altérée par un microenvironnement tumoral permissif (Kaur *et al.*, 2018). Pour cela, nous avons également voulu observer en utilisant des souris C57BL/6 WT, l'implication de Vat dans la colonisation intestinale. Nous n'avons pas observé de différences de la colonisation fécale des *E. coli pks+vat+* par rapport aux *E. coli pks+vat-* (**Figure résultat complémentaire**). Ainsi, les conditions de l'environnement digestif peuvent avoir une influence sur l'implantation des *E. coli pks+vat+*. Vat ne semble pas favoriser la colonisation des *E. coli pks+* en présence d'une couche de mucus non-altérée, comme dans les souris C57BL/6 WT. L'hypothèse de la présence d'une couche de mucus plus fine et d'un microenvironnement au niveau colique différent chez les souris C57BL/6 *Apc^{Min/+}* comparativement aux souris C57BL/6 WT, pourrait favoriser l'action de Vat et expliquer nos résultats. Le DSS a déjà été utilisé dans la littérature pour induire une déstabilisation transitoire de la couche de mucus en modèle murin (Harnack *et al.*, 2023). Il serait intéressant d'étudier cette hypothèse, en administrant du DSS à faible dose aux souris C57BL/6 WT pour observer si nous retrouvons cette différence de colonisation entre les *E. coli pks+vat+* et *E. coli pks+vat-*.

La diminution de la colonisation observée chez les souris C57BL/6 *Apc^{Min/+}* était associée à une diminution du nombre de tumeurs à 44 jours post-infection. Ainsi, en modèle *in vivo*, la présence de Vat semble favoriser la tumorigenèse des *E. coli pks+*. Pour évaluer la génotoxicité, nous avons évalué le marqueur γ -H2AX par immunohistochimie dans les biopsies coliques des souris *Apc^{Min/+}* à la fin de l'expérience. Nous n'avons pas observé de différence de ce marqueur de dommage à l'ADN. Il est cependant envisageable que, 44 jours post-infection, la tumorigenèse soit trop avancée pour observer une différence entre les groupes. En effet, dans le modèle murin *Apc^{Min/+}* les tumeurs apparaissent spontanément et relativement rapidement dans le tractus gastro-intestinal. Les *E. coli pks+* génotoxiques sont considérés comme des *drivers* capables d'induire des mutations (Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020). Ainsi, pour compléter cette analyse, il pourrait être intéressant d'infecter des souris et de regarder précocement (2j, 7j et 14j) si des dommages à l'ADN sont présents dans les cellules coliques des souris infectées avec des *E. coli pks+vat+*.

Pour vérifier ces résultats, nous avons réalisé la même expérience avec une autre souche de *E. coli pks+vat+*, la souche 11G5 isolée d'un patient atteint de CCR et qui a déjà été décrite dans la littérature (Bonnet *et al.*, 2014a; Raisch *et al.*, 2015; Jans *et al.*, 2023). Nous avons retrouvé une diminution du nombre de tumeurs chez les souris colonisées par les *E. coli*

pks+vat- en comparaison aux souris colonisées par *E. coli pks+vat+*. Les *E. coli pks+vat-*, malgré une réduction significative (à J14, J49 et J56) semblaient avoir colonisé de manière importante ($\sim 5.10^9$ CFU) et stable le tractus des souris *Apc^{Min/+}*. Ceci peut notamment être expliqué par la composition de leur microbiote intestinal et la présence d'autres bactéries au sein des niches écologiques associées à la muqueuse intestinale. En effet, comme développé lors de la partie introductive (*section I-3-2-4 du manuscrit*), certaines bactéries peuvent rentrer en compétition et empêcher ou faciliter l'implantation d'autres bactéries.

4) La présence de mucine-protéase au sein de la niche écologique intestinale

La colonisation du microbiote par des bactéries productrices de mucine-protéases dégradant la structure peptidique du mucus, peut modifier les sources nutritives disponibles pour les bactéries commensales (Conway and Cohen, 2015). Ainsi, la colonisation de la niche intestinale dans nos souris *Apc^{Min/+}* par les *E. coli pks+vat+* a pu impacter les différentes populations bactériennes présentes. La déstabilisation des communautés microbiennes associées à la muqueuse intestinale par la présence de telles enzymes est un des points que nous souhaitons étudier dans notre travail de recherche. En effet, lors des expériences menées sur les souris *Apc^{Min/+}* colonisées par les *E. coli pks+vat+* ou *E. coli pks+vat-*, nous avons collecté des échantillons fécaux à différents temps (avant traitement antibiotique ainsi qu'au milieu et à la fin de l'expérience). Nous envisageons de réaliser une analyse du microbiote fécal par le séquençage de l'ARN16S bactérien.

5) Inhiber la traversée des *E. coli pks+*

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la présence du gène *vat* dans le génome des *E. coli pks+*. *Vat* favorise la traversée et la propagation des *E. coli* dans le mucus, expliquant probablement la meilleure colonisation intestinale de ces souches dans notre modèle murin. Cette colonisation plus importante était associée à une augmentation du nombre de tumeurs au niveau du côlon. Donc *Vat* pourrait être une cible pour limiter le potentiel tumorigène des *E. coli*.

L'utilisation de molécules inhibitrices des mucine-protéases est déjà une solution qui a été avancée (Martens *et al.*, 2018). Nous avons pu mesurer grâce au Monolith-X l'interaction direct entre la mucine-protéase *Vat* et le mucus intestinal. Nous envisageons par la suite de

tester différentes molécules inhibitrices de Vat. Une potentielle réduction de l'interaction avec la protéine de mucus pourra être évaluée à l'aide du Monolith-X, avant de réaliser d'autres expériences complémentaires sur les modèles *in vitro* déjà utilisées. Une fois ces tests validés, nous pourrions envisager de tester une ou plusieurs molécules inhibitrices dans le modèle murin souris *Apc^{Min/+}* pour voir si ces molécules pourraient prévenir l'apparition de tumeurs comme nous l'avons observé pour les bactéries *E. coli pks+vat-*.

Vat semble favoriser la traversée, l'accès aux cellules épithéliales coliques et la tumorigenèse des *E. coli pks+*.

~Discussion et conclusion~

La bactérie *Escherichia coli* est un micro-organisme commensal du tube digestif humain qui colonise la niche écologique intestinale dès les premières années de la vie de l'enfant (Wall *et al.*, 2009; Payros *et al.*, 2014). Néanmoins, l'analyse du génome de ces bactéries a dévoilé une grande diversité génétique (Auvray *et al.*, 2021). Certaines souches au cours de leur évolution ont acquis et conservé des gènes et/ou des îlots génomiques, qui peuvent leur apporter un avantage pour coloniser une niche écologique. Les *E. coli* producteurs de colibactine (CoPEC) ont acquis un îlot de pathogénicité (« *pks* ») qui leur apporte la capacité de produire une génotoxine, la **colibactine**. Les CoPEC, même s'ils sont retrouvés avec une plus grande fréquence chez les patients ayant un CCR, sont également retrouvés chez d'autres populations (Shimpoh *et al.*, 2017). Les CoPEC peuvent donc être considérés aujourd'hui comme des bactéries pathobiontes. Ainsi, comme pour les AIEC et la maladie de Crohn, des questions similaires se posent : les CoPEC sont-ils impliqués dans la genèse de la maladie ? Sont-ils un facteur de risque ? Est-ce que le microenvironnement intestinal et la dysbiose favorisent leur colonisation ? Est-ce qu'il y a des facteurs génétiques ou environnementaux qui expliqueraient que ces souches soient inoffensives chez certaines personnes et délétères chez d'autres ? Et enfin, est-ce que toutes les souches ont la même virulence ? C'est sur ce dernier point, que porte notre travail.

Nous avons démontré dans les travaux expérimentaux de l'axe 1 que **Cnf1** est une toxine également produite par les CoPEC qui permet de **limiter le pouvoir tumorigène** de ces bactéries, en réduisant la sénescence et la réponse inflammatoire. Elle pourrait potentiellement favoriser la réparation des dommages à l'ADN induite par les CoPEC. **Nous avons ainsi montré dans un modèle murin prédisposé au CCR que Cnf1 réduit le nombre des tumeurs induites par les CoPEC.** Si nous nous plaçons d'un point de vue purement microbiologique, nous pouvons émettre l'hypothèse que la colibactine a pour la bactérie un rôle antimicrobien et que les effets génotoxiques sur l'hôte soient des dommages collatéraux. Cnf1 pourrait moduler ces effets et ainsi limiter la réponse de l'hôte et préserver sa niche écologique.

Lors des travaux expérimentaux de mon axe 2, nous avons souligné l'importance de Vat dans la traversée de la couche de mucus par les *E. coli pks+*. Vat favorise ainsi la colonisation de la muqueuse intestinale ce qui est associé à une augmentation des dommages

à l'ADN. **Nous avons démontré en modèle murin prédisposé au CCR que l'absence du gène *vat* dans le génome des CoPEC réduit la colonisation et le nombre de tumeurs.**

Cnf1, l'hémolysine A et la toxine Vat font partie des facteurs de virulence fréquemment retrouvés chez les UPEC (Desvaux *et al.*, 2020). Après attachement aux cellules urothéliales, les UPEC peuvent être internalisés et se multiplier dans les cellules à l'abri des défenses immunitaires (Zhou *et al.*, 2023). En lien avec la réponse immunitaire, les cellules infectées peuvent être exfoliées et relarguées dans l'urine.

Les facteurs de virulence retrouvés chez les CoPEC interviennent dans ces étapes de la physiopathologie de l'infection urinaire :

- L'hémolysine A s'intègre dans la membrane de la cellule de l'hôte et forme des pores (Ristow and Welch, 2016). À des fortes concentrations, la lyse cellulaire consécutive peut promouvoir la croissance bactérienne par relargage de nutriments et de fer, utiles pour les UPEC extracellulaires. À des doses sublytiques, l'induction d'une activité protéolytique est retrouvée non seulement sur les cellules urothéliales (conduisant à l'exfoliation), mais également sur les macrophages, ce qui permet d'altérer la réponse immunitaire (Dhakal and Mulvey, 2012).
- Cnf1, en modulant les voies de signalisation des Rho-GTPases, modifie la structure du cytosquelette des cellules urothéliales et ainsi favorise l'internalisation des UPEC.
- Le mécanisme d'action de Vat et son implication dans le développement d'infections urinaires ne sont pas entièrement connus. Vat est capable de former des vacuoles dans les cellules de la vessie et d'altérer leur cytosquelette (Díaz *et al.*, 2020). Il a été montré en modèle *ex vivo* que Vat induit une diminution de l'intégrité de la barrière uroépithéliale, associée à une desquamation cellulaire.

Rappelons également que la majorité des UPEC appartiennent au phylogroupe B2, alors que classiquement, il est rapporté que les souches commensales d'*E. coli* intestinales appartiennent principalement au groupe A (~ 40 %) et B1 (~ 30 %) (Duriez *et al.*, 2001; Escobar-Páramo *et al.*, 2006). Nous nous sommes donc demandé pour quelle raison la présence de ces facteurs de virulence était augmentée dans les pathologies intestinales chroniques.

Les souches des phylogroupes A et B1 semblent être plus généralistes puisqu'elles peuvent être isolées de tous les vertébrés et sont souvent isolées des habitats secondaires (le sol, les sédiments et l'eau). En revanche, les souches pathogènes extra-intestinales appartiennent généralement aux phylogroupes B2 et D et leur présence au niveau intestinal reste minoritaire (Duriez *et al.*, 2001; Kocsis *et al.*, 2022). Toutefois, il a été noté que la prévalence des isolats du groupe A en zone tempérée était deux fois moins élevée qu'en zone tropicale et qu'à l'inverse la fréquence des isolats du groupe B2 était significativement plus élevée dans les zones tempérées (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que la proportion des souches du groupe B2 et D semble augmenter au fil du temps surtout dans les pays occidentaux (Escobar-Páramo *et al.*, 2006; Stoppe *et al.*, 2017; Ballén *et al.*, 2022; Kocsis *et al.*, 2022).

Différentes hypothèses ont été formulées pour expliquer cette tendance : une modification du régime alimentaire et de l'hygiène, des modifications anthropiques de l'environnement, un changement dans l'utilisation et le type d'antibiotiques. En effet, l'utilisation des antibiotiques dans les années 2000 chez les animaux d'élevage était associée à une prédominance des souches des groupes A et B1 et à une plus grande résistance de ces souches aux antibiotiques par rapport au groupe B2 (Escobar-Páramo *et al.*, 2006; Ballén *et al.*, 2022). De nos jours, les *E. coli* du groupe B2 comprennent des ST qui ont diffusé et qui sont fréquemment résistantes à de nombreux antibiotiques. C'est le cas des *E. coli* ST131 qui sont généralement résistants aux fluoroquinolones et qui produisent des BLSE les rendant multirésistants (Ben Zakour *et al.*, 2016). D'autres clones d'*E. coli* sont également dominants au sein des ExPEC même s'ils ne sont pas toujours associés à des phénotypes de multirésistance ; ils comprennent ST10, ST38, ST69, ST73, ST95, ST127, ST405 (Manges *et al.*, 2019; Cummins *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023). Il est intéressant de noter que l'îlot *pks* est majoritairement regroupé au sein du phylogroupe B2 et plus particulièrement au sein des ST73 et ST95 (Auvray *et al.*, 2021). Dans notre étude, nous avons également associé le gène *vat* au ST73 et ST95, ce qui renforce l'association de ces gènes au sein de souches qui diffusent largement.

Ces souches deviennent donc prédominantes dans le microbiote intestinal des individus des pays industrialisés. Les facteurs de virulence de ces souches tels que Cnf1 et Vat qui n'avaient été décrits que dans la physiopathologie d'infections aiguës extra-intestinales pourraient être délétères dans l'intestin dans des conditions particulières telles que les MICI ou le CCR. Toutefois, les souches d'*E. coli* associées à la maladie de Crohn et au

CCR ont des profils de virulence différents, suggérant que d'autres facteurs comme le microenvironnement intestinal ou les facteurs génétiques de l'hôte sont impliqués dans la colonisation intestinale de ces souches. Néanmoins, Vat est retrouvée dans la majorité des souches que ce soit des AIEC ou des CoPEC.

Pour comprendre les effets délétères de ces pathobiontes, il est donc primordial d'étudier l'ensemble des facteurs génétiques, environnementaux et microbiens. Notre travail de thèse, par l'étude des facteurs de virulence des CoPEC, s'inscrit dans cette démarche.

En conclusion de ce travail de thèse, nous avons souligné l'importance de prendre en compte l'ensemble du virulome des CoPEC pour pleinement comprendre le mécanisme de la tumorigenèse de ces bactéries.

~Références bibliographiques~

Introduction bibliographique

- Agus, A., and Sokol, H. (2019) [Tryptophan and metabolic syndrome, a new challenge for health]. *Med Sci MS* **35**: 213–215.
- Ahmad, R., Raina, D., Trivedi, V., Ren, J., Rajabi, H., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2007) MUC1 oncoprotein activates the IkappaB kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. *Nat Cell Biol* **9**: 1419–1427.
- Ait Ouakrim, D., Pizot, C., Boniol, M., Malvezzi, M., Boniol, M., Negri, E., *et al.* (2015) Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ* **351**: h4970.
- Aksoy, N., and Akinci, O.F. (2004) Mucin macromolecules in normal, adenomatous, and carcinomatous colon: evidence for the neotransformation. *Macromol Biosci* **4**: 483–496.
- Albenberg, L., Esipova, T.V., Judge, C.P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., *et al.* (2014) Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* **147**: 1055–1063.e8.
- Alfaro, C., Teijeira, A., Oñate, C., Pérez, G., Sanmamed, M.F., Andueza, M.P., *et al.* (2016) Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **22**: 3924–3936.
- 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.
- Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001) The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* **3**: 306–310.
- Andrews, S., Norton, I., Salunkhe, A.S., Goodluck, H., Aly, W.S.M., Mourad-Agha, H., and Cornelis, P. (2013) Control of iron metabolism in bacteria. *Met Ions Life Sci* **12**: 203–239.
- Arthur, J.C., Gharaibeh, R.Z., Mühlbauer, M., Perez-Chanona, E., Uronis, J.M., McCafferty, J., *et al.* (2014) Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat Commun* **5**: 4724.
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., *et al.* (2012) Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **338**: 120–123.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., *et al.* (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**: 174–180.
- Asar, M., Kayisli, Ü.A., Nımet İzgüt-Uysal, V., Öner, G., Kaya, M., and Polat, S. (2000) Cadmium-induced changes in epithelial cells of the rat stomach. *Biol Trace Elem Res* **77**: 65–81.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., and Holm, L. (2001) The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**: G922–929.
- Augeron, C., and Laboisse, C.L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* **44**: 3961–3969.
- Auvray, F., Perrat, A., Arimizu, Y., Chagneau, C.V., Bossuet-Greif, N., Massip, C., *et al.* (2021) Insights into the acquisition of the pks island and production of colibactin in the *Escherichia coli* population. *Microb Genomics* **7**.
- Aya, V., Flórez, A., Perez, L., and Ramírez, J.D. (2021) Association between physical activity and changes in intestinal microbiota composition: A systematic review. *PLoS One* **16**: e0247039.
- Aykan, N.F. (2015) Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncol Rev* **9**: 288.

- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., *et al.* (2015) Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* **17**: 852.
- Bakthavatchalu, V., Wert, K.J., Feng, Y., Mannion, A., Ge, Z., Garcia, A., *et al.* (2018) Cytotoxic Escherichia coli strains encoding colibactin isolated from immunocompromised mice with urosepsis and meningitis. *PLoS ONE* **13**: e0194443.
- Balamurugan, R., Rajendiran, E., George, S., Samuel, G.V., and Ramakrishna, B.S. (2008) Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **23**: 1298–1303.
- Baldus, S.E., Mönig, S.P., Huxel, S., Landsberg, S., Hanisch, F.-G., Engelmann, K., *et al.* (2004) MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **10**: 2790–2796.
- Balish, E., and Warner, T. (2002) *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am J Pathol* **160**: 2253–2257.
- Ballén, V., Gabasa, Y., Ratia, C., Sánchez, M., and Soto, S. (2022) Correlation Between Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants and Biofilm Formation Ability Among Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Strains Isolated in Catalonia, Spain. *Front Microbiol* **12**: 803862.
- Bammann, L.L., Clark, W.B., and Gibbons, R.J. (1978) Impaired colonization of gnotobiotic and conventional rats by streptomycin-resistant strains of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **22**: 721–726.
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., *et al.* (2017) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**: 16878.
- Bansil, R., and Turner, B.S. (2018) The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv Drug Deliv Rev* **124**: 3–15.
- Bardhan, K., Anagnostou, T., and Boussiotis, V.A. (2016) The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* **7**: 550.
- Ben Zakour, N.L., Alsheikh-Hussain, A.S., Ashcroft, M.M., Khanh Nhu, N.T., Roberts, L.W., Stanton-Cook, M., *et al.* (2016) Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of Escherichia coli ST131. *mBio* **7**: e00347-00316.
- Benninghoff, A.D., Hintze, K.J., Monsanto, S.P., Rodriguez, D.M., Hunter, A.H., Phatak, S., *et al.* (2020) Consumption of the Total Western Diet Promotes Colitis and Inflammation-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients* **12**: 544.
- Bergstrom, K., Shan, X., Casero, D., Batushansky, A., Lagishetty, V., Jacobs, J.P., *et al.* (2020) Proximal colon-derived O-glycosylated mucus encapsulates and modulates the microbiota. *Science* **370**: 467–472.
- Bernalier-Donadille, A. (2010) [Fermentative metabolism by the human gut microbiota]. *Gastroenterol Clin Biol* **34 Suppl 1**: S16-22.
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., *et al.* (2017) Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep* **7**: 40373.
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., and Welling, G.W. (2011) Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* **17**: 478–482.
- Bibeau, F., Léger, A., Bazille, C., and Selves, J. (2020) Les cancers colorectaux héréditaires vus par le pathologiste. *Ann Pathol* **40**: 105–113.
- Biedermann, L., Zeitz, J., Mwinji, J., Sutter-Minder, E., Rehman, A., Ott, S.J., *et al.* (2013) Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PloS One* **8**: e59260.
- Birchenough, G.M.H., Nyström, E.E.L., Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016) A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* **352**: 1535–1542.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., *et al.* (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**: 1453–1462.
- Bobek, L.A., Liu, J., Sait, S.N., Shows, T.B., Bobek, Y.A., and Levine, M.J. (1996) Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7. *Genomics* **31**: 277–282.

- Boleij, A., Hechenbleikner, E.M., Goodwin, A.C., Badani, R., Stein, E.M., Lazarev, M.G., *et al.* (2015) The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **60**: 208–215.
- Bonacorsi, S., Houdoin, V., and Bingen, E. (2001) Facteurs de virulence associés à *E. coli* responsable de méningite néonatale. *Arch Pédiatrie* **8**: 726–731.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., *et al.* (2014a) Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **20**: 859–867.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., *et al.* (2014b) Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **20**: 859–867.
- Boparai, K.S., Mathus-Vliegen, E.M.H., Koornstra, J.J., Nagengast, F.M., Leerdam, M. van, Noesel, C.J.M. van, *et al.* (2010) Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicentre cohort study. *Gut* **59**: 1094–1100.
- Bossuet, N., Guyonnet, C., Chagneau, C.V., Tang-Fichaux, M., Penary, M., Loubet, D., *et al.* (2023) Oxygen concentration modulates colibactin production. *Gut Microbes* **15**: 2222437.
- Bossuet-Greif, N., Dubois, D., Petit, C., Tronnet, S., Martin, P., Bonnet, R., *et al.* (2016) *Escherichia coli* ClbS is a colibactin resistance protein. *Mol Microbiol* **99**: 897–908.
- Bossuet-Greif, N., Vignard, J., Taieb, F., Mirey, G., Dubois, D., Petit, C., *et al.* (2018) The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *mBio* **9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874909/>. Accessed February 8, 2020.
- Brennan, C.A., Clay, S.L., Lavoie, S.L., Bae, S., Lang, J.K., Fonseca-Pereira, D., *et al.* (2021a) *Fusobacterium nucleatum* drives a pro-inflammatory intestinal microenvironment through metabolite receptor-dependent modulation of IL-17 expression. *Gut Microbes* **13**: 1987780.
- Brennan, C.A., Nakatsu, G., Gallini Comeau, C.A., Drew, D.A., Glickman, J.N., Schoen, R.E., *et al.* (2021b) Aspirin Modulation of the Colorectal Cancer-Associated Microbe *Fusobacterium nucleatum*. *mBio* **12**: e00547-21.
- Brew, R., Erikson, J.S., West, D.C., Kinsella, A.R., Slavin, J., and Christmas, S.E. (2000) Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* **12**: 78–85.
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., *et al.* (2013) High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLoS ONE* **8** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572998/>. Accessed March 19, 2020.
- Buecher, B., and Pauw, A. de (2012) [Hereditary colorectal cancer]. *Rev Med Interne* **33**: 471–474.
- Bujanda, L., and Herreros-Villanueva, M. (2017) Pancreatic Cancer in Lynch Syndrome Patients. *J Cancer* **8**: 3667–3674.
- Burns, M.B., Lynch, J., Starr, T.K., Knights, D., and Blekhman, R. (2015) Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med* **7**: 55.
- Byndloss, M.X., Olsan, E.E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C.R., Cevallos, S.A., Lokken, K.L., *et al.* (2017) Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* **357**: 570–575.
- Byrd, J.C., and Bresalier, R.S. (2004) Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**: 77–99.
- Calhau, V., Domingues, S., Ribeiro, G., Mendonça, N., and Da Silva, G.J. (2015) Interplay between pathogenicity island carriage, resistance profile and plasmid acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **64**: 828–835.
- Campisi, J., and Fagagna, F. d'Adda di (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 729–740.
- Campregher, C., Luciani, M.G., and Gasche, C. (2008) Activated neutrophils induce an hMSH2-dependent G2/M checkpoint arrest and replication errors at a (CA)₁₃-repeat in colon epithelial cells. *Gut* **57**: 780–787.
- Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**: 330–337.

- Cao, Y., Schlag, P.M., and Karsten, U. (1997) Immunodetection of epithelial mucin (MUC1, MUC3) and mucin-associated glycotopes (TF, Tn, and sialosyl-Tn) in benign and malignant lesions of colonic epithelium: apolar localization corresponds to malignant transformation. *Virchows Arch Int J Pathol* **431**: 159–166.
- Capon, C., Maes, E., Michalski, J.C., Leffler, H., and Kim, Y.S. (2001) Sd(a)-antigen-like structures carried on core 3 are prominent features of glycans from the mucin of normal human descending colon. *Biochem J* **358**: 657–664.
- Caprioli, A., Donelli, G., Falbo, V., Possenti, R., Roda, L.G., Roscetti, G., and Ruggeri, F.M. (1984) A cell division-active protein from *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **118**: 587–593.
- Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L.G., Ruggeri, F.M., and Zona, C. (1983) Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* **39**: 1300–1306.
- Cario, E. (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**: 1182–1193.
- Carlini, F., Maroccia, Z., Fiorentini, C., Travaglione, S., and Fabbri, A. (2021) Effects of the *Escherichia coli* Bacterial Toxin Cytotoxic Necrotizing Factor 1 on Different Human and Animal Cells: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* **22**: 12610.
- Carr, S., and Kasi, A. (2023) Familial Adenomatous Polyposis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538233/>. Accessed September 1, 2023.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., *et al.* (2012) *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* **22**: 299–306.
- Caza, M., Lépine, F., and Dozois, C.M. (2011) Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **80**: 266–282.
- Chakraborty, A., Saralaya, V., Adhikari, P., Shenoy, S., Baliga, S., and Hegde, A. (2015) Characterization of *Escherichia coli* Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population. *Ann Med Health Sci Res* **5**: 241–246.
- Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., and Vijay-Kumar, M. (2014) Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* **104**: 15.25.1-15.25.14.
- Chassaing, B., Compher, C., Bonhomme, B., Liu, Q., Tian, Y., Walters, W., *et al.* (2022) Randomized Controlled-Feeding Study of Dietary Emulsifier Carboxymethylcellulose Reveals Detrimental Impacts on the Gut Microbiota and Metabolome. *Gastroenterology* **162**: 743–756.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015) Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* **519**: 92–96.
- Chaveroche, M.K., Ghigo, J.M., and Enfert, C. d' (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **28**: E97.
- Chen, C.-Y., Hsu, K.-C., Yeh, H.-Y., and Ho, H.-C. (2020a) Visualizing the effects of antibiotics on the mouse colonic mucus layer. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi Tzu-Chi Med J* **32**: 145–153.
- Chen, E.X., Jonker, D.J., Kennecke, H.F., Berry, S.R., Couture, F., Ahmad, C.E., *et al.* (2019) 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). *J Clin Oncol* **37**: 481–481.
- Chen, J., Röcken, C., Lofton-Day, C., Schulz, H.-U., Müller, O., Kutzner, N., *et al.* (2005) Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis* **26**: 37–43.
- Chen, S., Su, T., Zhang, Y., Lee, A., He, J., Ge, Q., *et al.* (2020b) *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer metastasis by modulating KRT7-AS/KRT7. *Gut Microbes* **11**: 511–525.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., and Xiang, C. (2012a) Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* **7**: e39743.
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., and Xiang, C. (2012b) Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **7** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386193/>. Accessed February 1, 2021.

- Chen, Y., Peng, Y., Yu, J., Chen, T., Wu, Y., Shi, L., *et al.* (2017) Invasive *Fusobacterium nucleatum* activates beta-catenin signaling in colorectal cancer via a TLR4/P-PAK1 cascade. *Oncotarget* **8**: 31802–31814.
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J., and Sebti, S.M. (2000) Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem* **275**: 17974–17978.
- Chua, A.C., Klopčič, B., Lawrance, I.C., Olynyk, J.K., and Trinder, D. (2010) Iron: An emerging factor in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol WJG* **16**: 663–672.
- Chung, H.S., and Raetz, C.R.H. (2010) Interchangeable domains in the Kdo transferases of *Escherichia coli* and *Haemophilus influenzae*. *Biochemistry* **49**: 4126–4137.
- Chung, J.W., Hong, S.J., Kim, K.J., Goti, D., Stins, M.F., Shin, S., *et al.* (2003) 37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* **278**: 16857–16862.
- Chung, L., Thiele Orberg, E., Geis, A.L., Chan, J.L., Fu, K., DeStefano Shields, C.E., *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.
- Ciccolallo, L., Capocaccia, R., Coleman, M.P., Berrino, F., Coebergh, J.W.W., Damhuis, R. a. M., *et al.* (2005) Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. *Gut* **54**: 268–273.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* **5**: 58–65.
- Clooney, A.G., Fouhy, F., Sleator, R.D., O’ Driscoll, A., Stanton, C., Cotter, P.D., and Claesson, M.J. (2016) Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. *PLoS One* **11**: e0148028.
- Cloyd, J.M., Chun, Y.S., Ikoma, N., Vauthey, J.N., Aloia, T.A., Cuddy, A., *et al.* (2018) Clinical and Genetic Implications of DNA Mismatch Repair Deficiency in Biliary Tract Cancers Associated with Lynch Syndrome. *J Gastrointest Cancer* **49**: 93–96.
- Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997) *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect Immun* **65**: 5088–5095.
- Cone, R.A. (2009) Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 75–85.
- Contamin, S., Galmiche, A., Doye, A., Flatau, G., Benmerah, A., and Boquet, P. (2000) The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol Biol Cell* **11**: 1775–1787.
- Conway, T., and Cohen, P.S. (2015) Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* **3**.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**: 99–118.
- Costea, P.I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M.J., Bushman, F.D., *et al.* (2018) Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* **3**: 8–16.
- Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., *et al.* (2014) Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* **63**: 1932–1942.
- Cougnoux, A., Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Romagnoli, C., Robin, F., *et al.* (2016) Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut* **65**: 278–285.
- Cougnoux, A., Gibold, L., Robin, F., Dubois, D., Pradel, N., Darfeuille-Michaud, A., *et al.* (2012) Analysis of structure-function relationships in the colibactin-maturing enzyme ClbP. *J Mol Biol* **424**: 203–214.
- Crost, E.H., Tailford, L.E., Monestier, M., Swarbrick, D., Henrissat, B., Crossman, L.C., and Juge, N. (2016) The mucin-degradation strategy of *Ruminococcus gnavus*: The importance of intramolecular trans-sialidases. *Gut Microbes* **7**: 302–312.

- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010) Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**: 26–38.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010) Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11537–11542.
- Cummings, J.H. (1981) Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* **22**: 763–779.
- Cummins, M.L., Reid, C.J., and Djordjevic, S.P. (2022) F Plasmid Lineages in Escherichia coli ST95: Implications for Host Range, Antibiotic Resistance, and Zoonoses. *mSystems* **7**: e0121221.
- Czene, K., Lichtenstein, P., and Hemminki, K. (2002) Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer* **99**: 260–266.
- Dai, Z., Coker, O.O., Nakatsu, G., Wu, W.K.K., Zhao, L., Chen, Z., et al. (2018) Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome* **6**: 70.
- Dalmaso, G., Cougnoux, A., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., and Bonnet, R. (2014) The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes* **5**: 675–680.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640–6645.
- Dautin, N. (2010) Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins* **2**: 1179–1206.
- 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.
- Defosse, G., Uhry, Z., Delafosse, P., Dantony, E., Almeida, T. d', Plouvier, S., et al. (2021) Cancer incidence and mortality trends in France over 1990–2018 for solid tumors: the sex gap is narrowing. *BMC Cancer* **21**: 726.
- Delmas, J., Dalmaso, G., and Bonnet, R. (2015) Escherichia coli: The Good, the Bad and the Ugly. *Clin Microbiol Open Access* **4**: 1–3.
- Demouveau, B., Gouyer, V., Magnien, M., Plet, S., Gottrand, F., Narita, T., and Desseyn, J.-L. (2018) La structure des mucines conditionne les propriétés viscoélastiques des gels de mucus. *médecine/sciences* **34**: 806–812.
- Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., et al. (2016) A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **167**: 1339–1353.e21.
- Desvaux, M., Dalmaso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., and Bonnet, R. (2020) Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal Escherichia coli. *Front Microbiol* **11**: 2065.
- Desvaux, M., Parham, N., and Henderson, I.R. (2004) The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* **155**: 53–60.
- Dhakal, B.K., and Mulvey, M.A. (2012) The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe* **11**: 58–69.
- Dharmani, P., Srivastava, V., Kissoon-Singh, V., and Chadee, K. (2009) Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun* **1**: 123–135.
- Díaz, J.M., Dozois, C.M., Avelar-González, F.J., Hernández-Cuellar, E., Pokharel, P., Santiago, A.S. de, and Guerrero-Barrera, A.L. (2020) The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of Escherichia coli Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol* **10**: 299.
- Dominguez, C., McCampbell, K.K., David, J.M., and Palena, C. (2017) Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer. *JCI Insight* **2**: e94296, 94296.
- Dominguez-Bello, M.G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., and Blaser, M.J. (2019) Role of the microbiome in human development. *Gut* **68**: 1108–1114.

- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2016) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* **14**: 20–32.
- Dorier, M., Béal, D., Marie-Desvergne, C., Dubosson, M., Barreau, F., Houdeau, E., *et al.* (2017) Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology* **11**: 751–761.
- Dougherty, M.W., and Jobin, C. (2021) Shining a Light on Colibactin Biology. *Toxins* **13**: 346.
- Dougherty, M.W., and Jobin, C. (2023) Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. *Gut Microbes* **15**: 2185028.
- Dougherty, M.W., Valdés-Mas, R., Wernke, K.M., Gharaibeh, R.Z., Yang, Y., Brant, J.O., *et al.* (2023) The microbial genotoxin colibactin exacerbates mismatch repair mutations in colorectal tumors. *Neoplasia N Y N* **43**: 100918.
- Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., *et al.* (2002) CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* **111**: 553–564.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., and Curtiss, R. (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**: 4145–4154.
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., *et al.* (2013) Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog* **9**: e1003141.
- Driver, J.A., Gaziano, J.M., Gelber, R.P., Lee, I.-M., Buring, J.E., and Kurth, T. (2007) Development of a risk score for colorectal cancer in men. *Am J Med* **120**: 257–263.
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2022) Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol* **13**: 812774.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., *et al.* (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol Read Engl* **147**: 1671–1676.
- Dziubańska-Kusibab, P.J., Berger, H., Battistini, F., Bouwman, B.A.M., Iftekhhar, A., Katainen, R., *et al.* (2020) Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat Med* **26**: 1063–1069.
- Earle, K.A., Billings, G., Sigal, M., Lichtman, J.S., Hansson, G.C., Elias, J.E., *et al.* (2015) Quantitative Imaging of Gut Microbiota Spatial Organization. *Cell Host Microbe* **18**: 478–488.
- Edgar, R.C. (2018) Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences. *PeerJ* **6**: e4652.
- El Aidy, S., Baarlen, P. van, Derrien, M., Lindenbergh-Kortleve, D.J., Hooiveld, G., Levenez, F., *et al.* (2012) Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunol* **5**: 567–579.
- Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C.A., Hu, B., Jin, C., and Flavell, R.A. (2013) Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and glycosms. *Nat Rev Cancer* **13**: 759–771.
- Elzinga, J., Lugt, B. van der, Belzer, C., and Steegenga, W.T. (2021) Characterization of increased mucus production of HT29-MTX-E12 cells grown under Semi-Wet interface with Mechanical Stimulation. *PLoS One* **16**: e0261191.
- Engevik, M.A., Engevik, A.C., Engevik, K.A., Auchtung, J.M., Chang-Graham, A.L., Ruan, W., *et al.* (2021) Mucin-Degrading Microbes Release Monosaccharides That Chemoattract *Clostridioides difficile* and Facilitate Colonization of the Human Intestinal Mucus Layer. *ACS Infect Dis* **7**: 1126–1142.
- Erdem, A.L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., and Girón, J.A. (2007) Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 7426–7435.
- Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., and Hansson, G.C. (2013) Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **305**: G341–G347.
- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., *et al.* (2004) Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5698–5700.

- Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., *et al.* (2006) Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* **8**: 1975–1984.
- Escoula, Q., Bellenger, S., Narce, M., and Bellenger, J. (2019) Docosaehaenoic and Eicosaehaenoic Acids Prevent Altered-Muc2 Secretion Induced by Palmitic Acid by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in LS174T Goblet Cells. *Nutrients* **11**: E2179.
- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Desvaux, M., De Paepe, K., Gresse, R., Sauvaitre, T., *et al.* (2019) Experimental models to study intestinal microbes-mucus interactions in health and disease. *FEMS Microbiol Rev* **43**: 457–489.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., *et al.* (2013) Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 9066–9071.
- Fabbri, A., and Bracci, L. (2022) Immunomodulatory properties of CNF1 toxin from *E. coli*: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Cancer Res* **12**: 651–660.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Ballan, G., Loizzo, S., and Fiorentini, C. (2013) The cytotoxic necrotizing factor 1 from *E. coli*: a janus toxin playing with cancer regulators. *Toxins* **5**: 1462–1474.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Rosadi, F., Ballan, G., Maroccia, Z., Giambenedetti, M., *et al.* (2020) The *Escherichia coli* protein toxin cytotoxic necrotizing factor 1 induces epithelial mesenchymal transition. *Cell Microbiol* **22**: e13138.
- Fabich, A.J., Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., *et al.* (2008) Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* **76**: 1143–1152.
- Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., *et al.* (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**: 194–198.
- Faís, T., Cougnoux, A., Dalmasso, G., Laurent, F., Delmas, J., and Bonnet, R. (2016) Antibiotic Activity of *Escherichia coli* against Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 6986–6988.
- Falbo, V., Pace, T., Picci, L., Pizzi, E., and Caprioli, A. (1993) Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **61**: 4909–4914.
- 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.
- Favier, A. (2006) Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr* **64**: 390–396.
- Feng, Q., Liang, S., Jia, H., Stadlmayr, A., Tang, L., Lan, Z., *et al.* (2015) Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Nat Commun* **6**: 6528.
- Fiorentini, C., Fabbri, A., Flatau, G., Donelli, G., Matarrese, P., Lemichez, E., *et al.* (1997) *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *J Biol Chem* **272**: 19532–19537.
- Fiorentini, C., Falzano, L., Fabbri, A., Stringaro, A., Logozzi, M., Travaglione, S., *et al.* (2001) Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **12**: 2061–2073.
- Fiorentini, C., Matarrese, P., Straface, E., Falzano, L., Donelli, G., Boquet, P., and Malorni, W. (1998) Rho-dependent cell spreading activated by *E. coli* cytotoxic necrotizing factor 1 hinders apoptosis in epithelial cells. *Cell Death Differ* **5**: 921–929.
- Fischbach, M.A., and Sonnenburg, J.L. (2011) Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe* **10**: 336–347.
- Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997) Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**: 729–733.
- Flier, L.G. van der, and Clevers, H. (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* **71**: 241–260.
- Frantz, A.L., Rogier, E.W., Weber, C.R., Shen, L., Cohen, D.A., Fenton, L.A., *et al.* (2012) Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with

- downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol* **5**: 501–512.
- Fu, C., Zhao, H., Wang, Y., Cai, H., Xiao, Y., Zeng, Y., and Chen, H. (2016) Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA* **88**: 275–286.
- Fu, J., Wei, B., Wen, T., Johansson, M.E.V., Liu, X., Bradford, E., *et al.* (2011) Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* **121**: 1657–1666.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., *et al.* (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**: 446–450.
- Gagnière, J., Bonnin, V., Jarrousse, A.-S., Cardamone, E., Agus, A., Uhrhammer, N., *et al.* (2017) Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin Sci Lond Engl 1979* **131**: 471–485.
- Gagnière, J., Raisch, J., Veziat, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., *et al.* (2016) Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **22**: 501–518.
- Gaines, S., Praagh, J.B. van, Williamson, A.J., Jacobson, R.A., Hyoju, S., Zaborin, A., *et al.* (2020) Western Diet Promotes Intestinal Colonization by Collagenolytic Microbes and Promotes Tumor Formation After Colorectal Surgery. *Gastroenterology* **158**: 958-970.e2.
- Gao, R., Gao, Z., Huang, L., and Qin, H. (2017) Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **36**: 757–769.
- Gaudier, E., and Hoebler, C. (2006) [Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity]. *Gastroenterol Clin Biol* **30**: 965–974.
- Gendler, S.J. (2001) MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**: 339–353.
- Gianotti, R.J., and Moss, A.C. (2017) Fecal Microbiota Transplantation: From *Clostridium difficile* to Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol* **13**: 209–213.
- Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., *et al.* (2016) The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **18**: 617–631.
- Gillois, K., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., and Mercier-Bonin, M. (2018) Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives. *Microorganisms* **6**: 53.
- Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M.E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., *et al.* (2010) CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest* **120**: 485–497.
- Goodrich, J.K., Davenport, E.R., Beaumont, M., Jackson, M.A., Knight, R., Ober, C., *et al.* (2016) Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* **19**: 731–743.
- Goodwin, A.C., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Huso, D.L., Wu, X., Murray-Stewart, T.R., *et al.* (2011) Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15354–15359.
- Gram, I.T., Park, S.-Y., Wilkens, L.R., Haiman, C.A., and Le Marchand, L. (2020) Smoking-Related Risks of Colorectal Cancer by Anatomical Subsite and Sex. *Am J Epidemiol* **189**: 543–553.
- Graziani, F., Pujol, A., Nicoletti, C., Dou, S., Maresca, M., Giardina, T., *et al.* (2016) *Ruminococcus gnavus* E1 modulates mucin expression and intestinal glycosylation. *J Appl Microbiol* **120**: 1403–1417.
- Grys, T.E., Siegel, M.B., Lathem, W.W., and Welch, R.A. (2005) The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* **73**: 1295–1303.
- Guo, P., Tian, Z., Kong, X., Yang, L., Shan, X., Dong, B., *et al.* (2020) FadA promotes DNA damage and progression of *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal cancer through up-regulation of chk2. *J Exp Clin Cancer Res CR* **39**: 202.
- Gustafsson, J.K., Davis, J.E., Rappai, T., McDonald, K.G., Kulkarni, D.H., Knoop, K.A., *et al.* (2021) Intestinal goblet cells sample and deliver luminal antigens by regulated endocytic uptake and transcytosis. *eLife* **10**: e67292.
- Gustafsson, J.K., Sjövall, H., and Hansson, G.C. (2012) Ex vivo measurements of mucus secretion by colon explants. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **842**: 237–243.

- Gutiérrez, D., Pardo, M., Montero, D., Oñate, A., Farfán, M.J., Ruiz-Pérez, F., *et al.* (2015) TleA, a Tsh-like autotransporter identified in a human enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **83**: 1893–1903.
- Habouria, H., Pokharel, P., Maris, S., Garénaux, A., Bessaiah, H., Houle, S., *et al.* (2019) Three new serine-protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. *Virulence* **10**: 568–587.
- Hahn, A., Barth, H., Kress, M., Mertens, P.R., and Goppelt-Struebe, M. (2002) Role of Rac and Cdc42 in lysophosphatidic acid-mediated cyclo-oxygenase-2 gene expression. *Biochem J* **362**: 33–40.
- Han, C., Shin, A., Lee, J., Lee, J., Park, J.W., Oh, J.H., and Kim, J. (2015) Dietary calcium intake and the risk of colorectal cancer: a case control study. *BMC Cancer* **15**: 966.
- Han, Y.W. (2015) *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol* **23**: 141–147.
- Haqqani, A.S., Sandhu, J.K., and Birnboim, H.C. (2000) Expression of Interleukin-8 Promotes Neutrophil Infiltration and Genetic Instability in Mutatect Tumors. *Neoplasia N Y N* **2**: 561–568.
- Harnack, C., Berger, H., Liu, L., Mollenkopf, H.-J., Strowig, T., and Sigal, M. (2023) Short-term mucosal disruption enables colibactin-producing *E. coli* to cause long-term perturbation of colonic homeostasis. *Gut Microbes* **15**: 2233689.
- Harrington, S.M., Sheikh, J., Henderson, I.R., Ruiz-Perez, F., Cohen, P.S., and Nataro, J.P. (2009) The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun* **77**: 2465–2473.
- Hayes, C.L., Dong, J., Galipeau, H.J., Jury, J., McCarville, J., Huang, X., *et al.* (2018) Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Sci Rep* **8**: 14184.
- Henderson, I.R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., and Nataro, J.P. (1999) Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**: 5587–5596.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **68**: 692–744.
- Hews, C.L., Tran, S., Wegmann, U., Brett, B., Walsham, A.D.S., Kavanaugh, D., *et al.* (2017) The StcE metalloprotease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* reduces the inner mucus layer and promotes adherence to human colonic epithelium ex vivo. *Cell Microbiol* **19** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5434857/>. Accessed March 31, 2020.
- Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* **4**: 45–60.
- Holmén Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Karlsson, H., and Hansson, G.C. (2013) *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **305**: G357–G363.
- Homann, N., Tillonen, J., and Salaspuro, M. (2000) Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. *Int J Cancer* **86**: 169–173.
- Homburg, S., Oswald, E., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2007) Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **275**: 255–262.
- Hosios, A.M., and Vander Heiden, M.G. (2014) Acetate metabolism in cancer cells. *Cancer Metab* **2**: 27.
- Hossain, M.S., Karuniawati, H., Jairoun, A.A., Urbi, Z., Ooi, D.J., John, A., *et al.* (2022) Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* **14**: 1732.
- Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W., and Van de Wiele, T. (2011) Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev* **69**: 245–258.
- Howe, J.R., Mitros, F.A., and Summers, R.W. (1998) The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol* **5**: 751–756.
- Huang, J., Che, M.-I., Huang, Y.-T., Shyu, M.-K., Huang, Y.-M., Wu, Y.-M., *et al.* (2009) Overexpression of MUC15 activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes the oncogenic potential of human colon cancer cells. *Carcinogenesis* **30**: 1452–1458.

- Huelsenbeck, S.C., Roggenkamp, D., May, M., Huelsenbeck, J., Brakebusch, C., Rottner, K., *et al.* (2013) Expression and cytoprotective activity of the small GTPase RhoB induced by the Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1. *Int J Biochem Cell Biol* **45**: 1767–1775.
- Iftexhar, A., Berger, H., Bouznad, N., Heuberger, J., Boccellato, F., Dobrindt, U., *et al.* (2021) Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing E. coli transform primary colon epithelial cells. *Nat Commun* **12**: 1003.
- Ijssennagger, N., Belzer, C., Hooiveld, G.J., Dekker, J., Mil, S.W.C. van, Müller, M., *et al.* (2015) Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 10038–10043.
- Imai, Y., Yamagishi, H., Fukuda, K., Ono, Y., Inoue, T., and Ueda, Y. (2013) Differential mucin phenotypes and their significance in a variation of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* **19**: 3957–3968.
- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.-K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., *et al.* (2006) Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3920–3925.
- Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium (2019) The Integrative Human Microbiome Project. *Nature* **569**: 641–648.
- Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S.E., Martin, A., and Philpott, D.J. (2014) The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol Cell* **54**: 309–320.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247–269.
- Jakobsson, H.E., Rodríguez-Piñero, A.M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., *et al.* (2015) The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* **16**: 164–177.
- Jans, M., Kolata, M., Blancke, G., Ciers, M., Dohlman, A.B., Kusakabe, T., *et al.* (2023) Colibactin-induced genotoxicity and colorectal cancer exacerbation critically depends on adhesin-mediated epithelial binding. *BioRxiv Prepr Serv Biol* 2023.08.16.553526.
- Jay, P. (2021) Un moteur hybride pour propulser le tapis roulant de l'épithélium intestinal. *médecine/sciences* **37**: 701–703.
- Jin, C., Xia, J., Wu, S., Tu, W., Pan, Z., Fu, Z., *et al.* (2018) Insights Into a Possible Influence on Gut Microbiota and Intestinal Barrier Function During Chronic Exposure of Mice to Imazalil. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* **162**: 113–123.
- Jin, L.Z., Marquardt, R.R., Baidoo, S.K., and Frohlich, A.A. (2000) Characterization and purification of porcine small intestinal mucus receptor for Escherichia coli K88ac fimbrial adhesin. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**: 17–22.
- Joensen, K.G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M., and Aarestrup, F.M. (2014) Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic Escherichia coli. *J Clin Microbiol* **52**: 1501–1510.
- Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., *et al.* (2014) Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**: 281–291.
- Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016) Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* **16**: 639–649.
- Johansson, M.E.V., Jakobsson, H.E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñero, A.M., *et al.* (2015) Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host Microbe* **18**: 582–592.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15064–15069.
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., and Hansson, G.C. (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**: 352–361.
- Johnson, C.M., Wei, C., Ensor, J.E., Smolenski, D.J., Amos, C.I., Levin, B., and Berry, D.A. (2013) Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control CCC* **24**: 1207–1222.
- Johnson, J.R. (1991) Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**: 80–128.

- Joshi, S., Kumar, S., Bafna, S., Rachagani, S., Wagner, K.-U., Jain, M., and Batra, S.K. (2015) Genetically engineered mucin mouse models for inflammation and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **34**: 593–609.
- Ju, J.A., and Gilkes, D.M. (2018) RhoB: Team Oncogene or Team Tumor Suppressor? *Genes* **9**: 67.
- Ju, T., Aryal, R.P., Kudelka, M.R., Wang, Y., and Cummings, R.D. (2014) The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomark Sect Dis Markers* **14**: 63–81.
- Juge, N. (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol* **20**: 30–39.
- Kaiko, G.E., Ryu, S.H., Koues, O.I., Collins, P.L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E.J., *et al.* (2016) The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. *Cell* **165**: 1708–1720.
- Kamphuis, J.B.J., Mercier-Bonin, M., Eutamène, H., and Theodorou, V. (2017) Mucus organisation is shaped by colonic content; a new view. *Sci Rep* **7**: 8527.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., Ossowski, I. von, Reunanen, J., Partanen, P., *et al.* (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 17193–17198.
- Kaur, K., Saxena, A., Debnath, I., O'Brien, J.L., Ajami, N.J., Auchtung, T.A., *et al.* (2018) Antibiotic-mediated bacteriome depletion in *ApcMin/+* mice is associated with reduction in mucus-producing goblet cells and increased colorectal cancer progression. *Cancer Med* **7**: 2003–2012.
- Kesari, M.V., Gaopande, V.L., Joshi, A.R., Babanagare, S.V., Gogate, B.P., and Khadilkar, A.V. (2015) Immunohistochemical study of MUC1, MUC2 and MUC5AC in colorectal carcinoma and review of literature. *Indian J Gastroenterol Off J Indian Soc Gastroenterol* **34**: 63–67.
- Khodaverdi, N., Zeighami, H., Jalilvand, A., Haghi, F., and Hesami, N. (2021) High frequency of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Enterococcus faecalis* in the paraffin-embedded tissues of Iranian colorectal cancer patients. *BMC Cancer* **21**: 1353.
- Kim, J., Braun, D., Ukaegbu, C., Dhingra, T.G., Kastrinos, F., Parmigiani, G., *et al.* (2020) Clinical Factors Associated With Gastric Cancer in Individuals with Lynch Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* **18**: 830-837.e1.
- Kim, J., and Lee, H.K. (2022) Potential Role of the Gut Microbiome In Colorectal Cancer Progression. *Front Immunol* **12**: 807648.
- Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* **12**: 319–330.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., and Hocevar, B.A. (2010) Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* **38**: 96–109.
- Klemm, P., and Schembri, M.A. (2000) Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol IJMM* **290**: 27–35.
- Knoop, K.A., McDonald, K.G., McCrate, S., McDole, J.R., and Newberry, R.D. (2015) Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal Immunol* **8**: 198–210.
- Knust, Z., and Schmidt, G. (2010) Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Growing Toxin Family. *Toxins* **2**: 116–127.
- Kobayashi, R.K.T., Gaziri, L.C.J., Venancio, E.J., and Vidotto, M.C. (2007) Detection of Tsh protein mucinolytic activity by SDS-PAGE. *J Microbiol Methods* **68**: 654–655.
- Kocsis, B., Gulyás, D., and Szabó, D. (2022) Emergence and Dissemination of Extraintestinal Pathogenic High-Risk International Clones of *Escherichia coli*. *Life* **12**: 2077.
- Koeneman, B.A., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J.C., and Capco, D.G. (2010) Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol Toxicol* **26**: 225–238.
- Komiya, Y., Shimomura, Y., Higurashi, T., Sugi, Y., Arimoto, J., Umezawa, S., *et al.* (2019) Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut* **68**: 1335–1337.
- Korpela, K., and Vos, W.M. de (2018) Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *Curr Opin Microbiol* **44**: 70–78.

- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., *et al.* (2013) *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* **14**: 207–215.
- Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., *et al.* (2012) Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* **22**: 292–298.
- Kumar, P., Luo, Q., Vickers, T.J., Sheikh, A., Lewis, W.G., and Fleckenstein, J.M. (2014) EatA, an immunogenic protective antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*, degrades intestinal mucin. *Infect Immun* **82**: 500–508.
- Kumari, R., and Jat, P. (2021) Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol* **9**: 645593.
- Kunzmann, A.T., Murray, L.J., Cardwell, C.R., McShane, C.M., McMenamin, U.C., and Cantwell, M.M. (2013) PTGS2 (Cyclooxygenase-2) expression and survival among colorectal cancer patients: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **22**: 1490–1497.
- Lai, Y.-R., Chang, Y.-F., Ma, J., Chiu, C.-H., Kuo, M.-L., and Lai, C.-H. (2021) From DNA Damage to Cancer Progression: Potential Effects of Cytolethal Distending Toxin. *Front Immunol* **12**: 760451.
- Landraud, L., Gibert, M., Popoff, M.R., Boquet, P., and Gauthier, M. (2003) Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol* **47**: 1653–1667.
- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Woo, G.K.S., Fung, A.M.Y., Ngan, A.H.Y., Song, Y., *et al.* (2006) Bacteraemia caused by *Anaerotruncus colihominis* and emended description of the species. *J Clin Pathol* **59**: 748–752.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., *et al.* (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**: 541–546.
- Lee, K.-H., Chen, W.-S., Jiang, J.-K., Yang, S.-H., Wang, H.-S., Chang, S.-C., *et al.* (2021) The efficacy of anti-EGFR therapy in treating metastatic colorectal cancer differs between the middle/low rectum and the left-sided colon. *Br J Cancer* **125**: 816–825.
- Lee, M.S., Hyun, H., Park, I., Kim, S., Jang, D.-H., Kim, S., *et al.* (2022) Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) of Magnetically Confined Bacteria Enables Early Detection of Human Bacteremia. *Small Methods* **6**: e2101239.
- Leeming, E.R., Johnson, A.J., Spector, T.D., and Le Roy, C.I. (2019) Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients* **11**: 2862.
- Lemke, G. (2019) How macrophages deal with death. *Nat Rev Immunol* **19**: 539–549.
- Lemonnier, M., Landraud, L., and Lemichez, E. (2007) Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 515–534.
- Li, D., Elankumaran, P., Kudinha, T., Kidsley, A.K., Trott, D.J., Jarocki, V.M., and Djordjevic, S.P. (2023) Dominance of *Escherichia coli* sequence types ST73, ST95, ST127 and ST131 in Australian urine isolates: a genomic analysis of antimicrobial resistance and virulence linked to F plasmids. *Microb Genomics* **9**: mgen001068.
- Li, Y., Kundu, P., Seow, S.W., Matos, C.T. de, Aronsson, L., Chin, K.C., *et al.* (2012) Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice. *Carcinogenesis* **33**: 1231–1238.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., *et al.* (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* **343**: 78–85.
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., *et al.* (2015) Ocean plankton. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science* **348**: 1262073.
- Lin, T.-C., Chien, W.-C., Hu, J.-M., Tzeng, N.-S., Chung, C.-H., Pu, T.-W., *et al.* (2020) Risk of colorectal cancer in patients with alcoholism: A nationwide, population-based nested case-control study. *PLoS ONE* **15**: e0232740.
- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P., and Prendergast, G.C. (2001) RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* **21**: 6906–6912.

- Liu, Q.-Q., Li, C.-M., Fu, L.-N., Wang, H.-L., Tan, J., Wang, Y.-Q., *et al.* (2020) Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* induces the stemness in colorectal cancer via upregulating histone demethylase JMJD2B. *Gut Microbes* **12**: 1788900.
- Liu, Y., Fu, K., Wier, E.M., Lei, Y., Hodgson, A., Xu, D., *et al.* (2022) Bacterial Genotoxin Accelerates Transient Infection-Driven Murine Colon Tumorigenesis. *Cancer Discov* **12**: 236–249.
- Loizzo, S., Rimondini, R., Travaglione, S., Fabbri, A., Guidotti, M., Ferri, A., *et al.* (2013) CNF1 increases brain energy level, counteracts neuroinflammatory markers and rescues cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**: e65898.
- Loonen, L.M.P., Stolte, E.H., Jaklofsky, M.T.J., Meijerink, M., Dekker, J., Baarlen, P. van, and Wells, J.M. (2014) REG3 γ -deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunol* **7**: 939–947.
- Lopès, A., Billard, E., Casse, A.H., Villéger, R., Veziant, J., Roche, G., *et al.* (2020) Colibactin-positive *Escherichia coli* induce a procarcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer. *Int J Cancer* **146**: 3147–3159.
- Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M.-C., Ruiz, A.F., Kalegari, P., and Ferbeyre, G. (2019) The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **117**: 15–22.
- Lotfollahzadeh, S., Recio-Boiles, A., and Cagir, B. (2023) Colon Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>. Accessed August 30, 2023.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**: 220–230.
- Lu, Y., Chen, J., Zheng, J., Hu, G., Wang, J., Huang, C., *et al.* (2016) Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Sci Rep* **6**: 26337.
- Lucas, C., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2017) Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **18**.
- Lucas, C., Salesse, L., Hoang, M.H.T., Bonnet, M., Sauvanet, P., Larabi, A., *et al.* (2020) Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ Mice. *Gastroenterology* **158**: 1373–1388.
- Macedonia, M.C., Drewes, J.L., Markham, N.O., Simmons, A.J., Roland, J.T., Vega, P.N., *et al.* (2020) Clinically adaptable polymer enables simultaneous spatial analysis of colonic tissues and biofilms. *Npj Biofilms Microbiomes* **6**: 1–10.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* **288**: 2222–2226.
- Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 478–485.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.-E., and Brandtzaeg, P. (2008) The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* **1**: 11–22.
- Magalhaes, Y.T., Farias, J.O., Silva, L.E., and Forti, F.L. (2021) GTPases, genome, actin: A hidden story in DNA damage response and repair mechanisms. *DNA Repair* **100**: 103070.
- Mah, L.-J., El-Osta, A., and Karagiannis, T.C. (2010) γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**: 679–686.
- Manges, A.R., Geum, H.M., Guo, A., Edens, T.J., Fibke, C.D., and Pitout, J.D.D. (2019) Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Rev* **32**: e00135-18.
- Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., Hall, N., Peters, W.H.M., Roelofs, R., Boleij, A., and Tjalsma, H. (2011) Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* **6**: e20447.
- Mariotto, A.B., Enewold, L., Zhao, J., Zeruto, C.A., and Yabroff, K.R. (2020) Medical Care Costs Associated with Cancer Survivorship in the United States. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **29**: 1304–1312.
- Martens, E.C., Chiang, H.C., and Gordon, J.I. (2008) Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* **4**: 447–457.

- Martens, E.C., Neumann, M., and Desai, M.S. (2018) Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. *Nat Rev Microbiol* **16**: 457–470.
- Marteyn, B., West, N.P., Browning, D.F., Cole, J.A., Shaw, J.G., Palm, F., *et al.* (2010) Modulation of Shigella virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **465**: 355–358.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpfu, C., Nayar, M., Singh, R., *et al.* (2004) Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**: 80–93.
- Matsumoto, M., Inoue, R., Tsukahara, T., Ushida, K., Chiji, H., Matsubara, N., and Hara, H. (2008) Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 572–576.
- Mayer, E.A., Nance, K., and Chen, S. (2022) The Gut-Brain Axis. *Annu Rev Med* **73**: 439–453.
- Mayrand, D., and Holt, S.C. (1988) Biology of asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species. *Microbiol Rev* **52**: 134–152.
- Mazieres, J., Antonia, T., Daste, G., Muro-Cacho, C., Berchery, D., Tillement, V., *et al.* (2004) Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **10**: 2742–2750.
- McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* **8**: e61217.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**: 298–300.
- Mills, M., Meysick, K.C., and O'Brien, A.D. (2000) Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1 of Uropathogenic Escherichia coli Kills Cultured Human Uroepithelial 5637 Cells by an Apoptotic Mechanism. *Infect Immun* **68**: 5869–5880.
- Mima, K., Nishihara, R., Qian, Z.R., Cao, Y., Sukawa, Y., Nowak, J.A., *et al.* (2016) Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* **65**: 1973–1980.
- Moore, W.E., and Holdeman, L.V. (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* **27**: 961–979.
- Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C.J., Laversanne, M., *et al.* (2023) Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut* **72**: 338–344.
- Moschos, S.J., and Mantzoros, C.S. (2002) The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* **63**: 317–332.
- Mousa, J.J., Yang, Y., Tomkovich, S., Shima, A., Newsome, R.C., Tripathi, P., *et al.* (2016) MATE transport of the E. coli-derived genotoxin colibactin. *Nat Microbiol* **1**: 1–7.
- Munro, P., Flatau, G., Doye, A., Boyer, L., Oregioni, O., Mege, J.-L., *et al.* (2004) Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem* **279**: 35849–35857.
- Munro, P., and Lemichez, E. (2005) Bacterial toxins activating Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol* **291**: 177–190.
- Na, S.-Y., Kim, K.B., Lim, Y.J., and Song, H.J. (2022) Vitamin D and Colorectal Cancer: Current Perspectives and Future Directions. *J Cancer Prev* **27**: 147–156.
- Navabi, N., McGuckin, M.A., and Lindén, S.K. (2013) Gastrointestinal cell lines form polarized epithelia with an adherent mucus layer when cultured in semi-wet interfaces with mechanical stimulation. *PLoS One* **8**: e68761.
- Navarro-Garcia, F., Gutierrez-Jimenez, J., Garcia-Tovar, C., Castro, L.A., Salazar-Gonzalez, H., and Cordova, V. (2010) Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun* **78**: 4101–4109.
- Nesta, B., Valeri, M., Spagnuolo, A., Rosini, R., Mora, M., Donato, P., *et al.* (2014) SsIE elicits functional antibodies that impair in vitro mucinase activity and in vivo colonization by both intestinal and extraintestinal Escherichia coli strains. *PLoS Pathog* **10**: e1004124.
- Ng, K.M., Ferreyra, J.A., Higginbottom, S.K., Lynch, J.B., Kashyap, P.C., Gopinath, S., *et al.* (2013) Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* **502**: 96–99.

- Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., and Raes, J. (2015) How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech* **8**: 1–16.
- Ni, J., Wu, G.D., Albenberg, L., and Tomov, V.T. (2017) Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**: 573–584.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., *et al.* (2006) *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**: 848–851.
- 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.
- Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., Zoete, M.R. de, Palm, N.W., Bailis, W., *et al.* (2015) Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell* **163**: 1444–1456.
- Ogino, S., and Goel, A. (2008) Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. *J Mol Diagn JMD* **10**: 13–27.
- Olivier, S., Mir, A.-M., Michalski, J.-C., and Lefebvre, T. (2011) [Signaling and metabolic predispositions linked to the colorectal cancer]. *Med Sci MS* **27**: 514–520.
- Orden, J.A., Domínguez-Bernal, G., Martínez-Pulgarín, S., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., *et al.* (2007) Necrotogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* **10**: 47–55.
- Oswald, E., and De Rycke, J. (1990) A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the *Vir* plasmid of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **56**: 279–284.
- Oswald, E., Pohl, P., Jacquemin, E., Lintermans, P., Van Muylem, K., O'Brien, A.D., and Mainil, J. (1994) Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotising factor type 1 or type 2. *J Med Microbiol* **40**: 428–434.
- Otto, B.R., Sijbrandi, R., Luirink, J., Oudega, B., Heddle, J.G., Mizutani, K., *et al.* (2005) Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 17339–17345.
- Ouwerkerk, J.P., Vos, W.M. de, and Belzer, C. (2013) Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **27**: 25–38.
- Pagnini, C., Corleto, V.D., Mangoni, M.L., Pillozzi, E., Torre, M.S., Marchese, R., *et al.* (2011) Alteration of local microflora and α -defensins hyper-production in colonic adenoma mucosa. *J Clin Gastroenterol* **45**: 602–610.
- Pakbin, B., Brück, W.M., and Rossen, J.W.A. (2021) Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci* **22**: 9922.
- Pan, X., Chen, R., Zhang, Y., Zhu, Y., Zhao, J., Yao, H., and Ma, J. (2023) Porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* delivers two serine protease autotransporters coordinately optimizing the bloodstream infection. *Front Cell Infect Microbiol* **13**: 1138801.
- Paone, P., and Cani, P.D. (2020) Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* **69**: 2232–2243.
- Papillon, E., Bonaz, B., and Fournet, J. (1999) [Short chain fatty acids: effects on gastrointestinal function and therapeutic potential in gastroenterology]. *Gastroenterol Clin Biol* **23**: 761–769.
- Parham, N.J., Srinivasan, U., Desvaux, M., Foxman, B., Marrs, C.F., and Henderson, I.R. (2004) PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 73–83.
- Passel, M.W.J. van, Kant, R., Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Derrien, M., Malfatti, S.A., *et al.* (2011) The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PloS One* **6**: e16876.
- Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., and Pop, M. (2013) Robust methods for differential abundance analysis in marker gene surveys. *Nat Methods* **10**: 1200–1202.
- Payros, D., Dobrindt, U., Martin, P., Secher, T., Bracarense, A.P.F.L., Boury, M., *et al.* (2017) The Food Contaminant Deoxynivalenol Exacerbates the Genotoxicity of Gut Microbiota. *mBio* **8**: e00007-17.

- Payros, D., Secher, T., Boury, M., Brehin, C., Ménard, S., Salvador-Cartier, C., *et al.* (2014) Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* **5**: 313–325.
- Pedersen, A., Johansen, C., and Grønbaek, M. (2003) Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* **52**: 861–867.
- Pedram, K., Shon, D.J., Tender, G.S., Mantuano, N.R., Northey, J.J., Metcalf, K.J., *et al.* (2023) Design of a mucin-selective protease for targeted degradation of cancer-associated mucins. *Nat Biotechnol* 1–11.
- Pei, S., Doye, A., and Boquet, P. (2001) Mutation of specific acidic residues of the CNF1 T domain into lysine alters cell membrane translocation of the toxin. *Mol Microbiol* **41**: 1237–1247.
- Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.P., Herault, F., Tasca, C., *et al.* (1997) A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol* **24**: 1095–1107.
- Perez-Vilar, J., Eckhardt, A.E., DeLuca, A., and Hill, R.L. (1998) Porcine submaxillary mucin forms disulfide-linked multimers through its amino-terminal D-domains. *J Biol Chem* **273**: 14442–14449.
- Peters, R.J.B., Bommel, G. van, Herrera-Rivera, Z., Helsper, H.P.F.G., Marvin, H.J.P., Weigel, S., *et al.* (2014) Characterization of Titanium Dioxide Nanoparticles in Food Products: Analytical Methods To Define Nanoparticles. *J Agric Food Chem* **62**: 6285–6293.
- Piciocchi, A., Germinario, E.A.P., Garcia Etxebarria, K., Rossi, S., Sanchez-Mete, L., Porowska, B., *et al.* (2021) Association of Polygenic Risk Score and Bacterial Toxins at Screening Colonoscopy with Colorectal Cancer Progression: A Multicenter Case-Control Study. *Toxins* **13**: 569.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010) THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON CANCER. *Gastroenterology* **138**: 2059–2072.
- Pino, M.S., Mino-Kenudson, M., Wildemore, B.M., Ganguly, A., Batten, J., Sperduti, I., *et al.* (2009) Deficient DNA Mismatch Repair Is Common in Lynch Syndrome-Associated Colorectal Adenomas. *J Mol Diagn JMD* **11**: 238–247.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Rosendahl Huber, A., Hoeck, A. van, Wood, H.M., Nomburg, J., *et al.* (2020) Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* **580**: 269–273.
- Png, C.W., Lindén, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., *et al.* (2010) Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* **105**: 2420–2428.
- Poretsky, R., Rodriguez-R, L.M., Luo, C., Tsementzi, D., and Konstantinidis, K.T. (2014) Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One* **9**: e93827.
- Porkka, N., Lahtinen, L., Ahtiainen, M., Böhm, J.P., Kuopio, T., Eldfors, S., *et al.* (2019) Epidemiological, clinical and molecular characterization of Lynch-like syndrome: A population-based study. *Int J Cancer* **145**: 87–98.
- Porter, N.T., and Martens, E.C. (2017) The Critical Roles of Polysaccharides in Gut Microbial Ecology and Physiology. *Annu Rev Microbiol* **71**: 349–369.
- Pothuraju, R., Krishn, S.R., Gautam, S.K., Pai, P., Ganguly, K., Chaudhary, S., *et al.* (2020) Mechanistic and Functional Shades of Mucins and Associated Glycans in Colon Cancer. *Cancers* **12**.
- Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C.G.J., Urrutia Ortega, I.M., Briedé, J.J., Kok, T.M. de, *et al.* (2017) Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis* **32**: 139–149.
- Puertollano, E., Kolida, S., and Yaqoob, P. (2014) Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **17**: 139–144.
- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., *et al.* (2009) Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect Immun* **77**: 4696–4703.
- Quin, R.J., and McGuckin, M.A. (2000) Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion. *Int J Cancer* **87**: 499–506.

- Rachagani, S., Torres, M.P., Moniaux, N., and Batra, S.K. (2009) Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer. *BioFactors Oxf Engl* **35**: 509–527.
- Raisch, J., Buc, E., Bonnet, M., Sauvanet, P., Vazeille, E., Vallée, A. de, *et al.* (2014) Colon cancer-associated B2 Escherichia coli colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J Gastroenterol WJG* **20**: 6560–6572.
- Raisch, J., Rolhion, N., Dubois, A., Darfeuille-Michaud, A., and Bringer, M.-A. (2015) Intracellular colon cancer-associated Escherichia coli promote protumoral activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* **95**: 296–307.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**: 229–241.
- Rao, S.G., and Jackson, J.G. (2016) SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer* **2**: 676–687.
- Rasool, S., Rasool, V., Naqvi, T., Ganai, B.A., and Shah, B.A. (2014) Genetic unraveling of colorectal cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* **35**: 5067–5082.
- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M.-C., and Dozois, C.M. (2007) Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among Escherichia coli clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1553–1562.
- Reuter, C., Alzheimer, M., Walles, H., and Oelschlaeger, T.A. (2018) An adherent mucus layer attenuates the genotoxic effect of colibactin. *Cell Microbiol* **20**.
- Rhee, K.-J., Wu, S., Wu, X., Huso, D.L., Karim, B., Franco, A.A., *et al.* (2009a) Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic Bacteroides fragilis, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun* **77**: 1708–1718.
- Rhee, S.H., Pothoulakis, C., and Mayer, E.A. (2009b) Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**: 306–314.
- Ridlon, J.M., Kang, D.J., Hylemon, P.B., and Bajaj, J.S. (2014) Bile Acids and the Gut Microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* **30**: 332–338.
- Rippere-Lampe, K.E., O'Brien, A.D., Conran, R., and Lockman, H.A. (2001) Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **69**: 3954–3964.
- Ristow, L.C., and Welch, R.A. (2016) Hemolysin of uropathogenic Escherichia coli: A cloak or a dagger? *Biochim Biophys Acta* **1858**: 538–545.
- Robertis, M.D., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., *et al.* (2011) The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* **10** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3072657/>. Accessed June 28, 2020.
- Roediger, W.E. (1980) Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* **21**: 793–798.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**: 5858–5868.
- Rosendahl Huber, A., Pleguezuelos-Manzano, C., and Puschhof, J. (2021) A bacterial mutational footprint in colorectal cancer genomes. *Br J Cancer* **124**: 1751–1753.
- Rossi, M., Jahanzaib Anwar, M., Usman, A., Keshavarzian, A., and Bishehsari, F. (2018) Colorectal Cancer and Alcohol Consumption—Populations to Molecules. *Cancers* **10**: 38.
- Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**: 313–323.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., and Gerding, D.N. (2009) Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**: 526–536.
- Rycke, J. de (1990) Mise en évidence et caractérisation biologique de deux toxines colibacillaires à activité cytotoxique et nécrosante (CNF1 et CNF2) et identification immunochimique de CNF1. <https://www.theses.fr/1990LYO10181>. Accessed September 25, 2023.

- Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., *et al.* (2021) Colibactin-Producing *Escherichia coli* Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model. *Cancers* **13**: 2060.
- Samadder, N.J., Jaspersen, K., and Burt, R.W. (2015) Hereditary and common familial colorectal cancer: evidence for colorectal screening. *Dig Dis Sci* **60**: 734–747.
- Samba-Louaka, A., Nougayrède, J.-P., Watrin, C., Jubelin, G., Oswald, E., and Taieb, F. (2008) Bacterial cyclomodulin Cif blocks the host cell cycle by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. *Cell Microbiol* **10**: 2496–2508.
- Sartor, R.B. (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**: 577–594.
- Savage, D.C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**: 107–133.
- Schaal, C., and Chellappan, S.P. (2014) Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Mol Cancer Res MCR* **12**: 14–23.
- Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K. (1997) Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* **387**: 725–729.
- Schmitt, M., and Greten, F.R. (2021) The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol* **21**: 653–667.
- Schoenborn, A.A., Furstenberg, R.J. von, Valsaraj, S., Hussain, F.S., Stein, M., Shanahan, M.T., *et al.* (2019) The enteric microbiota regulates jejunal Paneth cell number and function without impacting intestinal stem cells. *Gut Microbes* **10**: 45–58.
- Schroeder, B.O. (2019) Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol Rep* **7**: 3–12.
- Schroeder, B.O., Birchenough, G.M.H., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., and Bäckhed, F. (2018) Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe* **23**: 27-40.e7.
- Schütte, A., Ermund, A., Becker-Pauly, C., Johansson, M.E.V., Rodriguez-Pineiro, A.M., Bäckhed, F., *et al.* (2014) Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 12396–12401.
- Schwetz, I., Bradesi, S., and Mayer, E.A. (2003) Current insights into the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* **5**: 331–336.
- Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014) Microbes, Microbiota and Colon Cancer. *Cell Host Microbe* **15**: 317–328.
- Seekatz, A.M., Rao, K., Santhosh, K., and Young, V.B. (2016) Dynamics of the fecal microbiome in patients with recurrent and nonrecurrent *Clostridium difficile* infection. *Genome Med* **8**: 47.
- Shah, S.C., and Itzkowitz, S.H. (2022) Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology* **162**: 715-730.e3.
- Shibahara, H., Higashi, M., Koriyama, C., Yokoyama, S., Kitazono, I., Kurumiya, Y., *et al.* (2014) Pathobiological implications of mucin (MUC) expression in the outcome of small bowel cancer. *PloS One* **9**: e86111.
- Shimpoh, T., Hirata, Y., Ihara, S., Suzuki, N., Kinoshita, H., Hayakawa, Y., *et al.* (2017) Prevalence of pks-positive *Escherichia coli* in Japanese patients with or without colorectal cancer. *Gut Pathog* **9**: 35.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., *et al.* (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**: 855–867.
- Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeleer, P., Jacques, M., and Harel, J. (2017) Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 387.
- Silpe, J.E., Wong, J.W.H., Owen, S.V., Baym, M., and Balskus, E.P. (2022) The bacterial toxin colibactin triggers prophage induction. *Nature* **603**: 315–320.
- Silva, A.J., Pham, K., and Benitez, J.A. (2003) Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiol Read Engl* **149**: 1883–1891.
- Singh, S., Pillai, S., and Chellappan, S. (2011) Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *J Oncol* **2011**: 456743.

- Singh, V., Yeoh, B.S., Xiao, X., Kumar, M., Bachman, M., Borregaard, N., *et al.* (2015) Interplay between enterobactin, myeloperoxidase and lipocalin 2 regulates *E. coli* survival in the inflamed gut. *Nat Commun* **6**: 7113.
- Slack, E., Balmer, M.L., and Macpherson, A.J. (2014) B cells as a critical node in the microbiota-host immune system network. *Immunol Rev* **260**: 50–66.
- Slattery, M.L., Edwards, S.L., and Samowitz, W. (1998) Stage of colon cancer at diagnosis: implications for risk factor associations? *Int J Epidemiol* **27**: 382–387.
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., *et al.* (2011) Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* **6**: e16393.
- Sonnenburg, J.L., Xu, J., Leip, D.D., Chen, C.-H., Westover, B.P., Weatherford, J., *et al.* (2005) Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* **307**: 1955–1959.
- Steele, S.R., Park, G.E., Johnson, E.K., Martin, M.J., Stojadinovic, A., Maykel, J.A., and Causey, M.W. (2014) The impact of age on colorectal cancer incidence, treatment, and outcomes in an equal-access health care system. *Dis Colon Rectum* **57**: 303–310.
- Stoppe, N. de C., Silva, J.S., Carlos, C., Sato, M.I.Z., Saraiva, A.M., Ottoboni, L.M.M., and Torres, T.T. (2017) Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Front Microbiol* **8** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02512>. Accessed October 11, 2023.
- Su, Q., Guan, T., and Lv, H. (2016) Siderophore biosynthesis coordinately modulated the virulence-associated interactive metabolome of uropathogenic *Escherichia coli* and human urine. *Sci Rep* **6**: 24099.
- Sun, W., Wang, L., Zhang, Q., and Dong, Q. (2020) Microbial Biomarkers for Colorectal Cancer Identified with Random Forest Model. *Explor Res Hypothesis Med* **5**: 19–26.
- Sun, X., Yang, J., Deng, X., Wei, Y., Wang, C., Guo, Y., *et al.* (2022) Interactions of Bacterial Toxin CNF1 and Host JAK1/2 Driven by Liquid-Liquid Phase Separation Enhance Macrophage Polarization. *mBio* **13**: e0114722.
- Suriano, F., Nyström, E.E.L., Sergi, D., and Gustafsson, J.K. (2022) Diet, microbiota, and the mucus layer: The guardians of our health. *Front Immunol* **13**: 953196.
- Swidsinski, A., Sydora, B.C., Doerffel, Y., Loening-Baucke, V., Vanechoutte, M., Lupicki, M., *et al.* (2007) Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 963–970.
- Szentkuti, L., and Enss, M.L. (1998) Comparative lectin-histochemistry on the pre-epithelial mucus layer in the distal colon of conventional and germ-free rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **119**: 379–386.
- Szentkuti, L., Riedesel, H., Enss, M.L., Gaertner, K., and Von Engelhardt, W. (1990) Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem J* **22**: 491–497.
- Taieb, F., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. (2011) Cycle inhibiting factors (cifs): cyclomodulins that usurp the ubiquitin-dependent degradation pathway of host cells. *Toxins* **3**: 356–368.
- Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015) Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front Genet* **6**: 81.
- Tang-Fichaux, M., Chagneau, C.V., Bossuet-Greif, N., Nougayrède, J.-P., Oswald, É., and Branchu, P. (2020) The Polyphosphate Kinase of *Escherichia coli* Is Required for Full Production of the Genotoxin Colibactin. *mSphere* **5**: e01195-20.
- Tantoso, E., Eisenhaber, B., Kirsch, M., Shitov, V., Zhao, Z., and Eisenhaber, F. (2022) To kill or to be killed: pangenome analysis of *Escherichia coli* strains reveals a tailocin specific for pandemic ST131. *BMC Biol* **20**: 146.
- Tapader, R., Bose, D., and Pal, A. (2017) YghJ, the secreted metalloprotease of pathogenic *E. coli* induces hemorrhagic fluid accumulation in mouse ileal loop. *Microb Pathog* **105**: 96–99.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., and Vidal, A. (2007) Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **13**: 2826–2832.

- Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., *et al.* (2013) VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res* **73**: 539–549.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **138**: 2101-2114.e5.
- Testa, U., Pelosi, E., and Castelli, G. (2018) Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Med Sci* **6**: 31.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. (2012) A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* **10**: 575–582.
- Tomkovich, S., Yang, Y., Winglee, K., Gauthier, J., Mühlbauer, M., Sun, X., *et al.* (2017) Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res* **77**: 2620–2632.
- Topdagi, O., and Timuroglu, A. (2018) Eighteen Years’ Retrospective Review of Colorectal Cancer Cases in Eastern Population. *Eurasian J Med* **50**: 19–22.
- Travaglione, S., Fabbri, A., and Fiorentini, C. (2008) The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: a risk factor for human cancer development? *Infect Agent Cancer* **3**: 4.
- Tronnet, S., Floch, P., Lucarelli, L., Gaillard, D., Martin, P., Serino, M., and Oswald, E. (2020) The Genotoxin Colibactin Shapes Gut Microbiota in Mice. *mSphere* **5**: e00589-20.
- Tronnet, S., Garcie, C., Rehm, N., Dobrindt, U., Oswald, E., and Martin, P. (2016) Iron Homeostasis Regulates the Genotoxicity of *Escherichia coli* That Produces Colibactin. *Infect Immun* **84**: 3358–3368.
- Tsoumtsa Meda, L.L., Landraud, L., Petracchini, S., Descorps-Declere, S., Perthame, E., Nahori, M.-A., *et al.* (2022) The *cnf1* gene is associated with an expanding *Escherichia coli* ST131 H30Rx/C2 subclade and confers a competitive advantage for gut colonization. *Gut Microbes* **14**: 2121577.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kinoshita, K., and Fagarasan, S. (2008) Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. *Semin Immunol* **20**: 59–66.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 285–293.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenkov, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., *et al.* (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480–484.
- Turner, J.R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**: 799–809.
- Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., and Hooper, L.V. (2008) Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20858–20863.
- Valeri, M., Rossi Paccani, S., Kasendra, M., Nesta, B., Serino, L., Pizza, M., and Soriani, M. (2015) Pathogenic *E. coli* exploits SsIE mucinase activity to translocate through the mucosal barrier and get access to host cells. *PLoS One* **10**: e0117486.
- Vannini, E., Mori, E., Tantillo, E., Schmidt, G., Caleo, M., and Costa, M. (2021) CTX-CNF1 Recombinant Protein Selectively Targets Glioma Cells In Vivo. *Toxins* **13**: 194.
- Vannini, E., Olimpico, F., Middei, S., Ammassari-Teule, M., Graaf, E.L. de, McDonnell, L., *et al.* (2016) Electrophysiology of glioma: a Rho GTPase-activating protein reduces tumor growth and spares neuron structure and function. *Neuro-Oncol* **18**: 1634–1643.
- Vaulont, S., and Schalk, I. (2015) Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. *médecine/sciences* **31**: 756–763.
- Veiga, E., Lorenzo, V. de, and Fernández, L.A. (1999) Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol* **33**: 1232–1243.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., *et al.* (2002) Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* **295**: 1726–1729.
- Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P.E., Maue, A.C., Dauriat, C.J.G., Barnich, N., *et al.* (2020) Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E. coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Rep* **33**: 108229.

- Viennois, E., and Chassaing, B. (2018) First victim, later aggressor: How the intestinal microbiota drives the pro-inflammatory effects of dietary emulsifiers? *Gut Microbes* **9**: 289–291.
- 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.
- Vu, T., and Datta, P.K. (2017) Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers* **9**: 171.
- Wall, R., Ross, R.P., Ryan, C.A., Hussey, S., Murphy, B., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2009) Role of Gut Microbiota in Early Infant Development. *Clin Med Pediatr* **3**: 45–54.
- Walter, J., and Ley, R. (2011) The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol* **65**: 411–429.
- Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., and Liu, Y.-C. (2012) Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci* **57**: 3126–3135.
- Wang, X., Allen, T.D., May, R.J., Lightfoot, S., Houchen, C.W., and Huycke, M.M. (2008) *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res* **68**: 9909–9917.
- Wang, X., and Huycke, M.M. (2007) Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology* **132**: 551–561.
- Wang, X., Yang, Y., and Huycke, M.M. (2017) Commensal-infected macrophages induce dedifferentiation and reprogramming of epithelial cells during colorectal carcinogenesis. *Oncotarget* **8**: 102176–102190.
- Wang, Y., Wang, K., Han, G.-C., Wang, R.-X., Xiao, H., Hou, C.-M., *et al.* (2014) Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. *Mucosal Immunol* **7**: 1106–1115.
- Wei, X., Xu, H., and Kufe, D. (2005) Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell* **7**: 167–178.
- Wimley, W.C., Selsted, M.E., and White, S.H. (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci Publ Protein Soc* **3**: 1362–1373.
- Wirbel, J., Pyl, P.T., Kartal, E., Zych, K., Kashani, A., Milanese, A., *et al.* (2019) Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat Med* **25**: 679–689.
- Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K.M., Menendez, A., Bergstrom, K.S., Gill, N., *et al.* (2011) Antibiotic Treatment Alters the Colonic Mucus Layer and Predisposes the Host to Exacerbated *Citrobacter rodentium*-Induced Colitis. *Infect Immun* **79**: 1536–1545.
- Wong, C.C., and Yu, J. (2023) Gut microbiota in colorectal cancer development and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **20**: 429–452.
- Wong, S.H., and Yu, J. (2019) Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**: 690–704.
- Wong, S.H., Zhao, L., Zhang, X., Nakatsu, G., Han, J., Xu, W., *et al.* (2017) Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* **153**: 1621-1633.e6.
- Wright, D.P., Rosendale, D.I., and Robertson, A.M. (2000) *Prevotella* enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS Microbiol Lett* **190**: 73–79.
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Chevalier-Curt, M.J., Robert, V., *et al.* (2013) *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* **11**: 61.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., *et al.* (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**: 105–108.
- Wu, S., Morin, P.J., Maouyo, D., and Sears, C.L. (2003) *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* **124**: 392–400.

- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., *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.
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., *et al.* (2003) A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* **299**: 2074–2076.
- Xue, M., Kim, C.S., Healy, A.R., Wernke, K.M., Wang, Z., Frischling, M.C., *et al.* (2019) Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science* **365**.
- Y, L., Z, W., Y, Z., B, C., S, Y., W, L., and J, R. (2022) Alcohol-dependent downregulation of apolipoprotein H exacerbates fatty liver and gut microbiota dysbiosis in mice. *Lipids Health Dis* **21** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36123743/>. Accessed August 10, 2023.
- Yang, K., Popova, N.V., Yang, W., Lozonschi, I., Tadesse, S., Kent, S., *et al.* (2008) Interaction of Muc2 and Apc on Wnt signaling and in intestinal tumorigenesis: potential role of chronic inflammation. *Cancer Res* **68**: 7313–7322.
- Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., *et al.* (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**: 222–227.
- Yin, L., Laevsky, G., and Giardina, C. (2001) Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem* **276**: 44641–44646.
- Zhang, K., Mao, T., He, Z., Wu, X., Peng, Y., Chen, Y., *et al.* (2019) Angiotensin I-converting enzyme gene plays a crucial role in the pathology of carcinomas in colorectal cancer. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol* **47**: 2500–2506.
- Zhang, X., Zhang, W., Yuan, X., Fu, M., Qian, H., and Xu, W. (2016) Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review). *Int J Oncol* **49**: 857–867.
- Zhang, Z., Aung, K.M., Uhlin, B.E., and Wai, S.N. (2018) Reversible senescence of human colon cancer cells after blockage of mitosis/cytokinesis caused by the CNF1 cyclomodulin from Escherichia coli. *Sci Rep* **8**: 17780.
- Zhou, Y., He, H., Xu, H., Li, Y., Li, Z., Du, Y., *et al.* (2016) Association of oncogenic bacteria with colorectal cancer in South China. *Oncotarget* **7**: 80794–80802.
- Zhou, Y., Zhou, Z., Zheng, L., Gong, Z., Li, Y., Jin, Y., *et al.* (2023) Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic Escherichia coli: Mechanisms of Infection and Treatment Options. *Int J Mol Sci* **24**: 10537.
- Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., *et al.* (2013) [Epithelial cell in intestinal homeostasis and inflammatory bowel diseases]. *Med Sci MS* **29**: 1145–1150.

Illustrations

- Abidullah, M., Nahar, P., Ahmed, S.A., Kothari, H., and Vakeel, S. (2023) MUC4 Expression in Oral Dysplastic Epithelium and Oral Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *J Int Soc Prev Community Dent* 13: 124–132.
- Abreu, A.G., Abe, C.M., Nunes, K.O., Moraes, C.T.P., Chavez-Dueñas, L., Navarro-Garcia, F., et al. (2016) The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 7: 115–125.
- Agrawal, B., Gupta, N., and Konowalchuk, J.D. (2018) MUC1 Mucin: A Putative Regulatory (Checkpoint) Molecule of T Cells. *Front Immunol* 9: 2391.
- 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.
- Arora, T., and Bäckhed, F. (2016) The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J Intern Med* 280: 339–349.
- Cabon, L., Martinez-Torres, A.-C., and Susin, S.A. (2013) [Programmed cell death comes in many flavors]. *Med Sci MS* 29: 1117–1124.
- Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L.G., Ruggeri, F.M., and Zona, C. (1983) Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* 39: 1300–1306.
- Chen, Y., Zhao, Y.H., Kalaslavadi, T.B., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A.D., et al. (2004) Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 155–165.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8: 26–38.
- Desvaux, M., Parham, N., and Henderson, I.R. (2004) The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* 155: 53–60.
- Dougherty, M.W., and Jobin, C. (2021) Shining a Light on Colibactin Biology. *Toxins* 13: 346.
- Dougherty, M.W., Valdés-Mas, R., Wernke, K.M., Gharaibeh, R.Z., Yang, Y., Brant, J.O., et al. (2023) The microbial genotoxin colibactin exacerbates mismatch repair mutations in colorectal tumors. *Neoplasia N Y N* 43: 100918.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., and Curtiss, R. (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* 68: 4145–4154.
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2022) Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol* 13: 812774.
- Eslava, C., Navarro-García, F., Czczulin, J.R., Henderson, I.R., Cravioto, A., and Nataro, J.P. (1998) Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 66: 3155–3163.
- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Desvaux, M., De Paepe, K., Gresse, R., Sauvaitre, T., et al. (2019) Experimental models to study intestinal microbes-mucus interactions in health and disease. *FEMS Microbiol Rev* 43: 457–489.
- Faís, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., and Dalmasso, G. (2018) Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins* 10.
- Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., et al. (2016) The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 18: 617–631.
- Gire, V. (2005) [Senescence: a telomeric limit to immortality or a cellular response to physiologic stresses?]. *Med Sci MS* 21: 491–497.
- Gururaja, T.L., Ramasubbu, N., Venugopalan, P., Reddy, M.S., Ramalingam, K., and Levine, M.J. (1998) Structural features of the human salivary mucin, MUC7. *Glycoconj J* 15: 457–467.
- Gustafsson, J.K., and Johansson, M.E.V. (2022) The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19: 785–803.

- Guyer, D.M., Henderson, I.R., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2000) Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 38: 53–66.
- Habouria, H., Pokharel, P., Maris, S., Garénaux, A., Bessaiah, H., Houle, S., et al. (2019) Three new serine-protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. *Virulence* 10: 568–587.
- Harrington, S.M., Sheikh, J., Henderson, I.R., Ruiz-Perez, F., Cohen, P.S., and Nataro, J.P. (2009) The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun* 77: 2465–2473.
- Henderson, I.R., Czczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., and Nataro, J.P. (1999) Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67: 5587–5596.
- Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4: 45–60.
- Hossain, M.S., Karuniawati, H., Jairoun, A.A., Urbi, Z., Ooi, D.J., John, A., et al. (2022) Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* 14: 1732.
- Huang, J., Che, M.-I., Huang, Y.-T., Shyu, M.-K., Huang, Y.-M., Wu, Y.-M., et al. (2009) Overexpression of MUC15 activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes the oncogenic potential of human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 30: 1452–1458.
- Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016) Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 16: 639–649.
- Khan, S., Mian, H.S., Sandercock, L.E., Chirgadze, N.Y., and Pai, E.F. (2011) Crystal structure of the passenger domain of the *Escherichia coli* autotransporter EspP. *J Mol Biol* 413: 985–1000.
- Kim, C.-H., Kim, H.J., Song, K.S., Seong, J.-K., Kim, K.-S., Lee, J.-G., and Yoon, J.-H. (2005) MUC8 as a ciliated cell marker in human nasal epithelium. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 125: 76–81.
- Knust, Z., and Schmidt, G. (2010) Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Growing Toxin Family. *Toxins* 2: 116–127.
- Kumar, P., Luo, Q., Vickers, T.J., Sheikh, A., Lewis, W.G., and Fleckenstein, J.M. (2014) EatA, an immunogenic protective antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*, degrades intestinal mucin. *Infect Immun* 82: 500–508.
- Leyton, D.L., Sloan, J., Hill, R.E., Doughty, S., and Hartland, E.L. (2003) Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. *Infect Immun* 71: 6307–6319.
- Martens, E.C., Neumann, M., and Desai, M.S. (2018) Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. *Nat Rev Microbiol* 16: 457–470.
- Matsuyama, T., Ishikawa, T., Mogushi, K., Yoshida, T., Iida, S., Uetake, H., et al. (2010) MUC12 mRNA expression is an independent marker of prognosis in stage II and stage III colorectal cancer. *Int J Cancer* 127: 2292–2299.
- Mellies, J.L., Navarro-Garcia, F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2001) espC Pathogenicity Island of Enteropathogenic *Escherichia coli* Encodes an Enterotoxin. *Infect Immun* 69: 315–324.
- Munkley, J. (2016) The Role of Sialyl-Tn in Cancer. *Int J Mol Sci* 17: 275.
- Navarro-Garcia, F., Gutierrez-Jimenez, J., Garcia-Tovar, C., Castro, L.A., Salazar-Gonzalez, H., and Cordova, V. (2010) Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun* 78: 4101–4109.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., et al. (2006) *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313: 848–851.
- Olivier, S., Mir, A.-M., Michalski, J.-C., and Lefebvre, T. (2011) [Signaling and metabolic predispositions linked to the colorectal cancer]. *Med Sci MS* 27: 514–520.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005) Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol* 8: 83–91.

- Otto, B.R., Sijbrandi, R., Luirink, J., Oudega, B., Heddle, J.G., Mizutani, K., et al. (2005) Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280: 17339–17345.
- Owens, S.R., Chiosea, S.I., and Kuan, S.-F. (2008) Selective expression of gastric mucin MUC6 in colonic sessile serrated adenoma but not in hyperplastic polyp aids in morphological diagnosis of serrated polyps. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 21: 660–669.
- Packer, L.M., Williams, S.J., Callaghan, S., Gotley, D.C., and McGuckin, M.A. (2004) Expression of the cell surface mucin gene family in adenocarcinomas. *Int J Oncol* 25: 1119–1126.
- Paone, P., and Cani, P.D. (2020) Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 69: 2232–2243.
- Parham, N.J., Srinivasan, U., Desvaux, M., Foxman, B., Marrs, C.F., and Henderson, I.R. (2004) PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 230: 73–83.
- Parreira, V.R., and Gyles, C.L. (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* 71: 5087–5096.
- Peng, J., Tang, Y., and Huang, Y. (2021) Gut health: The results of microbial and mucosal immune interactions in pigs. *Anim Nutr Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui* 7: 282–294.
- Pothuraju, R., Krishn, S.R., Gautam, S.K., Pai, P., Ganguly, K., Chaudhary, S., et al. (2020) Mechanistic and Functional Shades of Mucins and Associated Glycans in Colon Cancer. *Cancers* 12.
- Raisch, J., Dalmaso, G., Bonnet, R., Barnich, N., Bonnet, M., and Bringer, M.-A. (2016) [How some commensal bacteria would exacerbate colorectal carcinogenesis?]. *Med Sci MS* 32: 175–182.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012) [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol* 16: 1–10.
- Shek, D., Akhuba, L., Carlino, M.S., Nagrial, A., Moujaber, T., Read, S.A., et al. (2021) Immune-Checkpoint Inhibitors for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review of Clinical Outcomes. *Cancers* 13: 4345.
- Sheng, Y.H., and Hasnain, S.Z. (2022) Mucus and Mucins: The Underappreciated Host Defence System. *Front Cell Infect Microbiol* 12: 856962.
- Shibahara, H., Higashi, M., Koriyama, C., Yokoyama, S., Kitazono, I., Kurumiya, Y., et al. (2014) Pathobiological implications of mucin (MUC) expression in the outcome of small bowel cancer. *PloS One* 9: e86111.
- Stepanjuk, A., Koel, M., Pook, M., Saare, M., Jääger, K., Peters, M., et al. (2019) MUC20 expression marks the receptive phase of the human endometrium. *Reprod Biomed Online* 39: 725–736.
- Su, W., Feng, B., Hu, L., Guo, X., and Yu, M. (2022) MUC3A promotes the progression of colorectal cancer through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *BMC Cancer* 22: 602.
- Sun, X., Yang, J., Deng, X., Wei, Y., Wang, C., Guo, Y., et al. (2022) Interactions of Bacterial Toxin CNF1 and Host JAK1/2 Driven by Liquid-Liquid Phase Separation Enhance Macrophage Polarization. *mBio* 13: e0114722.
- Takeuchi, K., Yagawa, M., Ishinaga, H., Kishioka, C., Harada, T., and Majima, Y. (2003) Mucin gene expression in the effusions of otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 67: 53–58.
- Thornton, D.J., Howard, M., Khan, N., and Sheehan, J.K. (1997) Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule. *J Biol Chem* 272: 9561–9566.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. (2012) A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 10: 575–582.
- Turner, J.R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 799–809.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., et al. (2002) Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295: 1726–1729.
- Wang, L., Zhang, X., Liu, J., and Liu, Q. (2022) MUC21 induces the viability and migration of glioblastoma via the STAT3/AKT pathway. *Exp Ther Med* 23: 331.

- Wang, S., You, L., Dai, M., and Zhao, Y. (2020) Mucins in pancreatic cancer: A well-established but promising family for diagnosis, prognosis and therapy. *J Cell Mol Med* **24**: 10279–10289.
- Werlang, C., Cárcarmo-Oyarce, G., and Ribbeck, K. (2019) Engineering mucus to study and influence the microbiome. *Nat Rev Mater* **4**: 134–145.
- Zhang, Z., Aung, K.M., Uhlin, B.E., and Wai, S.N. (2018) Reversible senescence of human colon cancer cells after blockage of mitosis/cytokinesis caused by the CNF1 cyclomodulin from *Escherichia coli*. *Sci Rep* **8**: 17780.

~Résumé~

Le cancer colorectal (CCR) est le 2^{ème} cancer le plus mortel, tout sexe confondu. Dans 90 % des cas, les patients développent un CCR spontanément, soulignant l'importance des facteurs environnementaux dans l'étiologie de ce cancer. L'altération de la composition du microbiote est associée dans de nombreuses études au développement du CCR. La muqueuse colique des patients atteints de CCR est anormalement colonisée par des *Escherichia coli* producteurs de la toxine colibactine (CoPEC). Ce composé, synthétisé par un îlot génomique de pathogénicité *pks*, a une action génotoxique. Il est capable d'alkyler l'ADN, d'induire des instabilités chromosomiques et des cassures double-brin après infection de cellules humaines en culture ou d'organoïdes mais également dans différents modèles murins. L'augmentation des dommages à l'ADN dans les cellules infectées peut amener à l'apparition de mutations, à l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence des cellules infectées. Néanmoins, la présence des CoPEC n'explique pas, à elle-seule, la pathogénie de la souche. Afin de comprendre l'implication des CoPEC dans le développement du CCR, il s'avère nécessaire **d'étudier la synergie entre les différents facteurs de virulence* produits par ces bactéries.**

Le premier axe de ma thèse porte sur l'impact de l'association entre deux cyclomodulines retrouvées chez les CoPEC : la colibactine et Cnf1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*). Nous avons démontré que le gène *cnf1* est associé à la présence de l'îlot *pks* dans 95 % des *E. coli* isolés d'une cohorte de patients ayant un CCR. **Nos travaux de recherche ont mis en évidence que Cnf1 limite le pouvoir de tumorigénèse des CoPEC et diminue la sénescence et l'inflammation associées à l'infection.**

Dans un deuxième axe, nous avons montré que les CoPEC possèdent des enzymes mucolytiques et nous avons déterminé leur rôle sur l'effet cancérigène des bactéries. En effet, il a été démontré que les CoPEC doivent être en contact étroit avec les cellules intestinales pour induire des dommages à l'ADN. La bactérie doit donc traverser le mucus protecteur qui recouvre l'épithélium colique pour accéder aux cellules. Le gène codant la mucine-protéase Vat, déjà décrite chez d'autres *E. coli* pathobiontes*, est associé dans 100 % des cas à la présence de l'îlot *pks* dans les souches de *E. coli* isolées de patients CCR. **Cette mucine-protéase pourrait permettre aux CoPEC de coloniser la couche de mucus intestinal protectrice, d'atteindre les cellules épithéliales coliques et ainsi d'induire leur action génotoxique.**

Ces travaux de recherches justifient la nécessité de prendre en compte l'ensemble du virulome des *E. coli* pour mieux comprendre leur pathogénie et ainsi améliorer la prise en charge des patients colonisés par des CoPEC et ayant un CCR.