

**THESE DE DOCTORAT DE L' UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I**

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Isabelle NGUYEN

BACTERIES ET CANCEROGENESE:

Identification et purification de trois protéines de la paroi de *Streptococcus infantarius* potentiellement impliquées dans l'inflammation et la cancérogenèse colorectales

Soutenue publiquement le: 12 mai 2006

Membres du jury:

Rapporteur externe	Madame S. GANGLOFF
Rapporteur externe	Monsieur P. TRIEU-CUOT
Rapporteur interne	Madame J. OGIER
Examineur	Monsieur J-P. KLEIN
Directeur de Thèse	Madame M. SCHÖLLER-GUINARD

A mes parents

Ce travail a été effectué à l'Unité Inserm 392 sous la direction de Marie Schöller-Guinard, Directeur de recherches à l'Inserm. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour avoir dirigé ce travail avec beaucoup d'humanité, pour son soutien sans faille tout au long de cette thèse, ainsi que pour la tolérance dont elle a fait preuve envers mes horaires de travail fantaisistes.

Je remercie également Monsieur J-P. Klein, Directeur de l'Unité 392 pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et pour nos discussions, scientifiques ou non, très enrichissantes.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur F. Raul, Directeur de recherches à l'Inserm, ainsi que Madame F. Gossé pour leur collaboration dans l'expérimentation animale.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur A. Van Dorsselaer, Directeur du LSMBO-CNRS, à Mesdames E. Leize-Wagner, D. Thiersé, C. Carapito et S. Richert pour les analyses par spectrométrie de masse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame J. Ogier, Professeur à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, à Madame S. Gangloff, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Reims et à Monsieur P. Trieu-Cuot, Directeur de recherches à l'Institut Pasteur pour leur compréhension et pour avoir accepté de lire, dans un intervalle de temps très court, ce travail et de le juger.

Je veux aussi remercier Annelise pour son aide inestimable à la paillasse durant toutes ces années de thèse et surtout dans ce lourd travail de purification protéique.

Je souhaite également remercier tous mes camarades et amis qui ont partagé ma « vie de labo » et qui ont chacun su apporter leur touche de couleur pour m'aider à ne pas baisser les bras dans les moments difficiles: Merci Laurence, Jordane, Mirjam, Marc, Vanessa, Rania et Ghada mais aussi Christiane, Fanny et Valérie et je n'oublie pas les stagiaires Fred, Anne, Pascal, Laeticia et surtout Stéphanie et Gwenaël.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance envers Monsieur le Professeur E. Candolfi qui m'a accueilli et permis de finaliser ma thèse au sein de son institut, ainsi que tous les étudiants et le personnel de l'Institut de Parasitologie pour leur gentillesse et leur accueil.

Je remercie aussi ma famille pour m'avoir supportée durant toutes ces années de thèse et surtout mes parents sans le soutien inépuisable desquels ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour.

Enfin je remercie la CAMPLP pour avoir financé ma première année de thèse et la Ligue contre le Cancer (Comité du Haut-Rhin) pour son soutien financier.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	6
ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	14
INTRODUCTION.....	18
1. LE CANCER COLORECTAL	20
1.1. Généralités	20
1.2. Les cancers colorectaux héréditaires	22
1.2.1. La FAP.....	22
1.2.2. Le HNPCC.....	22
1.3. Les cancers colorectaux sporadiques	23
1.4. Les étapes du développement tumoral.....	23
1.4.1. Voie APC/ β -caténine/Tcf	25
1.4.2. Voie Wnt « non canonique »	28
1.4.3. Cyclooxygénase-2.....	29
1.4.4. ras et dcc	29
a) <i>ras</i>	29
b) <i>dcc</i>	30
1.4.5. <i>p53</i>	33
2. ROLE DE L'INFLAMMATION DANS LA CANCEROGENESE DU TRACTUS GASTROINTESTINAL	34
2.1. Place des infections dans les cancers	34
2.2. Inflammation chronique et cancérogenèse.....	36
2.2.1. Médiateurs libérés lors de la réponse inflammatoire	38
2.2.1.1. ROS et RNS	38
2.2.1.2. Les prostaglandines et la COX-2	41
➤ Modulation de l'expression de la COX-2.....	41
a) Principaux effets de l'expression de la COX-2 dans la cancérogenèse colique.....	42
➤ mécanismes indépendants de la production des PGE ₂	42
➤ mécanismes dépendants des PGE ₂	43
b) Les récepteurs des PGE ₂	44
c) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	45
➤ AINS et apoptose	46
➤ AINS et angiogenèse	46
2.2.1.3. Les cytokines proinflammatoires	46
a) Les chimiokines.....	49
➤ Interleukine-8 ou IL-8.....	51
➤ Stimulation de la production d'IL-8	52
b) TNF- α	53
3. LES BACTERIES DANS LA CANCEROGENESE DU TRACTUS GASTRO- INTESTINAL	53
3.1. Bactéries dans l'inflammation associée au cancer colorectal	54
3.2. « pattern recognition receptor » (PRRs)	56
3.3. Exemples de bactéries impliquées dans le cancer du tractus gastro-intestinal	62
3.3.1. <i>Helicobacter pylori</i> et cancer gastrique	62
3.3.1.1. Facteurs de virulence de <i>H. pylori</i>	63

a) Les protéines Cag du système de sécrétion de type IV PAI.....	63
b) La protéine VacA	63
c) Les protéines OMPs	64
3.3.1.2. Inflammation causée par <i>H. pylori</i>	64
a) Cytokines proinflammatoires	64
b) Stress oxydatif	64
c) COX-2.....	65
3.3.2. <i>Citrobacter rodentium</i> et hyperplasie du côlon	65
4. COMPLEXE STREPTOCOCCUS BOVIS / STREPTOCOCCUS EQUINUS	67
4.1. Classification	67
4.2. pathologies associées	70
4.3. Complexe <i>S. bovis/S. equinus</i> et cancer colorectal	71
5. OBJECTIFS DU TRAVAIL	73
MATERIELS ET METHODES	76
1. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	78
1.1. Souches bactériennes	78
1.1.1. <i>Streptococcus infantarius</i>	78
1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	78
1.2. Extraction de l'ADN bactérien	79
1.2.1. Extraction de l'ADN génomique de Streptocoques.....	79
1.2.2. " Minipreparation " de l'ADN plasmidique.....	79
1.2.3. " Maxipreparation "de l'ADN plasmidique	79
1.3. P.C.R.....	80
1.4. Clonage des fragments d'ADN.....	81
1.4.1. Vecteurs bactériens.....	81
1.4.2. Digestion de l'ADN par une enzyme de restriction.....	82
1.4.3. Isolement de fragments d'ADN d'un gel d'agarose	82
1.4.4. Ligation.....	82
1.4.5. Transformation de <i>E. coli</i>	84
1.4.6. Criblage des clones par hybridation sur membrane	84
2. PREPARATION DES ANTIGENES BACTERIENS	85
2.1. Préparation des antigènes de parois	85
2.2. Préparation des antigènes excrétés.....	86
2.3. Lyse des streptocoques	86
2.4. Purification des composants induisant une libération d'IL-8	86
2.5. Extraction et purification de protéines recombinantes.....	87
2.5.1. Lyse des bactéries	87
2.5.2. Chromatographie d'affinité.....	87
➤ Sur colonne GST-Trapp	87
➤ Sur colonne chélatrice d'ions	87
2.6. Purification de protéines par immunoabsorbant	88
2.6.1. Choix des peptides à synthétiser	88
2.6.2. Préparation de l'antisérum polyclonal de lapin.....	88
2.6.3. Purification des IgG.....	89
2.6.4. Dosage de l'activité immune des IgG.....	89
2.6.5. Préparation de la colonne d'immunoaffinité.....	89
2.6.6. Purification de la protéine sur l'immunoabsorbant.....	90
2.7. Biotinylation du complexe HPM	90
➤ Biotinylation des groupements carboxyles.....	90
➤ Biotinylation des groupements amines.....	90

3. ANALYSES BIOCHIMIQUES	91
3.1. Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant	91
3.2. Western Blotting	91
4. ACTIVITE <i>IN VITRO</i> SUR LES CELLULES CACO-2.....	92
4.1. Culture cellulaire : les cellules épithéliales coliques Caco-2	92
4.2. Mesure de l'activité pro-inflammatoire <i>in vitro</i>	92
4.3. Test de viabilité au MTT.....	93
4.4. Dosage de l'IL-8 et des PGE ₂ dans les surnageants cellulaires	93
5. ACTIVITE <i>IN VIVO</i>.....	94
5.1. Animaux et traitements	94
5.2. Quantification des cryptes anormales et des tumeurs dans le côlon	95
5.3. Dosage de CINC/GRO et de PGE ₂ dans les muqueuses coliques	95
6. ANALSE PROTEOMIQUE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	95
7. STATISTIQUES.....	99
RESULTATS.....	100
1. LA FRACTION S300.....	103
1.1. Purification.....	103
1.2. Propriétés proinflammatoire et procancérogène de la fraction S300	105
1.2.1. Activité proinflammatoire <i>in vitro</i>	105
a) <i>in vitro</i>	105
b) <i>in vivo</i>	106
1.2.2. Activité procancérogène <i>in vivo</i>	107
2. IDENTIFICATION DES PROTEINES DE LA FRACTION S300 PAR SPECTRO-	
METRIE DE MASSE	108
3. CARACTERISATION PARTIELLE DES GENES CODANT TROIS PROTEINES DE LA	
FRACTION S300 ET EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINAN- TES.....	112
3.1. Clonage par PCR de fragments de gènes	113
3.2. Surexpression des protéines recombinantes.....	119
3.3. Essai de solubilisation des protéines surexprimées.....	121
3.4. Essais de purification sur colonne d'affinité.....	123
3.4.1. Chromatographie sur colonne GST-trapp.....	124
3.4.2. Chromatographie sur colonne His-Trapp.....	125
a) purification de l'Amino pep-His	125
b) purification de la PGI-His.....	126
4. PURIFICATION DES PROTEINES NATIVES DE <i>S. infantarius</i>	128
4.1. Préparation des sérums anti-aminopeptidase, anti-dipeptidase et anti-PGI	128
4.2. Activité et spécificité de reconnaissance des IgG	128
4.2.1. IgG anti-Dipeptidase.....	129
4.2.2. IgG anti-peptides.....	130
4.3. Chromatographie d'immunoaffinité	133
5. ETUDE DES PROPRIETES PROINFLAMMATOIRES ET PROCANCEROGE- NES DES	
TROIS PROTEINES PURIFIEES	134
5.1. Activité pro-inflammatoire <i>in vitro</i>	134
5.1.1. Survie cellulaire	135

5.1.2.	Libération d'IL-8 et de PGE2 par les cellules Caco-2	136
5.2.	Activité pro-inflammatoire <i>in vivo</i>	137
5.3.	Activité pro-cancérogène <i>in vivo</i>	138
6.	LE COMPLEXE HPM	139
6.1.	Purification.....	139
6.2.	Propriétés proinflammatoires et procancérogènes	141
6.2.1.	Propriétés proinflammatoires <i>in vitro</i>	141
6.2.2.	Activité pro-cancérogène <i>in vivo</i>	141
6.3.	Identification du complexe HPM.....	142
7.	RECHERCHE DES PRRs.....	143
7.1.	Biotinylation du complexe HPM	144
7.2.	Détermination de deux bandes protéiques par "Ligand Affinity Blotting"	144
	DISCUSSION	146
	BIBLIOGRAPHIE.....	156

ABBREVIATIONS

AA	acide arachidonique
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
AOM	azoxyméthane
APC	adenomatous polyposis coli
bFGF	basic fibroblast growth factor
CA	crypte anormale
CARD	caspase-recruitment domain
CSF-1	colony-stimulating factor 1
CIN	chromosome instability
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
COX-	cyclooxygénase-
CCR	cancer colorectal
CCRS	cancer colorectal sporadique
DCC	deleted in colorectal cancer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMH	1,2-diméthylhydrazine
Dsh	dishevelled
EB	end binding protein
EGF	epidermal growth factor
EGFR	récepteur de l'EGF
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAP	familial adenomatous polyposis
FCA	focus de cryptes anormales
GRO	growth related oncogens
GSK-3 β	glycogene-synthase kinase-3 β
GST	glutathion-S-transferase
HNPCC	hereditary non polyposis colon cancer
HSP	heat shock protein
IAP	inhibitors of apoptosis
IBD	inflammatory bowel disease
IFN	interféron
IL-	interleukine-

iNOS	NO synthase inducible
JNK	jun-N-terminal kinase
LEE	locus for enterocyte effacement
LEF	lymphoid enhancer factor
LOH	loss of heterozygosity
LPS	lipopolysaccharide
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
LT	lymphocyte T
LTA	acide lipoteichoïque
MALDI-	matrix assisted laser desorption ionisation-
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	monocyte chemoattractant protein
MDA	malondialdéhyde
MEK	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
MIF	migration inhibitory factor
Min	multiple intestinal neoplasia
MMP	matrix metalloproteinase
MMR	mismatch repair
MS	mass spectrometry
MSI ou MIN	microsatellite instability
MSI-H	microsatellite instability-high
MSS	microsatellite stable
nanoLC-ESI	nano liquid chromatography-electrospray ionisation
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NLS	nuclear localization signal
NO	oxyde nitrique
OMP	outer membrane protein
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PCNA	proliferative cell nuclear antigen
PCR	polymerisation chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PGI	phosphoglucose isomerase
PI-3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PK	protéine kinase

PLC	phospholipase C
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluoride
pNPP	para-nitrophényl-phosphate
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PRRs	pattern recognition receptors
RER	replication error
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
TAM	tumor associated macrophage
TCF	T-cell transcription factor
TGF	transforming growth factor
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
Q-TOF	quadripole-time of flight
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	récepteur du VEGF
WEA	wall extracted antigens
Wnt	Wingless-Int-1

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1:	Incidence des cancers du côlon et du rectum dans le monde .	21
Figure 2:	Cascades des événements impliqués dans la cancérogenèse colique	24
Figure 3:	Complexe APC/ β -caténine	26
Figure 4:	Interaction de c-Jun avec TCF4/ β -caténine	28
Figure 5:	Mutation de <i>ras</i> dans les cellules tumorales	30
Figure 6:	voie de transduction de l'apoptose <i>via</i> le récepteur DCC	32
Figure 7:	Etapes pathogénétiques du développement du CCR	37
Figure 8:	Principaux effets des ROS et RNS impliqués dans la cancérogenèse	39
Figure 9:	Implication de la COX-2 dans des phénomènes cellulaires	42
Figure 10:	Rôles des chimiokines dans la pathogenèse intestinales	50
Figure 11:	TLRs et leurs ligands	57
Figure 12:	Voies NF κ B et MAPK activés par les PAMPs bactériens	59
Figure 13:	<i>S. infantarius</i> en microscopie à balayage	69
Figure 14:	Carte du vecteur pGEM-T	81
Figure 15:	Carte du vecteur pGEX-4T-1.	83
Figure 16:	Carte du vecteur pET-15b	83
Figure 17:	MALTI-TOF	96
Figure 18:	Interface ESI-Q-TOF	97
Figure 19:	Identification des protéines par spectrométrie de masse	98
Figure 20:	Epithélium colique vu en microscopie	102
Figure 21:	Séparation du WEA par chromatographie échangeuse d'anions	104
Figure 22:	Séparation de la fraction MonoQ par chromatographie d'exclusion	104
Figure 23:	SDS-PAGE des fractions WEA, MonoQ, S300	105
Figure 24:	Libération d'IL-8 et de PGE ₂ par les cellules Caco-2 activées	105
Figure 25:	Dosage CINC/GRO et PGE ₂ dans les muqueuses de rats	106
Figure 26:	Quantification des cryptes anormales au niveau de la muqueuse colique	107
Figure 27:	Stratégie d'identification des protéines par spectrométrie de masse.	108
Figure 28:	SDS-PAGE 10% de la fraction S300 puis analyse par nanoLC-MS/MS	109
Figure 29:	Séparation bidimensionnelle de la fraction S300	110
Figure 30:	Alignement des séquences protéiques d'Aminopeptidases C	113
Figure 31:	Alignement des séquences protéiques des Dipeptidases A	114

Figure 32:	Alignement des séquences protéiques des PGI	115
Figure 33:	Séquence partielle du gène de l'Aminopeptidase de <i>S. infantarius</i>	116
Figure 34:	Séquence partielle du gène de la Dipeptidase de <i>S. infantarius</i>	117
Figure 35:	Séquence partielle du gène de la PGI de <i>S. infantarius</i>	118
Figure 36:	Surexpression de la protéine de fusion Dipep-GST	119
Figure 37:	Surexpression de la protéine recombinante Amino pep-His	120
Figure 38:	Surexpression de la protéine recombinante PGI-His	120
Figure 39:	Conditions de solubilisation de la protéine Dipep-GST	121
Figure 40:	Conditions de solubilisation de la protéine Amino pep-His	122
Figure 41:	Conditions de solubilisation de la protéine PGI-His	123
Figure 42:	Purification de la Dipep-GST sur colonne d'affinité	124
Figure 43:	Purification de l'Amino pep-His sur colonne d'affinité	125
Figure 44:	SDS-PAGE après chromatographie sur His-Trapp de l'Amino pep-His	126
Figure 45:	Purification de la PGI-His sur colonne d'affinité	127
Figure 46:	SDS-PAGE après chromatographie sur His-Trapp de la PGI-His	127
Figure 47:	SDS-PAGE des protéines recombinantes	128
Figure 48:	Activité immune des IgG anti-protéines recombinantes	129
Figure 49:	Structure 3D de la PGI de <i>B. stearrowthermophilus</i>	130
Figure 50:	Activité des IgG anti-peptides	131
Figure 51:	Reconnaissance des protéines recombinantes par les IgG anti-peptides	132
Figure 52:	SDS-PAGE et WB des protéines purifiées	133
Figure 53:	Survie des cellules Caco-2 activées par les protéines purifiées	135
Figure 54:	IL-8 et PGE ₂ libérées par Caco-2 activées par les protéines purifiées	136
Figure 55:	CINC/GRO et PGE ₂ dans les muqueuses de rats	137
Figure 56:	Cryptes anormales après administration de protéines purifiées	138
Figure 57:	Purification du complexe HPM par immunoaffinité	140
Figure 58:	Révélation de la fraction S300 et du complexe HPM	140
Figure 59:	Libération d'IL-8 et de PGE ₂ par Caco-2 activées par HPM	141
Figure 60:	Quantification des cryptes anormales dues à HPM	141
Figure 61:	Gel 2D du complexe HPM	142
Figure 62:	Western Blot du complexe HPM	144
Figure 63:	Ligand Affinity Blotting	144

Tableau 1: Cancers associés à des agents infectieux.	36
Tableau 2: Classification des streptocoques	67
Tableau 3: Evolution de la classification des espèces du complexe <i>S. bovis/S. equinus</i> .	70
Tableau 4: Amorces utilisées en PCR	80
Tableau 5: Liste des protéines identifiées dans la fraction S300.	111
Tableau 6: Récapitulatif des effets proinflammatoires et procancéreux	139
Tableau 7: Identification des protéines du complexe HPM par nano-LC/MS-MS	143

INTRODUCTION

1. LE CANCER COLORECTAL

1.1. Généralités

Le cancer colorectal (CCR) est, selon les chiffres les plus récents, le troisième cancer dans le monde avec une estimation de 1,02 million de nouveaux cas diagnostiqués en 2002 (Parkin *et al.*, 2005) et il est en progression constante depuis 1975. En terme d'incidence, il se situe après le cancer de la langue, de l'estomac et de la prostate chez l'homme et après le cancer du sein et du col de l'utérus chez la femme. Alors qu'il affecte de manière quasi-égale les hommes et les femmes avec un *sex ratio* de 1,2 : 1, sa répartition dans le monde démontre une réelle disparité (Figure 1). Si dans les régions développées (Amérique du Nord, Europe occidentale, Australie, Nouvelle Zélande et Japon), le CCR représente 20,9% de tous les cancers chez l'homme et 16,3% chez la femme, dans le reste du monde, il ne représente que respectivement 7,6% et 7%. Ces cancers sont plus rares en Amérique du sud, en Asie et surtout en Afrique. Ces différences ne semblent pas être liées à un polymorphisme génétique des populations puisque les émigrés perdent totalement le risque associé à leur pays ou région d'origine (Kolonel, 1988; McMichael *et al.*, 1980; Parkin et Khlat, 1996). Ces données soulignent l'importance des facteurs environnementaux dans la cancérogenèse colorectale.

Plusieurs auteurs mettent en cause le régime alimentaire, le mode de vie et la surcharge pondérale (Key *et al.*, 2004; Michels, 2005). De nombreuses études épidémiologiques ont établi qu'une forte consommation de viandes rouges ou cuisinées selon des procédés industriels (salaison, fumage, charcuterie...) augmente les risques de développer des adénomes ou un cancer du côlon (Chao *et al.*, 2005; Giovannucci *et al.*, 1994; Norat *et al.*, 2002; Willett, 2005). Ces risques augmenteraient proportionnellement à la consommation (Sandhu *et al.*, 2001). De façon constante, la sédentarité et l'obésité sont des facteurs favorisant le CCR (Giovannucci, 2002) alors que l'activité physique régulière est associée à une réduction du risque de cancer (Giovannucci, 2002; Hardman, 2001; Slattery et Potter, 2002; Thune et Furberg, 2001). Enfin, différentes études suggèrent que la consommation d'alcool constitue un facteur de risque du CCR (Giacosa *et al.*, 2004; Klatsky *et al.*, 1988).

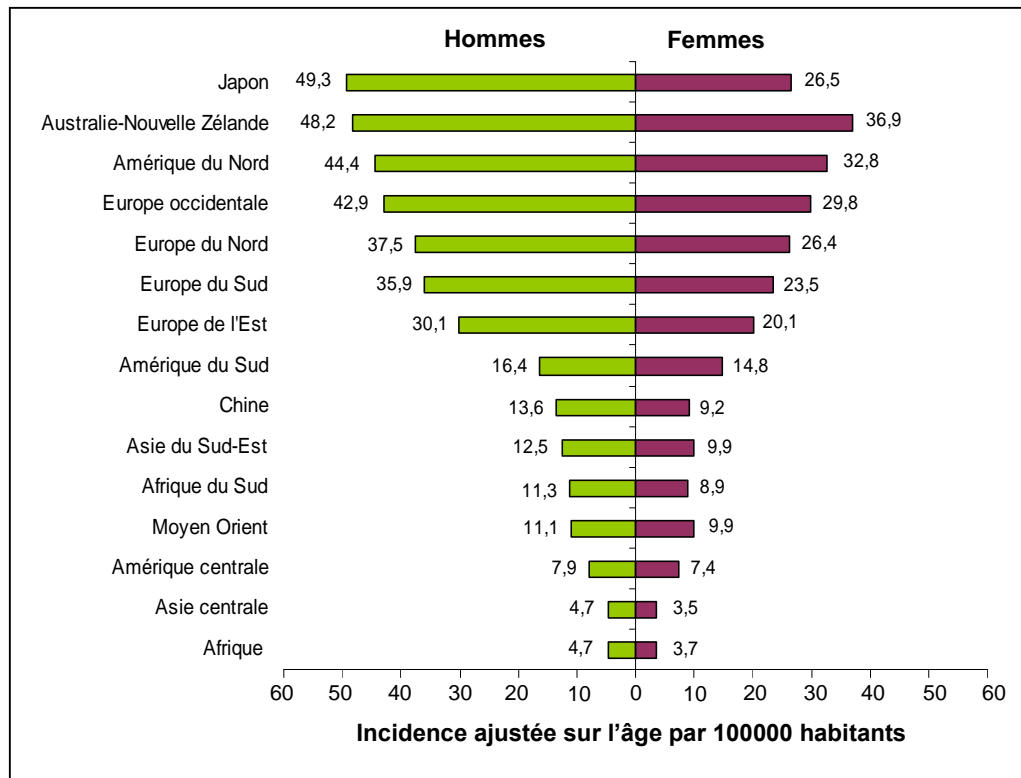


Figure 1 : Incidence des cancers du côlon et du rectum dans le monde.
Taux pour 100000 habitants ajustés sur l'âge (Parkin *et al.*, 2005)

Les CCR peuvent se diviser en deux grandes catégories : les cancers héréditaires à transmission autosomique dominante et les cancers sporadiques non héréditaires, qui représentent, respectivement, 5 à 10% et 80 à 90% des cancers colorectaux. Les cancers héréditaires peuvent être eux-mêmes de deux types: la polypose adénomateuse familiale (FAP) et les cancers héréditaires sans polypose (HNPCC).

Dans tous les cas, le cancer colorectal résulte d'une accumulation progressive de mutations génétiques et épigénétiques qui conduisent à la transformation de cellules épithéliales coliques normales en cellules adénomateuses. La perte de la stabilité génomique semble être l'étape pathogénétique-clé et précoce de la cancérogenèse. Deux types d'instabilités génomiques ont été identifiés dans les CCR : l'instabilité des microsatellites et l'instabilité chromosomique (Lengauer *et al.*, 1998).

L'instabilité chromosomique est décelée dans la grande majorité des cas de CCR (85%) et conduit à une aneuploïdie (gain ou perte de matériel chromosomique) avec un phénotype LOH (Loss Of Heterozygoty) ou CIN (Chromosome INstability) ou MSS (MicroSatellite Stable) car ces tumeurs ne présentent pas d'instabilité au niveau des séquences microsatellites.

De telles aberrations génétiques peuvent être générées à l'origine par une dérégulation des points de contrôle de la réplication de l'ADN ou de la formation du fuseau mitotique,

notamment des gènes *bub* et *mad* (Cahill *et al.*, 1998; Grady, 2004). Cette instabilité génomique contribue à générer des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeur, dans des oncogènes et dans les systèmes de réparation de l'ADN.

15 à 20 % des tumeurs du côlon et du rectum présentent une instabilité des microsatellites (MSI) causée par une inactivation du système MMR (Mutation Mismatch Repair) de réparation de l'ADN due à des mutations des gènes de ce système MMR, comme *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* et *hPMS2*, ou par une hyperméthylation du promoteur du gène *hMLH1*. Ces microsatellites sont de petites séquences, d'un ou plusieurs nucléotides, répétées au niveau de certains gènes et sont particulièrement sensibles aux décalages du cadre de lecture lors de la réplication de l'ADN. Le système MMR est responsable de la réparation de ces décalages et une inactivation des protéines formant ce système entraîne des erreurs dans l'ADN. Si ces erreurs apparaissent dans des parties codantes, les protéines traduites sont altérées. Nous verrons plus loin que certains gènes spécifiques sont fréquemment mutés au cours de la cancérogenèse suite à cette instabilité des séquences microsatellites. Ce type de tumeurs présente un phénotype MSI-H (MicroSatellite Instability-High) ou RER+ (Replication Error-positive) ou MIN+ (Microsatellite Instability-positive).

1.2. Les cancers colorectaux héréditaires

1.2.1. La FAP

Les cancers colorectaux héréditaires rassemblent deux pathologies : la FAP et le HNPCC. La polypose rectocolique familiale ou FAP (Familial Adenomatous Polyposis) représente 2 à 4% des CCR et se caractérisent par la présence de centaines de polypes adénomateux qui se développent le plus souvent dans la partie distale du côlon et apparaissent dès l'âge de 20 ans. Chez les patients non traités, ces polypes peuvent évoluer en CCR vers l'âge de 40 ans. La FAP est causée par des mutations germinales au niveau du gène suppresseur de tumeur *apc* (Adenomatous Polyposis Coli) (Bodmer *et al.*, 1987; Groden *et al.*, 1991; Leppert *et al.*, 1987). Le nombre de mutations différentes sur ce gène peut atteindre 300 mais toutes mènent à l'expression d'une forme tronquée inactive de la protéine (Syngal *et al.*, 2000). Le rôle de APC sera abordé dans la section (1.4.1).

1.2.2. Le HNPCC

Le deuxième groupe de cancers héréditaires réunit, quant à lui, les cancers sans adénomes multiples encore appelés HNPCC (hereditary non polyposis colon cancer) ou syndrome de Lynch. Ils représentent 2 à 10% des CRC dans les pays occidentaux et affectent généralement la partie proximale du côlon (Lynch *et al.*, 1996). La pathogenèse de ce cancer est caractérisée

par l'instabilité des microsatellites ou MSI causée par des mutations germinales dans les gènes *hMSH2* (Leach *et al.*, 1993), *hMLH1* (Bronner *et al.*, 1994), *hPMS1*, *hPMS2* (Nicolaidis *et al.*, 1994) et *hMSH6* (Miyaki *et al.*, 1997) du système MMR. Cette MSI conduit à des mutations fréquentes dans le gène *apc* et/ou de la β -caténine et/ou *K-ras*.

1.3. Les cancers colorectaux sporadiques

Le cancer colorectal sporadique n'a pas de contexte héréditaire évident et représente la majorité des cancers colorectaux (85 à 90%) (Potter *et al.*, 1993). Les patients affectés par cette maladie ne présentent pas de mutations génétiques germinales mais acquièrent des mutations responsables du développement tumoral tout au long de leur vie par exposition à divers cancérigènes chimiques, viraux, bactériens ou encore alimentaires.

Comme pour les CCR d'origine héréditaire, les CCR sporadiques (CCRS) peuvent suivre deux types de voies pathogénétiques différentes (Frattini *et al.*, 2004) :

- La majorité des CCRS (85%) est causée par une mutation somatique du gène *apc*. Au contraire, dans le cas de la FAP, cette mutation touche les cellules germinales (Kinzler et Vogelstein, 1996; Takayama *et al.*, 2001).

- 15 % des CCRS sont causés par une MSI due à des mutations somatiques des gènes du système MMR (Jass, 2004; Liu *et al.*, 1995). Cette même instabilité existe dans le cas du HNPCC mais touche alors les lignées germinales. Les cellules présentant une forte instabilité des microsatellites n'ont qu'un taux faible de mutation sur le gène *apc*. Le développement tumoral des cellules MIN⁺ est conduit par une voie APC-indépendante différente du modèle de Fearon et Vogelstein qui décrit la séquence pathogénétique suivie par près de 90% des cancers colorectaux.

1.4. Les étapes du développement tumoral

Le concept accepté quasi-universellement, à l'heure actuelle, concernant le développement des cancers du côlon/rectum pose l'idée que la majorité de ces cancers se développe à partir d'un adénome qui est une tumeur bénigne, vers un carcinome. Cette évolution est connue sous le terme de "séquence adénome-carcinome". Les adénomes se développent en principe à partir des foci de cryptes aberrantes ou FCA, et plus spécifiquement des FCA présentant une dysplasie. Ces FCA constituent la phase la plus précoce de la dérégulation cellulaire et proviennent d'une hyperprolifération des cellules des cryptes menant à une dilatation, élongation ou fission de ces cryptes.

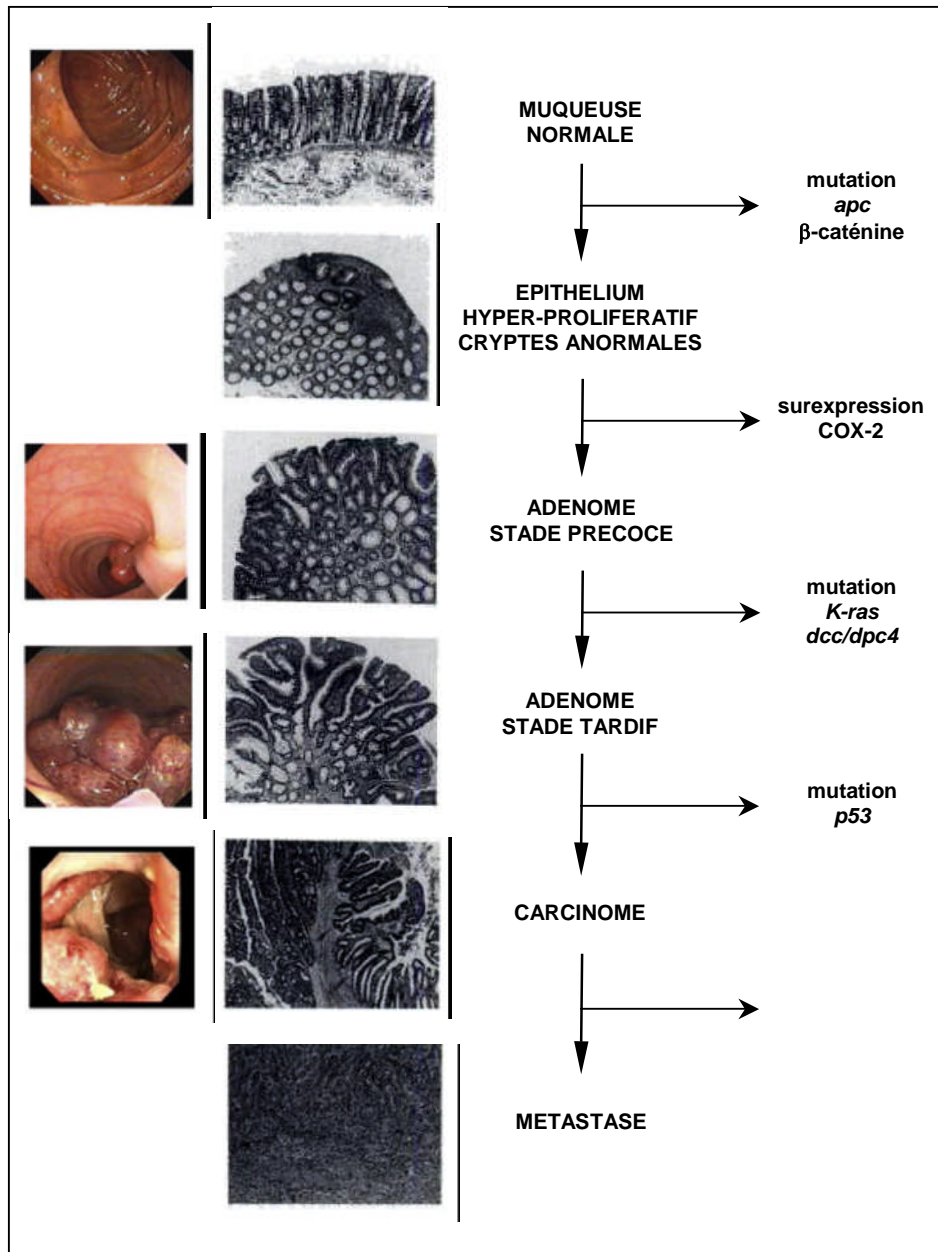


Figure 2 : Cascade des événements impliqués dans la cancérogenèse colique.
 Chronologie des différentes mutations ou pertes de gènes impliquées dans l'initiation et dans le développement d'un cancer colorectal. Adénome au stade précoce : adénome de moins de 1 cm de diamètre ; adénome au stade tardif : adénome d'au moins 1 cm de diamètre (D'après Fearon et Vogelstein, 1990)

Fearon et Vogelstein proposèrent pour la première fois en 1990 un modèle génétique décrivant les différents stades de développement d'un CCR à partir d'un épithélium normal jusqu'au développement de métastases (Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle identifie les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, nécessaires à toutes les étapes de l'évolution d'un cancer colorectal (Figure 2). Cette "séquence adénome-carcinome", qui décrit, à l'origine, le développement des cancers sporadiques, peut également être transposée à la FAP qui est causée, elle aussi, par une mutation dans le gène *apc*. S'ajoutant à cette cascade

d'événements mutationnels, le taux des instabilités génomiques, CIN et MSI, augmente tout au long de la cancérogenèse colique (Hermsen *et al.*, 2002; Meijer *et al.*, 1998; Ried *et al.*, 1999).

Il est maintenant reconnu que les CCR sporadiques progressent par étapes depuis une hyperprolifération du tissu épithélial jusqu'à la formation d'un adénocarcinome invasif, qui résulte d'une accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. La séquence des événements proposée lors du développement du CCR est : (i) inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, (ii) activation des oncogènes, (iii) mutations de multiples gènes et (iv) accumulation des changements dont la nature semble plus importante que l'ordre chronologique (Cho et Vogelstein, 1992).

1.4.1. Voie APC/ β -caténine/Tcf

Dans 80% des cas sporadiques de CCR, APC est inactivée par des mutations somatiques qui entraînent une perte d'expression ou l'expression d'une protéine tronquée (Kinzler et Vogelstein, 1996). *apc* (Adenomatous Polyposis Coli) est un gène suppresseur de tumeur et sa mutation est considérée comme le premier événement génétique intervenant dans la « séquence adénome-carcinome » de la cancérogenèse colorectale. Cette mutation précoce suggère que *apc* est un initiateur de tumeur sporadique. Pourtant, si sa mutation est suffisante pour initier la croissance d'une tumeur bénigne elle ne suffit pas pour faire progresser cette dernière vers un stade plus avancé (Powell *et al.*, 1992).

Dans l'épithélium colique normal, *apc* se concentre au sommet des villosités, c'est-à-dire dans les cellules matures qui subissent l'apoptose. Lorsque la protéine APC est exprimée sous sa forme mutée, généralement tronquée dans sa partie carboxyterminale, elle empêche la migration et l'apoptose des cellules, conduisant à une augmentation du nombre de cellules à la base de la crypte et entraînant ainsi la formation d'un foyer de cryptes anormales ou FCA (Smith *et al.*, 1994). Lorsque les cellules coliques humaines mutées sur *apc* sont transfectées avec le gène sauvage, la surexpression de APC normale rétablit l'apoptose (Morin *et al.*, 1996).

Le gène *apc* est localisé sur le chromosome 5q21 et code une protéine de 312 kDa constituée de plusieurs domaines qui lui permettent de fixer divers partenaires comme la β -caténine et les microtubules. Par ces liaisons, elle exerce un rôle à la fois direct dans la migration et l'adhésion cellulaires, mais également indirect, par la régulation de plusieurs gènes, dans la prolifération, la différenciation et le cycle cellulaires ainsi que dans l'apoptose. La fonction principale de APC est de réguler le taux cytosolique de β -caténine et cette

régulation appartient à la voie de transduction du signal Wnt qui pourrait jouer un rôle primordial dans la tumorigenèse colique (Arias *et al.*, 1999; Giles *et al.*, 2003).

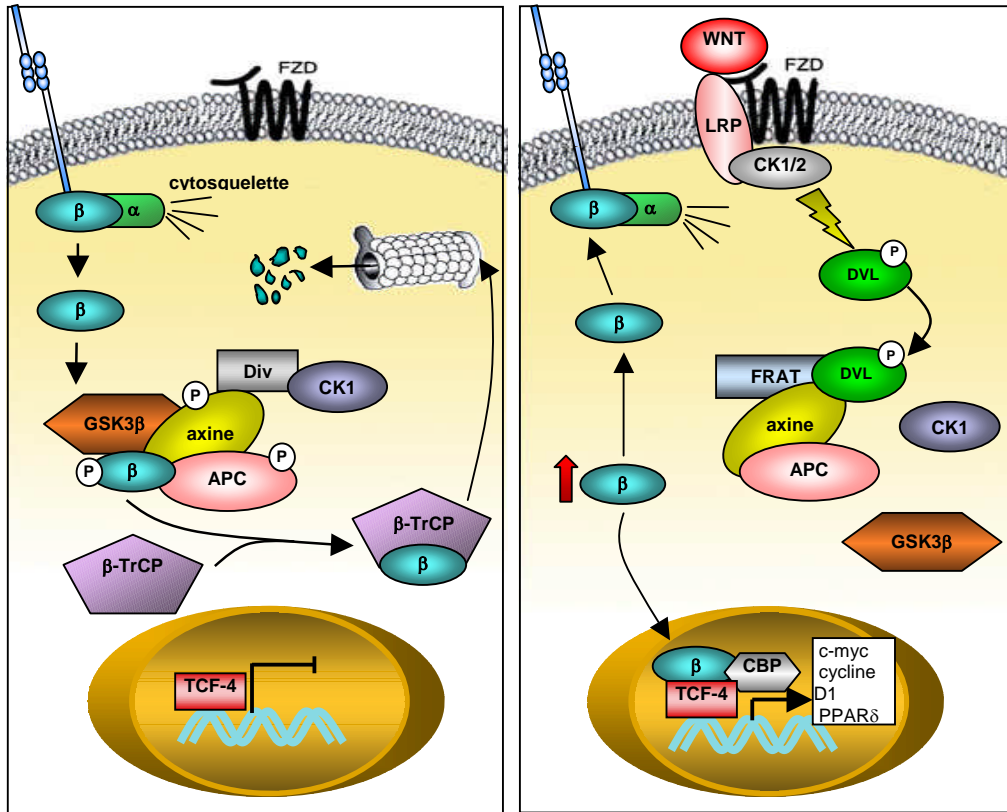


Figure 3 : Complexe APC/β-caténine. La protéine APC normale, après avoir été phosphorylée par la GSK-3β, lie la β-caténine. Ce complexe est ensuite dégradé par ubiquitination. Si APC mutée ou si la signalisation Wnt est activée, la β-caténine joue son rôle de facteur de transcription et stimule la transcription de nombreux gènes qui régulent le cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose en faveur de la cancérogénèse. α = α-caténine, β = β-caténine (Thorstensen *et al.*, 2005)

En l'absence de signal extracellulaire Wnt, c'est-à-dire dans les conditions physiologiques, les cellules inactivées maintiennent un niveau basal de β-caténine cytosolique grâce au complexe formé par APC-Axine-GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β) qui phosphoryle la β-caténine. Celle-ci peut alors être prise en charge par la β-TrCP pour être ubiquitinée et dégradée par le protéasome (Aberle *et al.*, 1997) (figure 3). APC possède un signal de localisation nucléaire potentiel NLS qui lui permettrait d'être transportée dans le noyau par un mécanisme énergétique dépendant de la phosphorylation. APC forme un complexe avec β-caténine/TCF qui pourrait ensuite être exporté hors du noyau grâce à sa séquence NLS, régulant ainsi le taux nucléaire de β-caténine (Henderson, 2000; Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2003; Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2000)

Lorsqu'un ligand extracellulaire Wnt se lie au récepteur transmembranaire Frizzled associé au co-récepteur LRP5 ou LRP6 (low-density lipoprotein receptor-related protein), elle

active la voie Wnt (Nusse, 2001; Tamai *et al.*, 2000). Les ligands Wnt constituent une grande famille de 16 glycoprotéines sécrétées riches en cystéine et certains d'entre eux induisent la transformation tumorale dans des modèles animaux et des cultures tissulaires (Wodarz et Nusse, 1998). Le récepteur Frizzled activé induit la phosphorylation de la protéine cytoplasmique Dishevelled (Dsh). D'une part, Dsh active la voie de jun kinase (JNK) (Li *et al.*, 1999a; Moriguchi *et al.*, 1999; Nateri *et al.*, 2005) et d'autre part, en se liant à l'axine, dissocie le complexe APC-Axine-GSK-3 β et inhibe ainsi la phosphorylation de la β -caténine qui ne peut alors s'associer à la β -TrCP pour être dégradée par le système ubiquitine-protéasome. La β -caténine libre s'accumule dans le cytosol et est transloquée dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid-enhancer factor) dont seule l'isoforme TCF-4 est significativement exprimée dans l'épithélium colique. TCF-4 complexée à la β -caténine active la transcription de gènes cibles : le gène *c-myc* qui régule la prolifération cellulaire et l'apoptose (He *et al.*, 1998; Jamerson *et al.*, 2000), les gènes de la cycline D1 qui joue un rôle primordial dans la régulation du cycle cellulaire (Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu et McCormick, 1999), de la MMP-7 (Crawford *et al.*, 1999), de la gastrine (Koh *et al.*, 2000), du facteur ITF-2 (Kolligs *et al.*, 2002) et du récepteur PPAR δ (peroxisome proliferator-activated receptor δ) qui est impliqué dans la transcription des prostaglandines et des acides gras ainsi que dans le contrôle de l'apoptose (He *et al.*, 1999). Par ailleurs, le complexe APC/ β -caténine/TCF stimule l'expression du récepteur CD44 à la surface des cellules (Wielenga *et al.*, 1999). CD44 est un acteur important dans les interactions de la cellule avec la matrice extracellulaire et sa surexpression stimule la mobilité cellulaire, la progression tumorale et les métastases (Wielenga *et al.*, 1993).

Des mutations du gène *apc*, l'inactivation de l'axine ou encore des mutations de la β -caténine conduisent à l'accumulation de cette β -caténine dans le cytosol et ont les mêmes effets que l'activation de la voie de signalisation Wnt. 70 à 80% des CCR comportent des altérations de cette voie Wnt (Bienz et Clevers, 2000; Fodde *et al.*, 2001). Les mutations les plus fréquentes touchent le gène *apc* et 50% des tumeurs coliques qui ne présentent pas d'altération de ce gène, montrent des mutations « gain de fonction » dans le gène *CTNNB1* de la β -caténine (Morin *et al.*, 1997; Sparks *et al.*, 1998). Toutes les études montrent que ces deux mutations s'excluent mutuellement et ainsi on ne trouve jamais de mutations d'*apc* et de *CTNNB1* dans la même cellule. Alors que les mutations d'*apc* sont spécifiques de l'épithélium colorectal, la dérégulation de la voie de Wnt/ β -caténine/TCF est commune à plusieurs cancers humains.

En plus de leur implication dans la voie Wnt, APC et la β -caténine peuvent intervenir dans la tumorigenèse colique par leurs interactions avec le cytosquelette de la cellule. En effet, APC s'associe avec les microtubules du cytosquelette en se liant à EB1 («End Binding » protein) qui appartient à la famille des protéines EB/RP associées aux microtubules (Su *et al.*, 1995). Elle pourrait ainsi être impliquée dans le maintien de la stabilité chromosomique en contrôlant l'organisation des kinétochores des chromosomes en métaphase (Kaplan *et al.*, 2001) et jouer un rôle dans la migration cellulaire. Dans les conditions physiologiques, la β -caténine est liée, d'une part, à la glycoprotéine transmembranaire E-cadhérine qui est essentielle dans l'adhésion cellulaire et les jonctions intercellulaires, et d'autre part, à l' α -caténine, par l'intermédiaire de laquelle la β -caténine interagit avec le cytosquelette d'actine (Jou *et al.*, 1995; Knudsen *et al.*, 1995).

1.4.2. Voie Wnt « non canonique »

Les ligands Wnt induisent deux types de voies de signalisation : la voie Wnt dite « canonique » qui est celle de APC/ β -caténine/TCF décrite précédemment et la voie Wnt « non canonique » qui ne dépend pas de la β -caténine et qui induit un flux calcique et une activation des Jun Kinases (Veeman *et al.*, 2003).

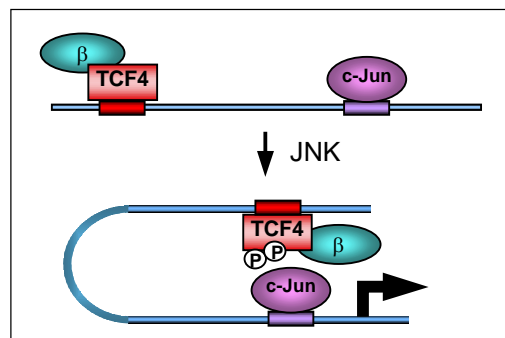


Figure 4 : Interaction de c-Jun avec TCF4/ β -caténine sur le promoteur de c-Jun est dépendante de la voie des JNK (Nateri *et al.*, 2005)

Dans plusieurs types de tumeurs, il existe une augmentation de l'activité du facteur de transcription AP1 (Eferl et Wagner, 2003). AP-1 est composé de deux membres de la famille Jun et Fos qui forment des homo- et hétérodimères. L'activation d'AP-1 nécessite la phosphorylation du proto-oncogène c-Jun par la c-Jun N-terminale Kinase (JNK) et stimule la transcription de plusieurs gènes qui interviennent dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Davis, 2000) mais induit également un rétrocontrôle positif de l'expression de son propre gène. En effet, Nateri *et al.* ont récemment montré que c-Jun phosphorylée interagit au niveau de son promoteur avec le facteur de transcription TCF-4

pour former un complexe c-Jun-TCF4/ β -caténine (figure 4) qui stimule l'expression de c-Jun. Lorsque l'on inhibe la phosphorylation de c-Jun ou que l'on induit des mutations dans son gène spécifiquement au niveau de l'intestin des souris *apc*^{Min}, hétérozygotes pour la mutation non-sens du gène *apc*, on assiste à la diminution du nombre et de la taille des tumeurs dans la muqueuse intestinale de ces souris (Nateri *et al.*, 2005).

En outre, d'autres voies de signalisation sont altérées au cours de la séquence adénome-carcinome : celle de K-ras, de p53 et de TGF- β .

1.4.3. Cyclooxygénase-2

L'instabilité chromosomique qui existe dans le CCR provoque des modifications dans l'expression de certaines enzymes. Ainsi la cyclooxygénase-2 (COX-2) est surexprimée dans les stades précoces de la cancérogenèse colique et semble y jouer un rôle important puisqu'elle participe à la transition vers un épithélium hyperprolifératif (Tatsu *et al.*, 2005). Cette enzyme constitue une cible potentielle pour le traitement et la prévention du CCR par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont des inhibiteurs spécifiques de cette COX-2. Depuis plus d'une dizaine d'années, l'effet des AINS sur l'incidence du CCR est reconnue (Giardiello *et al.*, 1993; Jolly *et al.*, 2002). L'étude menée par Langman *et al* (2000) suggère que l'utilisation prolongée et régulière d'aspirine réduit le risque de mortalité pour le cancer de l'œsophage, de l'estomac, du côlon et du rectum. Les mécanismes impliquant la COX-2 dans le CCR seront développés ultérieurement (paragraphe 2.2.1.2).

1.4.4. *ras* et *dcc*

a) *ras*

Près de la moitié des adénocarcinomes colorectaux et des adénomes de plus de 1 cm de diamètre présentent une mutation dans le gène *ras* qui n'est retrouvée que dans 9 % des adénomes de moins de 1 cm (Fearon et Vogelstein, 1990). Ceci suggère que la mutation *k-ras* intervient dans la progression tumorale et non dans son initiation. Les mutations de ce gène ne sont pas spécifiques de l'intestin puisqu'on les trouve dans 30 % des tumeurs chez l'homme (Bos *et al.*, 1987).

Les protéines Ras (HRAS, KRAS et NRAS) font partie de la superfamille des petites protéines G et interviennent dans le contrôle de la croissance cellulaire. Lorsque Ras est activée sous la forme Ras-GTP, elle entraîne une cascade de phosphorylations/activations successives de Raf1, des « mitogen-activated protein kinase kinases » 1 et 2 (MEK1 et MEK2), puis des « extracellular signal-regulated kinases » 1 et 2 (ERK1 et ERK2). ERK1/2 sont finalement transloquées dans le noyau où elles activent des facteurs, tels que Elk1 et c-

Myc, qui régulent la transcription de gènes stimulant la prolifération cellulaire ou ayant des propriétés anti-apoptotiques, comme *bcl-2*. D'autre part, ERK1/2 phosphoryle également c-Jun qui active le facteur de transcription AP1. Ce dernier stimule l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire, comme la cycline D1 connue pour promouvoir la division cellulaire, ainsi que celle des gènes de métalloprotéinases, notamment la MMP-7, qui sont des facteurs favorisant l'angiogenèse (Smakman *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 1995). Par ailleurs, RAS peut interagir directement avec la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et active ainsi la voie anti-apoptotique AKT qui favorise la survie cellulaire (figure 5).

Dans les tumeurs, les mutations de *ras* génèrent une accumulation de la forme active de la protéine, *RAS-GTP*, induisant une dérégulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, qui peut aboutir à la transformation tumorale (Burns *et al.*, 1993; Shirasawa *et al.*, 1993), et favoriser l'invasion cellulaire et la formation de métastases (Smakman *et al.*, 2005).

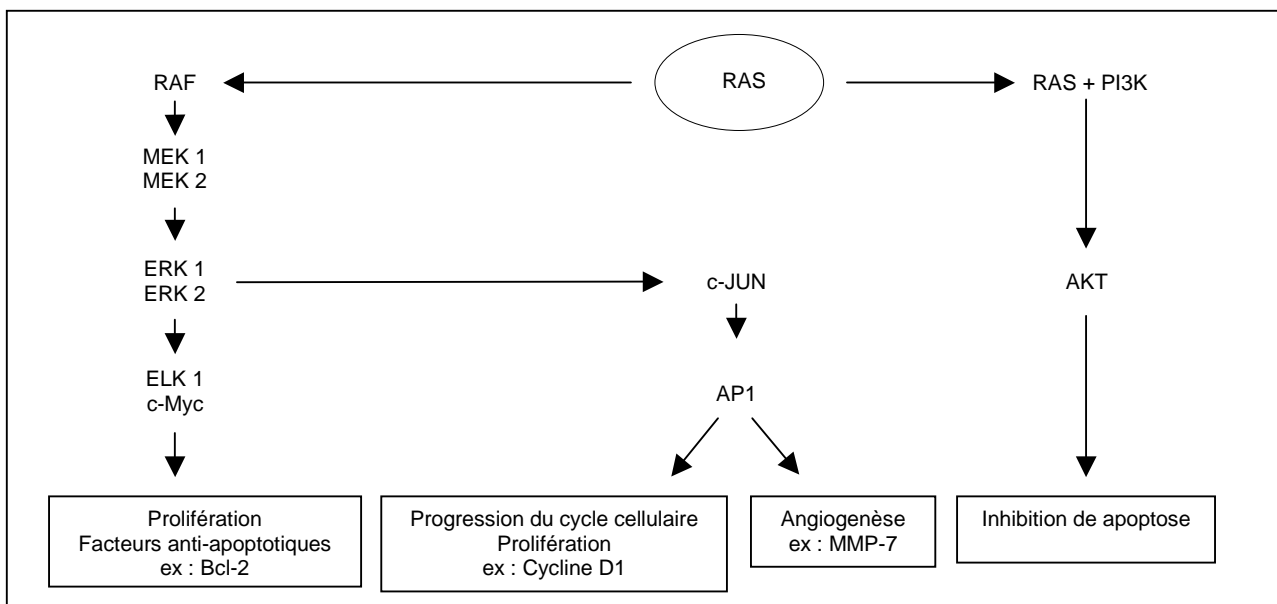


Figure 5 : *RAS* constitutivement activé dans les cellules tumorales présentant une mutation dans ce gène.

b) *dcc*

Simultanément, une mutation ou perte du gène *dcc* (Deleted in Colorectal Cancer) est nécessaire pour l'évolution de l'adénome en carcinome. Ce gène est délété dans 47% des adénomes et 75% des carcinomes colorectaux et semble intervenir dans une étape intermédiaire de la cancérogenèse colique pour assurer la transition entre l'adénome intermédiaire et l'adénome tardif (Fearon *et al.*, 1990). Le gène *dcc*, situé sur le chromosome 18q, code un récepteur transmembranaire homologue aux protéines de la famille N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et son domaine extracellulaire comporte des motifs

homologues à la fibronectine de type III. DCC est le récepteur de la nétrine-1 et fait partie de la famille des récepteurs à dépendance qui sont capables d'induire l'apoptose mais uniquement en l'absence de leur ligand (Keino-Masu *et al.*, 1996). Les cellules qui expriment ces récepteurs sont donc dépendantes de la présence du ligand pour survivre. La nétrine-1 est une protéine chimiotropique appartenant à une famille de protéines sécrétées apparentées à la laminine et a d'abord été décrite pour guider la migration des axones lors du développement du système nerveux (Stein *et al.*, 2001). Dans l'intestin, DCC est exprimé tout le long des villosités, alors que la nétrine-1 n'est produite qu'à la base des cryptes (Hsu *et al.*, 2001). Au fond de ces cryptes, les cellules, qui sont en phase de prolifération, sont dans un environnement riche en nétrine-1 qui les préserverait de la mort cellulaire, alors que les cellules qui cessent de proliférer pour se différencier et migrer le long de la villosité intestinale se retrouveraient progressivement dépourvue de nétrine-1 jusqu'au sommet où elles entrent en apoptose. Le système de dépendance généré par DCC permettrait donc de réguler la durée de survie des cellules épithéliales afin qu'elles ne soient pas soumises trop longtemps aux multiples agressions qu'elles subissent dans la lumière intestinale. Ce mécanisme pourrait ainsi éviter l'accumulation de mutations conduisant à la cancérisation de la cellule.

Forcet *et al.* ont montré que la mort cellulaire induite par DCC suit une nouvelle voie apoptotique indépendante des voies classiques c'est-à-dire mitochondriale ou médiée par les récepteurs de mort (Forcet *et al.*, 2001). En effet, en l'absence de nétrine-1, l'extrémité C-terminale intra-cytoplasmique de *dcc* est clivée par la caspase-3. Ce clivage permet à DCC d'interagir avec la protéine adaptatrice APPL et ainsi de recruter et d'activer la caspase-9 puis la caspase-3 (Liu *et al.*, 2002) pour déclencher la cascade de caspases qui conduit à l'apoptose (figure 6A).

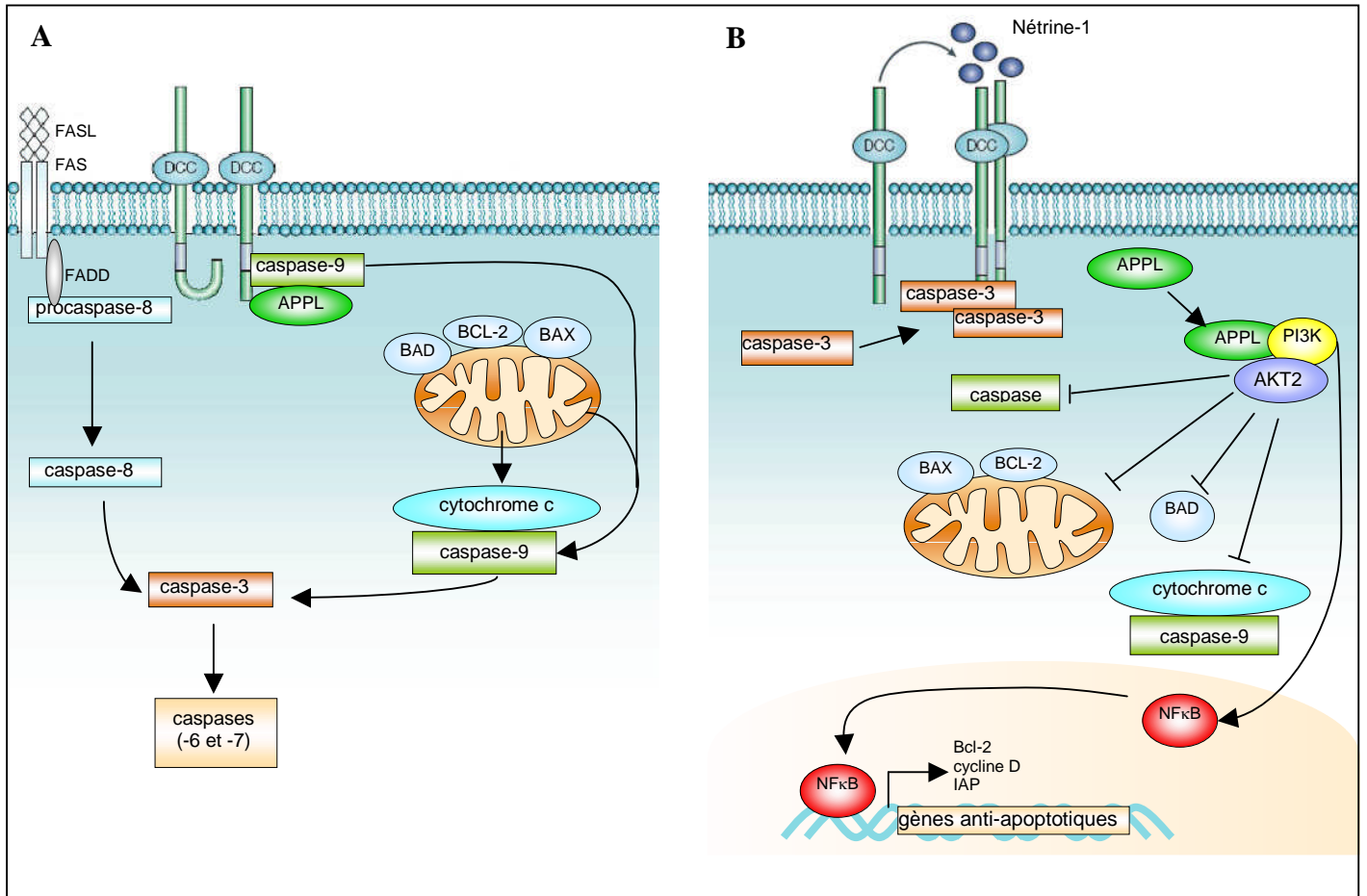


Figure 6 : voie de transduction de l'apoptose *via* le récepteur *dcc* dépendant de la nétrine

A : apoptose induite par l'absence de la nétrine-1, ligand spécifique du récepteur *dcc*

B : Inhibition de l'apoptose en présence de la nétrine-1 ou dans la cellule cancéreuse portant une mutation dans le gène *dcc*

Au contraire, la nétrine-1 en se liant à son récepteur entraîne une dimérisation de ce dernier. Le dimère DCC peut alors capturer la caspase-3 et par là même empêcher son clivage. Son domaine intra-cytoplasmique non clivé ne permet plus à DCC de recruter l'adaptateur APPL ni la caspase-9. La protéine APPL libre active alors la voie anti-apoptotique AKT, en se liant à la PI3K et à son adaptateur AKT2 (Hemmings, 1997). Cette voie conduit à l'inhibition des protéines pro-apoptotiques (cytochrome c et caspase-9) et à l'activation de NFκB (figure 6B). Ce dernier active lui-même la transcription de gènes de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, Bcl-X_l, cycline D et IAP (inhibitors of apoptosis) qui inhibent directement les caspases (Chen *et al.*, 2000; Guttridge *et al.*, 1999; Salvesen et Duckett, 2002) mais aussi de gènes de cytokines, comme les interleukines IL-1 et -6 (Yan *et al.*, 2005). NFκB inhibe également l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX (Bentires-Alj *et al.*, 2001).

Ainsi dans le cas de cancer, cette voie anti-apoptotique serait constamment activée dans les cellules tumorales qui portent une mutation dans le gène *dcc* ou qui le perdent. Elles

pourraient de cette manière échapper à l'apoptose nétrine-dépendante. De même, il a été montré que la surexpression de la nétrine-1 dans l'intestin conduit à une inhibition d'environ 50 % de la mort cellulaire dans l'épithélium et à un développement des lésions hyperplasiques et des adénomes. Ce blocage de l'apoptose entraîne à la fois une initiation de la tumorigenèse et une progression de cette dernière (Mazelin *et al.*, 2004).

1.4.5. p53

Le gène *TP53*, suppresseur de tumeurs, est situé sur le chromosome 17, qui est le siège fréquent de délétions chromosomiques dans les CCR (Baker *et al.*, 1989; Delattre *et al.*, 1989). Les mutations dans ce gène sont les altérations les plus fréquemment trouvées dans les cancers humains, dans plus de 50% des cas (Hollstein *et al.*, 1991) et dans plus de 75% des adénocarcinomes colorectaux (Kinzler et Vogelstein, 1996).

p53 est un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes importants dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Normalement, lorsque p53 est activée suite à divers stress cellulaires (dommage de l'ADN, hypoxie, cytokines, surexpression d'oncogènes, ...), elle agit comme un agent décisionnel qui provoquerait soit l'arrêt du cycle cellulaire en activant l'expression de p21, de cyclines, de CDK,... soit l'apoptose : en stimulant l'expression des gènes pro-apoptotiques (*c-myc*, *puma*, *noxa*, *bax*...), en réprimant celle des gènes anti-apoptiques (*bcl-2* et *bcl-xL*), en induisant le relargage de cytochrome c de la mitochondrie, en stimulant directement l'expression d'effecteurs de l'apoptose (APAF-1 et caspase-6) et en réprimant le gène d'un IAP, la survivine (Fridman et Lowe, 2003; Schmitt *et al.*, 2002; Watson, 2004; Yu et Zhang, 2005). Enfin p53 est également capable d'inhiber la voie de survie cellulaire PI3 kinase/AKT en et l'expression de PTEN, l'inhibiteur de la PI3 kinase (Stambolic *et al.*, 2001).

La perte de p53 dans de nombreux cancers conduit à une instabilité génomique, à une dérégulation du cycle cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. De nombreuses études ont montré que les mutations de ce gène suppresseur de tumeur interviennent tardivement dans la cancérogenèse colique et semblent être nécessaires à la transition de l'adénome vers le carcinome (Baker *et al.*, 1989; Delattre *et al.*, 1989).

2. ROLE DE L'INFLAMMATION DANS LA CANCEROGENESE DU TRACTUS GASTROINTESTINAL

2.1. Place des infections dans les cancers

Le nombre de cas de cancers dans le monde associés à des agents pathogènes est estimé à 13-20 %. Certains pathogènes sont reconnus comme des carcinogènes chez l'homme par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC). Les agents infectieux, principalement les virus, font partie des causes bien connues de cancer et participent au développement de diverses tumeurs (Pisani *et al.*, 1997). Les associations les plus répandues, qui couvrent près de 20 % de toutes les tumeurs, sont celles des papillomavirus et le cancer du col utérin, des polyomavirus et les tumeurs du cerveau, du virus Epstein-Barr et les lymphomes B et les carcinomes du nasopharynx, du virus de l'herpès et le sarcome de Kaposi, des virus de l'hépatite B et C et le cancer du foie, et du virus HTLV1 et de la leucémie T, mais il existe également une association avérée entre *Helicobacter pylori* et le cancer gastrique ainsi qu'entre *Schistosoma haematobium* et le cancer de la vessie (Pagano *et al.*, 2004) (Tableau 1).

Les infections pourraient être responsables de plus de 15% des cancers dans le monde (Kuper *et al.*, 2000; Parsonnet, 1999). Il existe trois mécanismes majeurs par lesquels un agent infectieux pourrait intervenir dans l'initiation ou la promotion de la cancérogenèse :

1°- Il peut persister dans l'organisme de l'hôte et induire une inflammation chronique qui s'accompagne souvent d'une production par les phagocytes d'espèces réactives oxygénées (ROS) et azotées (RNS) au niveau du site de l'inflammation. ROS et RNS sont capables de causer des lésions dans l'ADN, d'endommager les protéines et les membranes cellulaires ainsi que de modifier certaines activités enzymatiques et l'expression de gènes et ainsi de favoriser la cancérogenèse (Ohshima et Bartsch, 1994).

Ces espèces réactives peuvent aussi stimuler la prolifération cellulaire, ce qui amplifie les mutations génétiques et génère une accumulation des cellules tumorales (Cohen *et al.*, 1991).

2°- Il peut directement transformer les cellules en insérant ses propres gènes dans le génome de l'hôte. Ces insertions peuvent activer l'expression d'oncogènes, réprimer celle des suppresseurs de tumeurs ou stimuler la mitose.

3°- Il peut induire une immunodéficience de l'hôte. Les cancers qui surviennent dans un organisme immunodéprimé sont en général très agressifs (Beral et Newton, 1998).

Les infections causant le cancer les mieux démontrées sont les infections virales. En général, pour générer le processus tumoral, les virus doivent persister dans l'hôte et établir une infection chronique. Une des stratégies du virus est d'intégrer son matériel génétique dans le génome de la cellule-hôte. Cette intégration entraîne directement l'expression d'oncogènes viraux, de protéines activatrices d'oncogènes ou inhibitrices de gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui dérégule le cycle de la cellule infectée et inhibe l'apoptose. Ce mécanisme est utilisé par des virus comme les papillomavirus humains dont certains causent 90 % des cancers du col de l'utérus (IARC, 1995) ou le virus de l'hépatite B qui cause plus de la moitié des cancers hépatiques (IARC, 1994a). D'autres virus infectent, se maintiennent et transforment la cellule-hôte sans intégration de leur génome. C'est le cas du virus de l'hépatite C qui cause 25% des cancers du foie en y générant des lésions chroniques par une stimulation excessive de la réponse immunitaire de l'hôte (Shiratori *et al.*, 1995), et du virus Epstein-Barr qui, en activant l'expression de ses oncogènes, induit directement la tumorigénération des cellules infectées et est responsable de la maladie de Hodgkin et des carcinomes du nasopharynx (IARC, 1997). Certains virus ne sont pas directement oncogènes, comme les virus HIV, et sont impliqués dans des cancers par leurs effets délétères sur le système immunitaire de l'hôte et, par là, procurent un environnement propice à de nombreuses infections opportunistes.

Des infections par des parasites sont reconnues pour être associées à certains cancers. Les schistosomes, qui sont des vers parasitant le sang, causent des cancers, notamment de la vessie, en induisant une inflammation chronique (IARC, 1994b). La schistosomose affecte plus de 200 millions de personnes dans le monde et cause près de 95 % des infections parasitaires humaines. Le cancer de la vessie est une des plus sévères complications d'une schistosomose chronique (Tableau 1).

Mais les tumeurs causées par des infections oncogènes sont heureusement des événements plus rares que fréquents. En effet, la moitié de la population mondiale est infectée par *H. pylori* mais seulement 1 % des porteurs développe un cancer gastrique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la plupart des cancers résulte de la prolifération clonale de cellules où de multiples altérations génétiques et moléculaires doivent s'accumuler. En outre, Le système immunitaire est capable de contrôler le développement et d'endiguer l'expansion des cellules tumorales. Enfin, bien que les agents infectieux soient nécessaires, ils ne sont pas suffisants pour le développement de certaines tumeurs et leur action requiert différents facteurs géographiques, socioéconomiques et environnementaux (alcool, tabac, hygiène, autres agents pathogènes, immunodéficience, ...).

Conditions pathologiques	Néoplasmes associés	Agents étiologiques
Distomatose, cholangite	Sarcome cholangieux, carcinome du côlon	Douve du foie (<i>Opisthorchis viverrini</i>), acide biliaire
Cholécystite chronique	Cancer de la vésicule biliaire	Bactéries, calculs biliaires
Gastrite/ulcère	Adénocarcinome gastrique, lymphome du MALT	Helicobacter pylori
Hépatite	Carcinome hépatocellulaire	Virus de l'hépatite B et/ou C
Mononucléose	Lymphome des cellules B non hodgkinien, lymphome de Burkitt	Virus Epstein-Barr
SIDA	Lymphome des cellules B non hodgkinien, carcinome des cellules squameuses, sarcome de Kaposi	Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus de l'herpès de type 8
ostéomyélite	Carcinome de la peau dans les sinus drainants	Infection bactérienne
Maladie inflammatoire pelvienne, inflammation du col utérin	Carcinome des ovaires, de l'utérus, de l'anus	Gonorrhoeae, Chlamydia, papillomavirus humain 16 et 18
Cystite chronique	Carcinome de la vessie, du rectum, du foie, lymphome foliculaire de la rate	ver parasite (schistosome)

Tableau 1 : cancers associés à des agents infectieux (Coussens et Werb, 2002)

2.2. Inflammation chronique et cancérogenèse

Il est maintenant largement reconnu qu'il existe une relation de cause à effet entre l'inflammation et le cancer et que l'immunité innée y joue un rôle prépondérant. Lors de la réaction inflammatoire induite au site d'infection, une large batterie de cytokines et de chimiokines sont libérées pour activer et recruter les leucocytes (neutrophiles, cellules dendritiques, macrophages, éosinophiles, mastocytes et lymphocytes) au niveau de la lésion. Tous ces effecteurs de l'inflammation vont, à leur tour, y libérer des cytokines, tels le TNF- α et les interleukines, des médiateurs cytotoxiques, comme les espèces réactives oxygénées et les interférons (IFNs) et enfin des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) et des agents perforant la membrane. Les infections persistantes dans l'hôte induisent une inflammation chronique qui, par l'induction de cytokines pro- et anti-inflammatoires, peut provoquer des cascades de phénomènes mutagènes. Les cellules inflammatoires produisent des médiateurs, tels que les radicaux libres, les prostaglandines et les cytokines, qui participent aux différentes phases de la réaction inflammatoire. L'exposition chronique à ces médiateurs de l'inflammation engendre une augmentation de la prolifération cellulaire, une mutagenèse, une activation d'oncogènes et l'angiogenèse (Shacter et Weitzman, 2002).

L'association la mieux reconnue entre l'inflammation chronique et une maladie néoplasique est celle qui existe dans la cancérogenèse colique chez les patients présentant une maladie inflammatoire de l'intestin. En effet, le risque de cancer colorectal est cinq à vingt fois plus important chez les malades atteints d'une colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn que dans le reste de la population (Ekbom *et al.*, 1990a; Ekbom *et al.*, 1990b; Gillen *et al.*, 1994). Ce risque augmente de manière exponentielle avec la sévérité, l'étendue et la durée de l'inflammation. Les CCR associés à une maladie inflammatoire et les CCR sporadiques se développent tous les deux à partir de lésions précancéreuses de la muqueuse intestinale. Mais à la différence de l'évolution du CCRS vers des polypes adénomateux, dans le cas de CCR associé à une maladie inflammatoire, la muqueuse développe des lésions dysplasiques plates (Riddell *et al.*, 1983). Malgré ces différences morphologiques, ces deux types de CCR progressent l'un comme l'autre par étapes et avec une accumulation de mutations qui apparaissent dans les mêmes gènes mais qui ne se succèdent pas dans le même ordre au cours du processus de cancérisation (figure 7) (Seril *et al.*, 2003).

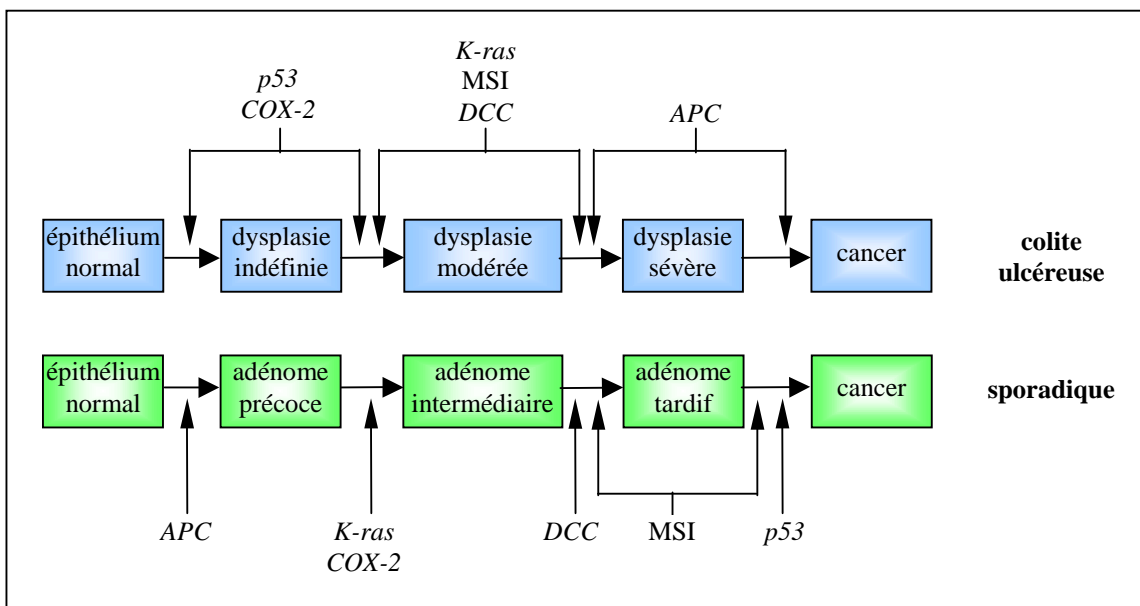


Figure 7 : Comparaison des étapes pathogénétiques du développement du cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse (en haut) et du cancer colorectal sporadique (en bas). COX-2, cyclooxygénase 2 ; MSI, microsatellite instability ; DCC, deleted in colon cancer ; APC, adenomatous polyposis coli. (Itzkowitz et Yio, 2004)

Par exemple, la mutation dans le gène *apc*, qui est considérée comme l'événement moléculaire majeur dans la première étape de la pathogénèse du CCRS, est beaucoup moins fréquente et intervient généralement assez tardivement dans la séquence dysplasie-carcinome associée à la colite ulcéreuse (Aust *et al.*, 2002). Au contraire, les mutations de *p53*, qui surviennent dans les dernières étapes de la séquence adénome-carcinome du CCR sporadique, apparaissent très vite dans la cancérogenèse associée à la colite (Brentnall *et al.*, 1994; Yin *et*

al., 1993). Comme dans certains CCRS, l'hyperméthylation du gène *hMLH1* génère une instabilité des microsatellites qui est un phénomène très fréquent dans les néoplasmes associés à la colite ulcéreuse (Fleisher *et al.*, 2000).

De nombreux auteurs ont montré que les cancers associés aux maladies inflammatoires de l'intestin se développent à partir du site où s'exerce l'inflammation chronique et que la colite ulcéreuse n'augmente pas le risque d'autres types de cancers (Ekblom *et al.*, 1992). C'est pourquoi ils concluent que les facteurs impliqués dans cette inflammation, tel le stress oxydatif, pourraient causer au niveau du site enflammé des altérations moléculaires impliquées dans la cancérogenèse.

Des gènes connus pour intervenir dans l'inflammation, notamment ceux codant la COX-2, la iNOS (inducible nitric oxide synthase) et des cytokines, voient leur expression fortement stimulée au niveau du site d'inflammation de la muqueuse colique et cette surexpression est maintenue dans les tumeurs qui y sont associées.

2.2.1. Médiateurs libérés lors de la réponse inflammatoire

2.2.1.1 ROS et RNS

Les radicaux libres, sous leurs formes réactives oxygénée (ROS) ou azotée (RNS), ont normalement un rôle protecteur en neutralisant les pathogènes et en détruisant les cellules tumorales. Mais il a été montré que iNOS, qui produit ces radicaux libres, est aussi impliquée dans de nombreuses pathologies, telles que l'inflammation et le cancer. Il est démontré que le stress oxydatif qui accompagne une inflammation chronique contribue à la transformation tumorale. Ce stress oxydatif, avec les dommages cellulaires qu'il provoque, semble jouer un rôle-clé dans le lien existant entre la pathogenèse de la colite ulcéreuse et celle du cancer colorectal. Les cellules inflammatoires qui interviennent dans la colite génèrent des espèces ROS et RNS. Ainsi, chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin, non seulement les neutrophiles et les macrophages libèrent des radicaux libres et des molécules pro-oxydantes lors de la réaction inflammatoire aiguë, mais les tissus enflammés expriment également fortement la iNOS et les espèces ROS/RNS. De même la iNOS et le NO (nitric oxide) sont détectés à des taux très élevés dans les tumeurs par rapport au taux d'expression basale dans les tissus normaux. Des travaux ont révélé que les souris Min (iNOS^{-/-}) présentaient beaucoup moins d'adénomes que les animaux Min (Ahn et Ohshima, 2001).

ROS et RNS agissent en oxydant et en endommageant l'ADN, soit directement, soit en interagissant avec d'autres radicaux ou des composants cellulaires (figure 8). Le NO et ses

dérivés, produits par les phagocytes, peuvent intervenir dans le processus séquentiel de la cancérogenèse en générant des dommages dans l'ADN, l'ARN et les protéines ainsi que des peroxydations de lipides membranaires qui aboutissent à la formation de produits mutagènes et génotoxiques (Burcham, 1998; Hussain *et al.*, 2003; Marnett et DuBois, 2002). Les cellules inflammatoires activées réduisent, grâce à la NADPH oxydase, l'oxygène en radicaux libres superoxydés qui peuvent générer des radicaux hydroxylés encore plus réactifs (Frenkel, 1992). D'autre part, l'anion superoxyde peut former de l'hydrogène peroxyde qui produit des lésions site-spécifiques dans l'ADN.

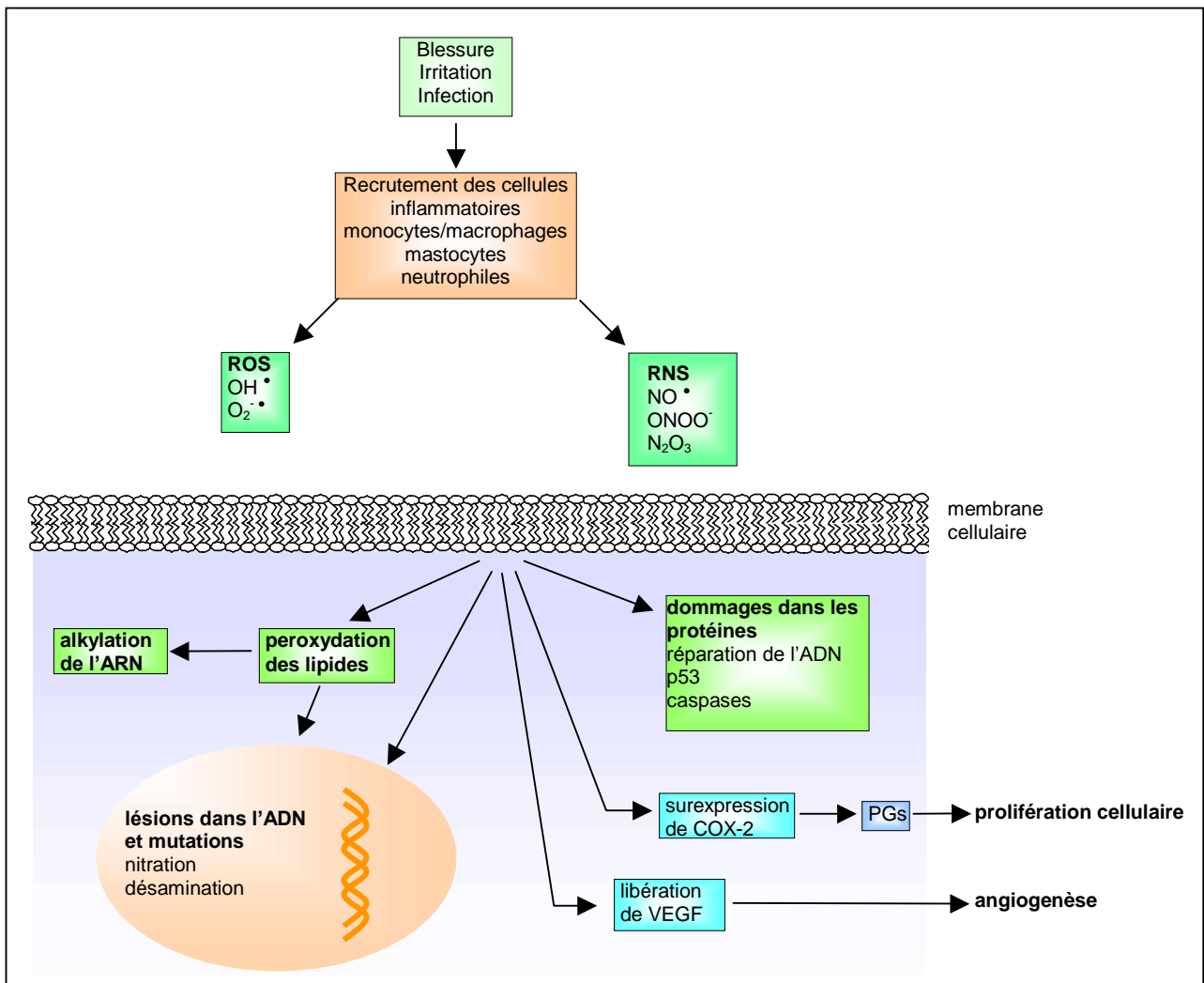


Figure 8 : Principaux effets des ROS et RNS impliqués dans la cancérogenèse au niveau du site d'inflammation.

L'inflammation consécutive à une agression cellulaire se traduit par le recrutement de cellules de l'inflammation dans les tissus. L'activation de ces cellules par des cytokines ou des composants bactériens conduit à la formation de radicaux libres, tels que ROS (reactive oxide species) et RNS (reactive nitrogen species). Ils participent à la progression tumorale en générant des dommages dans les lipides, les protéines et l'ADN. La peroxydation des lipides de la membrane cellulaire oxyde l'ADN, augmentant les risques de mutations. Les radicaux libres peuvent également modifier directement des protéines impliquées dans la cancérogenèse ou encore causer des lésions directes de l'ADN. Ils sont aussi capables d'induire l'expression de la COX-2 et la libération de VEGF favorisant la prolifération et l'angiogenèse (Hussain *et al.*, 2003).

Les espèces réactives ROS et RNS peuvent causer des altérations génétiques, des instabilités génomiques et des méthylations aberrantes de bases. En effet, H₂O₂ est capable d'inactiver le système de réparation de l'ADN, en dénaturant les complexes protéiques du MMR, et génère ainsi un phénotype MSI caractéristique des tissus tumoraux (Chang *et al.*, 2002). Des études ont, en outre, montré que ces ROS et RNS peuvent induire *in vitro* des modifications dans les séquences répétitives d'ADN et pourraient ainsi être à l'origine de l'instabilité des microsatellites au niveau de la muqueuse colique enflammée.

Les radicaux hydroxylés (OH[•]) et le peroxy-nitrite (ONOO[•]) sont des espèces très réactives qui induisent des lésions oxydatives et des nitrations de l'ADN (Nam *et al.*, 2004). Les espèces réactives dérivées du NO sont libérées par les cellules inflammatoires et peuvent agir sur les cellules épithéliales voisines en provoquant des mutations somatiques dans les gènes-clés impliqués dans la cancérogenèse. Ainsi ROS et RNS sont capables d'induire une destruction et une prolifération cellulaires qui vont favoriser sélectivement les clones qui comportent des mutations.

Les radicaux libres, produits pendant l'inflammation chronique, peuvent induire des mutations et des modifications post-traductionnelles de protéines associées au cancer. Ces dommages peuvent aboutir à la dérégulation de processus cellulaires comme la réparation de l'ADN (Chang *et al.*, 2002), le cycle cellulaire (Pervin *et al.*, 2001) et l'apoptose (Melino *et al.*, 1997). Les radicaux libres sont capables de moduler la croissance cellulaire et la promotion tumorale en activant des voies de signalisation conduisant à l'induction de proto-oncogènes, comme c-FOS, c-JUN et c-MYC.

Dans la muqueuse colique, au niveau du site d'inflammation, l'augmentation de l'activité de la iNOS est corrélée avec l'apparition de mutations dans *p53* générées par le NO, présent alors en forte concentration (Hofseth *et al.*, 2003b). L'expansion sélective des clones de mutants *p53* qui en découle pourrait participer à la cancérogenèse (Greenblatt *et al.*, 1994).

De nombreuses études ont montré que les inhibiteurs de la iNOS réduisent l'inflammation, la tumorigenèse, l'angiogenèse ainsi que les métastases (Hofseth *et al.*, 2003a). Les ROS et RNS ont, en plus, la possibilité de stimuler l'expression de médiateurs importants dans la cancérogenèse comme le VEGF (Ambs *et al.*, 1998) qui permet la vascularisation des tumeurs, ou encore la COX-2 (Landino *et al.*, 1996).

2.2.1.2. Les prostaglandines et la COX-2

La cyclooxygénase-2 (COX-2) est surexprimée aux stades précoces de la cancérogenèse colique et l'augmentation de son expression est détectée dans 85% des adénocarcinomes du côlon (Kargman *et al.*, 1995; Zhang et Sun, 2002).

La cyclooxygénase (Cox *et al.*, 2004) catalyse la première étape d'oxydation de l'acide arachidonique aboutissant à la synthèse des prostanoides (PGs), qui regroupent le thromboxane A₂ (TXA₂), les prostaglandines (PGE₂, PGD₂, PGF₂) et la prostacycline (PGI₂). Les PGs interviennent dans des processus physiologiques tels que la coagulation sanguine, l'ovulation, le métabolisme osseux, la croissance et le développement neuronal, la cicatrisation, la fonction rénale et les réponses immunitaires. La COX-1 et la COX-2 sont les deux isoformes identifiées de la cyclooxygénase (Kujubu *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1991). Alors que la COX-1 est constitutivement exprimée dans la majorité des tissus et est impliquée dans l'homéostasie, la COX-2 constitue la forme inducible de l'enzyme et son expression est stimulée par des facteurs de croissance, des agents mitogènes, des hormones ou encore des cytokines. Le taux d'expression de la COX-2 augmente fortement dans des pathologies, souvent inflammatoires (Ashida *et al.*, 2003; Catley *et al.*, 2003; Singh-Ranger *et al.*, 2003). En effet il a été montré que cette enzyme est surexprimée au niveau des sites d'inflammation (Herschman *et al.*, 1995). En outre, son expression augmente dans 40 % des adénomes colorectaux et dans 85 % des adénocarcinomes par rapport aux tissus épithéliaux normaux, tandis que le taux de COX-1 reste constant dans tous les cas (Eberhart *et al.*, 1994). D'autre part, la COX-2 est également surexprimée dans d'autres néoplasmes épithéliaux humains (Soslow *et al.*, 2000), comme le cancer du sein (Half *et al.*, 2002), du pancréas (Tucker *et al.*, 1999), de l'œsophage (Shamma *et al.*, 2000), de l'estomac (van Rees *et al.*, 2002) et de la langue (Wolff *et al.*, 1998).

➤ Modulation de l'expression de la COX-2

La surexpression de la COX-2 dans les tumeurs colorectales est due à une augmentation de la transcription de son gène et à la stabilisation de son ARN messager (Dixon *et al.*, 2001). Plusieurs voies de signalisation interviennent dans la régulation de cette expression : la voie des kinases ras/MEK/ERK, celle de Rho B ainsi que la voie Akt/PKB (Shao *et al.*, 2000; Sheng *et al.*, 2001a). L'expression de la COX-2 est rapidement induite par de nombreux stimuli : notamment par les médiateurs de l'inflammation comme l'interleukine 1 β (IL-1 β), le TNF- α , le lipopolysaccharide (LPS), l'IL-6 et l'interféron γ (IFN- γ), mais également par des

facteurs de croissance comme l'EGF (epidermal growth factor), le TGF- α et - β (transforming growth factor), le bFGF (basic fibroblast growth factor) et le PDGF (platelet-derived growth factor), ainsi que les acides gras, les sels biliaires et les mucines sécrétées par les cellules cancéreuses coliques (Glinghammar et Rafter, 2001; Inaba *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 1993; Wendum *et al.*, 2004). En outre, l'expression de la COX-2 est régulée par l'activation d'oncogènes, comme *k-ras*, et la répression de gènes supresseurs de tumeurs, tels que *p53*, connus pour être impliqués dans la cancérogenèse colique.

a) Principaux effets de l'expression de la COX-2 dans la cancérogenèse colique

- mécanismes indépendants de la production des PGE₂

La COX-2 pourrait jouer un rôle dans la cancérogenèse colique en activant directement des carcinogènes (figure 9). En effet, elle possède une activité peroxydase lui permettant d'agir sur les hydrocarbures polycycliques, les aflatoxines, les pesticides halogénés et les phénols (Shiff et Rigas, 1997).

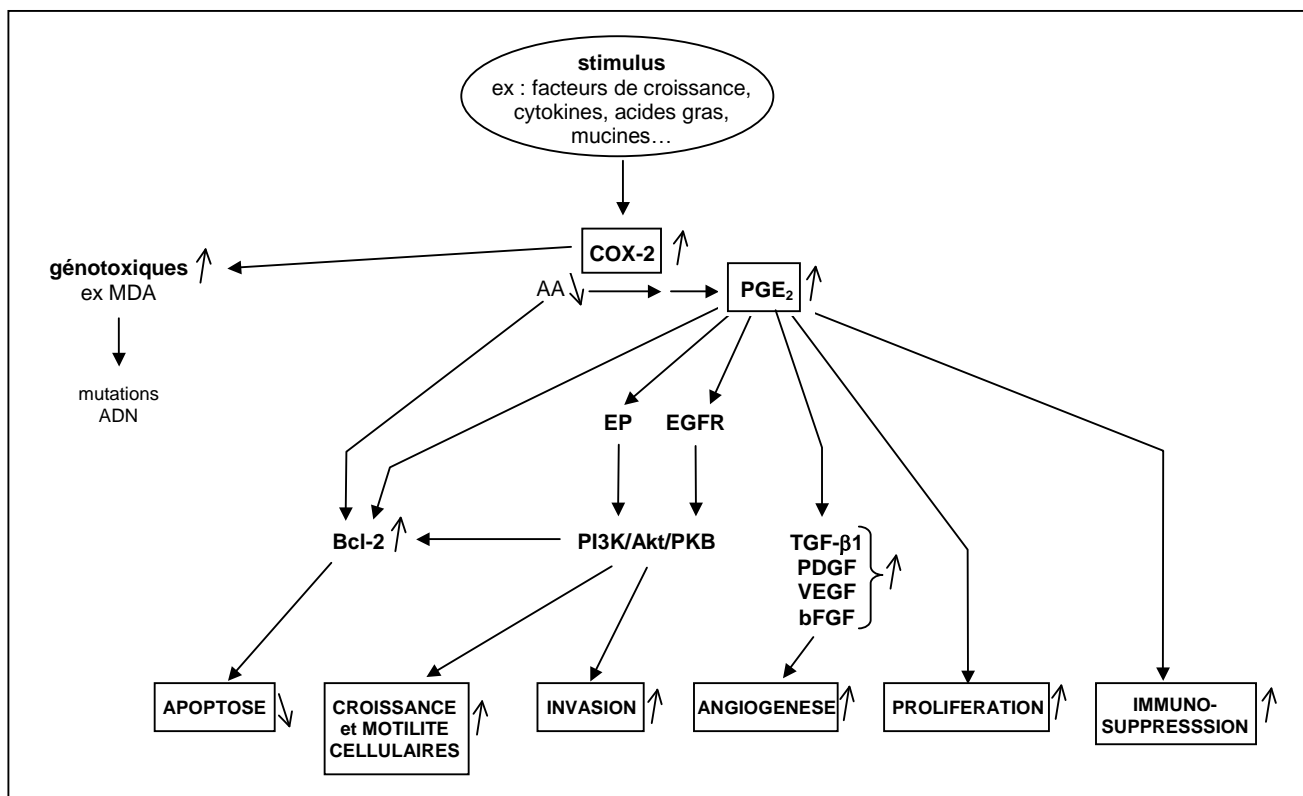


Figure 9 : La COX-2 est impliquée dans plusieurs phénomènes cellulaires qui participent à la tumorigenèse gastro-intestinale. La COX-2 transforme l'acide arachidonique (AA) en prostanoïdes et notamment en PGE₂. Les PGE₂ sont connus pour être capables de stimuler la prolifération et l'angiogenèse, tandis qu'elles inhibent l'apoptose et les réponses immunitaires. L'apoptose est inhibée par l'augmentation de l'expression de Bcl-2 qui est induite par la chute du taux en acide arachidonique converti par la COX-2 et par les PGE₂, soit directement, soit *via* leurs récepteurs EP qu'elles activent. (Backlund *et al.*, 2005; Cao et Prescott, 2002).

D'autre part, la COX-2 transforme l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂), intermédiaire qui lui-même est converti ensuite en PGs par diverses prostaglandine synthases spécifiques. Cependant, les PGH₂ peuvent être transformées en malondialdéhyde qui est un mutagène formant directement des adduits avec les désoxynucléosides (Prescott et White, 1996). Enfin, l'acide arachidonique libre, dont le taux est réduit par l'activité de la COX-2, possède lui-même des propriétés pro-apoptotiques (Cao *et al.*, 2000).

➤ mécanismes dépendants des PGE₂

Parmi les prostaglandines produites par la COX-2 dans les tumeurs colorectales, les PGE₂ sont les plus abondamment trouvées dans les CCR (Rigas *et al.*, 1993). Elles favorisent la progression tumorale en stimulant la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, en inhibant l'apoptose, en augmentant le pouvoir invasif des cellules et en modulant l'immunosuppression (Backlund *et al.*, 2005). Les modèles animaux de tumorigenèse intestinale ont permis de confirmer ces rôles des PGE₂. En effet, l'administration de PGE₂ à des souris Apc^{Min}, ou souris Min (multiple intestinal neoplasia), neutralise la régression des adénomes coliques induite par le traitement par des AINS qui inhibent spécifiquement la COX-2 (Hansen-Petrik *et al.*, 2002). Wang et al confirment ces résultats en montrant que le traitement des souris Apc^{Min} par les PGE₂ augmente considérablement la taille et le nombre des adénomes intestinaux (Wang *et al.*, 2004). Les PGE₂ aggravent, en outre, les tumeurs coliques induites chez les rats par l'azoxyméthane (AOM), un cancérigène chimique spécifique du côlon (Kawamori *et al.*, 2003).

▪ *Effets des PGE₂ sur la prolifération cellulaire et l'apoptose*

Les PGE₂ sont capables de stimuler le développement tumoral en induisant la prolifération cellulaire (Sheng *et al.*, 2001b) et en inhibant l'apoptose (Sheng *et al.*, 1998). Cette prolifération pourrait être médiée par la transactivation du récepteur de l'EGF par les PGE₂ (Pai *et al.*, 2002) et l'inhibition de l'apoptose semble être causée par l'augmentation de l'expression de Bcl-2.

Une étude a révélé que les PGs, notamment les PGE₂, augmentent la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire des hépatocytes de rats (Kimura *et al.*, 2000).

- *Effets des PGE₂ sur l'angiogenèse*

De nombreux travaux ont montré que la COX-2 tient un rôle important dans l'angiogenèse (Tsuji *et al.*, 1998). En effet, elle est impliquée dans la libération de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et le bFGF dans les CCR (Cianchi *et al.*, 2001). L'expression de la COX-2 et les PGE₂ qu'elle produit, augmentent l'adhésion cellulaire, la motilité et le pouvoir invasif des cellules cancéreuses coliques (Sheng *et al.*, 2001b; Tsuji *et al.*, 1997). Ces phénomènes jouent des rôles prépondérants dans le développement métastatique.

D'autre part, lorsque l'on surexprime la COX-2 dans les cellules cancéreuses coliques Caco-2, le pouvoir invasif de ces cellules est amplifié, la MMP-2 est activée et le taux en ARN de cette métalloprotéinase augmente (Tsuji *et al.*, 1997). L'expression de la COX-2 dans les cellules des lignées Caco-2 et HCA-7 est également associée à une forte production de VEGF, de bFGF, de TGFβ-1, de PDGF et d'endothéline-1. Tous ces facteurs sont connus pour stimuler la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation des vaisseaux (Tsuji *et al.*, 1998). Chez l'homme, une forte relation entre la COX-2 et la production de VEGF est décrite dans les CCR et leur expression augmente avec la formation de capillaires sanguins (Cianchi *et al.*, 2001).

Enfin, Les PGE₂ peuvent favoriser la progression tumorale en causant une immunosuppression chez le sujet (Kojima *et al.*, 2001).

- b) Les récepteurs des PGE₂

Les prostaglandines peuvent agir localement de façon autocrine ou paracrine. Elles activent, en s'y liant, une famille de récepteurs couplés aux protéines G, appelés EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄ (Coleman *et al.*, 1994; Suda *et al.*, 1996). Dans les cellules cancéreuses coliques, les PGE₂ stimulent la croissance et la motilité cellulaires, *via* le récepteur EP₄, par l'activation de la voie PI3K/AKT/protéine kinase B (PI3K/AKT/PKB) (Sheng *et al.*, 2001b). EP₂ et EP₃ sont également présents dans ces cellules et ont la même affinité pour les PGE₂ que EP₄. Alors que EP₁, EP₂ et EP₄ sont impliqués dans la promotion du CCR, l'activation du récepteur EP₃ réduit le développement tumoral (Shoji *et al.*, 2004). Tout récemment, il a été montré que le traitement de rats avec un antagoniste du récepteur EP₁ entraîne une réduction du nombre de cryptes anormales dans la muqueuse colique de ces animaux chez lesquels ces tumeurs colorectales avaient été induites par l'AOM puis amplifiées par l'administration de PGE₂

(Niho *et al.*, 2005). Ces récepteurs pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des CCR. Une autre voie thérapeutique est également très explorée : celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou AINS.

c) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Dans plusieurs études épidémiologiques, une réduction significative de la mortalité des cancers colorectaux a été observée chez les patients prenant des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par rapport aux individus qui n'en recevaient pas. Les AINS inhibent l'activité enzymatique des deux isoformes de la cyclooxygénase mais seuls les inhibiteurs sélectifs de la COX-2, tels le rofecoxib, le celecoxib ou le valdecoxib, montrent un effet protecteur dans la formation de polypes (Subbaramaiah *et al.*, 1997). Des études sur les populations révèlent que la consommation régulière d'AINS, comme l'aspirine (Baron *et al.*, 2003; Sandler *et al.*, 2003), sur une période de dix à quinze ans, peut diminuer de 40 à 50 % le risque de CCR (DuBois *et al.*, 1996a). La même constatation est faite pour les cancers de l'oesophage et de l'estomac (Langman *et al.*, 2000). Mais la prise prolongée des AINS non sélectifs peut avoir des effets secondaires indésirables comme des nausées, une dyspepsie, une gastrite, des douleurs abdominales ou une ulcération gastro-duodénale.

L'implication de la COX-2 dans la cancérogenèse épithéliale a pu être démontrée grâce aux modèles animaux de cancer du côlon et du sein (Backlund *et al.*, 2005; Sinicrope et Gill, 2004; Zha *et al.*, 2004). L'expression de la COX-2 a été révélée dans les adénomes intestinaux des rats traités à l'AOM (DuBois *et al.*, 1996b) et des souris Apc^{Min} (ou souris Min) qui portent une mutation dominante dans le gène *Apc* (Williams *et al.*, 1996). Le nombre et la taille des polypes dans la muqueuse de souris $Apc^{\Delta 716}$ est radicalement réduit (80 %) chez les souris déficientes pour le gène de la COX-2, par rapport aux souris $Apc^{\Delta 716}$ et $cox-2^{+/+}$ (Chulada *et al.*, 2000). Par ailleurs, le traitement de ces souris $Apc^{\Delta 716}$ possédant le gène sauvage de la COX-2 avec un inhibiteur sélectif de la COX-2 réduit efficacement le nombre des polypes (Jacoby *et al.*, 1996; Jacoby *et al.*, 2000; Oshima *et al.*, 1996). Cette enzyme constitue donc une cible potentielle pour le traitement et la prévention du CCR par les anti-inflammatoires non stéroïdiens. En effet, depuis plus d'une dizaine d'années, l'effet des AINS sur l'incidence du CCR est reconnue (Giardiello *et al.*, 1993). L'influence de ces anti-inflammatoires sur l'incidence du cancer confirme que la COX-2 pourrait jouer un rôle primordial dans la cancérogenèse colique.

➤ AINS et apoptose

Une augmentation de l'apoptose est observée après un traitement aux AINS dans l'épithélium intestinal des modèles animaux de CCR ainsi que chez les patients atteints de FAP (Sinicrope *et al.*, 2004). Bien que le mécanisme d'action des AINS sur l'inhibition de l'apoptose soit encore méconnu, il apparaît qu'ils peuvent déclencher la voie apoptotique mitochondriale dépendante des caspases dans les cellules cancéreuses coliques (Sun *et al.*, 2002) et qu'ils diminuent le taux de la protéine anti-apoptique Bcl-X_L (Zhang *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les cellules épithéliales intestinales de rats transfectées avec un ADNc codant la COX-2 présentent une adhérence accrue à la matrice extracellulaire, une résistance à l'apoptose induite par le butyrate et une surexpression de Bcl-2 (Tsuji et DuBois, 1995). Cependant les fonctions normales sont restaurées par le sulindac, un inhibiteur sélectif de la COX-2. Sun *et al.* (2002) ont montré que lorsqu'ils induisent la surexpression de la COX-2 dans les cellules cancéreuses coliques humaines HCT-15, l'apoptose induite par les AINS est inhibée. Toutes ces données suggèrent que la COX-2 peut contribuer à la progression tumorale en réduisant l'apoptose.

➤ AINS et angiogénèse

Dans les années 1980, les travaux de Peterson *et al.* montrèrent que les AINS étaient capables d'inhiber la vascularisation dans les xénogreffes tumorales, mettant ainsi en évidence le lien qui existe entre les PGs et l'angiogénèse (Peterson, 1983). Depuis, des études ont montré que les inhibiteurs spécifiques de la COX-2 sont capables de réduire l'angiogénèse *in vitro* (Tsuji *et al.*, 1998) et *in vivo* (Masferrer *et al.*, 2000). L'aspirine, notamment, inhibe l'angiogénèse et la production de facteurs angiogéniques dans les cellules cancéreuses coliques qui surexprimaient la COX-2.

2.2.1.3. Les cytokines proinflammatoires

Le microenvironnement d'une tumeur épithéliale est complexe et est constitué d'une grande variété cellulaire : cellules tumorales, fibroblastes, cellules endothéliales et leucocytes infiltrants. Non seulement les cellules de l'inflammation présentes au niveau de cette tumeur (neutrophiles, cellules dendritiques, macrophages, éosinophiles, mastocytes et lymphocytes) mais également les cellules tumorales sont capables de produire diverses cytokines et chimiokines qui exercent un contrôle autocrine et paracrine sur ce microenvironnement néoplasique. Elles agissent sur la croissance et la survie des cellules tumorales, régulent le développement et le remodelage de la matrice extracellulaire, contrôlent l'infiltration des leucocytes, stimulent la néovascularisation, modulent la réponse immune et semblent

intervenir sur les processus de formation des métastases (Baier *et al.*, 2005; Wilson et Balkwill, 2002).

Il a été montré que les cellules néoplasiques peuvent libérer de l'IL-6 et du CSF-1 (colony-stimulating factor-1) qui stimulent la différenciation des précurseurs myéloïdes en cellules macrophage-like (Allavena *et al.*, 2000).

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) tiennent un rôle important parmi les cellules inflammatoires dans les tissus néoplasiques et y sont recrutés par les chimiokines MCP (monocyte chemoattractant protein). Les TAMs peuvent agir de deux façons différentes dans les néoplasmes : activés par l'IL-2, l'IFN γ et l'IL-12, ils peuvent éliminer les cellules tumorales, ou bien stimulés par CCL2/MCP-1 et CCL5/RANTES, ils peuvent participer à la progression tumorale en produisant des facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques, des cytokines et des protéases (Brigati *et al.*, 2002; Schoppmann *et al.*, 2002). Il a été montré que, dans les mélanomes, les macrophages produisent du TGF- β , du TNF- α , de l'IL-1 α , de l'acide arachidonique et des protéases extracellulaires (Torisu *et al.*, 2000). Dans un modèle animal de cancer mammaire, les souris portant une délétion du gène codant le CSF-1 présentent une réduction des métastases pulmonaires et un retardement du développement des carcinomes (Lin *et al.*, 2001). Ces modèles animaux ont ainsi permis de confirmer l'importance des macrophages dans la cancérogenèse.

Il a aussi été montré que les TAMs ainsi que les cellules tumorales sont capables de libérer de l'IL-10 qui inhibe l'action anti-tumorale des cellules T cytotoxiques, participant ainsi à l'immunosuppression observée dans les cancers.

Le microenvironnement avoisinant la tumeur contient des cellules immunitaires qui libèrent des cytokines et des chimiokines tels le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 mais également des enzymes dégradant la matrice, des facteurs de croissance et des espèces réactives ROS/RNS. De très récents travaux ont montré que l'exposition prolongée des cellules épithéliales coliques, à partir de trois jours de stimulation, au TNF- α et/ou à l'IFN- γ provoque *in vitro* une forte induction de la iNOS et une augmentation des lésions dans l'ADN (Seidelin et Nielsen, 2005).

Toutes ces études ont montré qu'une association étroite existe entre le développement d'un néoplasme au niveau du tractus gastro-intestinal et une maladie intestinale inflammatoire ou IBD. Cette dernière est caractérisée par une forte libération de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes au niveau de la muqueuse. Leur production est régulée par

le facteur de transcription NF- κ B (Jobin et Sartor, 2000a; Neurath *et al.*, 1998). En l'absence de stimulation, NF- κ B est associé dans le cytoplasme à un complexe inhibiteur de κ B constitué des protéines I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ et I κ B γ . En réponse à divers stimuli (cytokines pro-inflammatoires, produits bactériens, stress oxydatif), ces protéines peuvent être phosphorylées par des I κ B kinases (I κ Ks) puis dégradées. NF- κ B ainsi libéré est transloqué dans le noyau où il se lie à l'ADN afin de réguler l'expression des gènes cruciaux dans le processus inflammatoire comme ceux codant le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et la COX-2 (Jobin et Sartor, 2000b). L'implication de l'activation de NF- κ B a été démontrée dans l'inflammation et la survie cellulaire (Chen *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2003). En plus de l'inflammation, l'activation prolongée de NF- κ B semble contribuer à la cancérogenèse (Karin *et al.*, 2002). L'activation de NF- κ B en réponse à l'inflammation chronique semble avoir un rôle particulièrement important dans la cancérogenèse gastro-intestinale notamment dans le cancer gastrique et le cancer associé à la colite ulcéreuse. NF- κ B est activé dans les macrophages de la *lamina propria* et dans les cellules épithéliales au niveau des tumeurs coliques chez des patients présentant une IBD (Lind *et al.*, 2001; Rogler *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2003).

Le modèle murin de cancer associé à la colite, décrit par Greten *et al.* (2004) a permis d'établir que NF- κ B constitue le lien central entre l'inflammation et la cancérogenèse. Dans ce modèle animal, l'inactivation de la voie I κ K β /NF- κ B entraîne une réduction de l'inflammation et limite la tumorigenèse au niveau intestinal. NF- κ B semble contribuer à la progression tumorale par deux mécanismes différents selon le type cellulaire. La voie I κ K β /NF- κ B est activée dans les entérocytes ainsi que dans les cellules myéloïdes environnantes et I κ K β contribue à la progression tumorale dans ces deux types cellulaires. Dans les cellules épithéliales, I κ K β stimule la cancérogenèse en inhibant l'apoptose *via* la voie mitochondriale. Il a été montré que la délétion de I κ K β dans les entérocytes diminue fortement l'incidence des tumeurs coliques en activant l'apoptose de ces cellules *via* l'induction de Bcl-X_L mais sans, cependant, réduire l'inflammation. Le deuxième mécanisme impliquant NF- κ B a été mis en évidence dans les cellules de la lignée myéloïde de ces souris où la délétion de I κ K β entraîne une diminution significative de la taille des néoplasmes coliques, accompagnée d'une augmentation de l'expression de cytokines proinflammatoires mais sans affecter, dans ce cas, l'apoptose. Ces deux mécanismes médiés par NF- κ B combinés semblent être impliqués dans la cancérogenèse associée à l'inflammation au niveau du côlon. En outre, chez les patients atteints de cancer associé à la colite, le traitement par des

AINS semble inhiber la voie $\text{IkK}\beta/\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Yamamoto *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 1998), en plus de l'inhibition de la COX-2 et de la synthèse de PGs (Gupta et Dubois, 2001).

Ainsi, en plus de leur rôle dans l'inflammation, les cytokines et chimiokines sont largement reconnues pour avoir des effets qui peuvent favoriser le développement tumoral en régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore l'angiogénèse.

a) Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines chimioattractantes qui recrutent les leucocytes au niveau du site d'inflammation. Elles appartiennent à une grande famille de molécules de petite taille (7-15 kDa) qui est subdivisée en quatre groupes en fonction de l'arrangement des résidus cystéine à l'extrémité N-terminale : les chimiokines C-X-C (un acide aminé entre deux cystéines), les chimiokines C-C (deux cystéines adjacentes), les chimiokines C et le groupe C-X₃-C (Bazan *et al.*, 1997; Kelner *et al.*, 1994; Luster, 1998).

Certaines cellules tumorales non seulement régulent l'expression de leur chimiokines pour participer au recrutement des cellules inflammatoires mais utilisent également ces médiateurs solubles pour favoriser la progression tumorale. Le meilleur exemple d'une telle influence des chimiokines sur la prolifération des cellules néoplasiques est celui des mélanomes. *In vitro*, la prolifération des mélanocytes est inhibée en bloquant $\text{GRO}\alpha$ ou le récepteur CXCR2 (Norgauer *et al.*, 1996). La surexpression de $\text{GRO}\alpha$, $\text{GRO}\beta$ ou $\text{GRO}\gamma$ dans de nombreuses lignées tumorales amplifie le développement de mélanome chez les souris dites *nude* (Balentien *et al.*, 1991; Owen *et al.*, 1997). Les chimiokines à motif CXC présentent une activité autocrine dans la progression des cancers du pancréas, des voies aéro-digestives supérieures et de la langue (Farrow et Evers, 2002; Vicari et Caux, 2002). Ces mêmes chimiokines sont reconnues comme des facteurs pro-angiogéniques qui stimulent la migration des cellules endothéliales (Strieter *et al.*, 1995).

Le tractus gastro-intestinal constitue le plus grand réservoir de lymphocytes de l'organisme. Son inflammation résultant d'une infection, d'une irritation ou d'une IBD est associée à un recrutement et une activation des leucocytes au niveau de la muqueuse (figure 10). Les chimiokines sont libérées lors de l'initiation et la persistance de cette inflammation.

Les chimiokines importantes dans la réponse immunitaire innée sont MCP-1/CCL-2 et RANTES/CCL5 qui sont capables d'attirer les monocytes et les éosinophiles, ainsi que IL-8/CXCL8 ou ENA-78/CXCL5 qui recrutent les neutrophiles et les lymphocytes T (LTs) au

site d'infection. Les cellules épithéliales de la muqueuse interviennent également dans la réponse immunitaire adaptative en produisant les chimiokines IP-10/CXCL10 et Mig/CXCL9 ou MIP-3 α /CCL20, qui attirent les LTs et les cellules dendritiques immatures (Dwinell *et al.*, 2003). Cette production de chimiokines peut être induite lors de l'infection par un pathogène microbien ou par des cytokines proinflammatoires comme le TNF- α , L'IL-1 β ou l'INF- γ .

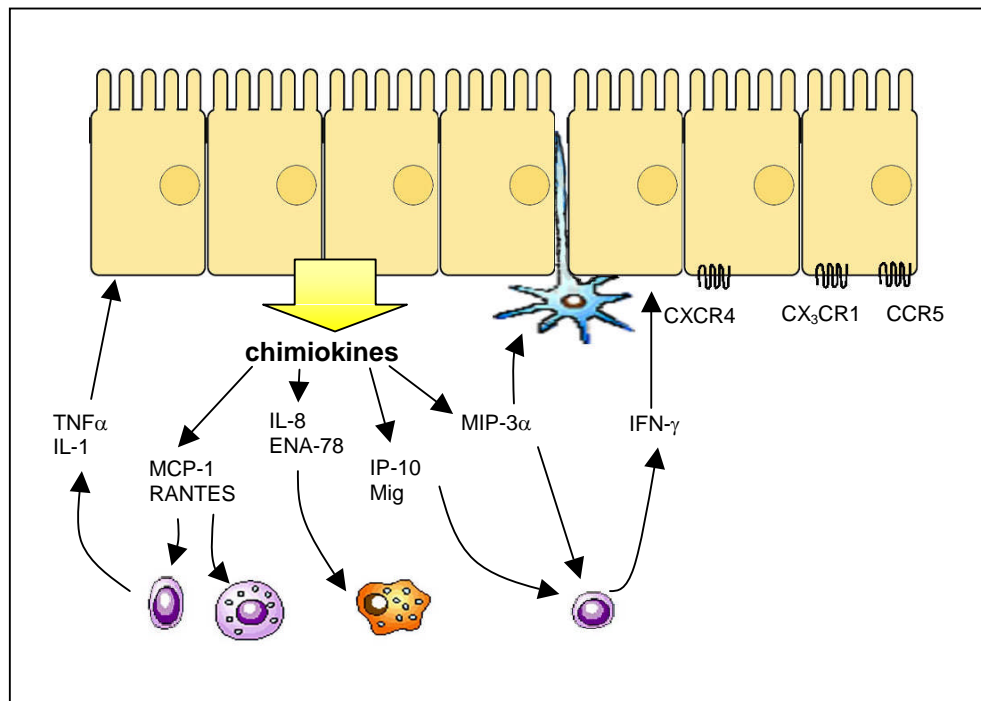


Figure 10 : Rôle des chimiokines dans la pathogénèse intestinale. Un large éventail de chimiokines CXC, CC et CX3C est produit par l'épithélium intestinal en réponse à des bactéries, à des composants bactériens ou à des cytokines et régule les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale. (Dwinell *et al.*, 2003)

IL-8 et CXCL5 sont sécrétées en grandes quantités par les entérocytes en réponse à la stimulation par les cytokines proinflammatoires chez les patients atteints d'une IBD. CXCL5 est détectée lors de l'initiation de la maladie alors que l'IL-8 est libérée à des stades plus tardifs. CCL2/MCP-1 semble stimuler la libération de facteurs angiogéniques ou d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire par les leucocytes infiltrants et pourrait ainsi participer à la métastase. Au contraire, IP-10/CXCL10 et Mig/CXCL9 semblent réduire l'angiogénèse. En outre, l'administration de CXCL10 ou de CXCL9, respectivement combinée à celle d'IL-12 ou d'IL-2, conduit à une réduction des adénocarcinomes coliques chez la souris. De même, MIP-3 α /CCL20 participe à l'inhibition de la croissance tumorale en stimulant les LT cytotoxiques spécifiques des tumeurs.

La présence de récepteurs à chimiokines, tels que CXCR4, CCR5 et CX₃CR1 dans la membrane des cellules épithéliales intestinales permet une régulation autocrine et paracrine de la synthèse de ces chimiokines.

➤ Interleukine-8 ou IL-8

L'IL-8 est un membre de la superfamille des chimiokines et est produite par divers types cellulaires dont les monocytes (Lindley *et al.*, 1988), les neutrophiles (McCain *et al.*, 1993), les myoblastes (De Rossi *et al.*, 2000), les cellules endothéliales (Gimbrone *et al.*, 1989) et les cellules épithéliales (Eckmann *et al.*, 1993; Rollins, 1997). L'IL-8 possède deux récepteurs CXCR1 et CXCR2 (ou IL-8RA et IL-8RB) qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Cerretti *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1991).

In vitro, il a été montré que les lignées de cellules cancéreuses coliques produisent de l'IL-8 mais cette dernière est également détectée dans les carcinomes de côlon humain. Les cellules cancéreuses coliques (Brew *et al.*, 1996; Eckmann *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1994) expriment constitutivement l'IL-8 mais cette production basale est stimulée lors de l'inflammation sous l'effet de cytokines *in vitro*. De même, *in vivo*, l'IL-8 est produite de façon constitutive par les cellules normales des cryptes de la muqueuse colique humaine et son expression augmente dans les IBD (Gibson et Rosella, 1995). Brew *et al.* ont montré *in vitro* que l'IL-8 stimule la prolifération des cellules des lignées cancéreuses coliques HCT116A, HT29 et Caco-2 et que l'IL-8 peut agir comme facteur de croissance autocrine sur ces cellules (Brew *et al.*, 2000).

Outre son action chimioattractive sur les neutrophiles, l'IL-8 possède la capacité à promouvoir la prolifération des cellules tumorales dans les mélanomes (Schadendorf *et al.*, 1994), les cancers du sein (Youngs *et al.*, 1997), des ovaires (Venkatakrishnan *et al.*, 2000), de la prostate (Inoue *et al.*, 2000), de la langue (Yao *et al.*, 2005), du foie, du pancréas, de l'estomac (Kitadai *et al.*, 1998) et du côlon (Brew *et al.*, 2000).

Dans un modèle murin de cancer obtenu après injection de cellules de fibrosarcome, Haqqani *et al.* (2000) ont montré que l'infiltration des neutrophiles mais également le taux de mutations dans l'ADN est proportionnel à l'expression d'IL-8 par les cellules tumorales. Les mêmes auteurs ont également montré que l'IL-8 favorise la prolifération cellulaire : en effet après injection de cellules de fibrosarcome à des souris « *nude* », il s'est avéré que la tumeur croît plus vite lorsque ces cellules surexpriment l'IL-8 (Haqqani *et al.*, 2001).

De nombreuses études ont montré que l'IL-8 stimule la réponse inflammatoire (Moser *et al.*, 1993), la prolifération des cellules tumorales (Brew *et al.*, 2000) et la migration des

cellules de lignées épithéliales coliques (Wilson *et al.*, 1999). En effet, par sa liaison à son récepteur CXCR, l'IL-8 induit la prolifération et la migration des cellules Caco-2. Très récemment il a été montré que cette stimulation implique la transactivation du récepteur EGFR médiée par l'enzyme protéolytique ADAM10 appartenant à la famille des « *A Disintegrin And Metalloproteinase* » (Wolfsberg *et al.*, 1995) qui clivent le précurseur proHB-EGF en ligand soluble actif de l'EGFR (Itoh *et al.*, 2005; Tanida *et al.*, 2004).

L'expression de l'IL-8 est plus importante dans les cellules cancéreuses coliques que dans les cellules intestinales normales, et est encore amplifiée à un stade métastatique. L'expression de ses récepteurs est, en outre, plus importante dans les lignées KM12C et KM12L4 métastatiques que dans la lignée Caco-2 non métastatique (Li *et al.*, 2001). Ceci suggère que cette chimiokine joue un rôle important dans la croissance et la métastase des carcinomes coliques et semble agir comme un facteur de croissance autocrine ou paracrine. En outre, l'inhibition de la production d'IL-8 ou l'inactivation de ses récepteurs CXCR par des anticorps spécifiques réduit la prolifération de ces cellules coliques cancéreuses. Cette étude montre, d'autre part, que l'IL-8 exogène augmente l'adhérence de ces dernières aux cellules endothéliales. Cette chimiokine semble donc contribuer à l'angiogenèse dans le cancer colique.

➤ Stimulation de la production d'IL-8

Les cytokines proinflammatoires tels le TNF- α et l'IL-1 α et 1- β , produites dans la muqueuse intestinale durant la maladie inflammatoire sont capables elles aussi de réguler l'expression de l'IL-8 dans l'épithélium colique (Mitsuyama *et al.*, 1994; Sartor, 1994). L'activation de leurs récepteurs EP4 par les PGE₂ exogènes induit une augmentation importante de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 et de la production de la protéine dans les cellules coliques humaines T84 (Yu et Chadee, 1998) alors que les PGE₂ inhibent cette transcription dans les macrophages et les monocytes (Wertheim *et al.*, 1993) et n'ont aucun effet sur la libération d'IL-8 par les neutrophiles (Agro *et al.*, 1996). Cependant, certains travaux sont en contradiction avec ces données, notamment ceux de Sasaki *et al.* (2000) et de Toshina *et al.* (2000). En effet l'administration d'un analogue des PGE₂, l'enprostil, à des rats avec une colite aiguë, provoque une diminution du taux de GRO/CINC-1, l'homologue de l'IL-8 chez le rat, dans les tissus enflammés (Sasaki *et al.*, 2000). *In vitro*, l'enprostil inhibe la production d'IL-8 par les lignées des cellules HT-29, SW620 et Caco-2 (Toshina *et al.*, 2000). Ces effets inverses des PGE₂ rappellent le rôle à la fois protecteur et agressif du NO en fonction de sa concentration et des cellules-cibles (Hofseth *et al.*, 2003a).

b) TNF- α

Le TNF (tumor necrosis factor) est un polypeptide de 17 kDa dont la forme biologiquement active est trimérique. Il peut se lier à deux récepteurs situés à la surface de la cellule : p55 et p75 (Zambello *et al.*, 2000). Le TNF- α est un médiateur majeur de l'inflammation. Il stimule une cascade d'autres cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance et d'adhésines endothéliales, qui recrutent et activent une série de cellules au niveau du tissu lésé.

L'action du TNF est modulée par un rétrocontrôle négatif, par une répression ou une surexpression de ses récepteurs, par la maturation de son précurseur lié à la membrane et enfin par le clivage de ses récepteurs de la membrane. Le TNF est connu pour ses effets inverses en fonction de sa concentration et du microenvironnement. Par exemple, dans une maladie tumorale, à forte dose, il peut détruire sélectivement les vaisseaux sanguins néoformés alors que sa production chronique peut contribuer au remodelage tissulaire et au développement du stroma nécessaires à la prolifération tumorale (Fajardo *et al.*, 1992; Lejeune *et al.*, 1998).

Des ARNm de TNF- α sont fréquemment détectés dans les muqueuses de patients atteints de la maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse (Cappello *et al.*, 1992). Dans le cancer colorectal et dans divers autres cancers, cette cytokine proinflammatoire est produite par les cellules tumorales et/ou libérée dans le stroma et son expression y est fréquemment associée à celle de l'IL-1, de l'IL-6 et du CSF (Wilson et Balkwill, 2002).

3. LES BACTERIES DANS LA CANCEROGENESE DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL

Une des premières fonctions de la flore commensale dans l'intestin est de métaboliser les éléments nutritifs non digestibles par l'organisme (Bergman, 1990; Cummings et Macfarlane, 1997). La dégradation des hydrates de carbones complexes par les bactéries est essentielle dans certaines synthèses de vitamines (Hill, 1997) et dans certains mécanismes d'adsorption du calcium, du magnésium et du fer (Younes *et al.*, 2001). Les bactéries résidentes de l'intestin, essentiellement coliques, sont capables de lutter contre la colonisation par de nouvelles espèces bactériennes, pathogènes ou non. Pour assurer cette résistance à la colonisation, les bactéries procèdent selon trois stratégies : (i) la compétition pour le substrat et/ou les sites d'adhésion aux mucines, (ii) l'altération des conditions physiologiques comme le potentiel redox, le pH... et (iii) la production de bactériocines, qui sont des protéines à

propriétés antibiotiques et qui empêchent le développement des autres bactéries (Bourlioux *et al.*, 2003). Ainsi, la flore colique peut être bénéfique et même essentielle à la santé de l'organisme, mais certaines bactéries peuvent devenir pathogènes et parmi celles-ci, certaines sont maintenant reconnues comme agents promoteurs du cancer colorectal.

L'infection bactérienne pourrait participer à l'initiation et/ou à la promotion de la cancérogenèse par deux mécanismes :

la bactérie en persistant dans l'hôte peut y induire une inflammation chronique ;

en interagissant directement avec les cellules de l'hôte, la bactérie ou ses composants pourraient moduler des voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore l'angiogenèse.

3.1. Bactéries dans l'inflammation associée au cancer colorectal

De plus en plus d'études démontrent l'implication de microorganismes dans l'induction de l'inflammation chronique au niveau colique. La flore intestinale constitue le stimulus majeur de l'activation et de la maturation du système immunitaire intestinal. Le développement de l'inflammation chronique lors d'une IBD semble être induite en partie par la flore commensale, puisque les souris « *nude* » et axéniques, élevées en l'absence de bactéries, ne présentent pas d'inflammation intestinale (Sellon *et al.*, 1998). Martin *et al.* (2004) ont récemment montré que les souches d'*Escherichia coli* isolées de muqueuses coliques cancéreuses sont capables d'induire l'expression d'IL-8 dans les cellules coliques *in vitro*. Cette stimulation ne dépend ni de l'adhérence ni de l'invasion par la bactérie.

Balish et Warner (2002) ont montré qu'*Enterococcus faecalis* est capable d'induire une colite et le développement d'adénocarcinomes rectaux chez des souris dont le gène codant l'IL-10 a été délété - ces souris constituent un modèle d'entéocolite chronique - alors qu'aucune pathologie n'est observée pour les mêmes souris axéniques. Il faut noter que l'IL-10 est connue pour ses effets inhibiteurs sur la réponse inflammatoire aiguë en réprimant la prolifération des cellules T et la production de cytokines par les macrophages (IL-1 α , IL-6 et TNF- α) (Hagenbaugh *et al.*, 1997).

Des études de plus en plus nombreuses soulèvent l'importance de la flore commensale colique dans l'induction de l'inflammation et le développement du CCR qui y est associé. En effet, des modèles animaux élevés en absence de bactérie ne présentent pas de colite ni de tumeur associée contrairement aux mêmes animaux vivants en conditions standards (Engle *et al.*, 2002; Erdman *et al.*, 2003; Kado *et al.*, 2001).

Plusieurs auteurs mettent en évidence la présence de bactéries associées à la muqueuse dans la majorité des biopsies de côlons provenant de patients présentant des adénomes ou des adénocarcinomes coliques, alors que les contrôles n'ayant pas de néoplasmes ne présentent pas de colonisation de la muqueuse (Martin *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 1998)

Onoue *et al.* (1997) ont montré que l'inoculation à des souris d'un mélange de bactéries fécales (*E. coli*, *Enterococcus faecium*, plusieurs espèces de bactéroïdes et de clostridium) ont un pouvoir promoteur sur la carcinogénèse en augmentant le nombre et le taux de progression des foyers de cryptes anormales ou FCA. Alors qu'il est reconnu que les bactéries, selon leur espèce, ont une influence plus ou moins importante sur la pathogénèse intestinale, il n'existe que peu d'études sur le rôle des espèces bactériennes considérées individuellement dans la tumorigénèse colorectale. Par exemple, Horie *et al.*, (1999) montrent que l'incidence des adénomes coliques varie de 30 à 70 % selon l'espèce bactérienne (*Mitsuokella multiacida*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium longum*, *C. paraputrificum*, *E. coli* ou *Lactobacillus acidophilus*) qu'ils inoculent séparément à des souris prétraitées avec un agent cancérigène chimique, la 1,2-diméthylhydrazine (DMH).

Fox *et al.* (1996) ont montré que *Helicobacter hepaticus*, une souche qui colonise l'intestin murin, cause des hépatites nécrosantes pouvant évoluer vers un carcinome hépatocellulaire.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'implication des bactéries dans la cancérogénèse ne sont pas encore connus. Mais de nombreuses bactéries qui causent des infections persistantes, produisent des toxines qui peuvent moduler spécifiquement des voies de signalisation cellulaires, perturbant alors la régulation de processus cellulaires tels que la prolifération ou l'apoptose, ou encore induisant une inflammation chronique. Mais d'autres toxines bactériennes peuvent directement agir comme des mutagènes et générer des dommages dans l'ADN des cellules infectées. Par ces différents mécanismes, les bactéries peuvent agir comme des promoteurs de tumeurs et intervenir dans la cancérogénèse (Lax, 2005).

Nous avons vu précédemment comment le stress oxydatif peut intervenir dans la cancérogénèse. Les bactéries sont connues pour participer à ce stress en produisant des intermédiaires réactifs oxygénés qui vont causer des dommages à l'ADN et générer notamment des instabilités chromosomiques CIN qui sont associées au cancer colorectal (Huycke et Gaskins, 2004).

Les travaux de Huycke *et al.* (2002) ont montré que, la souche commensale intestinale humaine, *E. faecalis*, est capable de produire du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène extracellulaires qui causent des mutations dans l'ADN des cellules épithéliales coliques *in vivo* chez le rat et *in vitro* dans les cellules HT29. Les auteurs ont également montré que la souche sauvage productrice de O_2^- qui colonisait le côlon de rats y générerait plus de lésions génomiques que la souche mutante déficiente dans son système de production de O_2^- .

3.2. « pattern recognition receptor » (PRRs)

Ce sont Medzhitov et Janeway qui, les premiers, suggérèrent que des récepteurs, appelés « pattern recognition receptors » (PPRs) pourraient jouer un rôle central dans la discrimination entre les microorganismes commensaux et les pathogènes par les cellules immunitaires grâce à la reconnaissance spécifique de motifs moléculaires conservés microbiens (Medzhitov et Janeway, 2002). Ces récepteurs situés sur les cellules mammifères reconnaissent en effet les antigènes microbiens décrits comme des « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs).

Les PRRs peuvent être classés en trois catégories :

- **Les récepteurs solubles**, parmi lesquels figurent le fragment C1q du complément, la « mannan-binding protein » (MBP), la CRP (C reactive protein) et les protéines NOD. Ces récepteurs agissent comme des opsonines solubles et facilitent la phagocytose des agents infectieux.
- **Les récepteurs induisant l'endocytose**, tels que le récepteur du mannose et les récepteurs scavenger, qui sont exprimés à la surface des cellules et facilitent également la phagocytose.
- La dernière classe de PRRs comprend certaines **intégrines** et les « **Toll-like receptors** » (TLRs). Ces récepteurs activent des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la réponse immunitaire.

Les PRRs les plus étudiés actuellement appartiennent à la famille des **TLRs** (figure 11). Il s'agit de protéines membranaires de type I, présentant un domaine extracellulaire riche en leucine LRR qui participe à la reconnaissance du ligand et une partie intracellulaire TIR contenant un domaine d'homologie avec le récepteur de l'IL-1 (Akira, 2003; Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

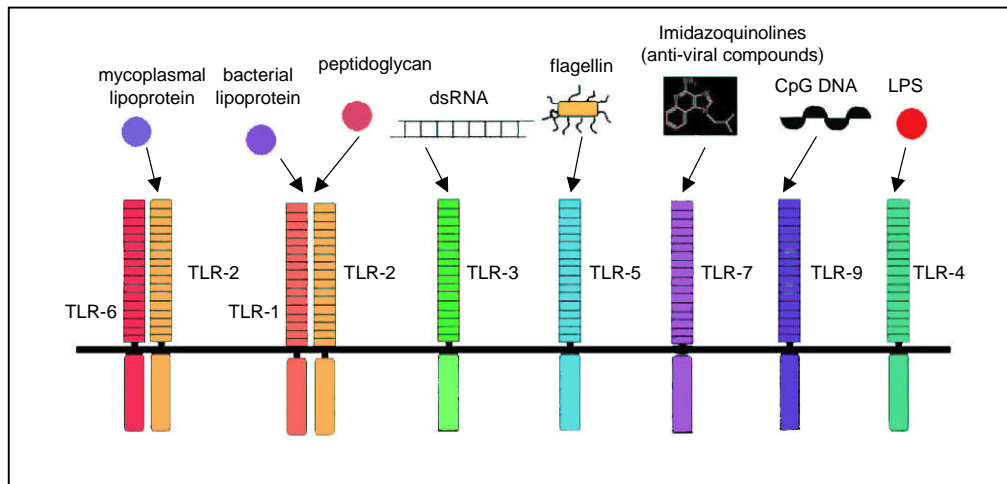


Figure 11 : TLRs et leurs ligands (Yamamoto *et al.*, 2004)

Les TLRs impliqués dans la reconnaissance de PAMPs bactériens sont :

- **TLR-2** qui reconnaît des composants bactériens variés, tels que les lipoprotéines, les acides lipotéichoïques (LTA) et le peptidoglycane (PGN) (Dziarski, 2003). TLR-2 constitue des hétérodimères avec TLR-1, TLR-6 et probablement TLR-10.
- **TLR-4** est le récepteur du LPS. Il a été également montré que TLR4 reconnaît des molécules endogènes comme les « heat-shock proteins » HSP 60 et HSP 70 ainsi que certains composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, acide hyaluronique et héparane sulfate) (Takenaka *et al.*, 2004).
- **TLR-5** est le récepteur de la flagelline qui existe chez la plupart des entérobactéries (Hayashi *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2004).
- **TLR-9** est le récepteur des oligonucléotides CpG. Il est exprimé au niveau des endosomes, alors que les autres TLRs sont localisés dans la membrane plasmique (Pedersen *et al.*, 2005).
- **TLR-11** a récemment été impliqué dans la reconnaissance de bactéries uropathogènes (Lauw *et al.*, 2005).

Certains TLRs solubles intracytoplasmiques, parfois avec une localisation endosomale, appelés **NODs**, sont décrits comme des récepteurs de fragments des PGN bactériens générés par la digestion enzymatique se produisant dans ce compartiment. Ces récepteurs ont une structure similaire à celle des autres TLRs : ils présentent un domaine LRR qui lie le ligand, un site d'oligomérisation qui est indispensable à son activité et un domaine CARD (caspase-recruitment domain) qui est l'analogue fonctionnel du domaine TIR des TLRs.

De récents travaux ont montré que *H. pylori* est capable d'injecter son PGN dans le cytoplasme des cellules épithéliales où il est reconnu par le récepteur NOD1, à condition que la bactérie possède un système de sécrétion de type IV fonctionnel (Viala *et al.*, 2004).

Diverses anomalies structurales héréditaires affectant NOD2 semblent être un facteur prédisposant essentiel au développement de la maladie de Crohn (Hugot *et al.*, 2001; Meinzer et Hugot, 2005).

Un grand nombre d'études suggère que l'initiation et la persistance de l'inflammation intestinale dans les IBD pourraient être causées par une réaction exagérée des défenses de la muqueuse intestinale vis-à-vis de la flore bactérienne commensale.

Dans un épithélium intestinal sain, la voie des TLRs, lorsqu'elle est activée par la flore normale, intervient dans la survie cellulaire et présente des effets protecteurs de la muqueuse contre les agressions. Mais lorsque ces TLRs sont activés par des microorganismes pathogènes, cette voie de signalisation conduit à l'inflammation de la muqueuse. Lorsque la muqueuse intestinale est lésée par des agressions de l'environnement ou subit des dommages génétiques, des anomalies dans la reconnaissance de la flore intestinale par les TLRs/NODs se produisent. Ceci entraîne une dérégulation des voies de signalisation conduisant à une stimulation aberrante de la production de cytokines proinflammatoires, causant une inflammation chronique (Cario, 2005).

Lorsque cette voie des TLRs est activée dans des cellules épithéliales transformées, elle accélère la progression tumorale.

Il est évident que les TLRs ne doivent pas être constamment activés par les constituants bactériens de la flore intestinale car dans le cas contraire, une inflammation permanente de la muqueuse serait entretenue. Pour restreindre l'accès des microorganismes et de leurs produits aux TLRs, l'intestin constitue une barrière physique et mécanique grâce à la présence de la couche de mucus, du glycocalyx qui recouvre l'épithélium et des jonctions intercellulaires imperméables. En outre, une faible expression de ces TLRs à la surface de l'épithélium permettrait également à l'organisme de tolérer la présence de cette flore normale (Otte *et al.*, 2004). D'autre part, la localisation des TLRs au niveau des cellules intestinales semble participer à cette tolérance de la muqueuse. Certains TLRs, tel TLR5, ont été détectés au niveau de la membrane basolatérale des cellules (Gewirtz *et al.*, 2001), d'autres, comme TLR4, sont situés dans les membranes d'organelles intracytoplasmiques (Hornef *et al.*, 2002). Cette organisation des TLRs permettrait de surveiller l'apparition de lésions dans la barrière

intestinale ou toute forme d'agression ou d'invasion microbienne, tout en tolérant la présence de la flore normale dans la lumière intestinale.

La reconnaissance des PAMPs par les TLRs ou les protéines NODs peut activer différentes voies de signalisation intracellulaire :

- des voies conduisant à la production des espèces ROS et RNS,
- des voies effectrices antimicrobiennes qui déclenchent la libération de peptides appelés défensines qui constituent une protection immédiate contre l'agent infectieux et
- des voies modulant la libération de cytokines pro- et anti-inflammatoires et des molécules d'adhésion impliquées dans l'inflammation.

➤ Signalisation par les TLRs/NODs

La liaison d'un PAMP à son TLR active les voies de signalisation intracytoplasmiques de NFκB et des kinases MAPKs (figure 12).

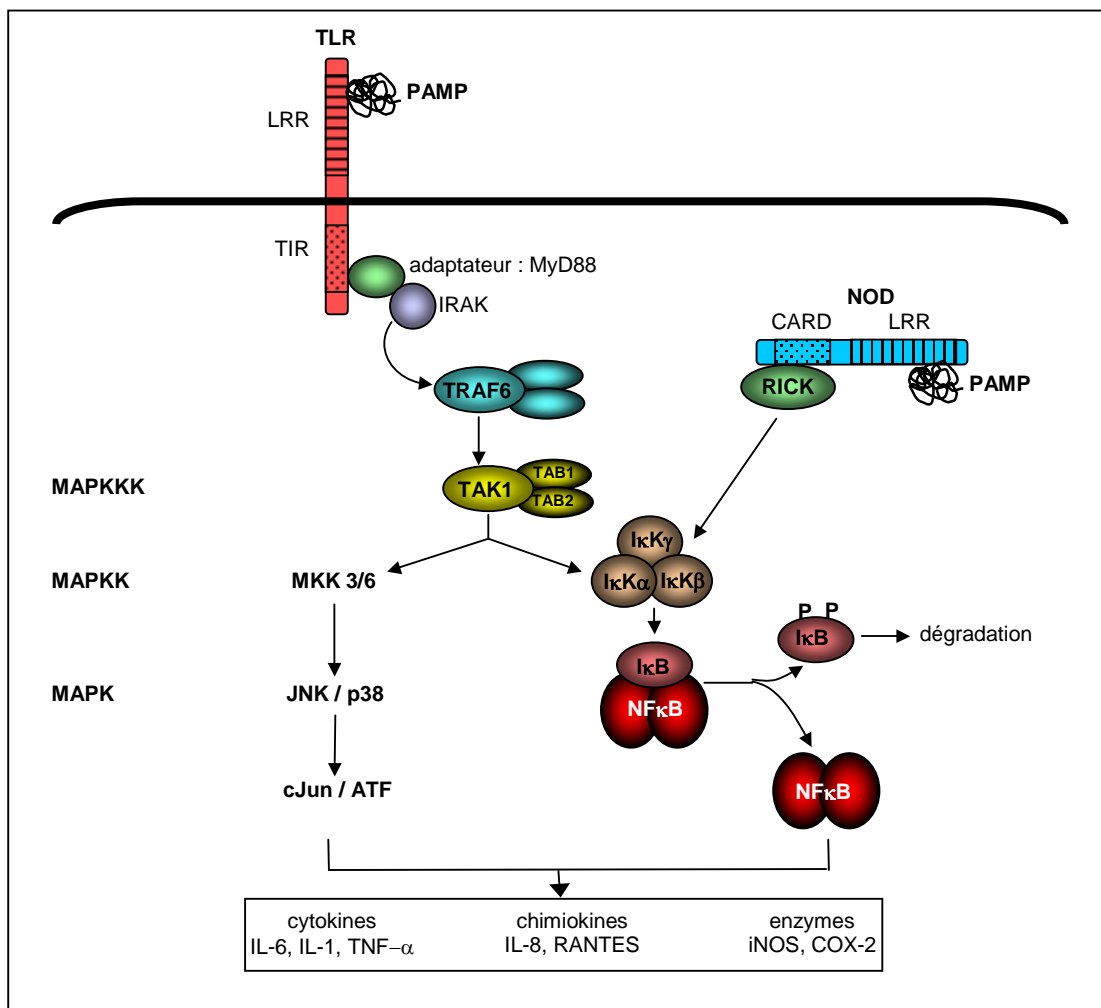


Figure 12 : schéma des voies NFκB et MAPK activées par les PAMPs bactériens via les récepteurs TLRs membranaires ou les protéines NODs cytoplasmiques. (Neish, 2004)

La liaison à son ligand entraîne une dimérisation du TLR induisant un changement conformationnel du domaine TIR qui peut alors interagir avec une protéine adaptatrice cytoplasmique MyD88 (O'Neill *et al.*, 2003). Ce dernier se lie ensuite à la sérine kinase IRAK (IL-1R-associated kinase) qui phosphoryle et active la molécule adaptatrice TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) (Kopp et Medzhitov, 2003). A son tour, TRAF6 active la kinase TAK1 qui est complexée aux protéines TAB1 et TAB2 (Deng *et al.*, 2000). Ce complexe TAK1/TAB1/TAB2 agit comme une I κ B kinase kinase (I κ KK) et phosphoryle les I κ B kinases (I κ K) qui elles-même vont phosphoryler le complexe I κ B et libérer ainsi NF κ B.

Lorsque qu'un PAMP intracytoplasmique se lie à la protéine NOD, cette liaison entraîne la dimérisation de NOD et le domaine CARD, ainsi activé, peut interagir avec un adaptateur RICK. Cette protéine RICK est une sérine/thréonine kinase qui active directement les I κ K (Kobayashi *et al.*, 2002).

Le recrutement de MyD88/IRAK/TRAF6 peut également activer la voie de signalisation des kinases MAPK. En effet, le complexe TAK1/TAB1/TAB2 activé par TRAF6 peut agir comme une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK). et phosphoryler la MAP kinase kinase (MAPKK), MKK3 ou MKK6, qui phosphoryle et active finalement les MAP kinases (MAPK), JNK ou p38 dans le cas d'une réponse à un stimulus bactérien. JNK et p38 vont elles-mêmes phosphoryler et activer les facteurs de transcription c-Jun et CREB/ATF, respectivement (Neish *et al.*, 2000; O'Neill, 2002).

Ces deux voies de signalisation NF κ B et MAPK régulées par les TLRs induisent, lorsqu'elles sont activées, la production de peptides antimicrobiens, de cytokines, de molécules d'adhésion comme ICAM-1, de molécules chimioattractives, de protéines anti-apoptotiques et d'enzymes comme la iNOS et la COX-2 (Boldrick *et al.*, 2002; Eckmann *et al.*, 2000).

Différents composants de *Helicobacter pylori* sont capables d'activer la voie de NF κ B en se liant à leurs TLRs : par exemple, le LPS active cette voie dans les cellules épithéliales gastriques *via* TLR-4 (Kawahara *et al.*, 2001a; Kawahara *et al.*, 2001b) ou TLR-2 (Smith *et al.*, 2003) selon les auteurs ; et sa protéine HSP60 est capable d'activer NF κ B en se liant à TLR-2 ou à TLR-4 des macrophages (Gobert *et al.*, 2004). La protéine CagA semble intervenir dans la stimulation de la libération d'IL-8 médiée par TLR2 dans ces cellules (Mandell *et al.*, 2004).

D'autres travaux ont montré que *Bifidobacterium lactis* induit une augmentation de la libération d'IL-6 par l'activation des voies de signalisation de NFκB et des MAPK/p38 dans les cellules épithéliales intestinales IEC de rat. Cette activation semble être médiée par TLR-2 puisqu'elle est totalement réprimée dans les fibroblastes de souris déficiente pour le gène de TLR-2 (Ruiz *et al.*, 2005).

Les cellules épithéliales intestinales primaires expriment constitutivement les récepteurs TLR-3 et TLR-5 alors que les TLR-2 et -4 sont détectés à de très faibles quantités. Ces deux derniers ne sont présents que dans les cellules de cryptes et leur expression disparaît au cours de la maturation cellulaire. La faible expression de TLR-4 dans l'épithélium normal expliquerait la tolérance de la muqueuse vis-à-vis de la flore commensale.

Des travaux ont montré que les cellules coliques de la lignée HT29 non différenciées sont fortement activées lorsqu'elles sont incubées avec *E. faecalis* et présentent une augmentation de l'expression de TLR-4 suite à cette stimulation. Au contraire, celles de la lignée Caco-2 différenciées ne répondent quasiment pas à ce stimulus bactérien (Furrie *et al.*, 2005).

TLR-2 intervient dans la reconnaissance des PAMPs des bactéries à Gram positif, tels que le lipopeptide, les LTA et le PGN. TLR-3 est impliqué dans la reconnaissance de l'ARN double brin viral (Alexopoulou *et al.*, 2001). Le côlon normal est relativement riche en ARNm des TLR-3, -4, -5 et -7 comparé à d'autres tissus du tractus gastro-intestinal (Zarembek et Godowski, 2002).

TLR-4 est fortement surexprimé dans les IBD, colite ulcéreuse ou maladie de Crohn, alors que le taux d'expression des TLR-2 et -5 reste stable (Cario et Podolsky, 2000). Les auteurs suggèrent donc que les composants de paroi des bactéries à Gram positif, qui sont les ligands du TLR-2, n'interviennent pas dans la pathogenèse de ces maladies inflammatoires de l'intestin. Mais cette hypothèse reste à démontrer car les travaux de Hausmann *et al.* (2002) ont abouti à des résultats quelque peu contradictoires puisqu'ils ont montré que, lors de l'inflammation de la muqueuse intestinale, le taux d'expression de TLR-2 et TLR-4 augmente non seulement dans des macrophages infiltrants mais également dans les cellules épithéliales.

Par ailleurs, bien que l'expression de TLR-5 reste constante dans les IBD, plusieurs études récentes ont montré que la flagelline, en se liant à son récepteur TLR-5, contribue à la pathogenèse de la maladie de Crohn (Lodes *et al.*, 2004; Sitaraman *et al.*, 2005). La flagelline est un constituant de certaines bactéries à Gram positif ou négatif, parmi lesquelles certaines sont commensales et d'autres entéro-invasives. *In vivo*, la flagelline, en se liant à son récepteur TLR5, stimule la libération d'IL-6 et de TNF-α en activant la voie des

MAPK/MEK1/2 au niveau de la muqueuse intestinale enflammée dans un modèle de souris de colite ulcéreuse alors qu'elle n'a aucun effet sur la muqueuse saine (Rhee *et al.*, 2005). Les auteurs ont, en outre, montré que l'exposition de la muqueuse déjà lésée issue de ces souris présentant une colite, à la flagelline, aggrave l'inflammation, accentue les lésions intestinales et augmente le taux de mortalité chez ces animaux. Gewirtz *et al.* (2001) ont montré qu'elle est également capable de stimuler la libération d'IL-8 et de TNF- α par les cellules épithéliales intestinales T84 en activant la voie de NF κ B *via* son récepteur TLR-5.

D'autres antigènes bactériens semblent également intervenir dans la pathogenèse des IBD, comme les oligosaccharides de *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine OmpC de *E. coli* (Landers *et al.*, 2002) et l'antigène I2 de *Pseudomonas* (Dalwadi *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 2000).

3.3. Exemples de bactéries impliquées dans le cancer du tractus gastro-intestinal

3.3.1. *Helicobacter pylori* et cancer gastrique

Dès les années 1990, l'infection par *Helicobacter pylori* est associée à une augmentation du risque d'adénocarcinome gastrique et au développement de lymphomes du MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) (Forman *et al.*, 1991; Talley *et al.*, 1991). De nombreuses études épidémiologiques ont en outre montré que l'incidence des adénocarcinomes intestinaux et gastriques est directement fonction du taux d'infection par *H. pylori* (Nardone *et al.*, 2004; Siman *et al.*, 1997; Uemura *et al.*, 2001).

H. pylori est une bactérie à Gram négatif présente dans l'estomac de plus de la moitié de la population mondiale et quasiment de tous les habitants des pays en voie de développement (Parsonnet, 1995). Cette bactérie est capable de coloniser le tractus gastrique et d'y persister, pourtant dans 80% des cas, les patients ne développent aucun symptôme. Une des études épidémiologiques les plus importantes menées à ce jour montre que dans 10 à 20% des cas les patients infectés présentent un ulcère peptique mais seulement 0,1 à 4% développent un cancer gastrique (Uemura *et al.*, 2001).

Le rôle de l'infection par *H. pylori* dans la cancérogenèse gastrique semble faire intervenir des facteurs génétiques, la réponse immunitaire de l'hôte ainsi que le génotype de la souche et l'expression de facteurs de virulence (Figueiredo *et al.*, 2005).

Il semble que ce soient l'inflammation chronique à long terme et le stress oxydatif, qui en découle, qui induisent la progression depuis l'atrophie gastrique vers la métaplasie puis la dysplasie intestinale et éventuellement jusqu'au cancer (Crowe, 2005). Les facteurs de

virulence directement impliqués dans cette pathogénèse sont les protéines Cag de l'îlot de pathogénicité PAI, VacA et les OMPs (outer membrane proteins).

3.3.1.1. Facteurs de virulence de *H. pylori*

a) Les protéines Cag du système de sécrétion de type IV PAI

Les souches de *H. pylori* qui contiennent le segment génomique complet de l'îlot de pathogénicité PAI appelé *cag*, de 40 kb et qui couvre environ 30 gènes, induisent une réponse inflammatoire bien plus importante lors de l'infection et sont associées avec un risque plus élevé de cancer gastrique que les souches qui ne possèdent pas cet îlot *cag* PAI (Blaser *et al.*, 1995).

Plusieurs de ces gènes *cag* PAI codent des protéines homologues aux composants du système de sécrétion de type IV. Ce système de sécrétion est utilisé par *H. pylori* pour injecter la protéine CagA (cytotoxin associated protein) et probablement d'autres éléments bactériens inconnus à ce jour, directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. CagA est alors phosphorylée par des kinases de la famille Src (Selbach *et al.*, 2003). Par cette phosphorylation, CagA peut s'associer à la membrane où elle interagit avec la tyrosine phosphatase SHP2 d'une part et avec le récepteur c-Met transmembranaire d'autre part (Higashi *et al.*, 2002). CagA induit alors une dispersion des cellules *via* l'interaction avec ce dernier récepteur (Churin *et al.*, 2003). Ce même phénomène de dispersion cellulaire est observé également avec le facteur de croissance des hépatocytes qui participe à la cancérogenèse, notamment au développement de métastases (Jiang *et al.*, 1999).

Plusieurs protéines codées par l'îlot *cag* PAI sont impliquées dans la stimulation de la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales et participent ainsi à la pathogénèse gastrique (Li *et al.*, 1999b; Naumann et Crabtree, 2005). Certaines de ces protéines ont en outre un effet stimulateur sur la motilité cellulaire (Al-Ghoul *et al.*, 2004).

b) La protéine VacA

VacA (vacuolating cytotoxin) est une cytotoxine qui est injectée par le système de sécrétion de type IV de *H. pylori* dans le cytoplasme de la cellule infectée. Les protéines VacA peuvent s'y polymériser pour former des pores anioniques dans la membrane plasmique mais également dans la membrane des endosomes (Cover et Blanke, 2005). En perforant les membranes endosomales, la toxine peut interrompre le trafic membranaire normal. VacA est en outre capable d'induire la formation de vacuoles en s'associant à d'autres protéines, comme les pompes à protons, dans le cytoplasme des cellules épithéliales gastriques. D'autre

part, VacA stimule la production de cytokines proinflammatoires et induit l'apoptose en entraînant la libération de cytochrome c (Willhite et Blanke, 2004) et en activant la caspase 3 (Cho *et al.*, 2003). Ainsi VacA est responsable de l'inflammation générée par l'infection à *H. pylori* ainsi que de la destruction de la muqueuse gastrique qui l'accompagne.

c) Les protéines OMPs

Pour coloniser l'estomac, *H. pylori* doit pouvoir adhérer à la muqueuse. Cette adhérence bactérienne contribue largement à la virulence de l'agent pathogène et plusieurs protéines OMPs de la membrane de *H. pylori* sont connues pour être des facteurs d'adhésion : BabA, SabA, AlpAB et OipA. Les souches qui possèdent le gène *babA2* codant l'adhésine BabA présentent une meilleure adhérence aux cellules épithéliales, montrent un phénotype bien plus agressif et sont associées à une plus forte incidence des adénocarcinomes gastriques (Guruge *et al.*, 1998). L'expression de BabA semble stimuler la transcription de l'IL-8 dans la muqueuse gastrique, accentuant ainsi l'inflammation (Rad *et al.*, 2002). Par ailleurs l'expression de BabA, BabB, SabA et OipA dans les souches d'*H. pylori* prélevées chez des patients est significativement associée à l'incidence de cancer gastrique et de métaplasie intestinale (Yamaoka *et al.*, 2005).

3.3.1.2. Inflammation causée par *H. pylori*

a) Cytokines proinflammatoires

Toutes les études montrent que l'infection par *H. pylori* s'accompagne d'une libération de cytokines proinflammatoires, tels IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ et TNF- α , dans la muqueuse gastrique (Permin et Andersen, 2005). Lors de cette infection, les lymphocytes T produisent de l'IL-17 qui active, à son tour, la libération d'IL-8 en stimulant la voie des ERK1/2 dans les macrophages et dans les cellules épithéliales gastriques (Sebkova *et al.*, 2004). En outre, ces dernières cellules infectées *in vitro* par *H. pylori* sécrètent de l'IL-18 qui peut activer la production d'IL-8 dans la muqueuse gastrique (Day *et al.*, 2004).

b) Stress oxydatif

L'inflammation persistante due à l'infection par *H. pylori* est associée à la formation de produits mutagènes comme les espèces réactives ROS (Baik *et al.*, 1996) et RNS (Fu *et al.*, 1999) qui pourraient directement endommager l'ADN des cellules-hôtes et ainsi causer des mutations, ou perturber les voies de signalisation régulant la croissance et la mort cellulaires (Stoicov *et al.*, 2004). En plus des réactifs ROS/RNS produits par les neutrophiles recrutés en

réponse à l'infection, le NO est synthétisé par la iNOS des cellules gastriques épithéliales et non épithéliales, suite à cette infection. L'augmentation de l'activité de la iNOS et la surproduction de NO consécutive contribuent fortement à la cancérogenèse associée à l'infection par la bactérie (Chang *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 1999; Mannick *et al.*, 1996). Nam *et al.* (2004) montrent que la iNOS est principalement exprimée dans les cellules épithéliales des adénocarcinomes gastriques. Les auteurs mettent en évidence que l'incidence de ces tumeurs cancéreuses gastriques est bien moindre chez les souris déficientes pour la iNOS que chez les animaux sauvages. Ils confirment ainsi le rôle-clé que tient cette enzyme dans l'initiation et les stades précoces de la cancérogenèse.

c) COX-2

L'expression de la COX-2 est induite par les cytokines proinflammatoires IL-1 β , TNF- α et IFN- γ , pendant l'infection par *H. pylori* ou directement par l'incubation des cellules épithéliales gastrique avec la bactérie (Romano *et al.*, 1998). La COX-2 est exprimée à des taux plus élevés dans la muqueuse gastrique des patients infectés par rapport aux sujets sains (Fu *et al.*, 1999; Sawaoka *et al.*, 1998). Cette augmentation est encore plus nette dans les lésions métaplasiques, dysplasiques ou cancéreuses causées par l'infection par *H. pylori* (Sun *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005). La surexpression de la COX-2 induite par les cytokines, par des facteurs de croissance ou encore par les espèces réactives ROS/RNS produites lors de la gastrite chronique causée par l'infection bactérienne persistante participe à la cancérogenèse gastrique (Konturek *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que l'inhibition de la COX-2 par l'aspirine ou d'autres AINS s'accompagne d'une réduction des adénocarcinomes gastriques (Akre *et al.*, 2001; Farrow *et al.*, 1998).

3.3.2. *Citrobacter rodentium* et hyperplasie du côlon

Citrobacter rodentium est un bacille à Gram négatif responsable d'une maladie infectieuse et transmissible connue sous le nom d'hyperplasie du côlon de la souris. Cette affection, spécifique de la souris, est transmise par voie fécale – orale et induit une colite et une prolifération massive des cellules des cryptes. Elle touche le plus souvent la moitié distale du côlon, parfois son intégralité, jusqu'au caecum. L'examen anatomo-pathologique révèle une hyperplasie des cellules épithéliales du colon, une diminution du nombre voire une absence des cellules à mucus, la présence de colonies de ces bacilles à Gram négatif dans la muqueuse, et chez les jeunes animaux on note également une inflammation, une érosion et

une nécrose de la muqueuse (Schauer *et al.*, 1995). Ces lésions de la muqueuse rappellent celles observées dans les maladies intestinales inflammatoires comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Barthold, 1979)

Cette hyperplasie de la muqueuse colique due à l'infection par *C. rodentium* peut aboutir à un cancer du côlon. En effet, des études ont montré que la bactérie accélère le développement d'adénomes chez les souris traitées par la DMH (Barthold et Jonas, 1977) et qu'elle peut initier la formation de tumeurs cancéreuses dans le côlon de souris transgéniques déficientes pour les gènes suppresseurs de tumeurs *apc* (Newman *et al.*, 2001).

Le génome de la bactérie présente, comme celui d'*H. pylori*, un îlot PAI appelé LEE (locus for enterocyte effacement) qui code des protéines composant un système de sécrétion de type III. Ce locus LEE existe aussi dans des souches d'*E. coli* humaines entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) et code des protéines indispensables à l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales. Un homologue du gène *eae* de *E. coli* situé dans le locus LEE a été mis en évidence chez *C. rodentium* (Mundy *et al.*, 2004). Expérimentalement, il a été montré que la présence du gène *eae* est indispensable à la colonisation de l'intestin de la souris. Il semblerait qu'il existe un lien étroit entre l'évolution de l'hyperplasie et le degré de colonisation de la muqueuse par la bactérie.

Klapproth *et al.* (2005) ont récemment montré qu'une protéine régule la colonisation bactérienne, la prolifération des cellules des cryptes et la régénération cellulaire de l'épithélium. Cette protéine est codée par le gène *lifA* (lymphocyte inhibitory factor A)/*efa1* (factor for adherence 1) situé sur un locus différent du LEE chez *C. rodentium* mais ce gène a également été identifié dans les souches de *E. coli* EPEC et EHEC. Dans ces souches, *lifA* code la lymphostatine qui inhibe l'expression des cytokines (IL-2, IL-4 et IFN- γ) *in vitro* et agit aussi comme un facteur d'adhésion (Klapproth *et al.*, 2000), alors que *efa1* code la toxine Shiga qui cause des lésions dans la muqueuse intestinale (Stevens *et al.*, 2002).

Depuis plusieurs années, les études mettant en évidence l'association entre *Streptococcus bovis* et le cancer colorectal chez l'homme s'accumulent dans la littérature. Nous avons décidé de consacrer le chapitre suivant à une revue des connaissances actuelles concernant la description et la classification du complexe *S. bovis/S. equinus* auquel appartient la souche *S. infantarius* subsp *infantarius* qui fait l'objet de cette thèse ainsi que les données existantes qui supportent l'existence d'une relation entre l'inflammation générée par l'infection par *S. bovis* et le cancer colorectal.

4. COMPLEXE STREPTOCOCCUS BOVIS / STREPTOCOCCUS EQUINUS

4.1. Classification

Pyogenes (py)	Groupe D et apparentés	Oraux (Or)	Non classés
Sous-ensemble py1 <i>S. pyogenes</i> Sous-ensemble py2 <i>S. agalactiae</i> (= <i>S. difficilis</i>) Sous-ensemble py3 <i>S. canis</i> <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> <i>S. equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i> Sous-ensemble py4 <i>S. porcinus</i> <i>S. uberis</i> <i>S. parauberis</i> Sous-ensemble py5 <i>S. hyointestinalis</i> <i>S. iniae</i> (= <i>S. shiloi</i>) <i>S. phocae</i> Non classés <i>S. castoreus</i> <i>S. didelphis</i> <i>S. halichoeri</i> <i>S. hyovaginalis</i> <i>S. marimammalium</i> <i>S. pluranimalium</i> <i>S. porcinus</i> (= <i>S. infrequens</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. subacidus</i>) <i>S. suis</i> biovar « capnophile » <i>S. thoralensis</i> <i>S. urinalis</i>	<i>S. alactolyticus</i> (= <i>S. intestinalis</i>) <i>S. entericus</i> <i>S. equinus</i> (= <i>S. bovis</i>) <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i> <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> <i>S. lutetiensis</i> <i>S. suis</i> (80% des souches)	Sous-ensemble Or1 <i>S. australis</i> <i>S. cristatus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. infantis</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. parasanguinis</i> <i>S. peroris</i> Sous-ensemble Or3 <i>S. pneumoniae</i> Sous-ensemble Or4 <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> <i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> <i>S. intermedius</i> Sous-ensemble Or5 <i>S. criceti</i> <i>S. devriesei</i> <i>S. downei</i> <i>S. ferus</i> <i>S. macacae</i> <i>S. mutans</i> <i>S. orisratti</i> <i>S. ratti</i> <i>S. sobrinus</i> Sous-ensemble Or6 <i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>S. vestibularis</i>	<i>S. acidominimus</i> <i>S. garvieae</i> <i>S. hansenii</i> <i>S. minor</i> <i>S. morbillorum</i> <i>S. oligofermentens</i> <i>S. ovis</i> <i>S. parvulus</i> <i>S. plantarum</i> <i>S. pleomorphus</i> <i>S. pseudopneumoniae</i> <i>S. raffinolactis</i> <i>S. sinensis</i>

Tableau 2: Classification des streptocoques.

Ce tableau a été réalisé à partir d'une classification rassemblant l'ensemble des taxons validement décrits, les synonymies ou les modifications de nomenclature ainsi que les références des publications originales (Bouvet *et al.*, 1994 ; Euzéby, 1997). *S. infantarius* subsp. *coli* a été renommé *S. lutetiensis*. = : synonyme Cette liste est mise à jour mensuellement et consultable sur le site www.vet.cict.fr/bacterio/ (mise à jour en janvier 2006).

Les infections à streptocoques occupent une place importante dans la pathologie infectieuse humaine car elles sont considérées comme les infections bactériennes les plus fréquentes et les plus sévères (Efstratiou, 2000; Schuchat, 1995). Les streptocoques sont définis comme des cocci à Gram positif et leur classification est présentée dans le tableau 2 (Bouvet, 1994; Euzéby, 1997). Parmi eux, les espèces commensales, qui appartiennent à la

flore des muqueuses de l'homme, incluent les streptocoques oraux qui colonisent l'oropharynx et les streptocoques du groupe D, commensaux de l'intestin.

La taxonomie des espèces a longtemps reposé sur la présence ou l'absence de l'antigène D de Lancefield (Lancefield, 1933) et sur la détermination du profil biochimique (acidification des polysides ou des polyalcools, production d'enzymes spécifiques) (Chang et Ellner, 1983; Farrow *et al.*, 1983a; Ibrahim *et al.*, 1996). Cet antigène D, est porté par un acide lipoteichoïque associé à la face interne de la membrane cytoplasmique (Jones et Shattock, 1960). L'identification des espèces a pu être ensuite affinée grâce aux analyses génomiques et la phylogénie moléculaire permet de classier les souches en fonction de l'homologie des ADN et des séquences d'ARNr 16S. Les techniques actuelles de ribotypie reposent sur l'analyse des différences de profils de restriction d'ARNr (ARNr 16S, 23S et espaces intergéniques), telle la technique ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Schlegel *et al.*, 2003b).

Dans les années 80, ces études génomiques ont montré que les streptocoques du groupe D "entérocoques" et "non-entérocoques", définis comme respectivement pouvant ou non se multiplier en milieu hostile, appartenaient à deux genres différents. Ainsi, en 1984, Schleifer et Kilpper-Bälz proposent le transfert des "streptocoques du groupe des entérocoques", que sont *S. faecium* et *S. faecalis*, dans le genre *Enterococcus* (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1984). De même, l'espèce *Streptococcus lactis*, constituée de trois sous-espèces *S. lactis* subsp. *lactis*, subsp. *cremoris* et subsp. *diacetilacis*, a été transférée au genre *Lactococcus* (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1987).

La plupart des streptocoques du groupe D et certaines espèces apparentées sont regroupées dans le complexe « *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* » qui est composé de bactéries rencontrées fréquemment dans la flore intestinale humaine et animale (Facklam, 1972). Ces streptocoques forment des cocci d'environ 2 µm de diamètre, qui s'assemblent sous forme de chaînettes (Figure 13). Ces bactéries anaérobies facultatives possèdent un métabolisme homofermentaire (production prédominante d'acide lactique au cours de la fermentation du glucose).

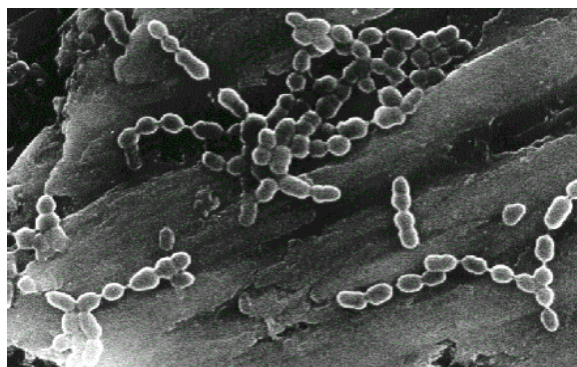


Figure 13 : *Streptococcus infantarius* NCTC8133 (X 5400) (cliché J. Hemmerlé)

Depuis l'étude de Farrow *et al.* de nombreux remaniements ont affecté la nomenclature de ce complexe *S. bovis/S. equinus* (Farrow *et al.*, 1983b; Farrow *et al.*, 1984) et la classification des espèces qui le composent ont récemment subi de nouvelles modifications.

S. bovis et *S. equinus* ont d'abord été considérés comme deux taxons différents. En effet, bien que phénotypiquement proches, ces deux souches étaient distinguées sur :

- la base de la fermentation du raffinose : résultat positif pour *S. bovis* et négatif pour *S. equinus*,
- sur leur habitat : *S. bovis* est isolé principalement des fèces des ruminants et des porcs alors que *S. equinus* est isolé principalement des fèces du cheval,
- sur leur pouvoir pathogène : *S. bovis* est éventuellement pathogène pour l'homme ou l'animal ce qui n'est pas le cas pour *Streptococcus equinus*,
- sur la fermentation de l'amidon, du glycogène, de l'inuline, du lactose et la production d'une alpha-galactosidase avec des résultats positifs pour *S. bovis* et négatifs pour *S. equinus*.

De nombreuses études utilisant les hybridations ADN - ADN, les analyses du gène *sodA* codant la superoxyde dismutase manganèse dépendante, les ribotypes et les séquences des ARNr 16S ont finalement permis de déterminer que les souches types de *S. bovis* et de *S. equinus* constituent une unique espèce. Poyart *et al.* formalisent cette synonymie et proposent d'utiliser la nomenclature de *S. equinus* pour désigner aussi bien les souches de *S. equinus* que les souches de *S. bovis* (Poyart *et al.*, 2002; Schlegel *et al.*, 2003a).

Ainsi, le complexe *S. bovis/S. equinus* comprend actuellement les espèces *S. gallolyticus*, *S. infantarius* et *S. lutetiensis*, fréquemment isolées d'infections humaines, ainsi que les espèces *S. equinus* et *S. alactolyticus*, isolées plutôt chez l'animal (tableau 3).

Au sein de l'espèce *S. gallolyticus*, des souches isolées de septicémies chez des pigeons, de méningites chez des bovins ou d'endocardites chez l'homme, appartiennent au biovar I

(mannitol +) et au biovar II.2 (mannitol -, tréhalose +, β -glucuronidase +, β -galactosidase +, ne fermentant ni amidon et ni glycogène). Le biovar II.1 (mannitol -, tréhalose -, β -glucuronidase -, β -galactosidase -, fermentant l'amidon et le glycogène) rassemble la souche type de *S. equinus* et les sous-espèces *S. infantarius* subsp. *infantarius* (esculine variable) et *S. infantarius* subsp. *coli* (esculine positive) (Schlegel *et al.*, 2000). Selon Poyart *et al.* (2002), les souches de *S. infantarius* subsp. *coli* méritent d'être élevées au rang d'espèce et proposent la nomenclature de *S. lutetiensis*.

S. infantarius subsp. *infantarius* a été isolé chez l'homme (fèces, hémoculture dont une réalisée chez un patient atteint d'endocardite) et de denrées alimentaires (produits laitiers et pois congelés). Les souches de *S. lutetiensis* ont été exclusivement isolées chez l'homme (fèces, urine, hémocultures dont certaines réalisées chez des patients atteints d'endocardite) (Bouvet *et al.*, 1997; Schlegel *et al.*, 2000)

ancienne nomenclature	synonyme précédent	nom actuel
<i>S. equinus</i> + souches animales de <i>S. bovis</i>	<i>S. equinus</i> = <i>S. bovis</i>	<i>S. equinus</i>
<i>S. bovis</i> biotype I	<i>S. caprinus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp <i>gallolyticus</i>
<i>S. bovis</i> biotype II.2	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp <i>pasteurianus</i>
<i>S. waius</i>	<i>S. macedonicus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp <i>macedonicus</i>
<i>S. bovis</i> biotype II.1	<i>S. infantarius</i> subsp <i>infantarius</i>	<i>S. infantarius</i> subsp <i>infantarius</i>
	<i>S. infantarius</i> subsp <i>coli</i>	<i>S. lutetiensis</i>
<i>S. intestinalis</i>	<i>S. alactolyticus</i>	<i>S. alactolyticus</i>

Tableau 3 : Evolution de la classification des espèces du complexe *S. bovis/S. equinus*

La nouvelle dénomination de *S. gallolyticus* subsp *macedonicus* proposée par Schlegel et al. rassemble les souches autrefois désignées sous les noms de *S. macedonicus* et *S. waius* (Schlegel *et al.*, 2003a)

4.2. pathologies associées

Différentes études ont montré que des souches du complexe *S. bovis/S. equinus* sont à l'origine de 11 à 14% des endocardites infectieuses et de 24% des endocardites à streptocoques (Ballet *et al.*, 1995; Delahaye *et al.*, 1995; Kupferwasser *et al.*, 1998).

Les données les plus récentes ont permis de distinguer parmi les souches du complexe *S. bovis/S. equinus* mises en cause dans les endocardites : *S. gallolyticus*, qui s'avère être l'espèce la plus virulente puisqu'elle est responsable de 13 % des cas et *S. infantarius* qui affecte seulement 1,5 % des patients (Hoen *et al.*, 2002). Dans tous les cas, les souches du complexe *S. bovis/S. equinus* semblent être associées aux endocardites les plus sévères. Ces espèces sont, en effet, les plus fréquemment trouvées chez les patients de plus de 60 ans

présentant une endocardite et ceci avec un taux de mortalité plus élevé que pour n'importe quelle autre endocardite infectieuse (45 % contre 25 %, respectivement) (Kupferwasser *et al.*, 1998; Pergola *et al.*, 2001).

L'implication d'espèces appartenant au complexe *S. bovis/S. equinus* a également été montrée dans des arthrites et des arthroplasties associées à un cancer du côlon (Garcia-Porrúa *et al.*, 2000; Vince *et al.*, 2003), des méningites (Barragan-Casas *et al.*, 2002; Namiduru *et al.*, 2003), des abcès du cerveau (Leibovitch *et al.*, 1991), des péritonites (Vilaichone *et al.*, 2002)...

4.3. Complexe *S. bovis/S. equinus* et cancer colorectal

L'association entre une bactériémie à « *S. equinus/S. bovis* » et une maladie gastro-intestinale, notamment un néoplasme colique, est largement documentée dans la littérature. Dès 1951, McCoy et Mason décrivent le cas d'une endocardite à entérocoques chez un patient présentant un carcinome au niveau du côlon (McCoy et Mason, 1951). Mais ce n'est qu'en 1974, que la souche *S. bovis* est incriminée comme agent infectieux impliqué dans cette association (Keusch, 1974; Roses *et al.*, 1974). Un peu plus tard, des études montrent que le côlon de patients atteints de colite ulcéreuse présente une augmentation de la quantité de certaines souches de streptocoques dans leur flore intestinale. Leur côlon présente notamment 100 fois plus de streptocoques du groupe D que celui des sujets sains. Cette augmentation concerne non seulement le nombre de germes mais également la diversité des espèces colonisantes (van der Wiel-Korstanje et Winkler, 1975).

Une étude a montré que, dans les cas de cancer gastro-intestinal associé à une bactériémie causée par des souches de *S. bovis* de biotype I ou II, les bactéries de biotype I (comme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* et *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*) sont mises en cause chez 71 à 100 % des patients, alors que les souches de biotype II (comme *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, la souche-type de *S. equinus* (anciennement *S. bovis*), *S. lutetiensis* et *S. infantarius* subsp. *infantarius*) sont responsables de seulement 17 à 25 % des cas (Ruoff *et al.*, 1989).

Les données statistiques relevées à ce jour dans la littérature mettent en évidence indubitablement l'association d'une bactériémie à « *S. equinus/S. bovis* » et d'un néoplasme gastro-intestinal, bien que ces données soient très variables d'une étude à l'autre. En effet, selon les rapports, chez 28 à 80 % des patients présentant une bactériémie et/ou une endocardite causée par ces souches, une tumeur maligne est détectée au niveau du côlon-rectum (Beebe et Koneman, 1995; Gold *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 1979; Waisberg *et al.*,

2002). L'étude de Klein *et al.* (1977) montre, en outre, une augmentation du portage en *S. bovis* dans les selles de 56 % des malades présentant une telle tumeur et de 28 % des patients atteints d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (IBD), par rapport à une population de sujets sains dont 10 % présentent cette augmentation du portage fécal.

Les spécialistes recommandent une exploration approfondie du tube digestif chez tous les patients atteints d'une bactériémie ou d'une endocardite à « *S. equinus/S. bovis* » (Beeching *et al.*, 1985; Bisno, 1991; Waisberg *et al.*, 2002). Certains auteurs proposent également que les anticorps anti-*S. bovis* pourraient être utilisés comme marqueur d'un cancer gastro-intestinal (Beeching *et al.*, 1985; Darjee et Gibb, 1993).

5. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le laboratoire s'attache à étudier la relation entre *S. infantarius* et le cancer colorectal ainsi que les phénomènes inflammatoires causés par cette bactérie. Nous nous intéressons également à l'identification des composants de la paroi bactérienne responsables de la pathogénicité de *S. infantarius* : impliqués dans les mécanismes liés à la colonisation de l'organisme-hôte, intervenant dans l'interaction et l'adhérence de la bactérie aux cellules ou jouant un rôle dans la modulation des voies de signalisation intracellulaire de l'hôte.

Des études antérieures menées au laboratoire, ont démontré que *S. infantarius* joue un rôle aggravant dans le développement du cancer colorectal en accélérant la formation de lésions tumorales au niveau du côlon de rat et que cette bactérie pouvait intervenir dès les stades précoces de la cancérogenèse. Cet effet cancérogène s'accompagne d'une réaction inflammatoire mise en évidence par la libération de chimiokines CINC/GRO dans la muqueuse colique. Ces effets proinflammatoires ont été confirmés par la stimulation *in vitro* de la libération d'IL-8 par les cellules coliques humaines Caco-2 et HT29 incubées avec les composants protéiques de la paroi de *S. infantarius* (Ellmerich *et al.*, 2000a; Ellmerich *et al.*, 2000b). La purification des protéines de la paroi bactérienne a permis d'isoler une sous-fraction protéique, que nous appelons S300, enrichie en facteurs proinflammatoires et procancérogènes.

L'objectif de ce travail a été d'isoler et de caractériser le ou les PAMPs protéiques de la paroi de *S. infantarius* impliqués dans la promotion du cancer colorectal et dans l'inflammation de la muqueuse colique qui y est associée. Ce travail a été mené en plusieurs étapes réclamant différentes approches méthodologiques.

La première étape a permis l'identification par spectrométrie de masse des différentes protéines incluses dans la fraction S300 semi-purifiée obtenue par des chromatographies successives à partir de la paroi bactérienne. De précédentes expériences avaient mis en évidence le pouvoir procancérogène de cette fraction S300 puisque, utilisée dans le modèle de CCR développé par le laboratoire chez le rat, elle est capable d'induire une augmentation des lésions précancéreuses dans le côlon de ces rats prétraités avec l'AOM. Cette fraction présente, outre un fort pouvoir de stimulation des cellules Caco-2 *in vitro*, une capacité à induire au niveau de la muqueuse une réaction inflammatoire corrélée à un effet tumoral *in vivo*.

Dans un second temps, nous nous sommes appliqués à isoler un fragment des gènes de trois protéines identifiées dans la fraction S300. Nous avons choisi une stratégie d'amplification par PCR de fragments localisés à l'intérieur de la partie codante de ces gènes. Le clonage de ces séquences amplifiées dans des vecteurs d'expression bactériens a permis de surexprimer un fragment de chacune des trois protéines choisies de *S. infantarius*. Les protéines recombinantes ainsi produites ont servi à générer des anticorps polyclonaux spécifiques de chacune de ces protéines d'intérêt. Pour la production d'anticorps spécifiques de deux de ces protéines, nous avons également utilisé des antigènes peptidiques de synthèse.

La troisième étape a consisté à purifier séparément les trois protéines de la paroi *S. infantarius* grâce aux anticorps polyclonaux par chromatographie d'immunoaffinité.

Enfin, l'étude *in vitro* et *in vivo* des effets de ces trois protéines purifiées sur la promotion du cancer colorectal associé à la réaction inflammatoire a été mise en œuvre. *In vitro*, les cellules Caco-2 ont été utilisées pour tester la capacité de chacune de ces protéines bactériennes à stimuler la libération d'IL-8 et de PGE₂ qui sont des marqueurs d'une réponse inflammatoire par des cellules cancéreuses coliques. Une expérience *in vivo*, avec notre modèle de CCR chez le rat, nous a permis de savoir si une ou plusieurs de ces protéines présente un pouvoir cancérogène.

Dans une deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à un complexe de haut poids moléculaire, appelé HPM, présent dans toutes les fractions purifiées à partir de la paroi de *S. infantarius* et ayant un pouvoir proinflammatoire plus important que celui de la fraction S300. La purification de ce complexe HPM par immunoaffinité a permis de montrer qu'il contient plusieurs protéines dont une majoritaire de 50 kDa.

Dans un premier temps, une expérience *in vivo*, menée avec notre modèle animal, nous a permis d'étudier si ce complexe HPM intervient dans la cancérogenèse colique chez le rat.

Nous avons ensuite cherché à caractériser le(s) récepteur(s) cellulaire(s) interagissant avec des antigènes protéiques de ce complexe HPM et présents à la surface des cellules THP-1 et Caco-2. Des expériences de "*Ligand Affinity Blotting*" ont été optimisées dans ce but. Finalement, l'identification par spectrométrie de masse de deux récepteurs mis en évidence a été envisagée.

MATERIELS ET METHODES

1. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1.1. Souches bactériennes

1.1.1. *Streptococcus infantarius*

La souche de *S. infantarius* NCTC 8133, isolée d'endocardite, nous a été fournie par le docteur A. P. Gibb du département de Microbiologie et des Maladies infectieuses de l'Université de Calgary, Canada. Cette souche cataloguée provient de la National Collection of Types Cultures (Londres, UK). Il s'agit de l'espèce *S. bovis* biotype II-1, récemment reclassée en *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (Schlegel et al., 2000).

Cette souche est cultivée dans du milieu BHI (Brain Heart Infusion, Difco) à 30 g/L enrichi en glucose 1%, en conditions anaérobies en système GENbox anaer (Biomérieux, France) et à 37°C. Les bactéries sont conservées dans le glycérol (50%) à -80°C.

1.1.2. *Escherichia coli*

JM109 : *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17* (r_{k-}, m_{k+}), *relA1, supE44, Δ(lac-proAB)*,

[F', *traD36, proAB, lacI^qZΔM15*]

Cette souche est communément utilisée pour produire des plasmides et offre un taux de transformation élevé. Elle permet une sélection des transformants par le système d' α -complémentation puisqu'elle possède le répresseur *lacI^qZΔM15* inductible (Gough et Murray, 1983)

BL21(DE3) : *E. coli* B [F-, *ompT, hsdS_B* (r_{B-} m_{B-}), *gal, dcm, λ(DE3)*]

Cette souche constitue un système de choix pour la surexpression de gène et la production de protéines recombinantes. Elle porte une mutation dans les gènes de protéases *lon* et *ompT*, ce qui permet une stabilité des protéines recombinantes.

Les *E. coli* sont cultivées dans du milieu LB (Luria-Bertani) à 37°C sous agitation en présence ou non d'ampicilline.

1.2. Extraction de l'ADN bactérien

1.2.1. Extraction de l'ADN génomique de Streptocoques

S. infantarius (NCTC 8133) est cultivé dans 400 mL de milieu BHI à 37°C pendant 18 heures. La culture est centrifugée à 7000g pendant 10 min à 4°C. L'ADN génomique est extrait à partir du culot bactérien selon la méthode de Spanier et Cleary (1983). Ce dernier est lavé deux fois avec 30 mL d'acétate de sodium 0,2 M, pH 6,0 froid, puis remis en suspension dans 20 mL de tampon T₁₀E₁ (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) glucosé à 25 % et additionné de 800 U de mutanolysine. La suspension est alors incubée à 37°C pendant 1h30, puis centrifugée 15 min à 9000g à 4°C. Le culot est repris dans 20 mL de tampon T₁₀E₁ additionné de 1 % de sarcosyl et incubé avec 200 µL de RNase à 10 mg/mL pendant 45 min à 37°C. Le tout est ensuite incubé avec 100 µL de protéinase K pendant 1h à 37°C.

Un volume de phénol-chloroforme (v/v) est ajouté au lysat bactérien et la phase aqueuse, qui contient l'ADN, est recueillie après centrifugation à 10000g, 15 min à 4°C et soumise à une 2^{ème} extraction au phénol-chloroforme. L'ADN génomique est ensuite précipité par addition de deux volumes d'éthanol absolu et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,4 glacé (30 min, à -20°C). Le culot est récupéré par centrifugation (9000g, 20 min, 4°C) et lavé dans 5 mL d'éthanol 75%. Il est finalement séché sous vide pendant 15 min avant d'être dissout dans 500 µL d'eau milliQ.

1.2.2. “ Minipreparation ” de l'ADN plasmidique

Les *E. coli* transformées sont cultivées dans 5 mL de milieu LB avec ampicilline (100 µg/mL), une nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est purifié sur colonne selon un protocole rapide et simple grâce au système Wizard® Plus SV (Promega).

1.2.3. “ Maxipreparation ” de l'ADN plasmidique

250 mL de milieu LB sontensemencés par 250 µL d'une préculture d' *E. coli* d'une nuit et mis en culture à 37°C sous agitation pendant un minimum de 16h. Cette méthode d'extraction consiste en une lyse alcaline des bactéries (Birnboim et Doly, 1979; Ish-Horowicz et Burke, 1981). Le culot bactérien est resuspendu dans 25 mL de tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, Glucose 50 mM, puis 50 mL de solution de NaOH 0,2 M, SDS 1% sont ajoutés, les bactéries sont lysées dans la glace pendant 5 à 10 min. Le SDS, les débris cellulaires et les protéines sont ensuite précipités dans la glace pendant 10 min en présence de d'acétate de potassium 5 M, pH 5,0. Après centrifugation (10000g, 20 min, 4°C), le surnageant est additionné de 10 mL d'isopropanol. Après une incubation d'une heure à -

20°C, le culot est récupéré par centrifugation (10000g, 20 min, 4°C) et lavé à l'éthanol 75% puis dissout dans un volume de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM). Les acides nucléiques sont ensuite séparés sur un gradient de chlorure de césium (1,1 g/mL, 60000rpm, 5 h). La bande inférieure correspondant à l'ADN super-enroulé est récupéré et subit une purification à l'isopropanol. L'ADN est ensuite précipité dans 10 volumes d'éthanol pendant 1 h à -20°C. Après centrifugation, le culot d'ADN est rincé à l'éthanol absolu et dissout dans un volume d'eau milliQ.

1.3. P.C.R.

La PCR consiste en une amplification exponentielle d'un fragment d'ADN spécifique grâce à deux amorces désoxyribonucléotidiques complémentaires aux extrémités du fragment à amplifier. A 50 à 100 ng d'ADN matrice sont ajoutés 5 µL de tampon PCR 10X (Invitrogen), les dNTPs (0,5 mM chacun, Invitrogen), 400 ng de l'amorce-sens, 400 ng de l'amorce-antisens, 1 unité de Taq polymérase (Invitrogen) et q.s.p. 50 µL d'eau.

Amorces	Séquences 5'-3'	Tm (°C)
dpep1F	TGTACWTCWATHHTTRGTYGGWAAA	44
dpep4R	RACATAAGCATCATCTGGAAC	44
pgi1F	GGTATTGGTGGTTCWTACCTTGGTGC	50
pgi6R	CCWGGTTTWCCAAGAAGAGCAAACAT	50
pgi7F	ATGWCACATATTAMATTYGAYTA	50
ampep1F	AAAGCTTCWGGWCGTTGCTGGATGTTT	50
ampep5R	AACACCWGTYYAAVACCATRGCCTG	50
dpep11F	CGGGATCCCGAAAAGCGTCTTATGATGGCT	59
dpep41R	GGAATTCGCATCATCTGGAACACGGCGAG	59
pgi11F	GGAATTCATATGGAATTCCTGCGGCTATCGACTTC	55
pgi61R	CGGGATCCCGTTTCTTGTATGCTTCTAC	55
ampep11F	GGAATTCATATGGAATTCAGCTCTTAATACTTTCCC	55
ampep51R	CGGGATCCCGTGTTCATCAAGCTTTCGCT	55

Tableau 4 : Amorces utilisées lors des différentes amplifications par PCR et leur température d'hybridation (Tm)

Programme PCR :

Etapes	
Dénaturation	5 min à 95°C
Hybridation	1 min à T _m
Polymérisation	1 min/500 pb à 72°C
Elongation finale	5 min à 72°C
Nombre de cycles	35

1.4. Clonage des fragments d'ADN

1.4.1. Vecteurs bactériens

➤ pGEM-T

Ce vecteur dérive du plasmide pUC et possède une origine de réplication et un gène de résistance à l'ampicilline (figure 14). Il permet d'insérer directement des fragments d'ADN amplifiés par PCR dans sa cassette de clonage qui se situe au niveau du gène *lacZ* codant la β-galactosidase. Le clonage d'un fragment d'ADN empêche ainsi la synthèse de la β-galactosidase et les clones recombinants sont détectés par α-complémentation sur un milieu avec de l'IPTG et du X-GAL

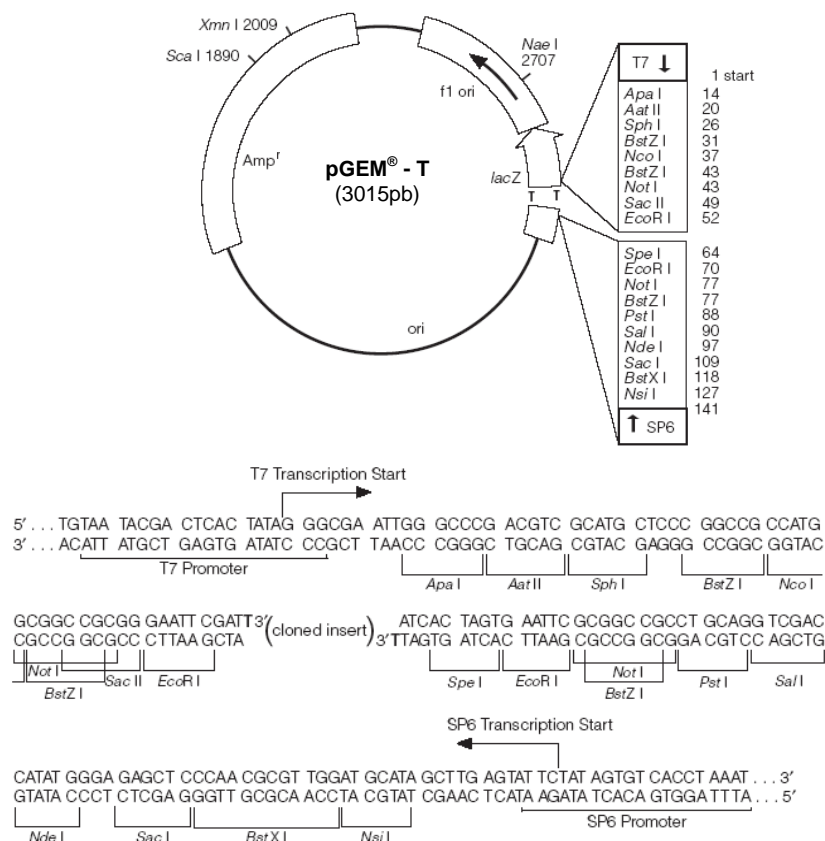


Figure 14 : carte du vecteur pGEM[®]-T et séquence de la cassette de clonage

➤ **pGEX-4T**

Le vecteur pGEX-4T dérive du plasmide pBR322 dont il possède l'origine de réplication et renferme le gène de résistance à l'ampicilline (figure 15). Il renferme une cassette de clonage en aval du gène de la Glutathion S-transférase (GST) et permet donc d'exprimer des protéines fusionnées à cette GST à l'extrémité N-terminale, sous le contrôle du promoteur *tac* inductible par l'IPTG.

➤ **pET-15b**

Ce vecteur d'expression possède une origine de réplication *E. coli* et le gène de résistance à l'ampicilline. Il permet, sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7, l'expression d'une protéine d'intérêt avec une queue poly-histidine (His₆-Tag) à son extrémité N-terminale. Ce promoteur est activé par la T7 ARN polymérase dont le gène est présent dans le chromosome bactérien des souches d'*E. coli* telles que BL21 et BL21(DE3) et dont l'expression est sous le contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'IPTG (figure 16).

1.4.2. Digestion de l'ADN par une enzyme de restriction

La digestion se fait pendant 2h à 37°C ou 12h à 37°C sur 1 µg d'ADN double brin en présence de 5U d'enzyme de restriction, dans un milieu réaction de 20 µL comportant le tampon de digestion correspondant à l'enzyme utilisée. La digestion est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose et le produit de restriction est purifié par précipitation éthanolique.

1.4.3. Isolement de fragments d'ADN d'un gel d'agarose

Ce vecteur d'expression possède une origine de réplication *E. coli* et le gène de résistance à l'ampicilline (figure 15). Il permet, sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7, l'expression d'une protéine d'intérêt avec une queue poly-histidine (His₆-Tag) à son extrémité N-terminale. Ce promoteur est activé par la T7 ARN polymérase dont le gène est présent dans le chromosome bactérien des souches d'*E. coli* telles que BL21 et BL21(DE3) et dont l'expression est sous le contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'IPTG.

1.4.4. Ligation

La ligation se fait à 4°C pendant une nuit dans un volume total de 10 µL. Le milieu réactionnel est constitué de 100 ng de vecteur linéarisé, de 50 à 100 ng de fragment d'ADN à cloner, de 5 µL de tampon de ligation 2X (LigaFast™ System, Promega), de 1U de T4 DNA ligase et qsp 10 µL d'eau.

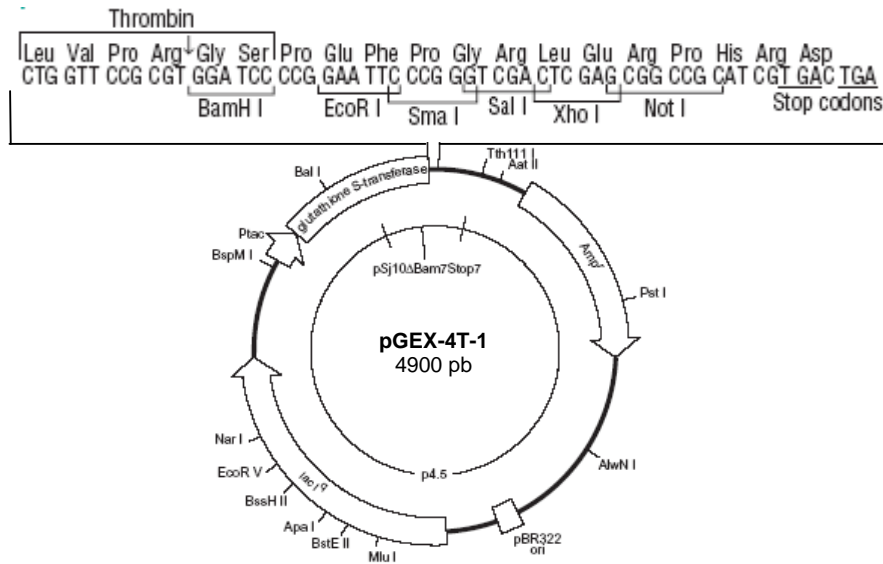


Figure 15 : carte du vecteur pGEX-4T-1 et séquence de la cassette de clonage

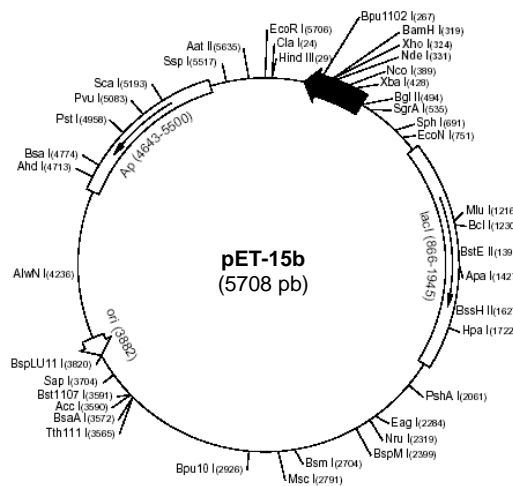
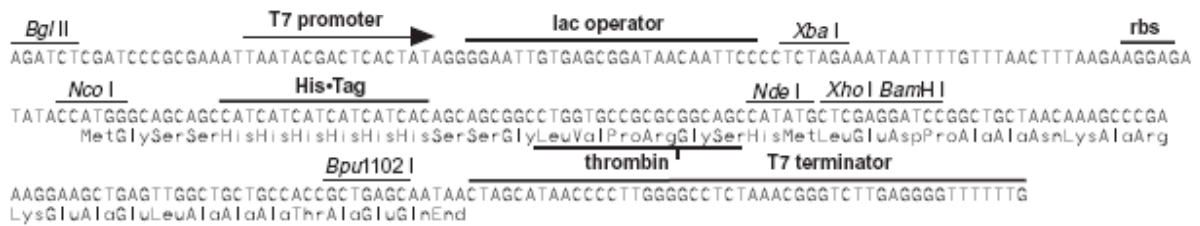


Figure 16 : carte du vecteur pET-15b et séquence de la cassette de clonage

1.4.5. Transformation de *E. coli*

➤ Transformation de JM109

La transformation de la souche JM109 compétentes (Promega) se fait selon un protocole simple par choc thermique (passage de 0 à 42°C pendant 50 secondes). Pour la sélection par α -complémentation des clones recombinants contenant le vecteur pGEM-T, nous étalons les bactéries transformées sur des boîtes LB-Agar (1,5%) avec de l'ampicilline (100 μ g/mL), du X-gal (2%) et de l'IPTG (80 μ M). Les boîtes sont alors mises une nuit à 37°C.

➤ Préparation de *E. coli* BL21 (DE3) électrocompétentes

La veille, une préculture de 100 mL de *E. coli* BL21 est lancée à 37°C sous agitation toute la nuit. A 50 mL de cette préculture sont ajoutés 450 mL de LB et les bactéries sont cultivées à 37°C jusqu'à une DO de 0,5 à 600 nm. La culture est alors refroidie pendant 1h à 4°C puis centrifugée à 7000g, 10 min à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 45 mL d'eau milliQ stérile et froide (4°C) puis la suspension est complétée à 450 mL avec de l'eau. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 30 mL d'eau froide puis complété à 300 mL avec de l'eau. Après une troisième centrifugation, le culot est resuspendu dans 4mL d'eau froide puis complété à 100 mL d'eau. Une ultime centrifugation permet de récupérer un culot bactérien qui est repris finalement dans 1,6 mL d'une solution aqueuse 20% glycérol stérile qui permet de conserver les cellules à -80°C. Les bactéries compétentes sont aliquotées à 75 μ L et sont ainsi prêtes à être transformées par électroporation.

➤ Transformation de *E. coli* BL21 (DE3) compétentes

Une suspension de 40 μ L de bactéries compétentes est mélangées à 1 μ L du produit de la ligation et incubée 1min dans la glace. Le tout est introduit dans une cuvette d'électroporation et soumis à une décharge électrique délivrée par un électroporateur (25 μ F, 2500 V, 200 Ω). Après addition de 1 mL de LB, les cellules transformées sont incubées 1h à 37°C. Puis 20 et 200 μ L de la suspension bactérienne sont étalés sur un milieu LB-agar (1,5%) sélectif avec ampicilline.

1.4.6. Criblage des clones par hybridation sur membrane

➤ Marquage de la sonde ADN à la digoxigénine

Les différentes sondes d'ADN double brin sont marquées de manière non radioactive en incorporant des désoxyribonucléotides dUTP marqués à la digoxigénine par PCR selon la méthode de l'amorçage au hasard ou " random priming " (Feinberg et Vogelstein, 1983).

➤ ***Transfert des acides nucléiques de colonies d'E. coli***

Les colonies transformées à analyser sont repiquées symétriquement sur deux boîtes de milieu LB-agar avec ampicilline. Sur une des boîtes, le milieu est préalablement recouvert par une membrane de nitrocellulose. Les deux répliques sont mises en culture une nuit à 37°C. Le filtre de nitrocellulose est ensuite incubé avec 3 mL de tampon de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) pendant 10 min, puis avec du tampon de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, EDTA 1 mM, pH 7,0) deux fois 10 min. Il est ensuite lavé dans du tampon SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrate de Na 30 mM) afin d'éliminer les débris cellulaires. Après séchage à l'air libre, les acides nucléiques sont fixés sur la membrane par irradiation aux UV en vue d'une hybridation avec une sonde d'ADN.

➤ ***Hybridation sur membrane***

La membrane sèche sur laquelle est fixé l'ADN bactérien est préincubée 30 min à 65°C dans 5 mL de tampon d'hybridation. La sonde d'ADN double brin marquée à la digoxigénine est d'abord dénaturée à 100°C pendant 3 min. Elle est immédiatement transférée sur la glace fondante puis rajoutée au milieu d'hybridation pour une incubation à 65°C toute la nuit. Après rinçage de la membrane dans le tampon SSC 2X, elle est séchée avant détection de la sonde avec un anticorps anti-digoxigénine conjugués à la phosphatase alcaline et la révélation se fait après incubation avec son substrat chimiluminescent, CSPD® (disodium 3-methoxyspiro dioxetane chloro tricyclodecanyl phenyl phosphate, Boehringer Mannheim) et exposition à un film autoradiographique.

2. PREPARATION DES ANTIGENES BACTERIENS

2.1. Préparation des antigènes de parois

S. infantarius est cultivé dans du milieu BHI à 37°C pendant 18 heures. En phase stationnaire, les cultures sont centrifugées à 7000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est soumis à une extraction douce des antigènes de paroi ou WEA (Wall Extracted Antigens) comme décrit précédemment (Scholler *et al.*, 1981). Celle-ci est réalisée sous agitation pendant 1 heure à 4°C, en présence d'un tampon phosphate 0,5 M, pH 6,0 (25 mL/Litre de culture), et de 5% (v/v) de billes de verre (Glasperlen 0,25-0,50 mm, Roth, Allemagne). Après centrifugation (7000g, 10 min, 4°C) le surnageant est dialysé contre

de l'eau distillée, lyophilisé à sec, dessalé à nouveau sur colonne EconoPac 10 DG (Biorad, France) puis repris dans un tampon Bis Tris 20 mM, pH 7,0.

2.2. Préparation des antigènes excrétés

S. infantarius est cultivé dans du milieu BHI à 37°C pendant 18 heures. En phase stationnaire, les cultures sont centrifugées à 7000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est remis en suspension dans du PBS 5 mM (1 L pour 10 L de culture). Les protéines excrétées sont préparées selon une méthode précédemment décrite (Aliprantis *et al.*, 2001). Après 4 heures d'incubation à 37°C, la culture est centrifugée à 7000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est conservé à -80°C ou dialysé contre de l'eau distillée pour être concentré par lyophilisation.

2.3. Lyse des streptocoques

Le culot bactérien, obtenu après centrifugation à 7000g pendant 10 min à 4°C à partir d'une culture de 18h de *S. infantarius*, est remis en suspension dans du PBS 5 mM (100 mL pour 10L de culture) avec 1 µM de PMSF. La suspension bactérienne est lysée par cinq séries de congélation dans l'azote liquide et décongélation à 37°C puis par plusieurs séries de sonications (10 min, 2 pulses/s) dans la glace. Le lysat est obtenu après centrifugation (9000g, 10 min, 4°C) et conservé à -80°C.

2.4. Purification des composants induisant une libération d'IL-8

La fraction WEA de *S. infantarius* est d'abord fractionnée par chromatographie échangeuse d'anions en système HPLC équipé d'une colonne MonoQ® HR 5/5 (Pharmacia, France), équilibrée avec un tampon A (BisTris 20mM, pH 7,0). L'élution est réalisée à un débit de 1 mL/min avec un gradient de NaCl (0,05 à 1 M) dans le tampon A. L'absorbance de l'éluat est enregistrée à 280 nm, les fractions de 2 mL sont collectées puis testées pour leur capacité à induire une libération d'IL-8 par les cellules Caco-2.

La fraction active (Fraction MonoQ) est rassemblée, dialysée contre le tampon A puis concentrée pour être à nouveau fractionnée par chromatographie d'exclusion (Sephacryl™ S300 column (100 x 2.5 cm; Pharmacia). La colonne est équilibrée avec un tampon A supplémenté avec 50 mM NaCl. La séparation se fait à un débit de 0,2 mL/min, l'absorbance de l'éluat est enregistrée à 280 nm, des fractions de 2 mL sont collectées puis testées pour leur capacité à induire une libération d'IL-8 par les cellules Caco-2. La fraction active (Fraction S300) est rassemblée, dialysée contre le tampon A puis concentrée.

2.5. Extraction et purification de protéines recombinantes

2.5.1. Lyse des bactéries

Les clones recombinants sont mis en préculture dans 10 mL de milieu LB avec de l'ampicilline (100 µg/mL) à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, 2 mL de cette préculture est réensemencée dans 25 mL jusqu'à une DO de 0,4 à 0,6. L'addition de 1 µM d'IPTG, qui est l'inducteur du promoteur bactérien de la β-galactosidase, permet d'activer l'expression de la phase codante de la protéine située en aval de ce promoteur. La surexpression est induite pendant 3h à 37°C.

Le culot bactérien, obtenu par centrifugation à 9000g pendant 10 minutes à 4°C, est repris dans 10 mL de PBS 10 mM avec 1 µM de PMSF, un inhibiteur de protéases. Les bactéries sont lysées dans la glace par sonication (2 pulses/s). Le lysat est récupéré après centrifugation (9000g, 10 min, 4°C) et conservé à -80°C.

2.5.2. Chromatographie d'affinité

➤ *Sur colonne GST-Trapp*

La matrice de Sepharose de la colonne (GST-trapp FF 1mL column, Amersham Biosciences), couplée au glutathion réduit, substrat de la GST (Glutathion S-Transferase), permet la purification de la GST et de toute protéine fusionnée à la GST. La colonne est lavée avec de l'eau (1 mL/min), puis équilibré avec du PBS, l'extrait protéique est déposé dans un tampon de liaison (PBS, pH 7,3) à un débit de 0,5 mL/min. La colonne est ensuite lavée avec 10mL de PBS. L'élution des protéines fusionnées à la GST est réalisée sous un débit de 1 mL/min dans un tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM, glutathion réduit 10 mM pH 8,0). Les protéines sont séparées selon leur affinité avec la colonne, et sont détectées à une longueur d'onde de 280 nm. Les différentes fractions sont collectées et analysées par SDS-PAGE.

➤ *Sur colonne chélatrice d'ions*

L'extrait protéique est déposé sur une colonne de Nickel chélatrice de cations divalents (His-Bind resin, Pharmacia) dans un tampon de fixation (Tris-HCl 20 mM, pH7,9, NaCl 0,5 M, imidazole 1 M) à un débit de 1 mL/min. L'élution est réalisée à l'aide d'un tampon Tris-HCl 20 mM, imidazole 80 mM). Les protéines sont séparées selon leur affinité pour le Nickel et sont détectées à une longueur d'onde de 280 nm. Les différentes fractions sont collectées et analysées par SDS-PAGE.

2.6. Purification de protéines par immunoabsorbant

2.6.1. Choix des peptides à synthétiser

Pour l'aminopeptidase A et la PGI, en se basant sur les séquences nucléotidiques traduites trouvées chez *S. infantarius*, nous avons choisi des antigènes peptidiques correspondant à une région très restreinte et très spécifique de chacune de ces deux protéines.

Les peptides ont été synthétisés et purifiés par NeoMPS (Strasbourg). La purification (>85%) des peptides a été effectuée par HPLC. Ils ont été couplés à une protéine porteuse, l'ovalbumine (OVA) à l'extrémité N-terminale par l'intermédiaire d'un agent couplant.

La séquence des peptides synthétiques utilisés pour la préparation des sérums polyclonaux est indiquée dans le tableau ci-dessous :

peptide	mers	séquence	acide aminé N-terminale	agent couplant
AMPEP32	15	YHSDKNITPQEFFKK	tyrosine	bisdiazodenzidine (BDB)
PGI8	17	CKPRKNVVIPELSELD	cystéine	maleimidobenzoyl-succinimide ester (MBS)

2.6.2. Préparation de l'antisérum polyclonal de lapin

Nous avons réalisé l'immunisation de lapins afin d'obtenir des antisérum polyclonaux dirigés contre des antigènes spécifiques :

- les protéines recombinantes d'intérêt, surexprimées dans *E. coli* (Dipeptidase A, Aminopeptidase C ou PGI)
- le complexe HPM (Haut Poids Moléculaire) de la fraction WEA de la souche *S. infantarius* NCTC 8133. Ce complexe, préparé par migration du WEA sur un gel de polyacrylamide 7,5%, migre au milieu du pré-gel à 5% de polyacrylamide,
- ou bien encore les peptides synthétiques respectivement spécifiques de l'Aminopeptidase C et de la PGI de *S. infantarius*. Ils sont injectés à raison de 100 µg de peptide couplé par injection

Pour les antigènes protéiques (les trois protéines recombinantes et le complexe HPM), les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide. Les bandes correspondant aux différentes protéines sont découpées séparément puis broyées dans 500 µL de PBS 5 mM.

L'immunisation consiste en 4 injections par voie sous-cutanée, à 10 jours d'intervalle. En ce qui concerne les peptides, de l'adjuvant de Freund est ajouté à l'inoculum, sinon l'acrylamide sert d'adjuvant. Une ponction est effectuée 4 jours après la dernière injection au niveau de la veine auriculaire.

2.6.3. Purification des IgG

Le sérum est obtenu après coagulation du sang, 1h à 37°C, puis 2h à 4°C, et centrifugation à 200g pendant 10 min. Le surnageant contenant les immunoglobulines est précipité au sulfate d'ammonium à 50% de saturation pendant 1h à 4°C. Le précipité est récupéré après centrifugation à 5000g pendant 10 min à 4°C, remis en suspension dans un tampon Tris-HCl 0,025 M, NaCl 0,035 M, pH 8,8, puis dialysé contre ce même tampon pendant 12h. La fraction IgG est isolée selon la méthode de (Corthier *et al.*, 1984) par chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne DEAE-Trisacryl M équilibrée avec un tampon Tris-HCl 0,025 M, NaCl 0,035 M, pH 8,8. Les IgG, non retenues sur la colonne, sont éluées dans le premier pic, dosées par la méthode de Bradford puis stockées à -20°C. La régénération de la colonne est réalisée avec un tampon Tris-HCl 0,025 M, NaCl 1 M.

2.6.4. Dosage de l'activité immune des IgG

L'activité immune des IgG est déterminée par un test ELISA double sandwich. Les antigènes utilisés pour immuniser le lapin sont adsorbés sur une plaque de microtitration (Maxisorp, Nunc) à raison de 50 µL par puits et de 1 µg/mL s'il s'agit d'une protéine pure ou 20 µg/mL pour un mélange protéique, dans un tampon bicarbonate (0,1 M, pH 9,6) pendant 1h à 37°C. Après saturation des sites spécifiques, les antigènes sont incubés avec une gamme de dilutions des sérums à tester pendant 1h à 37°C (50 µL par puits). Puis des anticorps anti-lapin couplés à la peroxydase alcaline dilués au 1/3000^e (Amersham Bioscience) sont incubés 1h à 37°C. La lecture de la DO à 405 nm est faite après 20 à 30 min d'incubation avec le substrat (p-nitrophenyl phosphate ou pNPP).

2.6.5. Préparation de la colonne d'immunoaffinité

Le gel de Sepharose 4B activé par le bromure de cyanogène (CNBr-activated Sepharose® 4B, Pharmacia biotech) est hydraté 5 min dans quelques mL d'acide chlorhydrique 1 mM froid, puis lavé abondamment (200 mL/g de gel sec) sur verre fritté. L'acide chlorhydrique protège les groupements activés qui autrement s'hydrolyseraient à un pH trop élevé. Les IgG obtenues par chromatographie échangeuse d'ions sont fixées sur le gel. 5 mg d'IgG sont couplées à 1 mL de gel hydraté (0,3 g de gel sec). La solution d'anticorps, préalablement équilibrée dans le tampon de couplage (NaHCO₃ 0,2 M pH 8,3; NaCl 0,5 M), est mise en contact avec le gel pendant 1h à température ambiante sous agitation, sans barreau magnétique. L'excès de groupements actifs est bloqué par une solution de glycine 0,2 M pH 8,0 (2 fois le volume du gel) pendant 2h à température ambiante, sous agitation. Les IgG non fixées sont éliminées par saut de pH, en passant alternativement un volume de tampon acétate

0,1 M pH 4,0 et un volume de tampon de couplage (3 fois). Le gel est stocké dans un tampon PBS 10 mM pH 7,2 avec 0,02% (v/v) d'azide de sodium à 10%, un agent antibactérien et antifongique.

2.6.6. Purification de la protéine sur l'immunoabsorbant

La dipeptidase A est purifiée à partir d'un extrait brut des antigènes de paroi WEA de *S. infantarius* par passage sur un immunoabsorbant (gel Sepharose 4B activé par le bromure de cyanogène et couplé aux IgG de lapin anti-dipeptidase). La fraction WEA est mise en contact avec le gel (1 volume de gel/volume de WEA dilué dans du PBS 10 mM pH 7,2) pendant 15 minutes à température ambiante et sous agitation. Le gel est ensuite séparé des composants non fixés, puis lavé avec un grand volume de PBS pH 7,2, afin d'éliminer les constituants fixés de manière aspécifique.

La dipeptidase A, retenue sur le gel, est éluée à l'aide d'un tampon glycine-HCl 0,1M, pH 2,2 (3 à 4 fois le volume du gel). L'éluat est neutralisé immédiatement par 1/15^e de son volume de KH₂PO₄ 1M, puis est dialysé contre de l'eau distillée, lyophilisé à sec, dessalé à nouveau sur colonne EconoPac 10 DG (Biorad) puis repris dans du Bis-Tris 20 mM, pH 7,0.

Nous suivons la même méthode pour purifier l'aminopeptidase C, la PGI et le complexe HPM de *S. infantarius*.

2.7. Biotinylation du complexe HPM

➤ *Biotinylation des groupements carboxyles*

La biotinylation du complexe HPM est effectuée avec la biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine en présence d'éthyldiméthylaminopropylcarbodiimide hydrochloride (EDC) et se fait entre les fonctions carboxyles des protéines et les fonctions amines primaires de la biotine. Le complexe HPM (1 mg) préparé dans 1 mL de tampon acide morpholino-éthanesulfonique 0,1 M (MES) pH 4,7-5,5 est mélangé avec 1 mL d'une solution de biotine 50 mM préparée dans le même tampon et 100 µL d'une solution d'EDC 20 mg/ml dans le tampon MES.

➤ *Biotinylation des groupements amines*

La biotinylation du complexe HPM est effectuée avec la sulfo-N-hydroxysuccinimide ester biotine et se fait entre les fonctions amines primaires des protéines et la fonction ester de la biotine. Le complexe HPM (1 mg) est dissout dans 1 mL de tampon carbonate 0,1 M pH 8,0 et mélangé avec 75 µL d'une solution de biotine à 1 mg/mL préparée dans le même tampon.

Pour les deux méthodes de biotinylation, le couplage est réalisé selon les indications du fabricant (Thongboonkerd *et al.*). Le mélange complexe HPM-agent de biotinylation est mis sous agitation pendant 2h à 25°C. L'élimination de la biotine libre se fait par chromatographie sur colonne d'exclusion de type Biogel P-6DG équilibrée et éluée en PBS pH 7,2.

3. ANALYSES BIOCHIMIQUES

3.1. Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant

Après avoir été dosée selon la méthode de Bradford (1976), les protéines sont séparées en gel 12, 10 ou 7,5% de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS et DTT). Dans certains cas, pour dissocier totalement des complexes protéiques, il nous a fallu travailler en présence d'urée 4 M en supplément du SDS, afin de rompre les liaisons hydrogènes. Les protéines peuvent ensuite être visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane.

3.2. Western Blotting

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham) préincubée dans le tampon de transfert (Towbin *et al.*, 1979). La révélation des protéines se fait par incubations séquentielles avec:

- une solution de saturation (PBS, 5% lait, 30 min)
- des anticorps primaires (dilués dans du PBS, 0,1 % lait, 2h).
- des anticorps secondaires couplés à la peroxydase, (dilués dans du PBS-0,05 % Tween 20, 0,1 % lait, 1h).
- le substrat chimioluminescent ECL (Amersham Life science, France), puis révélation par autoradiographie.

Toutes les étapes sont séparées par des séquences de lavages (3x10 min.) en PBS-Tween20

Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant.

Protéine à révéler	Anticorps primaires
Protéine fusionnée à la GST ou GST	Anti-GST couplés à la HRP (lapin , Amersham) au 1/1000 ^{ème} , 1h
Protéine possédant une queue poly-histidine	Anti-HIS-tag (souris, Amersham) au 1/3000 ^{ème} , 2h
Dipeptidase A	Anti-dipeptidase au 1/800 ^{ème} , 2h
Aminopeptidase C	Anti-aminopeptidase au 1/200 ^{ème} , 2h
Glucose-6-Phosphoisomérase	Anti-PGI au 1/400 ^{ème} , 2h
HPM	Anti-HPM au 1/200 ^{ème} , 2h

Anticorps primaires	Anticorps secondaires
Anti-IgG de lapin	Anti-IgG de lapin couplé à la HRP (NIF 824) (Amersham) au 1/30 000 ^{ème} , 1h
Anti-IgG de souris	Anti-IG de souris couplé à la HRP (NIF 825) (Amersham) au 1/20 000 ^{ème} , 1h

4. ACTIVITE IN VITRO SUR LES CELLULES CACO-2

4.1. Culture cellulaire : les cellules épithéliales coliques Caco-2

Les cellules épithéliales coliques de type Caco-2 (ECACC 86010202) sont une lignée de cellules humaines adhérentes qui proviennent d'un adénocarcinome du côlon (Chantret *et al.*, 1988; Jumarie et Malo, 1991). Elles ont été utilisées entre le passage 5 et 25. Les cellules Caco-2 sont cultivées à 37°C, en présence de 5% de CO₂, dans un milieu DMEM contenant du glucose (4,5 g/L), supplémenté en L-glutamine (2 mM), pyruvate de sodium (1 mM), acides aminés non essentiels, gentamicine (40 µg/mL), penicilline-streptomycine (100 U/100 µg/mL) ainsi que du sérum de veau fœtal décomplémenté (10% v/v). Un repiquage au 1/6^e est effectué tous les 7 jours : les cellules sont lavées puis décollées à l'aide d'une solution de trypsine 0,25%-EDTA 2 mM, centrifugées et remises en suspension dans du milieu frais. Le milieu est remplacé trois jours après le repiquage. Les cellules Caco-2 sont à confluence après 7 jours de culture et sont différenciées à partir du dixième jour. Elles acquièrent alors une structure et des fonctions enzymatiques proches des cellules coliques humaines (Pinto *et al.*, 1983).

4.2. Mesure de l'activité pro-inflammatoire *in vitro*

Les cellules Caco-2 sont repiquées en plaque de 96 puits, à raison de 4.10³ cellules/puits et amenées à confluence et différenciation après environ 12 jours de culture. Lors de

l'activation, les cellules sont lavées trois fois avec du milieu sans sérum, puis activées par les fractions collectées lors des diverses chromatographies (100 µL/puits), les fractions WEA ou celle des protéines excrétées, MonoQ, S300 ou le complexe HPM (50 µg/mL) pendant 20h à 37°C. Après activation, les cytokines ou prostaglandines sont dosées dans les surnageants de culture par un test ELISA.

4.3. Test de viabilité au MTT

Ce test est basé sur la capacité des cellules vivantes à internaliser et à transformer, au niveau des mitochondries, le 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium (MTT) bleu en un produit orange, insoluble dans l'eau : le Formazan. Il est utilisé pour vérifier l'absence de cytotoxicité des activateurs utilisés. Après activation, les cellules, débarrassées du milieu de culture contenant l'activateur, sont mises en contact avec un 100 µL de DMEM + MTT (0,2 mM) pendant 4 heures à 37°C. Le surnageant est ensuite éliminé puis les cellules sont lysées avec du DMSO (100 µL) afin de solubiliser le Formazan. Enfin, après agitation de la plaque (5 min.), on évalue la coloration des surnageants par spectrophotométrie (densité optique à 540 nm).

4.4. Dosage de l'IL-8 et des PGE₂ dans les surnageants cellulaires

➤ L'IL-8 a été dosée dans les surnageants de culture par une méthode ELISA sandwich au moyen d'un kit de dosage commercial (R&D systems) et selon les indications du fournisseur :

- Adsorption des anticorps de capture monoclonaux (4 µg/mL dans du PBS 5 mM pH 7,4, 18h, 4°C, 100 µL/puits).
- Saturation avec une solution de PBS 5 mM pH 7,4; 1% de lait (1h, 20°C, 300 µL/puits).
- Addition des surnageants de culture (2h, 20°C, 100 µL/puit).
- Addition des anticorps de détection polyclonaux (20 ng/mL dans du TBS-T, 0,1% de lait, 2h, 20°C, 100 µL/puits).
- Addition d'avidine conjuguée à la peroxydase (extravidine-HRP, Sigma) (1/1000^{ème} dans du TBS-T, 0,1% de lait, 20 min, 20°C, 100 µL/puits).
- Addition du substrat de l'enzyme, la 3,3',5,5'-tétraméthyl-benzidine (TMB), 15 min, 20°C, 100 µL/ puits. La réaction est bloquée par une solution d'H₂SO₄ 1M et la lecture s'effectue à 450 nm. Toutes les étapes sont séparées par des séquences de trois lavages en tampon PBS-T.

➤ Les PGE₂ ont été dosées dans les surnageants de culture par une méthode ELISA au moyen d'un kit de dosage commercial (R&D systems) et selon les indications du fournisseur :

- Utilisation de la plaque de 96 puits pré-coatée avec des anticorps polyclonaux anti-souris (chèvre).
- Addition des surnageants de culture (100 µL/puits).
- Addition de PGE₂ conjuguées à la phosphatase alcaline (50 µL/puits).
- Addition d'un anticorps monoclonal murin anti-PGE₂ (50 µL/puits).
- Incubation pendant 18 à 24 heures à 4°C.
- Lavage avec 200 µL de tampon de lavage (3 fois).
- Addition du substrat de l'enzyme, le p- nitrophényl phosphate, pNPP, 1h, 37°C, 200 µL/puits). La lecture s'effectue à 405 nm.

5. ACTIVITE IN VIVO

5.1. Animaux et traitements

Les expérimentations animales ont été réalisées selon le Guide Conseil de la Recherche Nationale pour l'Utilisation et la Protection des Animaux avec l'autorisation (n° 00573) du ministère de l'agriculture. Des rats wistar mâles, pesant entre 230 et 245 g, vivent en conditions standardisées (22°C, 60% d'humidité relative, 12h/12h jour/nuit, 20 change-ments d'air /heure) avec un accès libre à un régime alimentaire contrôlé (234 kcal/kg/jour; UAR A05), et à l'eau. Tous les animaux reçoivent des injections d'azoxyméthane (AOM) par voie intra-péritonéale, à raison de 15 mg/kg une fois par semaine pendant deux semaines. Une semaine après la dernière injection d'AOM, les rats sont répartis au hasard par groupes de 6.

Les rats reçoivent par gavage intra-gastrique 1 mL :

- de fraction WEA de *S. infantarius* (100 µg),
- ou de fraction S300 (6 µg),
- ou du complexe HPM (6µg),
- ou bien encore de chacune des trois protéines purifiées, aminopeptidase, dipeptidase ou glucose-6-phosphate isomérase (4µg),

diluée dans du tampon PBS 5 mM, deux fois par semaine pendant 5 semaines.

Dans le but de donner la même quantité de protéines à tous les animaux, le PBS est complété par de la gélatine de peau de porc pour obtenir une quantité finale de protéine de

120 µg/rat/gavage. Le groupe contrôle reçoit 120 µg de gélatine de peau de porc dans 1 mL de PBS. Un jour après le dernier gavage, les animaux sont endormis à la kétamine puis le côlon est prélevé.

5.2. Quantification des cryptes anormales et des tumeurs dans le côlon

La quantification du nombre de cryptes anormales hyperprolifératives et des tumeurs a été réalisée sur un segment de 5 cm de longueur correspondant à la partie distale du côlon. Le segment est au préalable lavé avec une solution de Krebs-Ringer (KR), ouvert dans le sens de la longueur, puis épinglé la muqueuse exposée sur une boîte de pétri contenant de la paraffine. La fixation du tissu est réalisée dans une solution de formaldéhyde 4% pendant une nuit à 4°C. Après lavage dans du KR, le tissu est placé dans du bleu de méthylène à 0,2% pendant 5 minutes. Après lavage, les segments de côlon sont observés au microscope à un faible grossissement (X5) pour la quantification du nombre de cryptes anormales et des tumeurs (Bird, 1987; Pereira *et al.*, 1994). Cette quantification est réalisée en double aveugle. Les critères d'identification des cryptes anormales sont: une taille augmentée, une couche de cellules épithéliales plus épaisse, l'augmentation de la zone autour de la crypte.

5.3. Dosage de CINC/GRO et de PGE₂ dans les muqueuses coliques

Les échantillons de muqueuse colique sont homogénéisés dans 1 mL de PBS contenant de l'EDTA (10 mM), du PMSF (2 mM) et de la gentamicine (40 µg/mL) puis les suspensions sont centrifugées (10 000g, 15 min, 4°C). Les surnageants sont utilisés pour déterminer les quantités de CINC/GRO et de PGE₂ qui sont dosées avec le kit de dosage IL-8 humain (R&D systems) et avec le kit de dosage de PGE₂ (R&D systems). Les résultats sont exprimés en picogrammes de CINC/GRO ou de PGE₂ par milligramme de protéines contenues dans le surnageant et préalablement dosées par la méthode de Bradford.

6. ANALYSE PROTEOMIQUE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse est de plus en plus utilisée pour caractériser les protéines. Jusqu'au milieu des années 80, la spectrométrie de masse était dédiée à l'analyse de petites molécules ne dépassant pas quelques centaines de Daltons. Ceci provenait de la difficulté à ioniser les macromolécules. Plus tard, deux nouvelles méthodes d'ionisation sont apparues permettant l'analyse de protéines. Hillenkamp est à l'origine du MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation): la préparation "matrice + protéine" sous forme cristalline est irradiée par un laser UV. L'absorption de la matrice à la longueur

d'onde du laser provoque la désorption puis l'ionisation des protéines (Karas *et al.*, 1989). La seconde technique d'ionisation, développée par Fenn, est l'electrospray qui permet aux protéines en solution de se retrouver, sous l'effet d'un fort champ électrique, sous forme ionisée en phase vapeur (Yamashita et Fenn, 1984a; Yamashita et Fenn, 1984b). C'est grâce à ces deux techniques que la protéomique a pu se développer.

Les techniques de spectrométrie de masse classiquement utilisées pour les études protéomiques sont le MALDI-MS (MALDI-Mass Spectrometry) et la nanoLC-ESI-MS-MS (nanoLiquid Chromatography-Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry). La première permet d'identifier les protéines à partir de la mesure des masses de leurs peptides de façon très précise, sensible et rapide. La seconde, permet en plus de séparer les peptides par chromatographie liquide et de disposer d'informations de séquences sur ces peptides.

La source MALDI peut-être associée à divers analyseurs mais celui le plus couramment utilisé pour identifier les protéines est l'analyseur à temps de vol : TOF (Time Of Flight) avec réflecteur (Cavusoglu, 2002).

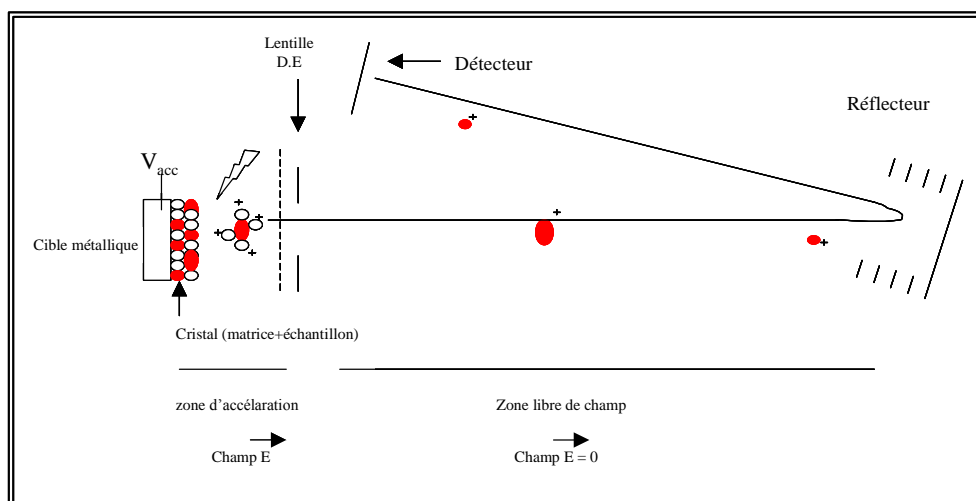


Figure 17 : Représentation schématique du MALDI-TOF avec réflecteur (Cavusoglu, 2002).

Il existe des MALDI-TOF linéaires mais la présence d'un réflecteur permet une meilleure précision notamment par l'allongement de la distance de vol (Vestal *et al.*, 1995). La liste des masses des peptides générés lors d'une digestion des protéines par une endoprotéase (généralement la trypsine) est utilisée pour la recherche dans les banques de données protéiques. Cependant, en dépit des excellents résultats obtenus avec cette technique, l'approche MALDI-MS souffre de plusieurs limites dues au fait qu'elle ne repose que sur l'établissement d'une carte peptidique massique et ne permet pas d'obtenir d'informations de séquences. Ainsi dans certains cas, elle ne suffit pas pour l'identification de la protéine, en

particulier pour les protéines d'organismes absents des banques de données. Pour répondre aux limites du MALDI-MS, l'approche nanoLC-MS-MS a été développée pour la protéomique.

La technique nanoLC-ESI-MS-MS qui a été utilisée dans notre cas est associée à un spectromètre de masse hybride (ESI-Q-TOF) représenté dans la figure 18 (Cavusoglu, 2002).

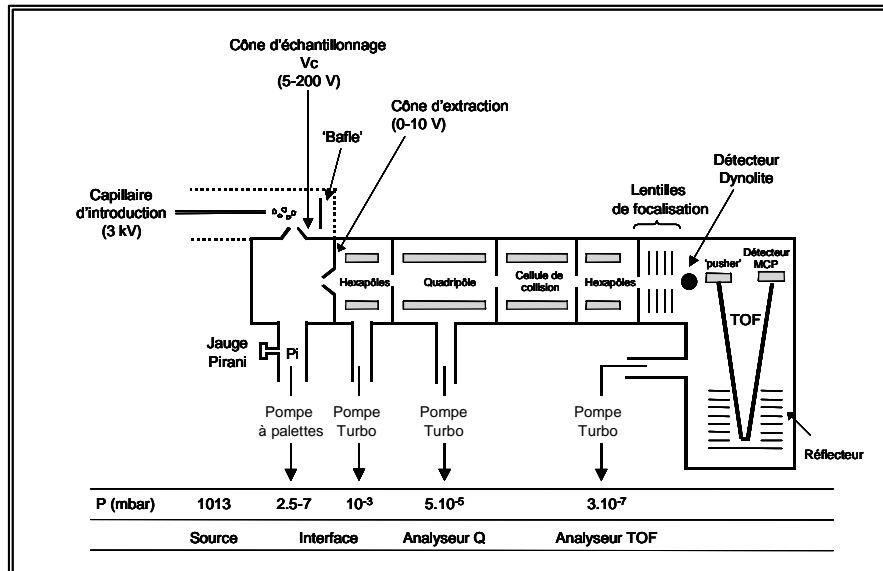


Figure 18 : Représentation schématique de l'interface de l'ESI-Q-TOF (Q-TOF II, Micromass) (Cavusoglu, 2002).

Dans ce cas aussi, les protéines, séparées sur gel, sont digérées par une endoprotéase (généralement la trypsine). Chaque peptide est ensuite séparé par une chromatographie en phase inverse puis ionisé après acidification de la solution. Le quadripôle analyse le courant continu d'ions puis retient les ions les plus intenses. Ces ions parents sélectionnés sont fragmentés en ions fils dans la chambre de collision puis analysés par l'analyseur TOF. C'est cette fragmentation qui permet l'obtention d'informations de séquence.

Les informations obtenues par ces deux techniques sont présentées par la figure 19:

- **Par l'approche MALDI-MS:** La masse des peptides tryptiques qui permet d'identifier les protéines en comparant ces masses avec les masses des peptides tryptiques théoriques présents dans les banques de données (empreinte peptidique massique) (Jensen *et al.*, 1996).

- **Par l'approche MS-MS:** La masse des peptides tryptiques et de leurs fragments qui permet l'identification des protéines en comparant ces masses à des masses théoriques de fragments présents dans les banques de données (Yates, 2000).

Si les protéines à identifier proviennent d'espèces non séquencées, l'identification se fait par homologie (empreinte massique par homologie); il faut pour cela un pourcentage

d'homologie supérieur à 80%. En dessous de ce pourcentage, l'identification par alignement de séquences sera nécessaire.

- **Le séquençage *de novo***: Cette étude nécessite l'étude de chaque spectre de masse afin de déterminer une séquence correspondant aux fragments de peptides tryptiques. En effet, la majorité des fragmentations de peptides tryptiques obtenues se situe dans la liaison peptidique. La différence de masse entre deux fragments consécutifs de même type donne une masse correspondant à l'un des 20 acides aminés. L'alignement des séquences peptidiques par un programme BLAST peut permettre l'identification de la protéine, même si celle-ci est légèrement mutée.

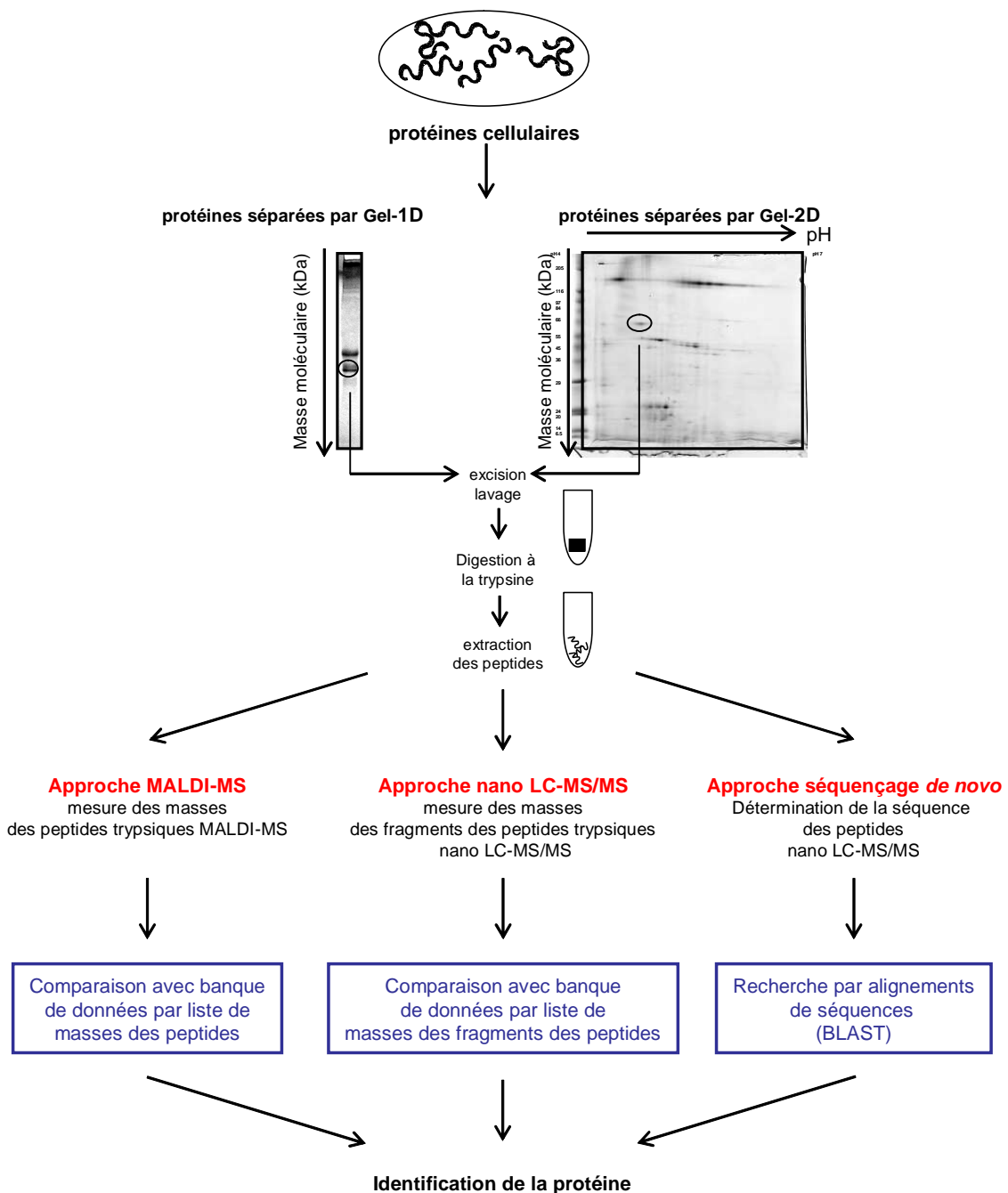


Figure 19 : Principe d'identification des protéines par spectrométrie de masse.

7. STATISTIQUES

Les données sont exprimées \pm SEM. Les différences statistiques entre chaque groupe ont été réalisées à l'aide du test de Student (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

RESULTATS

L'association entre un streptocoque du groupe « *S. equinus/S. bovis* » et une maladie néoplasique colique est aujourd'hui largement reconnue à travers les études épidémiologiques qui abondent dans la littérature. Mais le mécanisme d'action par lequel ces bactéries interviennent dans le cancer colorectal reste encore très peu exploré.

Pour aborder l'étude des mécanismes d'implication de ces streptocoques dans le CCR, nous avons utilisé l'espèce *S. infantarius* subsp. *infantarius* dans un modèle mis au point chez le rat, au laboratoire. Ce modèle consiste à induire chimiquement avec un cancérogène chimique spécifique de l'intestin, l'azoxyméthane (AOM), des lésions précancéreuses au niveau de la muqueuse colique. Ses lésions correspondent à la formation dans la muqueuse de cryptes anormales qui ont acquis des propriétés hyperprolifératives (figure 20). Un focus de cryptes anormales peut ensuite évoluer vers un adénome ou polype hyperplasique (Araki *et al.*, 1995).

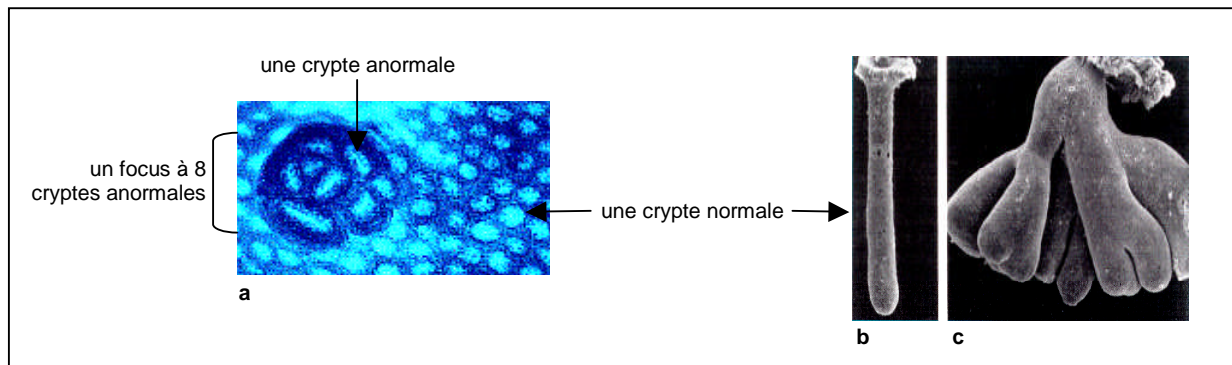


Figure 20 : épithélium colique vu en microscopie. Un focus de cryptes anormales de la muqueuse colique de rat après coloration au bleu de méthylène (a). Crypte colique de l'épithélium normal (b). Cryptes du polype hyperplasique (c)

Ce modèle animal a permis de démontrer que *S. infantarius* joue un rôle incontestable dans la progression du cancer colorectal en aggravant son développement à partir d'un stade très précoce. Cet effet s'accompagne d'une réaction inflammatoire au niveau de l'épithélium colique mise en évidence par une libération de chimiokines CINC/GRO. Il a été également montré qu'un extrait protéique de paroi (WEA ou «Wall Extracted Antigens») est capable d'entraîner un effet équivalent, voire plus important que les bactéries vivantes sur le développement des foyers précancéreux chez l'animal. Néanmoins, dans les conditions expérimentales utilisées, *S. infantarius* seul administré à des rats non prétraités par l'AOM, ne provoque pas la formation de nouvelles lésions précancéreuses dans la muqueuse colique. Il semble donc que la bactérie intervienne dans la promotion du cancer colorectal et non dans son initiation.

L'action proinflammatoire de *S. infantarius* a été confirmée *in vitro* par la stimulation de la libération d'IL-8 par les cellules Caco-2 et HT29 incubées avec les composants protéiques de sa paroi (Ellmerich *et al.*, 2000a; Ellmerich *et al.*, 2000b).

1. LA FRACTION S300

1.1. Purification

Au vu des résultats antérieurs qui ont mis en évidence les effets proinflammatoires et procancérogènes des protéines de la paroi *S. infantarius*, nous avons entrepris la purification des constituants de cette fraction WEA afin d'isoler le ou les PAMPs protéiques impliqués dans la pathogenèse colique associée à l'inflammation.

L'extrait WEA a été fractionné par une première chromatographie de type échangeuse d'anions (MonoQ HR5/5) sur un système HPLC (Figure 21). L'élution a été réalisée par un gradient de NaCl (0,05 à 1 M) et chaque fraction de 2 mL collectée a été testée pour sa capacité à induire une libération d'IL-8 par les cellules Caco-2. Les fractions actives ont été éluées entre 200 et 350 mM de NaCl et ont été rassemblées en une fraction appelée fraction MonoQ. Cette fraction représente en quantité de protéines environ 65% de l'extrait WEA.

Cette fraction MonoQ a ensuite été fractionnée par chromatographie d'exclusion (Sephacryl S300) (Figure 22). De la même manière, chaque fraction a été testée pour sa capacité à induire une libération d'IL-8 par les cellules Caco-2. Les fractions actives ont été éluées dans le volume mort puis ont été rassemblées dans une fraction appelée S300. Cette dernière ne représente en quantité de protéines qu'environ 6% de l'extrait WEA.

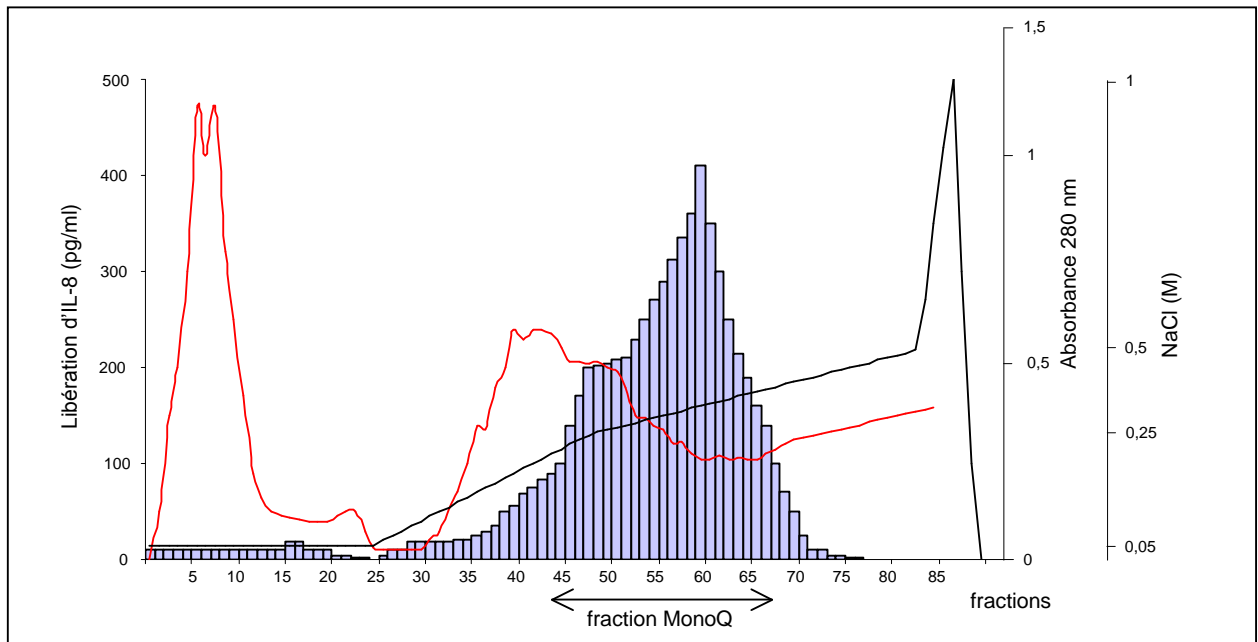


Figure 21 : Séparation du WEA par chromatographie échangeuse d'anions de type MonoQ HR 5/5.

L'élué est mesurée par l'absorbance à 280 nm (—) et l'activité de chaque fraction protéique collectée est mesurée par la libération d'IL-8 (■). Le gradient de NaCl appliqué (—).

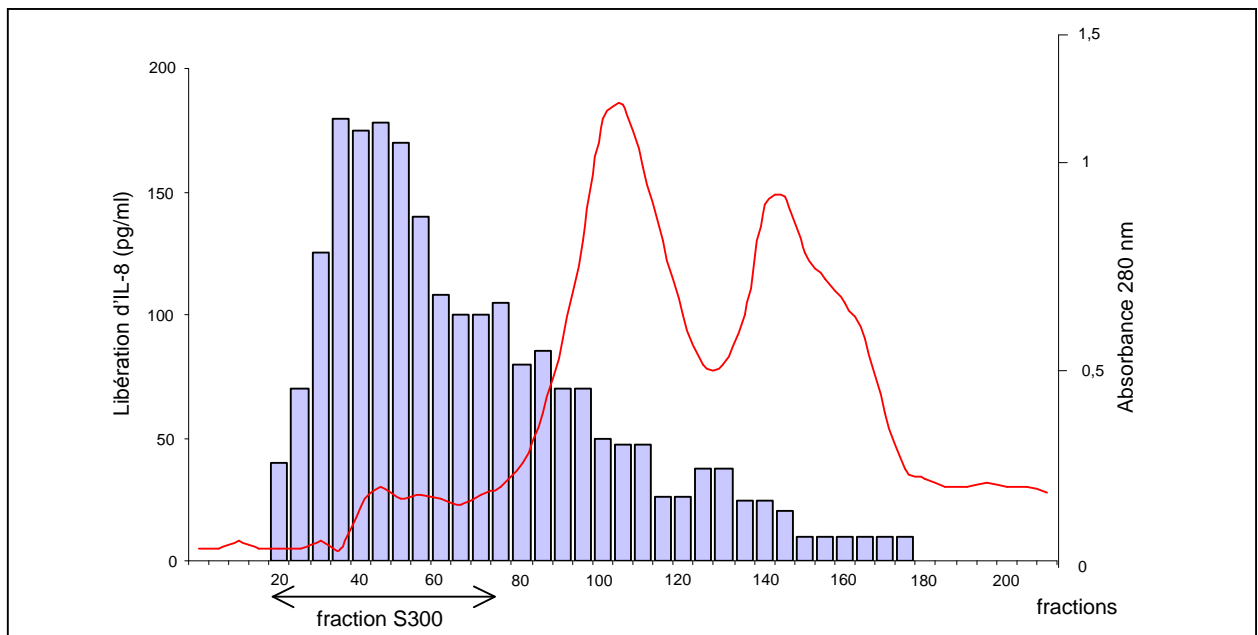


Figure 22: Séparation de la fraction MonoQ par chromatographie d'exclusion de type Sephacryl S300.

L'élué est mesurée par l'absorbance à 280 nm (—) et l'activité de chaque fraction protéique collectée est mesurée par la libération d'IL-8 (■).

Les profils protéiques de chaque fraction ont été analysés sur gel d'acrylamide 10% en conditions dénaturantes. La Figure 23 montre que les chromatographies successives permettent d'isoler une fraction S300 active qui ne comporte plus que 9 bandes protéiques visibles après coloration au bleu de Coomassie.

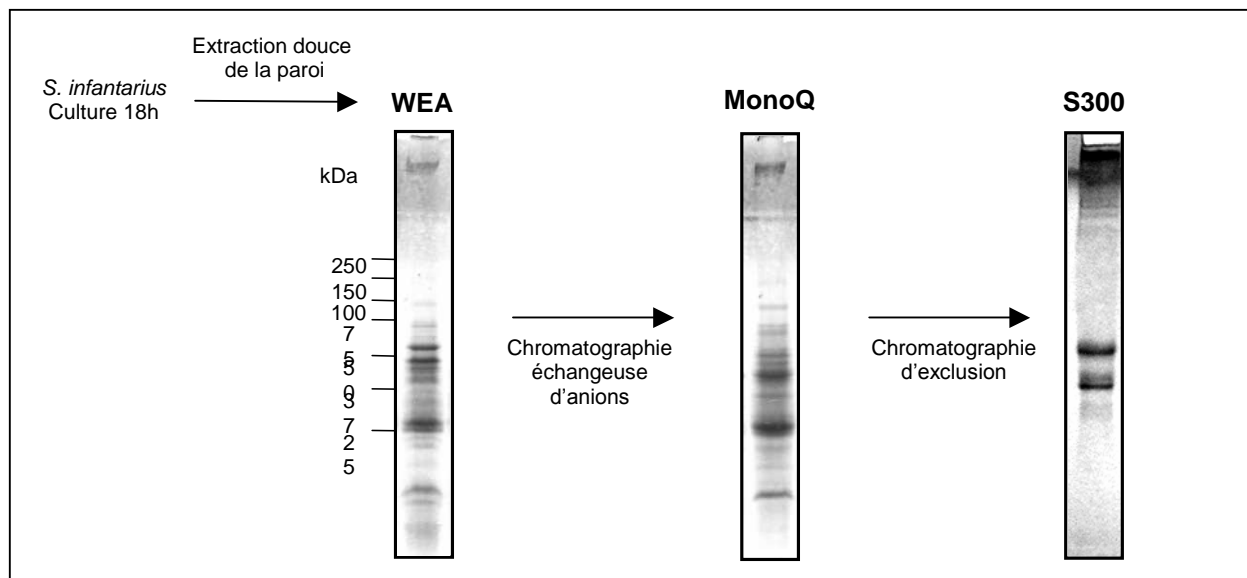


Figure 23 : SDS-PAGE 10% en conditions dénaturantes des fractions WEA, MonoQ et S300

1.2. Propriétés proinflammatoire et procancérogène de la fraction S300

1.2.1. Activité proinflammatoire in vitro

a) *in vitro*

L'activité pro-inflammatoire des fractions WEA et S300 a ensuite été mesurée. L'incubation des cellules Caco-2 avec ces fractions protéiques pendant 20 h à 37°C et à une concentration de 50µg/mL induit une libération d'IL-8 et de PGE₂ (Figure 24 a et b).

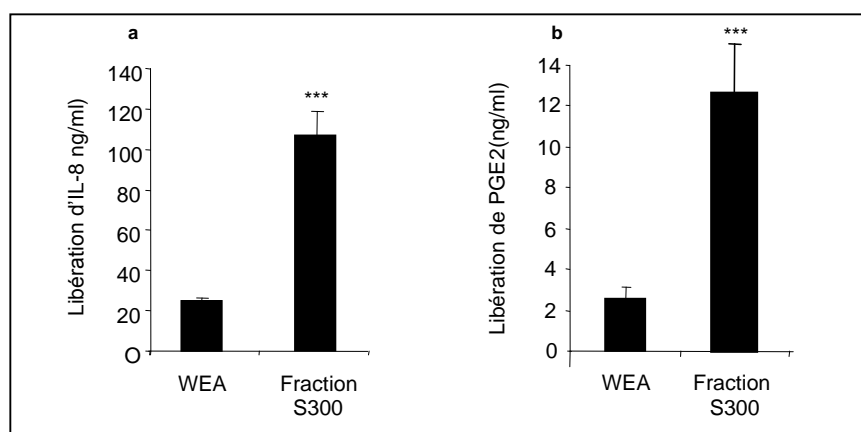


Figure 24 : Libération d'IL-8 (a) et de PGE₂ (b) par les cellules Caco-2 activées par les fractions WEA et S300

Les résultats sont exprimés en activité spécifique, c'est-à-dire en nanogrammes d'IL-8/PGE₂ par milligramme de protéines activatrices. La fraction WEA induit une libération d'IL-8 et de PGE₂ avec une activité de 24,9 ± 1,5 ng/mg et de 2,6 ± 0,8 ng/mg respectivement. Par ailleurs, l'activité de la fraction S300 est de 106,7 ± 12,1 ng IL-8/mg et de 12,4 ± 2,3 ng

PGE₂/mg. Cette dernière fraction semi-purifiée présente donc un enrichissement en constituants proinflammatoires puisqu'elle montre des activités spécifiques d'environ 4 fois celles de la fraction WEA.

b) *in vivo*

Les rats ont été prétraités à l'azoxyméthane afin d'induire un état précancéreux au niveau de la muqueuse colique, puis ils ont reçu par gavage intra-gastrique 11 administrations de WEA (100 µg) ou encore de fraction S300 (6 µg). Les quantités protéiques utilisées ont été choisies dans le souci de garder les proportions obtenues lors de la purification. Après avoir gratté la muqueuse colique, homogénéisé le tissu épithélial puis centrifugé l'échantillon, les cytokines CINC/GRO sont dosées dans le surnageant. CINC/GRO sont des chimiokines-CXC qui présentent une forte homologie avec l'IL-8 humaine et se fixant sur le même récepteur que celui de l'IL-8 (Shibata *et al.*, 2000; Wuyts *et al.*, 1998). Cette activité proinflammatoire a également été testée en mesurant la libération de PGE₂ dans les muqueuses coliques.

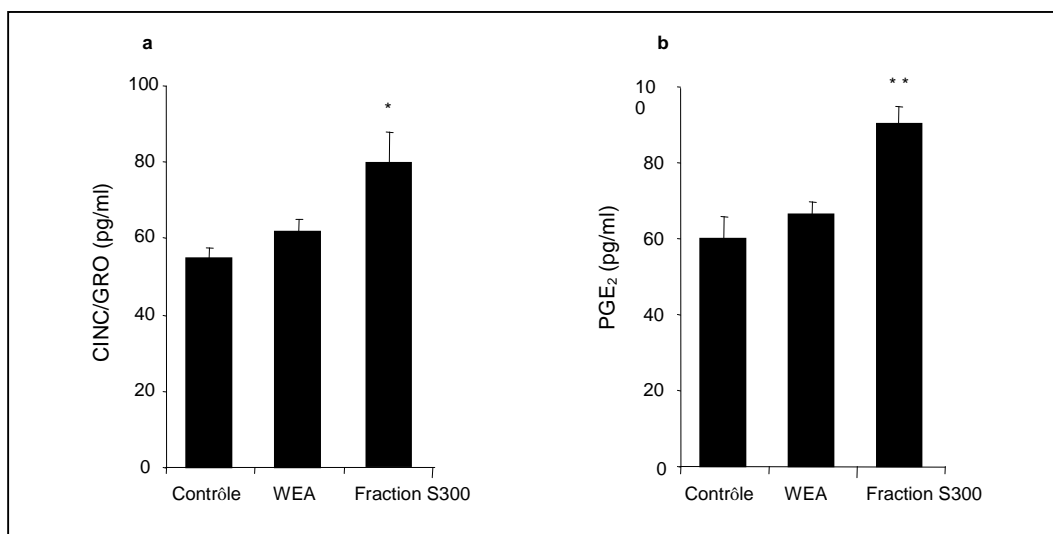


Figure 25 : Dosage de CINC/GRO (a) et de PGE₂ (b) dans les muqueuses de rats traités à l'AOM puis avec les fractions WEA (100 µg) ou S300 (6µg).

Les résultats de ces dosages, représentés dans la figure 25 sont exprimés en picogrammes de CINC/GRO ou PGE₂ par milligramme de protéines dosées dans le surnageant de muqueuse colique.

La fraction S300 induit une libération de CINC/GRO de $79,5 \pm 8,2$ pg/mg et de PGE₂ de $90,1 \pm 4,5$ pg/mg ce qui représente une augmentation respective de 44 et 51% par rapport aux rats contrôles, traités uniquement à l'AOM et qui est également plus importante que la libération provoquée par l'administration du WEA.

Il faut noter que ces effets ont été obtenus *in vivo* après administration de quantités bien plus faibles de fraction S300 (6 μ g) que de fraction WEA (100 μ g).

1.2.2. Activité procancérogène *in vivo*

Le comptage du nombre de cryptes anormales hyperprolifératives a été réalisé sur un segment de 5cm de longueur correspondant à la partie distale du côlon des mêmes rats chez lesquels ont été dosés les médiateurs de l'inflammation GRO/CINC et PGE₂. Les résultats sont présentés dans le diagramme ci-dessous (figure 26).

Il est à noter que pour pouvoir comparer tous les groupes nous avons travaillé avec une quantité constante de protéines. Chaque groupe a reçu 120 μ g de protéines grâce à l'ajout de gélatine de peau de porc en complément des fractions testées et les rats témoins ont donc reçu 120 μ g de gélatine diluée dans du PBS.

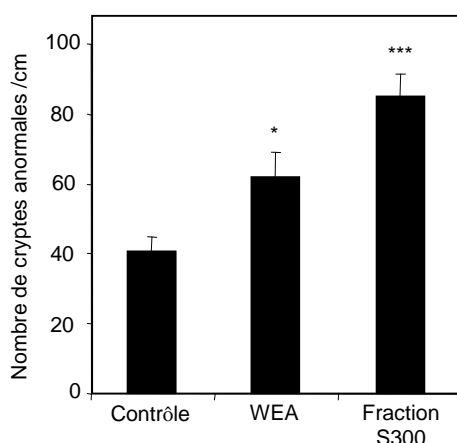


Figure 26 : quantification des cryptes anormales au niveau de la muqueuse du côlon distal de rats pré-traités à l'AOM puis avec les fractions WEA (100 μ g) ou S300 (6 μ g). Contrôle : rats traités à l'AOM seul.

Les résultats montrent que tous les rats qui ont reçu de l'AOM ont développé des cryptes anormales quel que soit le traitement. Cependant, l'administration de 100 μ g de fraction WEA entraîne une augmentation du nombre de cryptes anormales de 1,5 fois par rapport aux rats contrôles, confirmant ainsi les expériences antérieures (Ellmerich *et al.*, 2000b).

L'administration de 6 μ g de fraction S300 entraîne une augmentation importante, de 2,1 fois le nombre de cryptes anormales par rapport aux rats contrôles.

La taille du focus de cryptes anormales est un critère important pour l'évolution tumorale et l'observation de ce critère a permis de mettre en évidence une tendance de la fraction S300 à induire la formation de foci à 5 cryptes anormales et plus par rapport à la fraction WEA, ainsi que des adénomes (polypes) au niveau de la muqueuse colique contrairement à la fractions WEA ou MonoQ.

2. IDENTIFICATION DES PROTEINES DE LA FRACTION S300 PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Les protéines de la fraction S300 ont été caractérisées par spectrométrie de masse. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Emmanuelle Leize-Wagner appartenant au laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique (CNRS) dirigé par Alain Van Dorsselaer. Les gels en 2 dimensions (2-D) ont été réalisés par Danièle Thiersé et les analyses nanoLC-MS/MS par Sophie Richert.

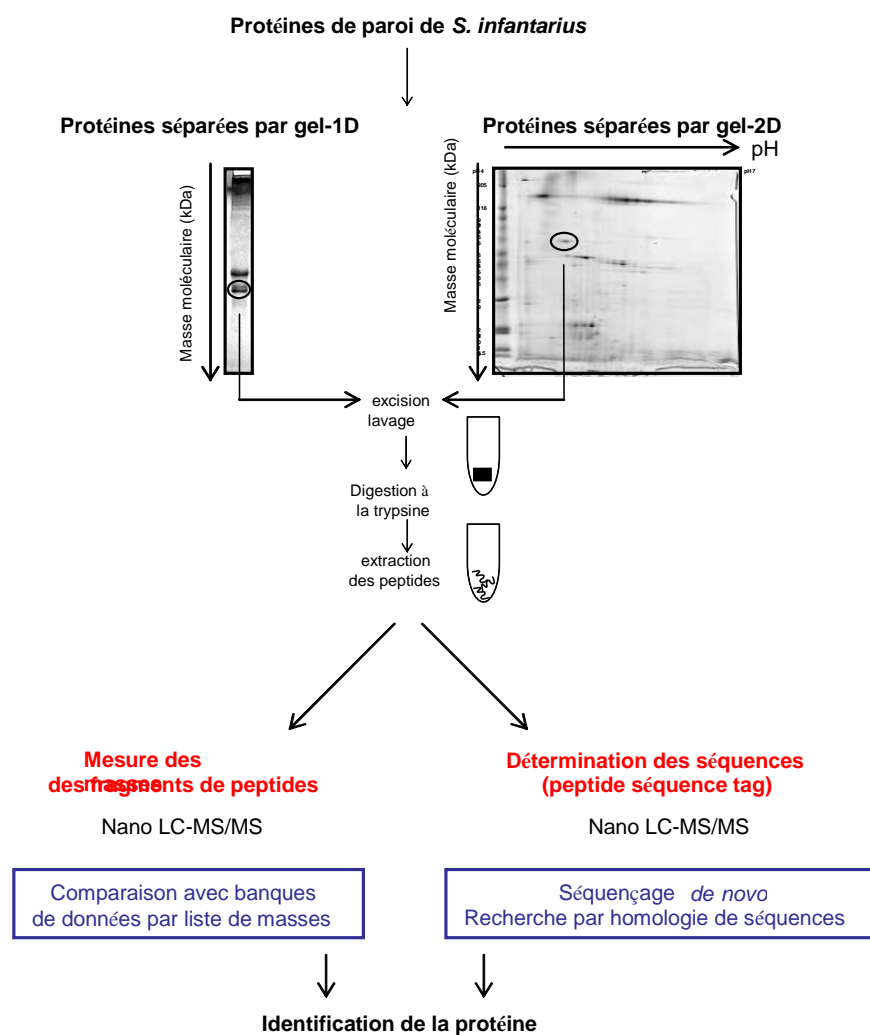


Figure 27 : stratégie d'identification protéique par spectrométrie de masse

La stratégie d'identification utilisée est résumée dans la figure 27. La fraction S300 a été séparée par SDS-PAGE 10% ou par gel bidimensionnel. Chaque spot protéique a ensuite été excisé et soumis à une digestion enzymatique à l'aide de la trypsine. Les peptides extraits ont été analysés par nanoLC-MS/MS sur un Q-TOF. Cette approche permet une caractérisation plus fine que la méthode MALDI-MS courante, en fournissant une liste de masses des

fragments de peptides tryptiques qui sera comparée à des masses théoriques de fragments de peptides tryptiques dans les banques de données. Elle permet également de fournir la séquence de ces fragments de peptides, qui par alignement, peuvent aboutir à l'identification de protéines qui ne seraient pas encore identifiées dans les banques. Cette approche de séquençage *de novo* a été choisie puisque très peu de protéines sont identifiées et séquencées chez *S. infantarius*. Il n'existe actuellement que 124 entrées spécifiques des espèces du complexe *S. bovis* / *S. equinus*/*S. infantarius*/ *S. gallolyticus* dans les bases de données Swiss Prot/TrEMBL (contre 12197 entrées pour *Streptococcus pyogenes*).

Après les deux étapes de purification de la fraction WEA, nous avons obtenu un enrichissement de la fraction S300 en protéines proinflammatoires qui s'avèrent également procancérogènes. Après les deux étapes de purification, les quantités de protéines de la fraction S300 sont si faibles qu'il nous était impossible de poursuivre la purification par d'autres chromatographies. Nous avons donc poursuivi notre étude par l'identification des protéines contenues dans cette fraction S300. Cette caractérisation a nécessité d'une part la séparation de la fraction S300 par SDS-PAGE 10% (figure 28a) puis d'autre part une analyse par nanoLC-MS/MS de chaque bande protéique colorée au bleu de Coomassie.

Par cette approche nous avons pu associer 6 des 9 bandes révélées à 5 protéines homologues retrouvées chez *S. infantarius* et d'autres espèces voisines (Figure 28b).

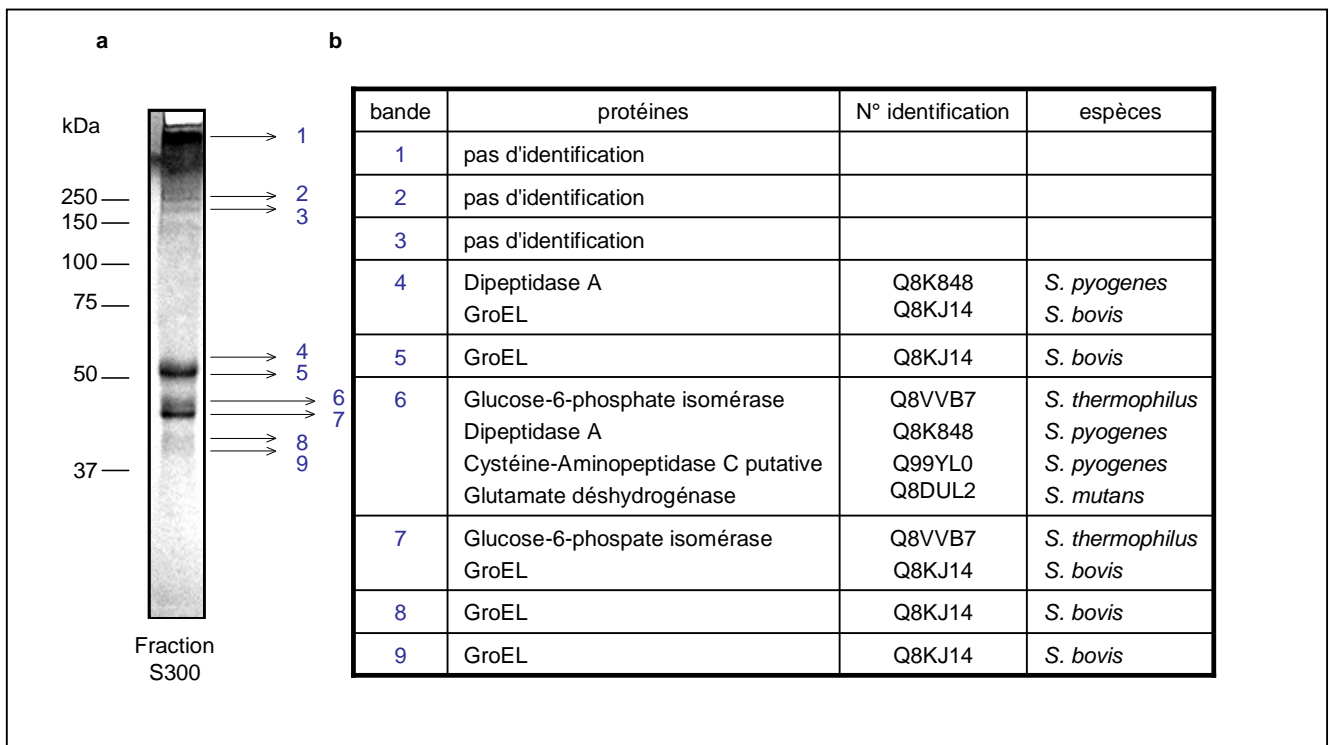


Figure 28 : SDS-PAGE 10% de la fraction S300 (a) et analyse par nano LC-MS/MS de chaque bande colorée au bleu de Coomassie (b)

Nous retrouvons dans la fraction S300 des protéines intervenant dans divers processus cellulaires :

- Biosynthèse des acides aminés (Glutamate déshydrogénase),
- Dégradation des protéines et peptides (Dipeptidase A et Aminopeptidase C),
- Métabolisme énergétique (Glucose-6-phosphate isomérase),
- Protéines de stress (GroEL).

Nous voyons que les protéines des bandes 8 et 9 migrent à des tailles moléculaires plus petites que la masse moléculaire théorique de GroEL. Il pourrait s'agir d'une forme dégradée de cette protéine. Au contraire les bandes 4 à 7 présentent des distances de migration attendues qui correspondent bien aux masses moléculaires des protéines qui y sont identifiées.

Ayant obtenu la caractérisation de seulement 6 bandes sur les 9 apparentes, nous avons choisi de séparer la fraction S300 par un gel en 2-dimensions. Cette technique permet une meilleure séparation et une détection d'un plus grand nombre de protéines. L'éventail de pH choisi a été de 4 à 7 (Figure 29).

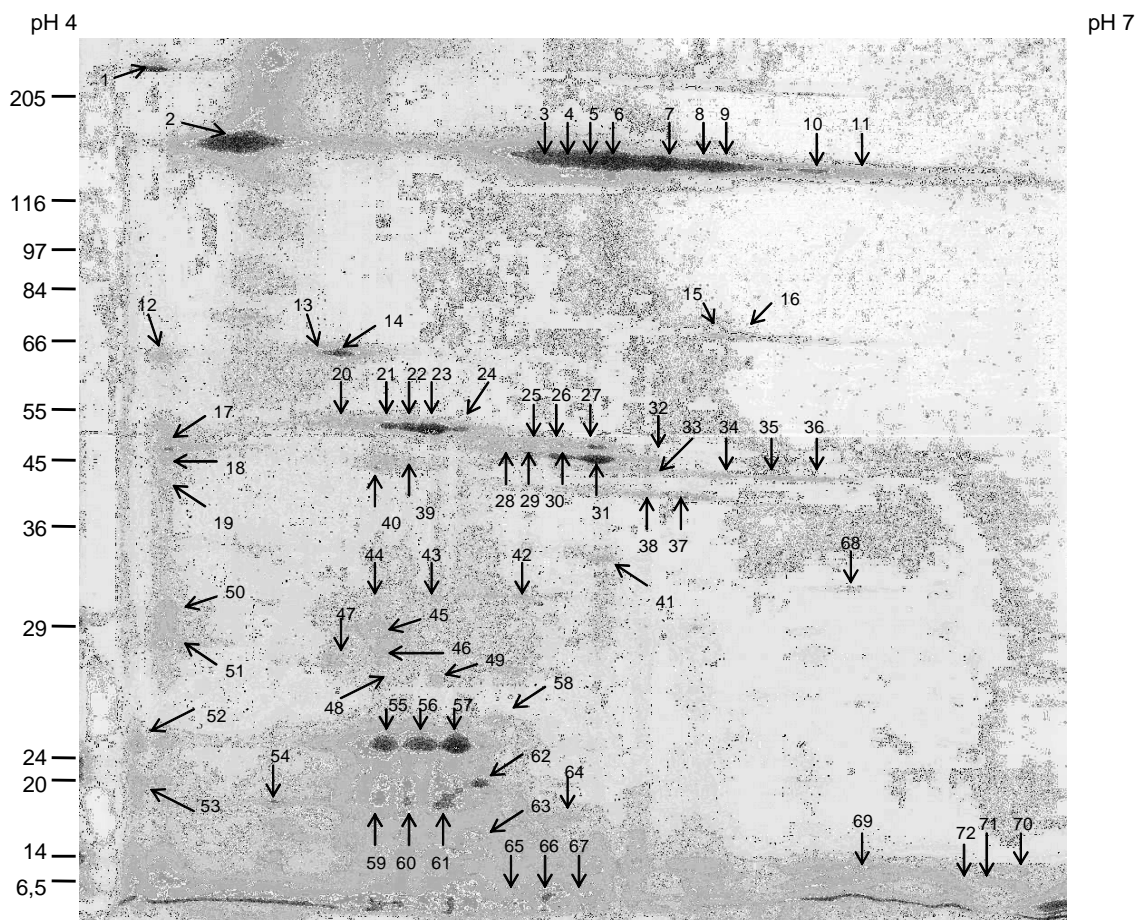


Figure 29 : Séparation bidimensionnelle de la fraction S300 selon un éventail de pH 4-7

De façon inattendue, la quantité de spots détectés est très importante, et 72 spots protéiques ont pu être excisés et analysés par nanoLC-MS/MS. Sur tous les spots analysés, seuls 4 n'ont pas pu être caractérisés; les autres représentent 11 protéines distinctes (Tableau 5).

Fonction (spot)	N° identification	Espèce
BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES		
NADP spécifique glutamate déshydrogénase putative (17, 18, 19,21-38, 43, 47, 50, 51, 68, 72)	Q8DUL2	<i>S. mutans</i>
HEAT SHOCK PROTEINS ET AUTRES PROTEINES DE STRESS		
GroEL (48, 55, 59, 60)	Q8KJ14	<i>S. bovis</i>
Superoxyde dismutase (48)	Q8G8G2	<i>S. infantarius subsp infantarius</i>
Protéine de résistance aux peroxydes (Dpr) (2-11, 42, 56, 57, 61, 72)	Q9KWH3	<i>S. mutans</i>
METABOLISME ENERGETIQUE		
Glucose 6 phosphate isomérase (20-23, 39, 40, 43-46, 49, 58)	Q8VVB7	<i>S. thermophilus</i>
Aldolase de classe II (42, 43, 61, 65, 66, 69, 70-72)	Q9FA98	<i>S. bovis</i>
L-lactate déshydrogénase (61, 63, 64)	Q59828	<i>S. bovis</i>
Enolase (59, 61, 62, 65, 66)	Q8E6G0	<i>S. agalactiae</i>
DEGRADATION DES PROTEINES		
Dipeptidase putative (12,-14, 20, 39)	Q8K848	<i>S. pyogenes</i>
Dipeptidase (1, 13, 14, 20, 54)	Q8E129	<i>S. agalactiae</i>
Glutamyl aminopeptidase (37, 38)	Q8E225	<i>S. agalactiae</i>
Cystéine aminopeptidase C putative (41, 42, 49, 50)	Q99YLO	<i>S. pyogenes</i>

Tableau 5 : Liste des protéines identifiées dans la fraction S300

Le gel 2-D nous a permis d'identifier 7 protéines supplémentaires par rapport au gel à une dimension :

- Superoxyde dismutase,
- Protéine de résistance aux peroxydes (Dpr),
- Aldolase de classe II,
- Enolase,
- L-Lactate déshydrogénase,
- Dipeptidase,

- Glutamyl aminopeptidase.

Cette analyse nous indique que la fraction S300 ne contient que 11 protéines différentes mais que les diverses étapes de purification dégradent fortement ces protéines dont on peut retrouver des fragments à des masses moléculaires beaucoup plus faibles que les masses théoriques. C'est le cas, par exemple, de la L-lactate déshydrogénase et de l'énolase qui ne sont détectées qu'à des spots de masses moléculaires beaucoup plus petites que celles données dans les banques de séquences, suggérant ainsi qu'il s'agit de peptides provenant de la dégradation de ces protéines. D'autres protéines présentent une masse moléculaire beaucoup plus élevée que leur masse théorique : par exemple, la protéine de résistance aux peroxydes (Dpr) est présente dans les spots 56 et 57 mais également dans les spots 2 à 11. Ceci n'est pas étonnant étant donné que cette protéine, dont le poids moléculaire se situe en général entre 15 et 25 kDa (spots 56 et 57), forme des oligomères qui peuvent atteindre des masses moléculaires allant jusqu'à 250 kDa et plus (spots 2 à 11).

Certaines protéines peuvent être détectées dans plusieurs spots qui correspondent chacun à une modification post-traductionnelle différente (glycosylations, phosphorylations, acylations, etc...) pouvant modifier le point isoélectrique des protéines portant une telle modification. C'est le cas, par exemple, de la Dpr dont les différentes isoformes sont détectées dans les spots 56 et 57, de la Glucose-6-phosphate isomérase dans les spots 20 à 23, de l'énolase dans les spots 65 et 66.

Ces résultats ont été publiés dans *Carcinogenesis* (Biarç *et al.*, 2004)

3. CARACTERISATION PARTIELLE DES GENES CODANT TROIS PROTEINES DE LA FRACTION S300 ET EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINANTES

La première caractérisation des protéines de la fraction S300, qui présente des activités proinflammatoire et procancérogène, nous a permis d'identifier 5 protéines différentes : la protéine de stress GroEL, la dipeptidase A, la glucose-6-phosphate isomérase, la cystéine aminopeptidase C et la glutamate déshydrogénase.

Nous avons choisi de poursuivre notre étude par la purification de trois de ces protéines : la cystéine aminopeptidase C (Amino pep), la dipeptidase A (Dipep) et la glucose-6-phosphate isomérase (PGI). D'après les données de la littérature, elles seraient, parmi les 5 protéines identifiées dans la fraction S300, les plus susceptibles d'avoir un rôle dans la virulence bactérienne, l'inflammation ou le cancer. Quant à la protéine de stress GroEL, par son caractère ubiquitaire chez les bactéries, son rôle dans la pathogenèse colique associée à *S. infantarius* nous semblait moins intéressant à explorer. Enfin, très peu de données ont été

	dpep1f →														
<i>S. pyogenes</i>	-----M	DKKIQRFS	CTTILVG	KKASYDGSTMVARTE	DSQNGDFTPKKMIVV	KPEDQPRHYRSVQSS	FEMD---	LPDNPMTY			73				
<i>S. agalactiae</i>	-----MA	CTTILVG	KKASYDGSTMVARTE	DSVNGDFTPKKLVV	TSKDQPRHYKSVLSN	FEVD---	LPDNPLPY				66				
<i>Oenococcus</i>	MRLFLYAEIYKEINM	KNQFSKTS	CTTILVG	KKASYDGSTIVARTE	DSGDGTFEAKKFIVV	SPKEQPKHYVSKISK	VEID---	LPDNPLRY			87				
<i>Lactococcus</i>	-----MK	IENRRKGS	CTTVLVG	RKASIDGSTMIARND	DGHE-ALDPQRFIVI	QPEEQPRHYKAVLSD	LELD---	LPENPLRY			73				
<i>Lactobacillus</i>	-----MKQTF	CTTILVG	KKASIDGSTMIARSE	DGGR-VIIPGFKVV	NPEDQPKHYTSVISK	QKIDDED	LAETPLRY				71				
<i>S. pyogenes</i>	TSVPDALGK	GIWAE	AGVNEANVAMSATET	ITTNSRVLGADPLVA	SG---IGEDM	TLV	LPYIRSAREGV	LRLG	AILEDY	GTYESNGVA	160				
<i>S. agalactiae</i>	TSVPDALGK	GIWGE	AGINSKNVAMSATET	ITTNSRVLGADPLVS	DG---IGEDII	TLV	LPYIQSAREGVERLG	AILEKY	GTYESNGIA		153				
<i>Oenococcus</i>	TSVPNADL	TEGIWGE	AGINSENAAMSATET	ITTNERVLAADPMVT	DG---IGEDFI	TIV	LPYIHSAKEGVKRLG	SLLEQF	GTYEQNGVA		174				
<i>Lactococcus</i>	TSTPNAVLK	EGIWPA	AGINSANVAMSATET	ITTNPRI	LGLDPYVE	N--G-MGEEDLV	TLV	LPYIKSAREGVERLG	QLLKTY	GTYPENGLA	160				
<i>Lactobacillus</i>	TSAPDVSGK	NGIWGA	AGINADVAMTATET	ITTNSRI	IQGVDPILD	PSEGG	LGEEDFV	TLT	LPYLHSAFDGV	KRVG	YLVEKY	GTYEMNGMA	161		
	← dpep4r														
<i>S. pyogenes</i>	FSD	EHD	IWWLETIGG	HHWIARRVPDDAYVT	NPNQFGIDHFEFNPN	EDYLC	SADL	KDFIDT	YHLDL	TYSHEHFN--	PRYAF	GSQRDKDRQY	248		
<i>S. agalactiae</i>	FSD	TEEI	WLETIGG	HHWIARRVPDDVYVT	NPNQLGIDHFEFNNC	DDYMC	SSDL	KEFIEQ	YHLDL	TYSNEHFN--	PRYAF	GSQRDKDRHY	241		
<i>Oenococcus</i>	FSD	ADEI	WLETIGG	HHWVAQRVPDDSYVT	VPNQLGIEINFDDS	DNFVY	SADL	KDFIRD	NHLNL	SFDGKVN---	SRLTF	GSHADIDHHY	261		
<i>Lactococcus</i>	FAD	KEEV	WLETIGG	HHWAAVRIPDDSYV	APNRMNIDEFKFDN-	DDYMC	SSDL	KLIDA	NHLNP	DFEGYESHYN	LRHI	FGSSSIKDSVY	248		
<i>Lactobacillus</i>	FSD	KDN	IWWLETIGG	HHWIARRIPDDAYVI	APNRLNIDTFDFDDS	ENFAA	ASDL	KLIDE	YHLNP	DREGYN----	MRHI	FGSSTIKDAHY	247		
<i>S. pyogenes</i>	NTPRAWIMQKFLNPE	IVQDPRS	FALAWCQK	PYRKITV	EDVKYVLS	SHYQDTG	YDPYGSEG	TPVSK	KVFRPI	GINR	TSQTAL	HIRPNKPQ	338		
<i>S. agalactiae</i>	NTPRSWAMQRFNLPE	IEQDPRS	LFIPWCQK	PYRKITV	EDIKYVLS	DHYQDSV	YDPYGPEG	DAVSR	RAFRSV	GINR	TSQTS	ILQLRPNKSL	331		
<i>Oenococcus</i>	NTPRAWFMQKFLTPS	VEQDPM	SDTIPFSQK	PRKVTI	EDIKYVLS	GHYQDTV	YDPYGTSG	TEAEK	HMFRPI	GINR	TSELSV	LQIRPNKPK	351		
<i>Lactococcus</i>	NNPRTWYGNFLG-N	PSEDP	QNELPFICE	ASRKITV	EDVKFVLS	SHFENTR	YDPYGSTN	SPEER	KLFRPI	GINR	NHSVH	ILQVRNNVPD	338		
<i>Lactobacillus</i>	NNPRAWYIHNYFDPD	FGGTP	ADQDQPFICR	ANRLIS	EDIKWAES	SHYQDTP	YDAYGDOG	TPEQK	KTFRPI	GINR	NFETH	ILQIRNDVPA	337		
<i>S. pyogenes</i>	EIAAIQ	WMAYGSM	PMF	NTMVP	FFTVQKTI	IPD	YFANTY	ENVFTDNFY	WTNRL	IAALADPHYN	HHETD	LDNYLEETMA	KGHAML	HAVEVQLLA	428
<i>S. agalactiae</i>	ETTGVQ	WLSYGSM	PMF	ATMV	PLFTQVET	VPN	YFSNT	TKDASTDNFY	WTNRL	IAALADPHFY	QHEAD	IESYIERTMA	QGHAH	INGVDREVAE	421
<i>Oenococcus</i>	GNQAVQ	WIAFGSM	PMF	NTLV	PFYTNVED	TPS	YLRDT	TNRSSENYY	WINRI	IAALADPHYR	DVVAY	FERYQKTI	ALGH	KNLLSADKLAAG	441
<i>Lactococcus</i>	ELAGVQ	WLAFGANTF	NHVVP	FFYTAIND	TPA	SYRDA	KEYDPTNMY	WLSAT	TAVLGD	SNYD	LFV	DLRNTFELNTMA	KFHE	IQNETDKNFET	428
<i>Lactobacillus</i>	EIAGVQ	WLAFGPNTF	NSMLP	FFYTNVTTTPE	AWQ	TTP-KF	NLNKIF	WLNKL	TAQLG	DTNYR	VYGE	LEDAFEQKSLA	QCHK	IQHETDKVKN	426
<i>S. pyogenes</i>	GE---	TVDLEENQ	KMSDYVQGETQ	LLN	KILFDAS	NLMTNRF	LSD-						472		
<i>S. agalactiae</i>	NK---	EIDFQKNQ	EMSDYIQKESQ	LLN	RILFDAS	NLMTNRF	MGD-						465		
<i>Oenococcus</i>	KSGQ	ELTATLEAANK	KITDQIKKETED	LLD	QVLF	TVSNLMN	NKFA	RSDN					490		
<i>Lactococcus</i>	AEDK--	IAYLTQANE	KLAEAAFKAQTE	LLG	RMVV	LGSANM	KLRF	FND-					474		
<i>Lactobacillus</i>	LSGKELQDKLIAANQ	KMSD	TVYNN	TVE	LLG	QMVDE	GHGLM	TLKYD	LLD-				474		

Figure 31 : alignement des séquences protéiques de Dipeptidase A de diverses espèces bactériennes.
Streptococcus pyogenes (GenBank 18202690), *S. agalactiae* (GenBank 22533554), *Oenococcus oeni* (GenBank 23038135), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (GenBank 18202788), *Lactobacillus helveticus* (GenBank : 1620973).
 Les zones surlignées correspondent aux motifs peptidiques conservés chez toutes ces espèces.

		← pgi7f →							← pgi1f →						
agalact	-----MTHIIFD	YSKVLE	QQFVGEHELD	YLPQOV	SAADAFLRQ	GTGPGS	DFLGMWDL	ENYDK	EEFSRIQKAA	EKIKSD	SEVLV	VIGI	82		
pyogen	-----MSHIIIFD	YSKVLE	ESFAGQHEID	FLQQOV	TEADKLLRE	GTGPGS	DFLGMWDL	ENYDK	EEFARILTA	EKIKSD	SEVLV	VIGI	82		
equi	-----MSHIIIFD	YSKVLE	EQFAGQHEID	FLQQOV	TEADQALRQ	GTGPGS	DFLGMWDL	ENYDK	EEFARILKAA	EKIKAD	SDVLV	VIGI	82		
thermo	MNFYKERLMAH	IKKFD	YSKVLE	DKFVAPHEVD	NLQAQV	TVADEMIRK	GTGPGAD	DFLGMWDL	ENYDR	EEFDRILKAA	EKIKES	SDVLV	VIGI	90	
pneumo	-----MSHIKFD	YSKVLE	DKFVAPHEVE	YMQSQV	TAADLIRK	GTGAGS	DFLGMWDL	EKYDR	EEFDRILKAA	EQIKSD	SDVLV	VIGI	82		
		← pgi1f →													
agalact	GGSYL	GAKAAIDFLN	NHFANLQTA	ERKAP	QILYAGNSIS	STYLA	DLVEYVQDKE	F	SVNV	ISKSGTTTEPAIAFR	VFKELLVKKYQ	QEEA	172		
pyogen	GGSYL	GAKAAIDFLN	HHFANLQTA	ERKAP	QILYAGNSIS	STYLA	DLVEYVQDKE	F	SVNV	ISKSGTTTEPAIAFR	VFKELLVKKYQ	QEEA	172		
equi	GGSYL	GAKAAIDFLN	SHFANLQTA	ERKAP	QILYAGNSIS	SYLA	DLVDYVQDKD	F	SVNV	ISKSGTTTEPAIAFR	VFKELLVKKYQ	QEEA	172		
thermo	GGSYL	GAKAAIDFLS	NHFANLQTK	ERKAP	QIVYAGNSIS	STYLA	DLLEYVEGKD	F	SVNV	ISKSGTTTEPAIAFR	LFKELLVKKYQ	QEEA	180		
pneumo	GGSYL	GAKAAIDFLN	HHFANLQTK	ERKAP	QILYAGNSIS	STYLA	DLVEYVADKD	F	SVNV	ISKSGTTTEPAIAFR	VFKELLVKKYQ	QEEA	172		
agalact	NKRIY	ATTDKVKGAV	KVEADANNW	ETFFVVP	DNVGGRF	SVLTA	VGL	LPIAASGADIT	ALME	GANAARKDL	SSDKIS	ENIAYQYAA	VRNVLY	262	
pyogen	NKRIY	ATTDKVKGAV	KVEADANNW	ETFFVVP	DNVGGRF	SVLTA	VGL	LPIAASGADIT	ALME	GANAARKDL	SSDKIS	ENIAYQYAA	VRNVLY	262	
equi	NKRIY	ATTDKVKGAV	KVEADANNW	ETFFVVP	DNVGGRF	SVLTA	VGL	LPIAASGADIT	ALME	GANAARKDL	SSDKIS	ENIAYQYAA	VRNVLY	262	
thermo	NKRIY	ATTDROK	GAV	KVEADANGW	ETFFVVP	DDIGGRF	SVLTA	VGL	LPIAVSGADIK	ALME	GANAARKEY	SSKIS	ENEAYQYAA	IRNILY	270
pneumo	NKRIY	ATTDROK	GAV	KVEADANGW	ETFFVVP	DDIGGRF	SVLTA	VGL	LPIAASGADIK	ALME	GANAARKDY	SSDKIS	ENEAYQYAA	VRNVLY	262
agalact	RKGYI	TEILANYEPS	LQYFGE	WWKQLAGES	EGKDQKGI	YPTSANF	STDLSL	SGQFIQEGY	RNLFET	VVVR	VEKPRK	NVTIPEL	TELDL	DGLG	352
pyogen	RKGYI	TEILANYEPS	LQYFGE	WWKQLAGES	EGKDQKGI	YPTSANF	STDLSL	SGQFIQEGY	RNLFET	VVIR	VDNPRK	NVIPELA	EADL	DGLG	352
equi	RKGYV	TEILANYEPS	LQYFSE	WWKQLAGES	EGKDQKGI	YPTSANF	STDLSL	SGQFIQEGY	RNLFET	VVIR	VDKPRQ	NVIPEMA	EADL	DGLG	352
thermo	RKGYT	TEILANYEPS	LQYFAE	WWKQLAGES	EGKDQKGI	YPTSANF	STDLSL	SGQFIQEGT	RNLFET	VVVR	VDKPRK	NVVIPELA	EADL	DGLG	360
pneumo	RKGYA	TEILVNYEPS	LQYFSE	WWKQLAGES	EGKDQKGI	YPTSANF	STDLSL	SGQFIQEGT	RIMFET	VVVR	VDKPRK	NVLIPTLE	EADL	DGLG	352
agalact	YLQGK	DVDFVNKKAT	DGVLLAHTD	G	VPNM	FVTLTPQDA	F	TLGYT	IYFFELAI	ALSGYLN	SVNPF	DQPGVEAYKR	NMFALL	GKPGFEELS	442
pyogen	YLQGK	DVDFVNKKAT	DGVLLAHTD	G	VPNM	FVTLTPQDE	F	TLGYT	IYFFELAI	AVSGYMN	AVNPF	DQPGVEAYKR	NMFALL	GKPGFEALS	442
equi	YLQGK	DVDFVNKKAT	DGVLLAHTD	G	VPNM	FITLPEQDE	F	TLGYT	IYFFELAI	ALSGYLN	GVNPF	DQPGVEAYKR	NMFALL	GKPGFEELG	442
thermo	YLQGK	DVDFVNKKAT	DGVLLAHTD	G	VPNM	FITLPEQDA	F	TLGYT	IYFFELAI	ALSGYLN	AVNPF	NQPGVEAYKR	NMFALL	GKPGFEELG	450
pneumo	YLQGK	DVDFVNKKAT	DGVLLAHTD	G	VPNM	YVTLPEQDA	F	TLGYT	IYFFELAI	ALSGYLN	AINPF	DQPGVEAYKR	NMFALL	GKPGFEELS	442
agalact	AELNARL	449													
pyogen	AELNARL	449													
equi	AALNARL	449													
thermo	AELNARL	457													
pneumo	KELNARL	449													

Figure 32 : alignement des séquences protéiques de Glucose-6-phosphate-isomérase de diverses espèces bactériennes.
Streptococcus agalactiae (GenBank 22533420), *S. pyogenes* (GenBank 23821583), *S. equi subsp zoepidermicus* (GenBank 24940626), *S. thermophilus* (GenBank 55820292), *S. pneumoniae* (GenBank 15903923).
 Les zones surlignées correspondent aux motifs peptidiques conservés chez toutes ces espèces.

Cette PCR a permis l'amplification d'un fragment ampep1f-5r de 927 pb du gène de l'aminopeptidase, d'un fragment dpep1f-4r de 180 pb du gène de la dipeptidase et de deux fragments du gène de la PGI : pgi1f-6r de 1092 pb et pgi7f-6r de 1311 pb. Chacun de ces fragments est inséré dans un premier plasmide pGEM-T fourni dans un kit de clonage (Promega). Les clones recombinants positifs sont sélectionnés en présence d'ampicilline et grâce au test d' α -complémentation de la β -galactosidase en présence d'IPTG et de X-GAL. La présence de l'insert est vérifié par PCR sur les colonies avec les amorces universelle et reverse et les plasmides des clones positifs sont séquencés. Les séquences des fragments ampep1f-5r, dpep1f-4r et pgi7f-6r sont données dans les figures 33, 34 et 35, respectivement. Le gène partiel de l'Aminoep de *S. infantarius* contient une phase de lecture ouverte de 307 acides aminés (AA) qui présentent 78 % d'identité avec l'aminopeptidase C de *S. mutans*. Le fragment du gène Dipep de *S. infantarius* présente une phase de lecture de 180 AA qui sont identiques à 84 % à une partie de la Dipeptidase A de *S. pyogenes*. Le fragment pgi7f-6r code une protéine de 436 AA qui présente 87 % d'identité avec la PGI de *S. agalactiae*.

AAA GCT TCA GGA CGT TGC TGG ATG TTT GCA GCT CTT AAT ACT TTC CGT CAT AAA	54
K A S G R C W M F A A L N T F R H K	18
ATG ATC TCA GAC CTT AAC TTG GAA AAC TTC GAA CTT TCT CAA GCG CAC ACA TTC	108
M I S D L N L E N F E L S Q A H T F	36
TTC TGG GAC AAA TAC GAA AAA TCA AAC TGG TTC TTA GAA CAA GTT ATT GCA ACT	162
F W D K Y E K S N W F L E Q V I A T	54
GCT GAC CAA GAA CTT GGT AGC CGT AAA GTA AAA TTC TTA CTT GAT GTG CCA CAA	216
A D Q E L G S R K V K F L L D V P Q	72
CAA GAT GGT GGT CAA TGG GAT ATG GTT GTT GCT CTT TTT GAA AAA TAC GGT GTT	270
Q D G G Q W D M V V A L F E K Y G V	90
GTG CCC AAA GCT GCT TAC CCA GAA TCA ATT TCA TCA AGC AAC AGT CGT GAA TTG	324
V P K A A Y P E S I S S S N S R E L	108
AAC CAA TAC CTT AAC AAA TTG TTG CGT CAA GAT GCA CAA ATT TTG CGT GAA GCA	378
N Q Y L N K L L R Q D A Q I L R E A	126
ATT GCA GCA GGT GCT GAT GAC AAA GCT GTT CAA ACT AAA AAA GAA GCT TTT CTT	432
I A A G A D D K A V Q T K K E A F L	144
CAA GAA GTC TTC AAT TTC TTA GCT ATT AAT CTT GGC TTG CCA CCA CGT ACA TTT	486
Q E V F N F L A I N L G L P P R T F	162
GAT TTT GCT TAC CGT GAT AAA GAC AAT AAC TAT CAT TCA GAT AAA AAT ATC ACA	540
D F A Y R D K D N N Y H S D K N I T	180
CCA CAA GAA TTC TTC AAA AAA TAT GTT GGT TTA GAT CTT TCT GAA TAC GTA TCA	594
P Q E F F K K Y V G L D L S E Y V S	198
GTT ATC AAT GCC CCA ACA GCT GAT AAA CCT TAT GGT AAA TCA TAC ACT GTT GAA	648
V I N A P T A D K P Y G K S Y T V E	216
ATG CTT GGT AAC GTG GTT GGT AGC CGT GAT GTT CGT TAC ATC AAC CTT GAT ATG	702
M L G N V V G S R D V R Y I N L D M	234
GAA CGT TTC AAA GAA TTG GCT ATT GCT CAA ATG CAA GCT GGT GAA ACT GTT TGG	756
E R F K E L A I A Q M Q A G E T V W	252
TTT GGT TCT GAT GTT GGC CAA ATT TCA GAC CGC CAA AAA GGT ATC ATG GCA ACA	810
F G S D V G Q I S D R Q K G I M A T	270
AAT GTT TAC GAT TTT GAA ACA GCT ATG GAT ATA AAC TTC ACA CAA GAT AAA GCA	864
N V Y D F E T A M D I N F T Q D K A	288
GGT CGT CTT GAT TAC AGC GAA AGC TTG ATG ACA CAC GCT ATG GTG TTA ACA GGT	918
G R L D Y S E S L M T H A M V L T G	306
GTT	921
V	307

Figure 33 : séquence partielle du gène de l'Aminopeptidase C de *S. infantarius* et traduction de sa plus grande phase de lecture.

TGT	ACA	TCA	ATC	TTG	GTC	GGT	AAA	AAA	GCG	TCT	TAT	GAT	GGC	TCA	ACA	ATG	ATT	54
C	T	S	I	L	V	G	K	K	A	S	Y	D	G	S	T	M	I	18
GCC	CGT	ACA	GAA	GAT	TCA	CAA	AGT	GGT	GAT	TTT	ACA	CCG	AAA	CAA	TTT	ATT	GTG	108
A	R	T	E	D	S	Q	S	G	D	F	T	P	K	Q	F	I	V	36
GTT	AAT	CCA	GAA	GAC	CAA	CCA	CGT	CAC	TAT	AAA	TCA	GTT	TTA	TCT	TCA	TTT	GAA	162
V	N	P	E	D	Q	P	R	H	Y	K	S	V	L	S	S	F	E	54
ATC	GAT	TTG	CCA	GAC	AAT	CCA	ATG	CGC	TAC	ACT	TCA	GTG	CCT	GAT	GCT	TTG	CGT	216
I	D	L	P	D	N	P	M	R	Y	T	S	V	P	D	A	L	R	72
AAA	GAT	GGT	ATT	TGG	GGT	GAA	GCA	GGT	ATC	AAC	GAA	GCT	AAT	GTT	GCA	ATG	AGC	270
K	D	G	I	W	G	E	A	G	I	N	E	A	N	V	A	M	S	90
GAG	ACA	GAA	ACA	ATC	ACA	ACA	AAT	GCG	CGT	GTT	TTG	GGT	GCT	GAT	CCG	CTC	GTT	324
E	T	E	T	I	T	T	N	A	R	V	L	G	A	D	P	L	V	108
GAA	TCA	GGN	GTC	GGT	GAA	GAA	GAT	ATG	TTA	ACA	TTG	GTG	CTT	CCA	TAT	GTC	CGT	378
E	S	G	V	G	E	E	D	M	L	T	L	V	L	P	Y	V	R	126
ACA	GCG	CGT	GAA	GGT	GCA	AAA	CGT	CTT	GGT	GCG	ATT	CTT	GAA	GAA	TAC	GGT	ACT	432
T	A	R	E	G	A	K	R	L	G	A	I	L	E	E	Y	G	T	144
TAT	GAA	TCA	AAT	GGT	GTT	GCT	ATT	TCA	GAC	GTT	GAT	GAA	ATT	TGG	TGG	TTG	GAA	486
Y	E	S	N	G	V	A	I	S	D	V	D	E	I	W	W	L	E	162
ACA	GTC	GGT	GGT	CAC	CAC	TGG	ATT	GCT	CGC	CGT	GTT	CCA	GAT	GAT	GCT	TAT	GTT	540
T	V	G	G	H	H	W	I	A	R	R	V	P	D	D	A	Y	V	180
A																		541

Figure 34 : séquence partielle du gène de la Dipeptidase A de *S. infantarius* et traduction de sa plus grande phase de lecture. (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl)

Aux extrémités de chacun de ces fragments de gène ont ensuite été ajoutés, par PCR, des sites uniques de clonage présents dans des vecteurs d'expression bactériens. Nous avons greffé des sites différents à chaque extrémité afin d'insérer de façon orientée les fragments dans les vecteurs pour permettre la traduction de la bonne phase de lecture. Le couple d'amorces dpep11f et dpep41r ont été utilisés pour ajouter les sites EcoRI et BamHI aux extrémités du fragment dpep1f-4r pour être inséré dans la cassette de clonage du vecteur pGEX-4T-1. Nous avons ajouté par PCR les sites NdeI et BamHI aux extrémités du fragment amep1f-5r avec les amorces amep11f et amep51r et aux extrémités des fragments pgi1f-6r à l'aide du couple d'amorces pgi11f/pgi61r. Malgré tous les essais d'optimisation de la PCR, il nous a été impossible d'ajouter de site à l'extrémité 5' du fragment pgi7f-6r. Les fragments amep11f-51r et pgi11f-61r sont, quant à eux, insérés dans le vecteur pET-15b.

Les vecteurs recombinants ainsi construits sont purifiés sur gel d'agarose et utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* JM109 qui vont permettre l'amplification de ces plasmides. La sélection des clones positifs contenant les vecteurs recombinants sont sélectionnés par « Southern Blot » en utilisant des sondes conjuguées à la digoxigénine synthétisées par PCR avec les couples amep11f/amep51r, dpep11f /dpep41r et pgi11f/pgi61r.

T	ATG	TCT	CAT	ATT	ACA	TTC	GAC	TAT	TCA	AAA	CTT	TTG	GGT	CAA	TTC	GTC	GAA	52
M	S	H	I	T	F	D	Y	S	K	L	L	G	Q	F	V	E	17	
CAA	GAA	GAA	ATC	GAC	TTC	ATG	CAA	ACA	CAA	GTC	AAC	GTT	GCT	GAC	GAA	TAC	TTG	106
Q	E	E	I	D	F	M	Q	T	Q	V	N	V	A	D	E	Y	L	35
CGC	AAA	GGT	ACA	GGT	CCA	GGT	TCT	GAC	TTT	CTT	GGT	TGG	TTA	GAC	CTT	CCT	GAA	160
R	K	G	T	G	P	G	S	D	F	L	G	W	L	D	L	P	E	53
AAC	TAT	GAC	AAA	GAA	GAA	TTT	GCG	CGT	ATC	CAA	AAA	GCT	GCT	GCT	AAA	ATC	CAA	214
N	Y	D	K	E	E	F	A	R	I	Q	K	A	A	A	K	I	Q	71
TCA	GAC	AGC	GAA	GTT	CTT	GTT	GTT	ATC	GGT	ATC	GGT	GGT	TCT	TAC	CTT	GGA	GCT	268
S	D	S	E	V	L	V	V	I	G	I	G	G	S	Y	L	G	A	89
CGT	GCG	GCT	ATC	GAC	TTC	TTG	AGC	AAC	CAC	TTC	TAT	AAC	CTT	CAA	GCA	TCT	GCA	322
R	A	A	I	D	F	L	S	N	H	F	Y	N	L	Q	A	S	A	107
GAC	CGT	AAA	GGT	CCA	CAA	ATC	CTT	TAC	GCT	GGT	AAC	TCA	ATT	TCT	TCA	ACT	TAC	376
D	R	K	G	P	Q	I	L	Y	A	G	N	S	I	S	S	T	Y	125
CTT	GCA	GAC	CTT	GTT	GAA	TAC	GTT	AAA	GAT	AAA	GAT	TTC	TCA	GTA	AAC	GTC	ATC	430
L	A	D	L	V	E	Y	V	K	D	K	D	F	S	V	N	V	I	143
TCT	AAA	TCT	GGT	ACA	ACA	ACT	GAA	CCA	GCT	ATC	GCT	TTC	CGT	GTA	TTC	AAA	GAA	484
S	K	S	G	T	T	T	E	P	A	I	A	F	R	V	F	K	E	161
CTT	TTG	ATT	GAA	AAA	TAC	GGT	CAA	GAA	GAA	GCT	AAC	AAA	CGT	ATC	TAC	GCT	ACA	538
L	L	I	E	K	Y	G	Q	E	E	A	N	K	R	I	Y	A	T	179
ACT	GAT	AAA	GCT	AAA	GGC	GCT	GTT	AAA	GTT	GAA	GCT	GTT	GCT	AAC	GAT	TGG	GAA	592
T	D	K	A	K	G	A	V	K	V	E	A	V	A	N	D	W	E	197
ACA	TTT	GTT	GTT	CCA	GAT	AAC	GTT	GGT	GGA	CGT	TTC	TCA	GTA	TTG	ACT	GCT	GTA	646
T	F	V	V	P	D	N	V	G	G	R	F	S	V	L	T	A	V	215
GGT	CTT	CTT	CCA	ATC	GCT	GCC	GCT	GGT	ATC	GAC	ATC	GAA	GCT	CTT	ATG	AAC	GGT	700
G	L	L	P	I	A	A	A	G	I	D	I	E	A	L	M	N	G	233
GCT	AAC	GCT	GCT	CGT	AAA	GAA	TTG	ACT	TCT	GCT	GAA	ATC	TCA	GAA	AAC	ATC	GCT	754
A	N	A	A	R	K	E	L	T	S	A	E	I	S	E	N	I	A	251
TAC	CAA	TAC	GCT	GCA	GTT	CGT	AAC	GTA	CTT	TAC	CGT	AAA	GGC	TAC	ATC	ACT	GAA	808
Y	Q	Y	A	A	V	R	N	V	L	Y	R	K	G	Y	I	T	E	269
ATT	TTG	GCT	AAC	TAC	GAA	CCA	TCA	CTT	CAA	TAT	TTT	GGT	GAA	TGG	TGG	AAA	CAA	862
I	L	A	N	Y	E	P	S	L	Q	Y	F	G	E	W	W	K	Q	287
TTA	GCT	GGT	GAA	TCA	GAA	GGT	AAA	CAC	CAA	AAA	GGT	ATC	TAC	CCA	ACA	TCT	GCT	916
L	A	G	E	S	E	G	K	H	Q	K	G	I	Y	P	T	S	A	305
AAC	TTC	TCA	ACT	GAC	CTT	CAC	TCA	CTT	GGT	CAA	TTC	ATC	CAA	GAA	GGT	TAC	CGT	970
N	F	S	T	D	L	H	S	L	G	Q	F	I	Q	E	G	Y	R	323
AAC	ATC	TTC	GAA	ACA	GTT	GTT	CGT	ATT	GAC	AAA	CCA	CGT	AAA	AAC	GTT	GTT	ATC	1024
N	I	F	E	T	V	V	R	I	D	K	P	R	K	N	V	V	I	341
CCT	GAA	TTG	TCA	GAA	GAC	CTT	GAT	GGT	CTT	GGA	TAC	CTT	CAA	GGC	AAA	GAT	GTT	1078
P	E	L	S	E	D	L	D	G	L	G	Y	L	Q	G	K	D	V	359
GAT	TTT	GTA	AAC	AAA	AAA	GCA	ACT	GAT	GGT	GTT	CTT	CTT	GCT	CAC	ACT	GAT	GGT	1132
D	F	V	N	K	K	A	T	D	G	V	L	L	A	H	T	D	G	377
GGT	GTT	CCT	AAC	ATG	TTC	TTG	ACA	CTT	CCT	CAA	CAA	GAT	GAA	TTC	ACT	CTT	GGT	1186
G	V	P	N	M	F	L	T	L	P	Q	Q	D	E	F	T	L	G	395
TAC	ACA	ATC	TAC	TTC	TTC	GAG	TTA	GCA	ATT	GGT	CTT	TCA	GGT	TAC	CTT	AAC	GCT	1240
Y	T	I	Y	F	F	E	L	A	I	G	L	S	G	Y	L	N	A	413
GTT	AAT	CCA	TTT	AAC	CAA	CCA	GGT	GTA	GAA	GCA	TAC	AAG	AAA	AAT	ATG	TTT	GCT	1294
V	N	P	F	N	Q	P	G	V	E	A	Y	K	K	N	M	F	A	431
CTT	CTT	GGA	AAA	CCT	GG													1311
L	L	G	K	P														436

Figure 35 : séquence partielle du gène de la glucose-6-phosphate isomérase de *S. infantarius* et traduction de sa plus grande phase de lecture.

Après vérification par séquençage des plasmides des clones positifs, les vecteurs recombinants pGEX-dpep, pET-ampep et pET-pgi sont produits dans les bactéries JM109 et des «maxipréparations» d'ADN plasmidique sont réalisées. Puis chacun de ces vecteurs est utilisé pour transformer par électroporation des bactéries *E. coli* BL21(DE3) compétentes qui permettent de surexprimer des protéines recombinantes soit fusionnées à la Glutathion-S-transférase (GST) dans le cas du plasmide pGEX-4T-1, soit conjuguées à une queue de 6 résidus histidine (His-tag) dans le cas du vecteur pET-15b. Les clones positifs contenant le vecteur pGEX-dpep, pET-ampep ou pET-pgi sont sélectionnés par PCR sur colonies et quelques clones positifs sont choisis arbitrairement pour subir le test de surexpression des protéines de fusion en présence d'IPTG.

3.2. Surexpression des protéines recombinantes

Des fragments des gènes de la Dipeptidase, de l'Amino-peptidase ou de la PGI de *S. infantarius* ont été clonés dans des vecteurs d'expression plasmidique qui permettent la production par *E. coli* de protéines recombinantes conjuguées à une étiquette ou «tag» qui permet de cribler et purifier facilement ces protéines surexprimées. Quelques clones positifs contenant le plasmide recombinant présentant un insert avec la bonne phase de lecture après vérification par séquençage, sont soumis à un test d'expression protéique. En présence d'ampicilline, l'expression de la protéine recombinante est induite dans une culture bactérienne ayant une DO de 0,4 à 0,6 avec 1 μ M d'IPTG à 37°C pendant 3h. 5 mL de cette culture sont centrifugés et le culot bactérien est directement déposé sur gel de polyacrylamide afin de vérifier la production des protéines recombinantes par coloration au bleu de Coomassie et par Western Blot.

Après induction, l'extrait protéique du clone recombinant sélectionné, contenant la construction pGEX-dpep, présente une bande surexprimée vers 46 kDa qui correspond à la taille attendue pour la Dipeptidase fusionnée à la GST (figure 36a). En effet, le poids moléculaire théorique calculé à partir de la séquence peptidique de la Dipep est de 26 kDa et la masse de la GST de 19,7 kDa.

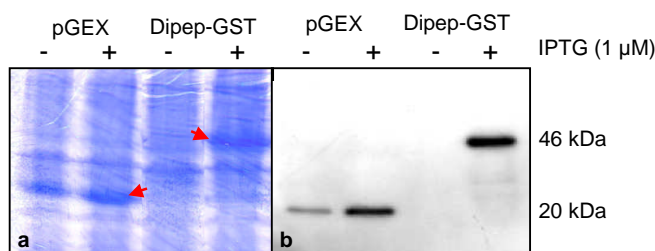


Figure 36: Surexpression de la protéine de fusion Dipep-GST induite dans *E. coli* par 1 μ M d'IPTG (3h, 37°C). (a) gel SDS-PAGE 10% des protéines totales des bactéries transformées avec le plasmide vide (pGEX) ou le plasmide recombinant (Dipep-GST) après coloration au bleu de Coomassie. (b) Western Blot avec les anticorps anti-GST. (- : sans IPTG, + : avec IPTG).

Nous observons effectivement une bande vers 20 kDa, plus importante que les autres parmi les protéines totales des bactéries transformées avec le plasmide vide. Nous vérifions par Western Blot que ces bandes surexprimées de 46 et 20 kDa correspondent effectivement à la Dipep-GST et à la GST, respectivement. La figure 36b montre qu'elles sont reconnues par des anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre la GST.

Après induction, l'extrait protéique d'un clone contenant le plasmide recombinant pET-ampep, présente une bande fortement surexprimée à 34 kDa qui correspond au poids moléculaire attendu pour l'aminopeptidase recombinante (figure 37a). Cette bande n'est pas visible sur gel dans l'extrait bactérien non induit. La protéine surexprimée est reconnue par des anticorps monoclonaux spécifiques de l'épitope poly-histidine (figure 37b). Ceci confirme la production d'une protéine Aminopep-His-tag recombinante de 34 kDa.

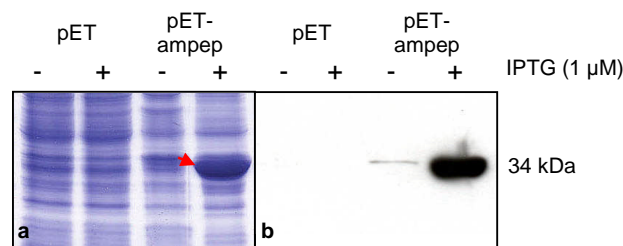


Figure 37 : Surexpression de la protéine recombinante Aminopeptidase-His induite dans *E. coli* par 1 μ M d'IPTG (3h, 37°C). (a) gel SDS-PAGE 10% des protéines totales des bactéries transformées avec le plasmide vide (pET) ou le plasmide recombinant (pET-ampep). (b) Western Blot avec les anticorps anti-His-tag. (- : sans IPTG, + : avec IPTG)

De même, l'IPTG induit la production d'une protéine majoritaire de 44 kDa, taille théoriquement attendue pour la PGI recombinante, par les bactéries contenant le plasmide recombinant pET-pgi (figure 38a). Cette protéine surexprimée est reconnue par des anticorps monoclonaux spécifique de l'épitope poly-histidine (figure 38b). Ceci confirme la production d'une protéine PGI-His-tag recombinante de 44 kDa qui n'est pas détectée en l'absence d'IPTG dans le clone recombinant.

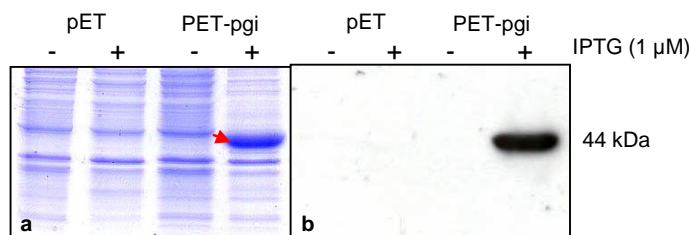


Figure 38 : Surexpression de la protéine recombinante PGI-His induite dans *E. coli* par 1 μ M d'IPTG (3h, 37°C). (a) gel SDS-PAGE 10% des protéines totales des bactéries transformées avec le plasmide vide (pET) ou le plasmide recombinant (PGI-His). (b) Western Blot avec les anticorps anti-His-tag. (- : sans IPTG, + : avec IPTG)

Ainsi, nous avons sélectionné 3 clones capables de surexprimer les 3 protéines recombinantes d'intérêt : l'Amino pep-His-tag, la Dipep-GST et la PGI-His-tag. Il s'agit ensuite de produire une quantité suffisante de protéine recombinante soluble afin de purifier ces différentes protéines par chromatographie d'affinité.

3.3. Essai de solubilisation des protéines surexprimées

Dans les conditions standards d'induction de l'expression protéique par l'IPTG (1 μ M pendant 3h à 37°C), les 3 protéines recombinantes sont surexprimées sous forme insoluble. L'insolubilité des protéines peut s'expliquer soit par leur agrégation dans des corps d'inclusion qui se forment suite à une surexpression trop importante des protéines qui ne peuvent alors se replier correctement, soit par la nature hydrophobe de la protéine produite elle-même. Les protéines insolubles ne pouvant être purifiées par chromatographie d'affinité, il nous a fallu optimiser les conditions d'induction afin de solubiliser au mieux les protéines produites. Il est possible de ralentir la production des protéines bactériennes en diminuant la quantité d'IPTG et/ou la température d'incubation. Nous avons ainsi induit la production des protéines recombinantes avec différentes concentrations d'IPTG (0.1, 0.5 et 1 μ M) sous différentes températures : 37°C pendant 3h, 25°C pendant 24h, 15°C et 7°C pendant 72h.

La figure 39 montre que lors d'une induction à 37°C pendant 3h avec 1 μ M d'IPTG, la quasi-totalité de la Dipeptidase recombinante est produite sous forme insoluble (I). En ralentissant la vitesse d'expression, en abaissant la température à 15°C, l'induction pendant 72h permet de solubiliser une grande partie de la protéine surexprimée (S) avec 1 μ M d'IPTG, ce qui est confirmé par Western Blot qui révèle une bande importante à 46 kDa par les anticorps anti-GST dans le surnageant de lyse (S) des bactéries.

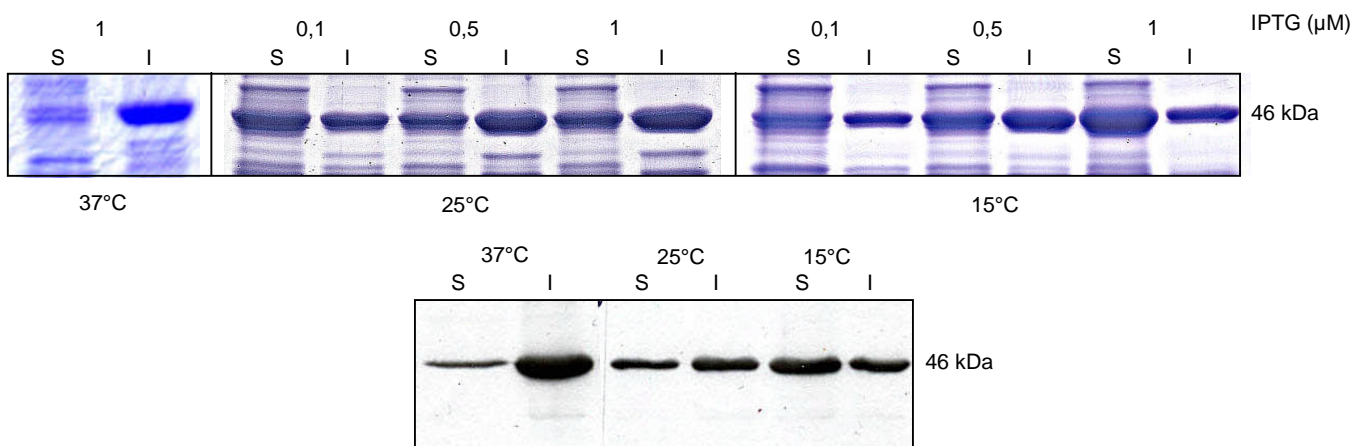


Figure 39 : Surexpression de la Dipeptidase fusionnée à la GST dans différentes conditions d'induction. (en haut) SDS-PAGE 10% de la fraction soluble (S) et insoluble (I) d'extraits protéiques de *E. coli* transformées par le vecteur recombinant pGEX-dipep. (en bas) Western blot des extraits protéiques, après induction avec 1 μ M d'IPTG et révélation avec un anticorps anti-GST.

A 37°C avec 1 μM d'IPTG, une induction de 3h entraîne la surexpression d'une Aminopeptidase recombinante sous une forme exclusivement insoluble qui est visualisée sur gel de polyacrylamide vers 34 kDa (figure 40). En effet, les anticorps anti-His-tag ne semblent détecter aucune protéine dans le surnageant de lyse S dans ces conditions. La protéine reste insoluble quelles que soient les conditions de température et de concentration en IPTG utilisées dans les précédents essais de solubilisation de la Dipep. Il faut abaisser la température à 7°C et induire l'expression pendant 72h en présence de 1 μM d'IPTG pour solubiliser une fraction de la protéine dont on révèle la présence dans le surnageant de lyse S par Western Blot.

L'incubation des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) avec 1 μM d'IPTG à 37°C pendant 3h induit une expression de la PGI-His-tag recombinante visualisée dans la fraction insoluble C du lysat sous forme d'une bande vers 44 kDa colorée au bleu de Coomassie (figure 41). Il n'a été possible de solubiliser qu'une faible quantité de cette protéine PGI-His-tag, en induisant la surexpression avec 1 μM d'IPTG à 7°C pendant 72h. Sa présence dans le surnageant de lyse est confirmée par Western Blot.

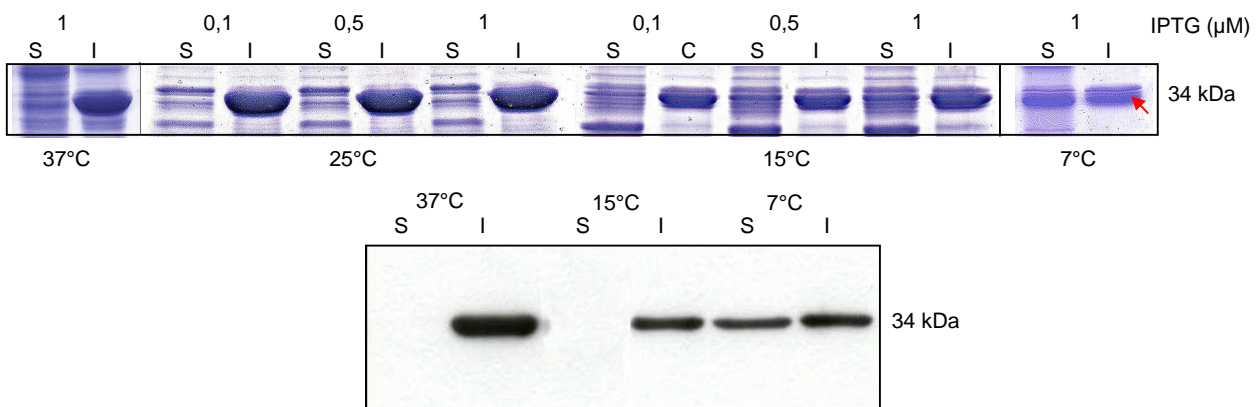


Figure 40 : Surexpression de l'Aminopeptidase recombinante dans différentes conditions d'induction.
(en haut) SDS-PAGE 10% de la fraction soluble (S) et insoluble (I) d'extraits protéiques de *E. coli* transformées par le vecteur recombinant pET-ampep. (en bas) Western blot des extraits protéiques, après induction avec 1 μM d'IPTG et révélation avec un anticorps anti-His-tag.

Nous avons observé que, dans tous les cas, quelle que soit la concentration d'IPTG (0.1, 0.5 ou 1 μM) utilisée pour l'induction, nous avons le même profil d'expression de la protéine recombinante avec quasiment le même taux de solubilisation pour une même température d'induction.

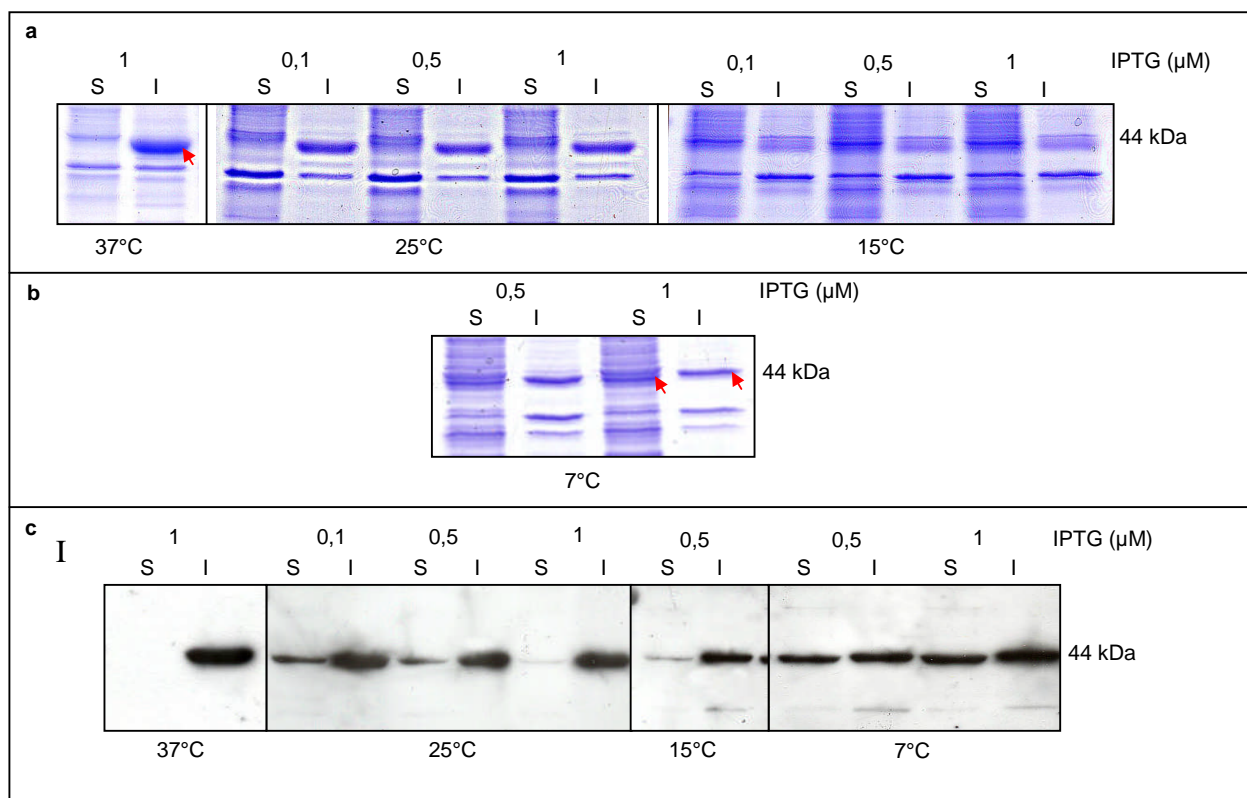


Figure 41 : Surexpression de la PGI recombinante dans différentes conditions d'induction.
(en haut) SDS-PAGE 10% de la fraction soluble (S) et insoluble (I) d'extraits protéiques de *E. coli* transformées avec le vecteur recombinant pET-pgi. (en bas) Western blot avec un anticorps anti-His-tag.

3.4. Essais de purification sur colonne d'affinité

Un litre de culture de bactéries *E. coli* BL21 recombinantes (DO de 0,4 à 0,6) est incubé avec 1 μM d'IPTG pour induire la surexpression des protéines recombinantes dans les conditions déterminées précédemment et qui favorisent la production des protéines sous forme soluble en quantité suffisante pour être purifiées ensuite par chromatographie d'affinité. Ainsi, l'expression de la Dipeptidase-GST est induite dans le clone recombinant pGEX-dipep pendant 72h à 15°C, celle de l'Amino-peptidase-His-tag et de la PGI-His-tag est induite pendant 72h à 7°C dans les clones pET-ampep et pET-pgi, respectivement.

Après induction, les bactéries sont centrifugées et le culot est repris dans 60 mL de tampon de fixation de la colonne de chromatographie puis les bactéries sont lysées par sonication. 5 mL du surnageant de lyse sont déposés sur la colonne de chromatographie d'affinité : une colonne de type GST-trapp pour la Dipeptidase-GST ou une colonne de nickel pour l'Amino-pep-His-tag ou la PGI-His-tag.

3.4.1. Chromatographie sur colonne GST-trapp

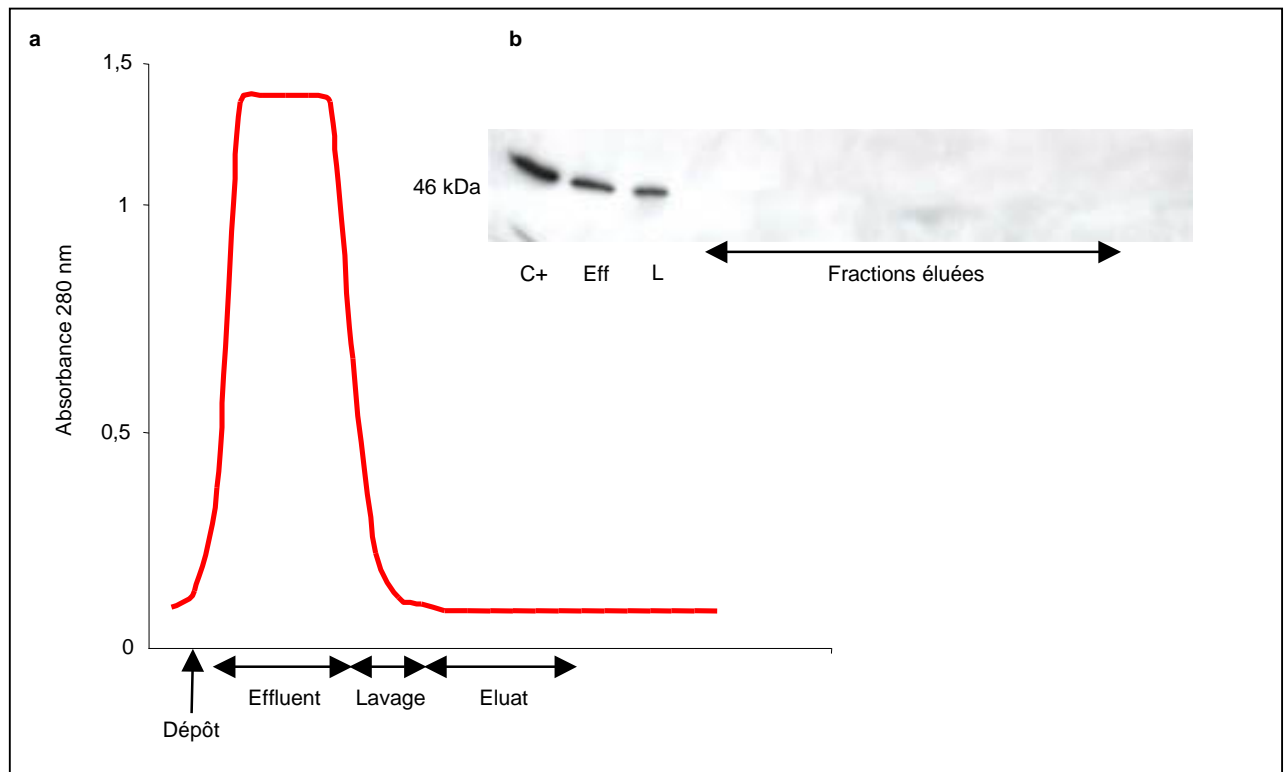


Figure 42 : profil d'éluion (a) d'un extrait protéique de *E. coli* surexprimant la protéine de fusion Dipeptidase-GST sur colonne d'affinité GST-trapp.
(b) Révélation des protéines fusionnées à la GST dans les fractions collectées. C+ : extrait contenant la Dipep-GST, Eff : effluent, L : lavage.

Le surnageant de lyse des bactéries *E. coli* transformées par le plasmide recombinant pGEX-dipep est séparé sur la colonne GST-trapp (Amersham, Biosciences) dans le tampon de liaison (PBS pH 7,3). Le chromatogramme correspondant à cette purification est présenté ci-dessous : les protéines sont détectées à une longueur d'onde de 280 nm et l'absorbance est reportée en ordonnée (figure 42a). Le fragment de la Dipeptidase conjuguée à la GST se fixe à la colonne qui est constituée d'une matrice Sépharose couplée au glutathion réduit, substrat de la GST, alors que les autres protéines ne sont pas retenues et sont exclues dans l'effluent.

Le chromatogramme montre un pic unique et ne correspond pas au profil qui est théoriquement attendu : aucun pic d'éluion n'apparaît après application du tampon d'éluion. Les différentes fractions collectées (effluent, lavage et éluat) sont analysées par Western Blot (figure 42b). La protéine de fusion de 46 kDa est détectée avec les anticorps anti-GST dans l'effluent et le lavage mais aucun signal n'est révélé dans les fractions éluées : la Dipeptidase n'a pas été retenue sur la colonne. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce problème : (i) une déficience de la colonne, (ii) les sites de liaison pourraient être inaccessibles dans les conditions natives de la chromatographie, (iii) une absence de

décrochage de la protéine lors de l'élution ou (iv) quantité trop faible de Dipeptidase recombinante dans l'éluat pour être détectée.

3.4.2. Chromatographie sur colonne His-Trapp

a) purification de l'Amino pep-His

5 mL du lysat des bactéries *E. coli* transformées par le vecteur pET-amino pep sont déposés sur la colonne His-trapp (Amersham, Biosciences) dans le tampon de fixation. Après lavage de la colonne, l'élution de l'Amino peptidase-His-tag permet d'obtenir le profil représenté dans la figure 43: les protéines sont détectées à une longueur d'onde de 280 nm et l'absorbance est reportée en ordonnée.

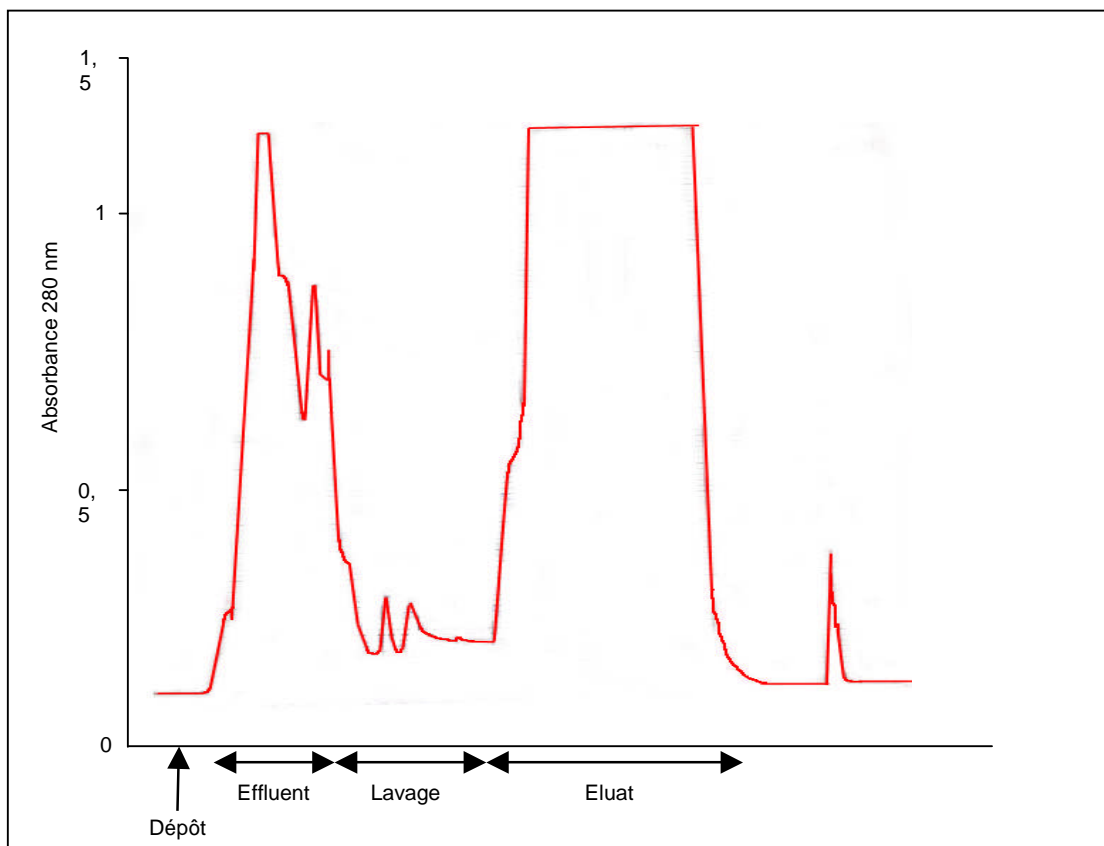


Figure 43 : profil d'élution d'un extrait protéique de *E. coli* surexprimant la protéine recombinante Amino peptidase-His-tag sur colonne de nickel His-trapp.

Le fragment de l'Amino peptidase couplée à l'épitope de poly-histidine, chargé négativement à pH basique, se lie normalement à la colonne sur laquelle sont greffés des ions Zn^{2+} , et va en être décroché par application du tampon d'élution qui contient de l'imidazole. Les autres protéines ne sont pas retenues et sont exclues dans l'effluent. Nous pouvons observer un pic d'élution qui correspond au décrochage de l'Amino peptidase-His-tag. Les différentes fractions (effluent, lavage et éluat) sont collectées et analysées sur gel de polyacrylamide et par Western Blot (figure 44)

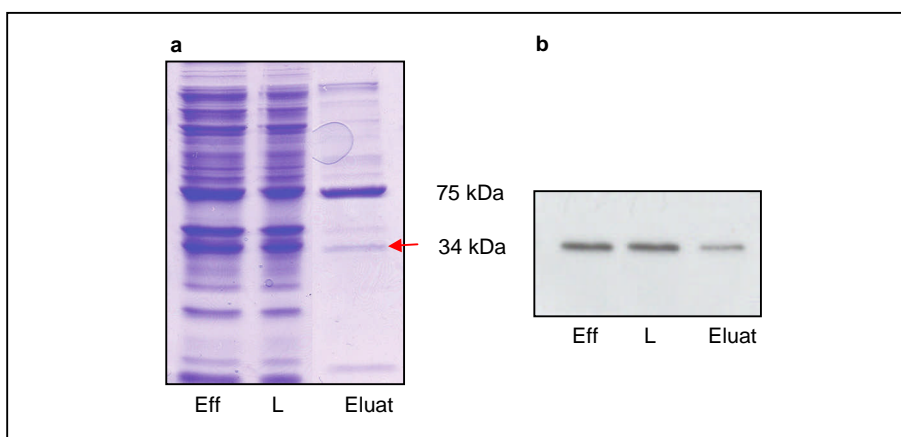


Figure 44 : (a) profil SDS-PAGE 10 % des différentes fractions obtenues lors de la chromatographie sur colonne His-trapp de l'extrait protéique des bactéries transformées par le vecteur pET-aminopep. (b) Détection des protéines couplées à la poly-histidine dans les fractions collectées. Eff : effluent, L : lavage.

La protéine recombinante de 34 kDa est détectée avec les anticorps anti-GST dans toutes les fractions aussi bien dans l'effluent, le lavage que dans l'éluat. Malheureusement, le gel de polyacrylamide révèle, après coloration, que la fraction éluee contient non seulement l'Amino pep-His-tag, qui est en plus présente en faible quantité, mais également plusieurs autres protéines dont une bande majoritaire vers 75 kDa qui n'est pas reconnue par les anticorps anti-His-tag. Cette chromatographie ne nous a donc pas permis de purifier de façon satisfaisante notre protéine recombinante d'intérêt.

b) purification de la PGI-His

5 mL du lysat des bactéries BL21 (DE3) transformées avec le vecteur pET-pgi sont déposés sur la colonne His-trapp dans le tampon de fixation. Suivant le même protocole que pour la purification de l'Amino pep-His, l'élution de la PGI-His-tag permet d'obtenir le profil représenté figure 45. Nous observons un pic d'élution qui correspond au décrochage de la PGI-His-tag après application du tampon d'élution. Les différentes fractions (effluent, lavage et éluat) sont collectées et analysées sur gel de polyacrylamide et par Western Blot (figure 46).

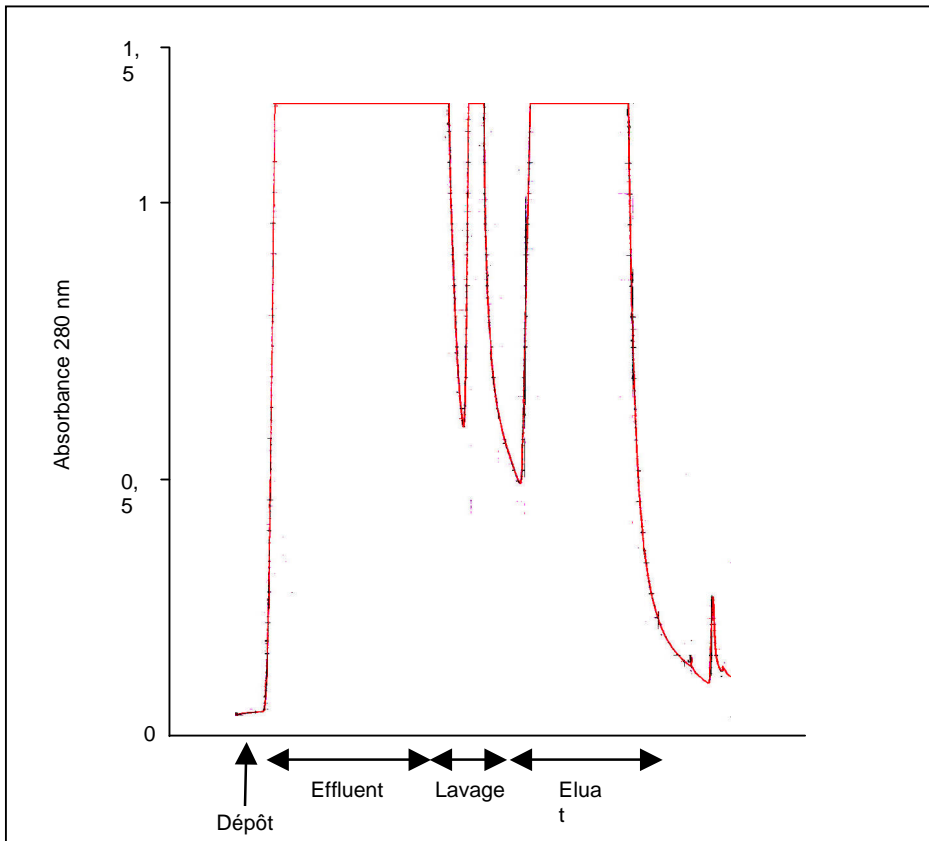


Figure 45 : profil d'éluion d'un extrait protéique de *E. coli* surexprimant la protéine recombinante PGI-His-tag sur colonne de nickel His-trapp.

La protéine PGI-His-tag de 44 kDa est détectée avec les anticorps anti-GST dans toutes les fractions : l'effluent, l'éluat et un peu dans le lavage. Cette chromatographie ne nous a pas permis de purifier de façon satisfaisante notre protéine recombinante d'intérêt, PGI-His-tag puisque l'éluat présente de nombreuses protéines dont une majoritaire vers 75 kDa qui n'est pas reconnue par les anticorps anti-His-tag. Le gel de polyacrylamide montre en outre, après coloration, que la fraction éluee ne contient qu'une très faible quantité de PGI-His-tag.

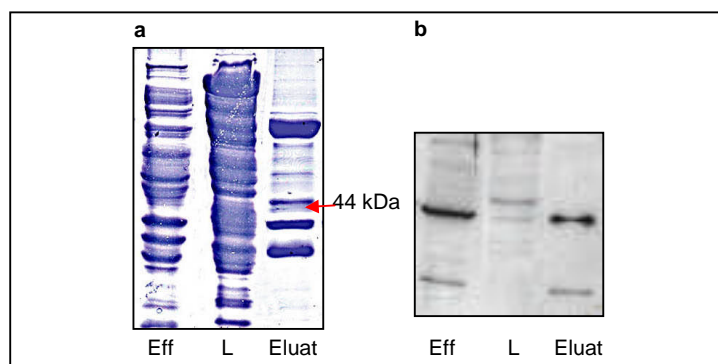


Figure 46 : (a) profil SDS-PAGE 10 % des différentes fractions obtenues lors de la chromatographie sur colonne His-trapp de l'extrait protéique des bactéries transformées par le vecteur pET-pgi. (b) Détection des protéines couplées à la poly-histidine dans les fractions collectées. Eff : effluent, L : lavage.

4. PURIFICATION DES PROTEINES NATIVES DE *S. infantarius*

L'étape de séparation par chromatographie d'affinité des protéines extraites des bactéries *E. coli* BL21 recombinantes devait permettre de purifier la Dipeptidase-GST, l'Amino-peptidase-His et la PGI-His en quantité suffisante pour immuniser des lapins en vue de la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces protéines. Or les essais sur colonne d'affinité n'ayant pas permis d'obtenir des protéines recombinantes suffisamment purifiées, nous avons choisi d'injecter aux animaux les bandes correspondant à ces protéines découpées sur le gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie.

4.1. Préparation des sérums anti-aminopeptidase, anti-dipeptidase et anti-PGI

Après induction de la surexpression de la protéine recombinante (Dipep-GST, Amino-pep-His ou PGI-His) dans *E. coli* à 37°C pendant 3h (conditions pour produire la plus forte expression), l'extrait de protéines totales est séparé par SDS-PAGE avec un maximum de résolution (figure 47). Après coloration du gel, les bandes correspondant aux protéines d'intérêt sont découpées puis broyées dans du tampon PBS pour être injectées aux lapins par voie sous-cutanée. L'immunisation de trois lapins avec chacun des broyats permet, après au moins 4 injections, d'obtenir des sérums dirigés contre chacune des trois protéines recombinantes.

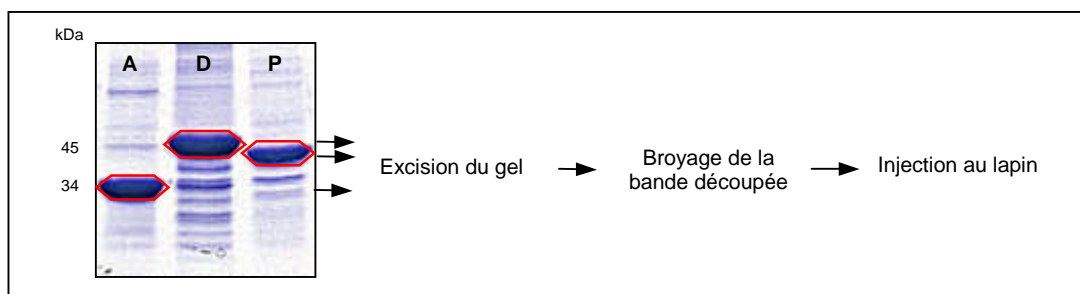


Figure 47 : SDS-PAGE 12 % des protéines totales des bactéries *E. coli* BL21 surexprimant les protéines recombinantes Amino pep-His-tag (A), Dipep-GST (D) ou PGI-His-tag (P).

4.2. Activité et spécificité de reconnaissance des IgG

5 jours après la dernière immunisation, le sérum des lapins est préparé à partir du sang prélevé. Après purification des immunoglobulines IgG par précipitation au sulfate d'ammonium (50%) suivie d'une chromatographie DEAE Trisacryl M, l'activité immune des anticorps est testée par ELISA. L'activité de chaque sérum est comparée à celle du sérum non immun (SNI) correspondant, qui a été prélevé au préalable avant toute injection de l'antigène et qui sert de témoin. L'activité de tous ces anticorps polyclonaux est mesurée par rapport aux protéines de la fraction WEA de *S. infantarius* puisque ces IgG seront utilisées pour purifier les protéines issues de sa paroi.

4.2.1. IgG anti-Dipeptidase

Les IgG anti-Dipep-GST, anti-Amino pep-His et anti-PGI-His sont préparées à partir des sérums ponctionnés après la septième immunisation des animaux. Ils sont testés en ELISA sur les protéines du WEA qui sont coatées en plaque de microtitration.

Nous observons que tous les sérums SNI développent la même activité vis-à-vis du WEA donc, dans un souci de simplicité, nous ne représentons dans le diagramme suivant que l'activité d'un seul SNI qui correspond au lapin « anti-Dipep-GST ».

La figure 48 montre que le sérum anti-Dipep-GST présente une activité immune accrue pour le WEA par rapport au SNI, c'est-à-dire qu'il est enrichi en IgG reconnaissant spécifiquement des antigènes présents dans la fraction WEA. Ces IgG sont, en principe, des anticorps anti-Dipep-GST. Le titre en IgG anti-dipeptidase est suffisamment élevé pour permettre l'utilisation de ce sérum afin de préparer un immunoabsorbant qui servira à la purification de la Dipeptidase de *S. infantarius*.

Ces IgG sont épuisées sur une matrice de Sépharose sur laquelle ont été fixés de façon covalente les protéines extraites de bactéries *E. coli* sauvages puis, une nouvelle fois, sur membrane de nitrocellulose sur laquelle les extraits protéiques de *E. coli* sauvages ont été transférés. Cet épuisement permet d'éliminer un maximum d'anticorps dirigés contre *E. coli* et non spécifiques de la Dipeptidase-GST. Par Western Blot, nous avons effectivement vérifié que les IgG ainsi épuisés ne donnent plus de signal détectable sur un extrait de protéines totales de *E. coli* sauvages BL21 transformés ou non avec le plasmide pGEX-4T-1 vide mais reconnaissent toujours la protéine recombinante Dipep-GST.

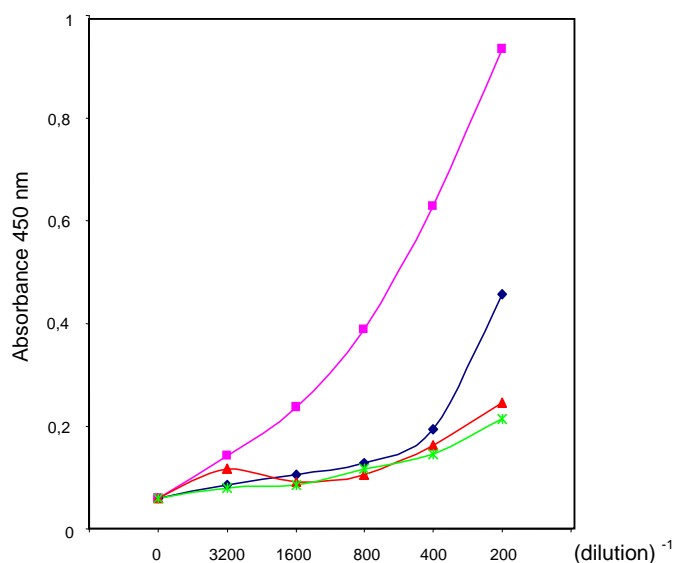


Figure 48 : Activité immune des IgG polyclonales anti-Dipep-GST ■, anti-Amino pep-His ▲, anti-PGI-His ★, SNI ◆ sur le WEA de *S. infantarius*.

Par contre, même après 7 immunisations, les lapins n'ont pas développé de réponse immunitaire détectable par ELISA vis-à-vis des antigènes Aminopep-His ou PGI-His. En effet, la courbe de reconnaissance des protéines du WEA par le sérum anti-Aminopep-His ou anti-PGI-His est aussi faible que la courbe d'activité du sérum pré-immun. Alors que ces anticorps reconnaissent leur protéine recombinante respectives en Western Blot. Ces résultats suggèrent que les IgG produites sont capables de se fixer sur les protéines dénaturées, dans les conditions du Western Blot, mais pas sur les protéines natives, dans les conditions non dénaturantes de l'ELISA. Ces anticorps semblent donc dirigés contre des épitopes enfouis dans la structure tridimensionnelle des protéines. Ils ne sont donc pas utilisables pour la purification des protéines natives de *S. infantarius* par chromatographie d'immunoaffinité.

Des peptides ont alors été choisis dans une région très restreinte et très spécifique de l'Aminopeptidase et la PGI de *S. infantarius* pour être utilisés comme antigène dans la production de nouveaux sérums.

4.2.2. IgG anti-peptides

Les peptides ont été synthétisés et purifiés par NeoMPS (Strasbourg). Ils ont été couplés à l'extrémité N-terminale, par l'intermédiaire d'un agent couplant, à l'ovalbumine (OVA) qui joue le rôle de protéine porteuse.

Des sérums dirigés contre ces peptides synthétiques ont ensuite été préparés par immunisation de lapins. Les sérums sont testés contre le peptide antigénique libre, la protéine recombinante correspondante et le WEA. Le sérum non immun prélevé avant immunisation des animaux sert de témoin. Le peptide AMPEP32, de séquence 5'-YHSDKNITPQEFFKK-3' est spécifique de l'Aminopeptidase et le peptide PGI8, de séquence 5'-CKPRKNVVIPELSELDL-3', de la PGI. La structure cristallographique de la PGI de *Bacillus stearothermophilus* est connue et possède une séquence peptidique homologue à celle de *S. infantarius* (Sun *et al.*, 1999). Nous avons choisi le peptide PGI8 dans une boucle bien exposée de la protéine, indiquée par une flèche dans la figure 49.

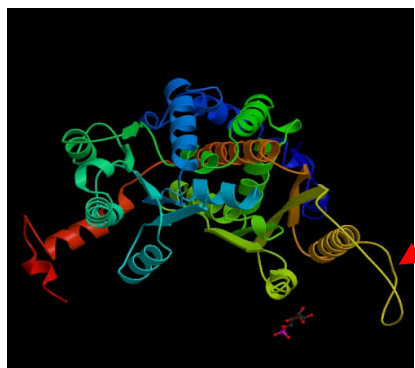


Figure 49 : structure tridimensionnelle de la PGI de *B. stearothermophilus*. (Sun *et al.*, 1999)
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?job=summary&pdbld=1C7R&page>

Nous espérons ainsi produire des anticorps dirigés contre des épitopes qui seraient, eux aussi, dirigés vers l'extérieur de la PGI de *S. infantarius* et donc plus accessibles.

Les sérums anti-peptides obtenus présentent une forte activité immune pour leur peptide libre respectif par rapport au SNI, comme le montre la figure 50. Les deux anticorps anti-peptides se fixent sur leur peptide respectif et sur la protéine recombinante correspondante. L'affinité pour le peptide est supérieure à celle pour la protéine recombinante. Ceci suggère que seule une partie des anticorps dirigés contre les peptides synthétiques sont capables de se fixer sur la protéine recombinante, ou bien encore que les séquences qui correspondent aux peptides ne sont pas entièrement exposées ou que dans la protéine elles sont maintenues dans des configurations telles qu'elles ne peuvent être totalement reconnues par les anticorps anti-peptides. En effet, la conformation d'un peptide libre, même couplé à une protéine porteuse, n'est pas la même que celle qu'il pourrait avoir au sein de la protéine entière.

Nous pouvons observer que le sérum non immun des animaux contient déjà des anticorps reconnaissant des protéines de *E. coli*, ce qui est normal puisque les lapins ne sont pas élevés en milieu stérile.

Une petite partie des anticorps anti-peptides se fixe sur les antigènes du WEA puisqu'ils donnent un léger signal en ELISA plus important que celui qui est détecté avec le SNI. Cette reconnaissance sera vérifiée par Western Blot.

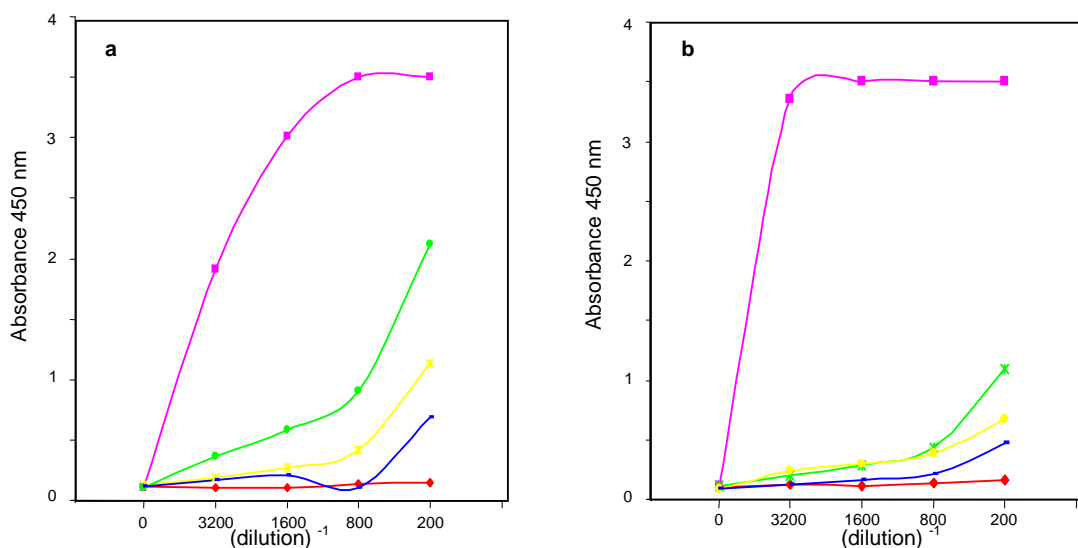


Figure 50 : Activité immune des IgG polyclonales anti-peptide-AMPEP32 (a) et anti-peptide-PG18 (b) vis-à-vis de son peptide libre respectif (■), de la protéine recombinante correspondante (●), du WEA de *S. infantarius* (▲) et activité du sérum pré-immun SNI pour le peptide libre (◆) et pour la protéine recombinante (*).

Les IgG anti-peptides sont précipités au sulfate d'ammonium (50%) puis purifiés par chromatographie sur DEAE Trisacryl M, avant d'être épuisés sur membrane de nitrocellulose sur laquelle des extraits protéiques d'*E. coli* ont été transférés.

Le Western blot représenté figure 51 montre que les IgG anti-peptide-AMPEP32 reconnaissent la protéine recombinante Aminopep-His de 34 kDa et une protéine de 27 kDa dans la fraction WEA de *S. infantarius*. Une très légère bande vers 30 kDa également est révélée avec ces anticorps dans l'extrait de protéines totales de *E. coli* BL21 (DE3). Ces bactéries semblent donc exprimer une protéine de même poids moléculaire que la protéine de 27 kDa du WEA et qui possède une homologie suffisante avec cette dernière pour être reconnue par les mêmes anticorps. Le signal plus faible dans les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) suggère que les anticorps anti-AMPEP32 présentent une affinité moindre pour cette protéine de *E. coli* que pour celle de *S. infantarius*, ou bien que cette protéine est plus faiblement exprimée dans *E. coli*.

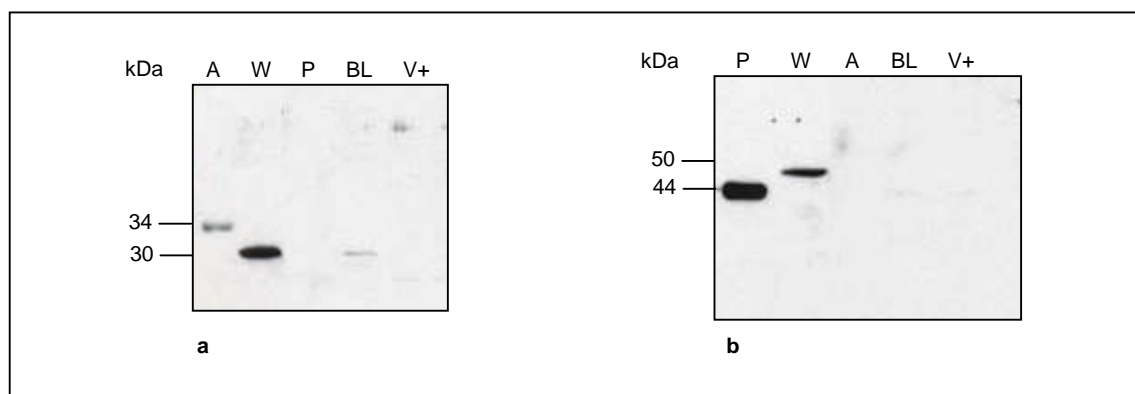


Figure 51 : Reconnaissance des protéines recombinantes et des antigènes de WEA de *S. infantarius* par les IgG anti-peptides AMPEP32 (a) et PGI8 (b) purifiées et épuisées contre *E. coli*.
A : extrait des bactéries *E. coli* BL21 surexprimant l'Aminopeptidase-His, P : extrait des bactéries surexprimant la PGI-His, W : WEA, BL : extrait total de *E. coli* BL21, V+ : extrait total de *E. coli* transformé par le vecteur pET-15b vide.

Les anticorps anti-peptide-PGI8 reconnaissent la protéine recombinante PGI-His de 44 kDa et une protéine de 51 kDa dans la fraction WEA de *S. infantarius*.

Les anticorps anti-peptides se fixent spécifiquement sur leur protéine recombinante respective, ne reconnaissent pas la protéine hétérologue et ne révèlent aucune bande dans le témoin V correspondant à l'extrait des bactéries transformées par le vecteur pET-15b vide.

Ces résultats suggèrent que *S. infantarius* exprime une protéine de 27 kDa contenant un peptide spécifique de l'Aminopeptidase et une protéine de 51 kDa présentant un peptide spécifique de la PGI. Rappelons que l'Aminopeptidase C de *S. pneumoniae* a un poids moléculaire de 50,2 kDa et que la PGI de *S. agalactiae* est une protéine de 49,6 kDa. Il est possible que la bande de 27 kDa révélée pour l'Aminopeptidase chez *S. infantarius* corresponde à une protéine dégradée dans le WEA.

4.3. Chromatographie d'immunoaffinité

Les anticorps polyclonaux anti-Dipeptidase reconnaissent dans la fraction WEA une protéine qui migre à 60 kDa en SDS-PAGE (figure 52a).

Les IgG anti-peptide-AMPEP32 révèlent dans le WEA au moins 3 bandes dont les principales migrent à 89, 27 et 15 kDa. Nous révélons ici deux bandes supplémentaires par rapport au Western Blot de la figure 51. Ceci peut être dû à une différence de quantité protéique de WEA déposé sur le gel. Les bandes qui migrent à 27 et 15 kDa pourraient correspondre à une dégradation de la protéine révélée à 89 kDa.

Les anticorps anti-peptide-PGI8 se fixent à une protéine de 51 kDa du WEA, ceci confirmant les résultats obtenus précédemment et représentés dans la figure 51.

Les anticorps polyclonaux anti-Dipeptidase, anti-peptide-AMPEP32 et anti-peptide-PGI8 sont fixés sur une matrice de Sepharose afin de préparer 3 immunoadsorbants différents. Les antigènes de la fraction WEA reconnus par ces anticorps sont retenus spécifiquement lors du contact avec le gel. L'effluent est constitué des protéines non retenues sur le gel et les antigènes fixés spécifiquement aux anticorps sont décrochés lors de l'éluion réalisée grâce à un saut de pH en appliquant un tampon glycine pH 2,2.

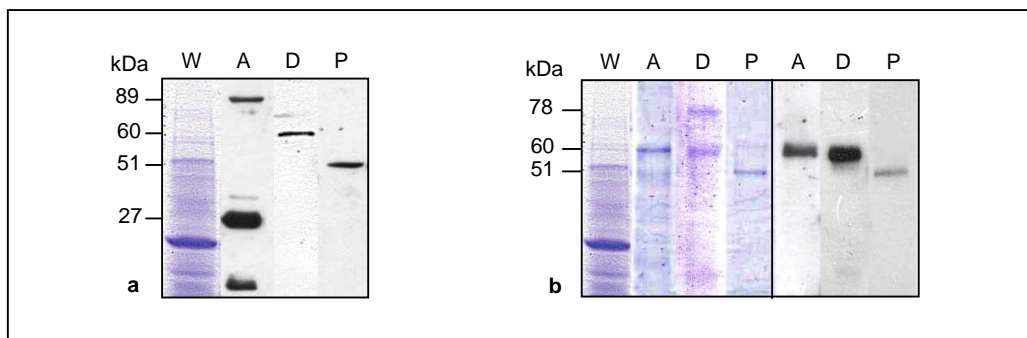


Figure 52 : (a) reconnaissance des protéines de la fraction WEA de *S. infantarius* par les IgG anti-Dipeptidase (D) et les anticorps anti-peptides AMPEP32 (A) et PGI8 (P). (b) Protéines Dipep (D), Aminopep (A) et PGI (P) purifiées à partir du WEA (W) et révélées par les anticorps spécifiques correspondants.

Les protéines du WEA retenues sur l'immunoadsorbant sur lequel ont été fixés les anticorps anti-Dipep-GST ont été éluées à pH 2,2 et déposées sur un gel de polyacrylamide 10 %. La coloration au bleu de Coomassie montre les protéines reconnues par les anticorps anti-Dipeptidase-GST correspondent à deux bandes de poids moléculaire de 78 et 60 kDa (figure 52b). Mais le Western blot réalisé sur cet éluat avec ces anticorps anti-Dipep-GST ne révèle que la bande de 60 kDa. Il est possible que la protéine de 78 kDa se fixe aux anticorps dans les conditions non dénaturantes de la chromatographie sur immunoadsorbant mais que sa conformation dans les conditions dénaturantes du SDS-PAGE soit telle que la protéine ne soit plus reconnue par ces anticorps. Ou bien, les deux protéines de 78 et 60 kDa peuvent être

associées au sein d'un même complexe où seule la protéine de 60 kDa est fixée aux anticorps anti-Dipep mais les deux protéines sont copurifiées sur l'immunoabsorbant.

Les protéines éluées du gel sur lequel ont été fixés les anticorps anti-peptide-AMPEP32 sont déposées sur gel qui, après coloration montre une bande majoritaire de 60 kDa qui est également révélée par Western Blot avec ces mêmes anticorps. Ce résultat est inattendu puisque ces anticorps avaient reconnu trois bandes dans le WEA à 89, 27 et 15 kDa (figure 52a). Il est possible que les épitopes des protéines de 27 et 15 kDa révélées dans les conditions dénaturantes du Western Blot par ces IgG anti-peptide-AMPEP32 soient enfouis au sein de la conformation native de ces protéines lors de la chromatographie d'immunoaffinité qui se fait en conditions non dénaturantes. De cette manière, ces protéines ne seraient pas fixées sur le gel d'immunoabsorbant. La protéine de 60 kDa purifiée par cet immunoabsorbant et révélée par les anticorps anti-peptide-AMPEP32 pourrait provenir de la dégradation de la protéine ou du complexe de 89 kDa mis en évidence dans le WEA. En effet, l'élution lors de la purification sur immunoabsorbant nécessite une étape de décrochage à pH très acide qui peut rompre certaines liaisons hydrogène.

La protéine éluée du gel sur lequel ont été fixés les anticorps anti-peptide-PGI8 montre en SDS-PAGE une taille de 51 kDa et est révélée avec les mêmes anticorps.

Une fois purifiée séparément, chacune des trois protéines de la paroi *S. infantarius* est utilisée dans des études *in vitro* sur des cellules Caco-2 et *in vivo* chez le rat. Ces analyses permettent d'observer les effets individuels de chacune de ces protéines sur la cancérogenèse colique et sur l'inflammation de la muqueuse.

5. ETUDE DES PROPRIETES PROINFLAMMATOIRES ET PROCANCEROGENES DES TROIS PROTEINES PURIFIEES

In vitro, les cellules Caco-2 ont été utilisées pour tester la capacité de chaque protéine purifiée de la paroi de *S. infantarius* à stimuler la libération des marqueurs de l'inflammation que sont l'IL-8 et les PGE₂. D'autre part, une expérience *in vivo*, avec notre modèle de cancer colorectal chez le rat, nous a permis de tester le pouvoir cancérogène de ces protéines purifiées.

5.1. Activité pro-inflammatoire in vitro

L'activité pro-inflammatoire des protéines purifiées a été mesurée en suivant le même protocole que celui déjà utilisé au début de ce travail (section 1.2.1) et comparée à l'activité des fractions WEA et S300. Ainsi, des cellules Caco-2 sont incubées avec ces différentes

protéines pendant 20 h à 37°C et à une concentration de 50µg/mL pour le WEA, 25 µg/mL pour la S300 et 10 µg/mL pour les trois protéines pures. La libération d'IL-8 et de PGE₂ est mesurée par ELISA et la survie cellulaire est déterminée grâce à un test MTT.

5.1.1. Survie cellulaire

Avant de réaliser les expériences d'activation avec les différentes protéines, nous avons étudié la viabilité des cellules Caco-2 en présence de concentrations croissantes de ces activateurs protéiques. Après une stimulation de 20h à 37°C, les cellules sont débarrassées de leur surnageant d'activation et incubées avec le réactif MTT qui permet d'évaluer le pourcentage de cellules vivantes.

La figure 53 montre que l'incubation avec la Dipeptidase entraîne une diminution de la viabilité des cellules Caco-2 de manière dose-dépendante pour des quantités de protéine de 1 à 5µg par puits (5 à 25 µg/mL). Seules 40% des cellules sont encore vivantes lorsqu'elles sont activées par 25 µg/mL de Dipeptidase et entre 25 et 50 µg/mL, la viabilité des cellules diminue encore mais de façon beaucoup moins marquée.

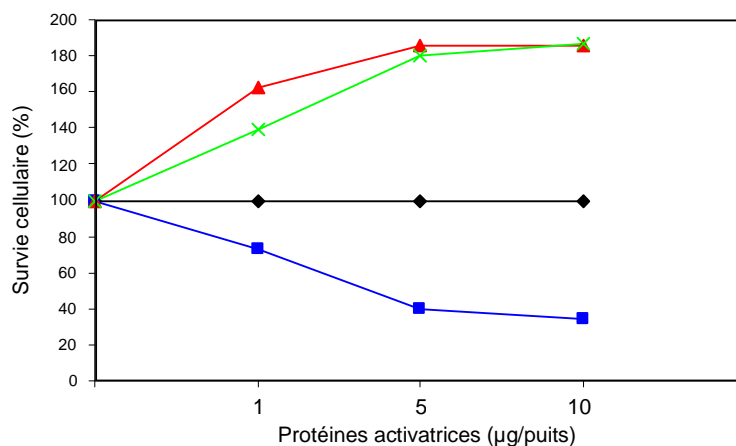


Figure 53 : pourcentage de survie des cellules Caco-2 après 20h d'activation avec la Dipeptidase (—■—), l'Aminopectidase (—x—), la PGI (—▲—) par rapport à la survie des cellules non activées (—◆—).

Au contraire, l'Aminopectidase et la PGI provoquent une prolifération des cellules Caco-2 qui s'accroît avec la concentration des protéines pour atteindre un plateau à partir de 25 µg/mL de protéine. A cette dose, on assiste à un quasi-doublement de la population cellulaire soit une augmentation de 1,85 et 1,86 fois la population témoin non stimulée avec, respectivement, la PGI et l'Aminopectidase.

Ainsi, alors que la Dipeptidase de *S. infantarius* présente un effet cytotoxique sur les cellules coliques humaines Caco-2, son Aminopeptidase et sa PGI possèdent un pouvoir hyperprolifératif sur les mêmes cellules.

5.1.2. Libération d'IL-8 et de PGE₂ par les cellules Caco-2

Les résultats sont exprimés en activité spécifique, c'est-à-dire en nanogrammes d'IL-8/PGE₂ par milligramme de protéines activatrices et sont présentés dans la figure 54. La fraction WEA induit une libération d'IL-8 et de PGE₂ avec une activité de 25 ng/mg et de 3 ng/mg respectivement. Par ailleurs, l'activité de la fraction S300 est de 125 ± 10 ng IL-8/mg et de 13 ± 1,05 ng PGE₂/mg. L'Aminopeptidase présente une activité de 195 ng IL-8/mg et de 221 ± 19,7 ng PGE₂/mg, la Dipeptidase une activité de 281 ± 46 ng IL-8/mg et de 142 ± 38,7 ng PGE₂/mg et enfin l'activité de la PGI est de 195 ± 12 ng IL-8/mg et de 154 ± 76,98 ng PGE₂/mg.

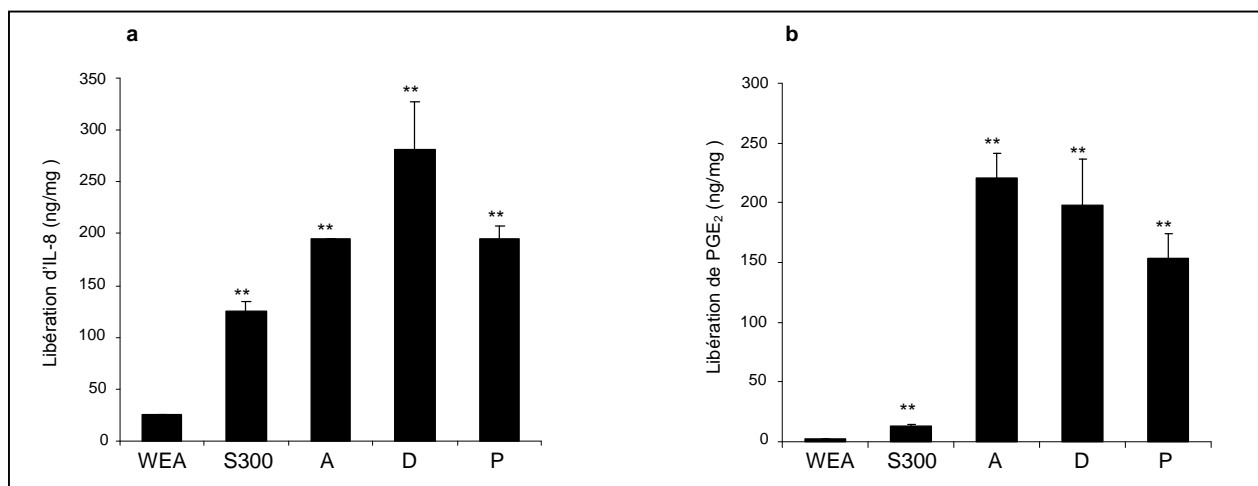


Figure 54 : Libération d'IL-8 (a) et de PGE₂ (b) par les cellules Caco-2 activées pendant 20h par les protéines purifiées de la paroi de *S. infantarius*. A : Aminopeptidase, D : dipeptidase, P : phosphoglucose-isomérase

Les trois protéines purifiées présentent toutes une activité pro-inflammatoire *in vitro* significativement plus élevée que la S300. En effet, la Dipeptidase provoque une libération d'IL-8 par les cellules Caco-2, 11 fois plus élevée que celle induite par la fraction WEA et environ 2 fois plus que la fraction S300. L'Aminopeptidase et la PGI stimulent la même libération d'IL-8 et elles sont 8 fois plus actives que le WEA. Mais ces trois protéines sont surtout de puissants stimulateurs de la libération de PGE₂ : en effet, l'Aminopeptidase entraîne une synthèse de 74 fois plus de PGE₂ que le WEA et 17 fois plus que la S300. La Dipeptidase et la PGI présente quasiment le même pouvoir activateur en induisant une libération de prostaglandines d'au moins 47 fois supérieure au WEA et 12 fois plus importante que celle induite par la fraction S300.

5.2. Activité pro-inflammatoire *in vivo*

Les propriétés proinflammatoires des trois protéines purifiées ont été testées dans notre modèle animal de cancer colorectal selon le même protocole que précédemment (section 1.2.2). Ainsi, les rats prétraités à l'azoxyméthane reçoivent par gavage intra-gastrique 11 administrations de WEA (100 µg), de fraction S300 (6 µg), de Dipeptidase, d'Aminopectidase ou de PGI (4 µg chacune).

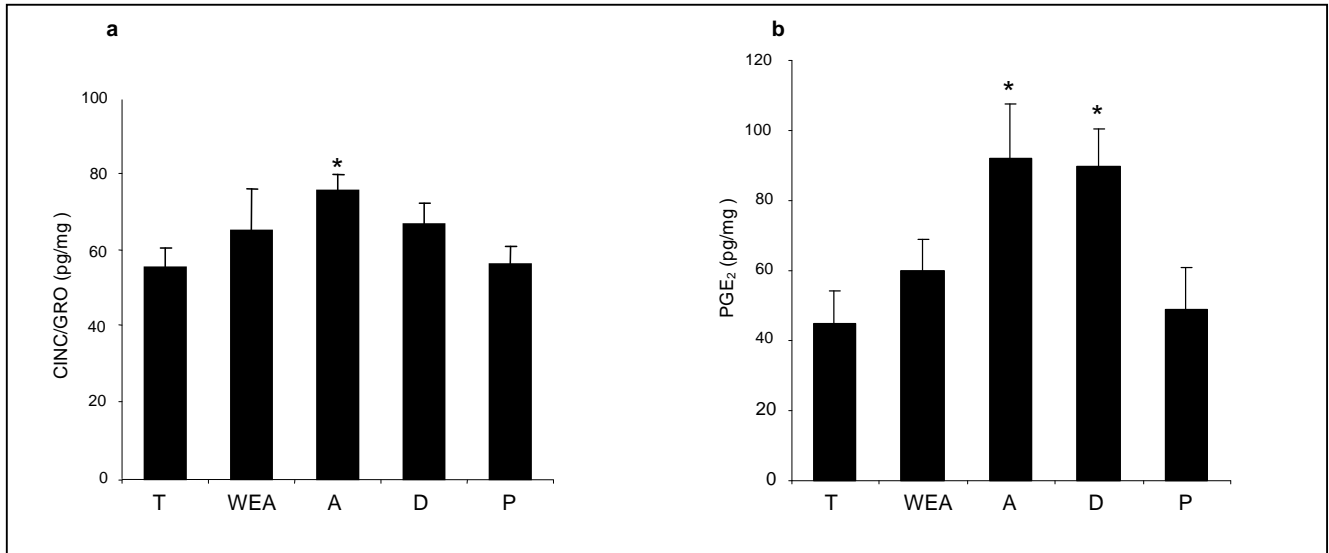


Figure 55: Dosage de CINC/GRO (a) et des PGE₂ (b) dans les muqueuses de rats traités à l'AOM puis avec les fractions WEA (100 µg) ou les protéines purifiées (4µg) de la paroi de *S. infantarius*. A : Aminopectidase, D : dipeptidase, P : PGI, T : rats contrôles traités avec l'AOM seul.

L'activité proinflammatoire a été testée en mesurant la libération des cytokines CINC/GRO ainsi que des PGE₂ dans les muqueuses coliques. Les résultats de ces dosages, représentés figure 55 sont exprimés en picogrammes de CINC/GRO ou PGE₂ par milligramme de protéines dosées dans le surnageant de muqueuse colique.

Nous avons vu dans les expériences précédentes que 6 µg de la fraction S300 induisaient une libération de CINC/GRO et de PGE₂, respectivement, 44 et 51% plus importante que celle mesurée dans les rats contrôles traités uniquement à l'AOM.

Dans cette expérience animale, nous voyons que l'Aminopectidase induit une libération de $75,9 \pm 3,96$ pg CINC/GRO /mg, ce qui représente une libération de 1,36 fois plus importante que celle observée dans les rats contrôles. Les deux autres protéines purifiées ont une activité comparable à celle du WEA et l'augmentation modérée observée n'est pas statistiquement significative. L'Aminopectidase et la Dipeptidase provoquent quasiment la même libération de PGE₂, respectivement, de $92,07 \pm 15,3$ pg /mg et $89,62 \pm 10,7$ pg /mg, c'est-à-dire environ 2 fois plus que les rats contrôles. La PGI semble sans activité proinflammatoire sur la muqueuse colique en ce concerne les PGs.

Il faut noter que ces effets ont été obtenus *in vivo* après administration de quantités bien plus faibles de chacune des 3 protéines purifiées (4µg) que de la fraction WEA (100 µg).

5.3. Activité pro-cancérogène *in vivo*

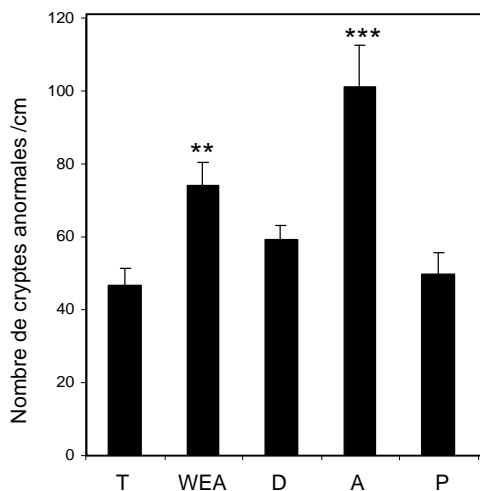


Figure 56 : quantification des cryptes anormales au niveau de la muqueuse du côlon distal de rats pré-traités à l'AOM puis avec les fractions WEA (100 µg) ou la Dipeptidase (D), l'Aminopeptidase (A) ou la PGI (P)(4µg). T : rats contrôles traités avec l'AOM seul.

Le comptage du nombre de cryptes anormales hyperprolifératives est toujours réalisé sur un segment de 5cm de longueur correspondant à la partie distale du côlon des mêmes rats chez lesquels ont été dosés les médiateurs de l'inflammation GRO/CINC et PGE₂. Les résultats sont présentés figure 56.

Les résultats montrent que tous les rats qui ont reçu de l'AOM ont développé des cryptes anormales quel que soit le traitement. Nous avons vu précédemment que l'administration de 100 µg de fraction WEA et de 6 µg de fraction S300 entraîne une augmentation du nombre de cryptes anormales, respectivement de 1,5 fois et de 2,1 fois par rapport aux rats contrôles.

Parmi les trois protéines purifiées, l'Aminopeptidase est celle qui présente la plus forte activité promotrice sur la formation des cryptes anormales. Ainsi, les animaux ayant reçu 4 µg de cette protéine présentent 2,2 fois plus de cryptes anormales que les rats témoins et 1,4 fois plus que les rats traités avec 100 µg de WEA.

La PGI n'a pas d'effet décelable sur la promotion de cryptes anormales et l'effet modéré de la Dipeptidase n'est pas statistiquement significatif (tableau 6)

traitements	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>		
	IL-8 ng/ml	PGE ₂ ng/ml	CINC/GRO pg/ml	PGE ₂ pg/ml	CA/cm
Témoin	-	-	55,8	44,87	46,6
WEA	24,9	2,6	65,3	60,13	74,3
S300	125	13	79,5	90,1	92
Amino pep	195	221	75,9	92,07	101,1
Dipep	281	142	67,1	89,62	59,03
PGI	195	154	56,3	48,83	49,9

Tableau 6 : récapitulatif de la libération des médiateurs proinflammatoires *in vivo* et *in vitro* et de la quantification des cryptes anormales chez les rats traités avec les différentes protéines de paroi de *S. infantarius*.

6. LE COMPLEXE HPM

6.1. Purification

Un complexe protéique de très haute masse moléculaire est constamment présent dans toutes les fractions actives du point de vue inflammatoire (WEA, MonoQ et S300) et toutes les approches en spectrométrie de masse ont échoué à l'identifier (figure 57).

Afin de le caractériser, nous avons d'abord cherché à le purifier. Après immunisation d'un lapin avec ce complexe HPM, des anticorps polyclonaux ont été obtenus, et la fraction IgG a été couplée à un gel de Sepharose afin de préparer une colonne d'immunoaffinité. La séparation du WEA sur cette colonne nous a permis de purifier un complexe protéique contenant plusieurs protéines dont une majoritaire de 50 kDa .

D'autres protéines, notamment vers 200 kDa, 100 kDa et 35 kDa, semblent avoir été purifiées mais en quantité minoritaire. Ces résultats suggèrent que ce complexe est sans doute constitué d'un agglomérat de protéines qui, au cours des étapes de purification, s'est désagrégé. Il est aussi possible que cette protéine soit reliée à la membrane bactérienne et que des fragments membranaires aient pu être entraînés lors de son extraction. Lors de la purification par immunoaffinité, l'élution de la protéine nécessite une étape en milieu acide (pH 2,2) qui a pu permettre l'extraction de ces fragments.

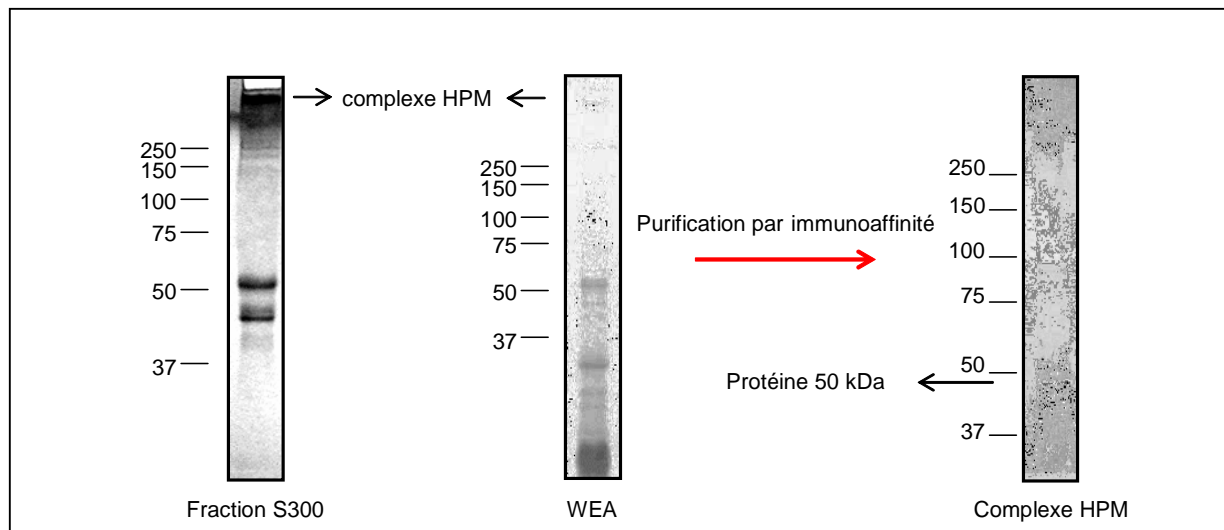


Figure 57 : Purification du complexe HPM par immunoaffinité

Les IgG utilisées pour la colonne d'immunoaffinité ont été obtenues après immunisation d'un lapin avec le complexe HPM du WEA. Nous avons donc vérifié que ces IgG reconnaissaient la même bande dans la fraction S300. La fraction S300 et le complexe HPM ont été séparés par SDS-PAGE 7,5% en conditions dénaturantes puis transférés sur une membrane PVDF. L'incubation séquentielle de la membrane avec les anticorps polyclonaux anti-complexe HPM puis les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à la HRP et enfin le substrat de la HRP a permis de mettre en évidence la présence du complexe HPM dans la fraction S300 (figure 58).

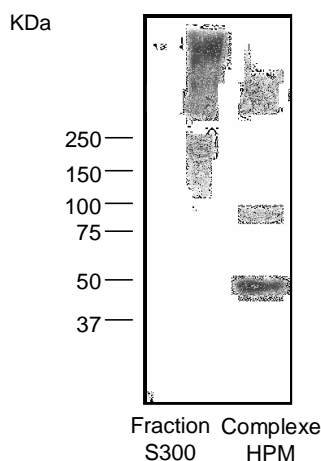


Figure 58 : Révélation de la fraction S300 et du complexe HPM par les IgG anti-HPM

Cette figure montre que toutes les protéines purifiées par immunoaffinité ainsi que celle localisée dans le pré-gel de la fraction S300 sont reconnues par les mêmes anticorps. Elle confirme la présence d'un complexe HPM dans la fraction S300.

6.2. Propriétés proinflammatoires et procancéreuses

6.2.1. Propriétés proinflammatoires *in vitro*

Les cellules Caco-2 ont été incubées en présence de 50 µg/mL du complexe HPM pendant 20h à 37°C. La libération d'IL-8 et de PGE₂ a ensuite été mesurée par ELISA dans les surnageants de culture (figure 59).

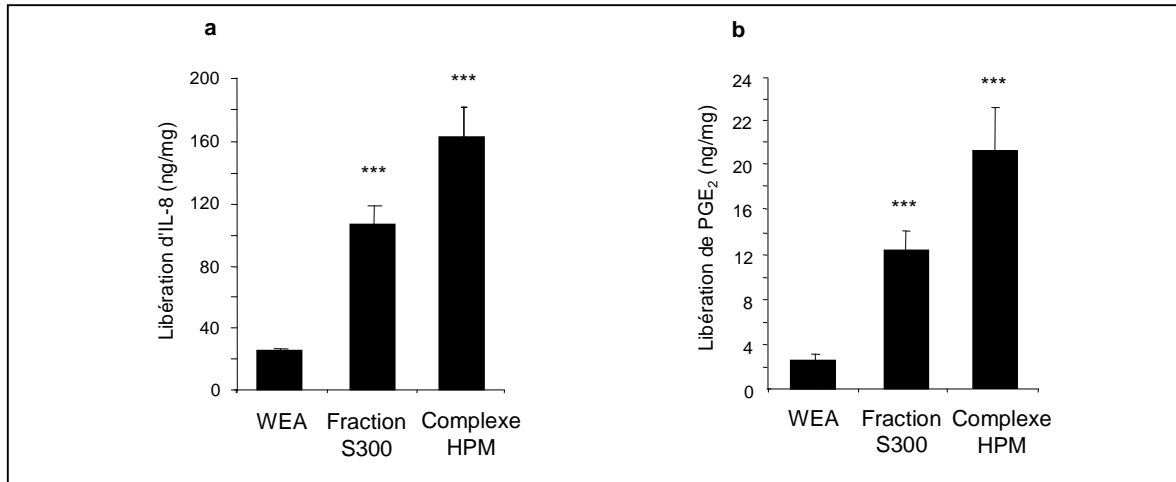


Figure 59 : Libération d'IL-8 (a) et de PGE₂ (b) par les cellules Caco-2 activées avec les fractions WEA, S300 et avec le complexe HPM. Toutes les fractions protéiques sont utilisées à 50 µg/mL.

Les résultats sont exprimés en activité spécifique. Les résultats montrent que le complexe HPM induit une libération d'IL-8 par les cellules Caco-2 avec une activité de 163 ± 19 ng/mg et de PGE₂ avec une activité de $21,3 \pm 3,9$ ng/mg. Ces activités spécifiques sont environ 1,5 et 1,7 fois plus importantes que celles de la fraction S300.

6.2.2. Activité pro-cancéreuse *in vivo*

Les rats ont été pré-traités à l'azoxyméthane puis, ont reçu par gavage intra-gastrique 11 administrations du WEA (100µg), de la fraction S300 (6 µg) et du complexe HPM (6 µg). Le nombre de cryptes anormales, comptées sur 5 cm de côlon distal de chaque rat, est représenté par la figure 60.

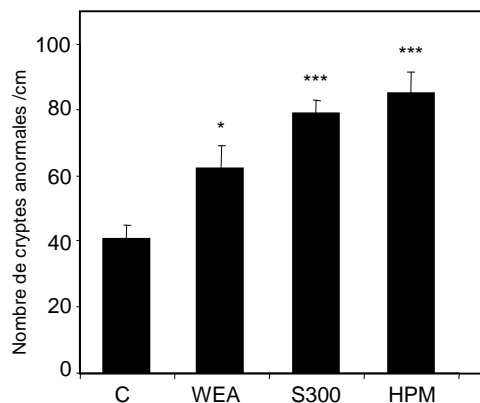


Figure 60 : quantification des cryptes anormales au niveau de la muqueuse du côlon distal de rats pré-traités à l'AOM puis avec les fractions WEA (100 µg), la fraction S300 (6 µg) ou le complexe HPM (6 µg).

Les résultats montrent que tous les rats qui ont reçu de l'AOM ont développé des cryptes anormales quel que soit le traitement. L'administration de 6 μ g de complexe HPM entraîne une augmentation du nombre de cryptes anormales de 2,3 fois par rapport aux rats contrôles alors que cette augmentation était respectivement de 1,5 et 2,1 fois suite à l'administration des fractions WEA et S300.

6.3. Identification du complexe HPM

Les protéines du complexe HPM a été purifiée par séparation de la fraction WEA sur colonne d'immunoaffinité couplée aux anticorps polyclonaux anti-HPM. Ces protéines sont séparées sur gel en 2-dimensions avec un éventail de pH choisi de 3 à 10 (figure 61). Les différents spots colorés au bleu (80 spots isolés) sont analysés par nanoLC-MS/MS et par séquençage *de novo* et les protéines identifiées sont réunies dans le tableau 7.

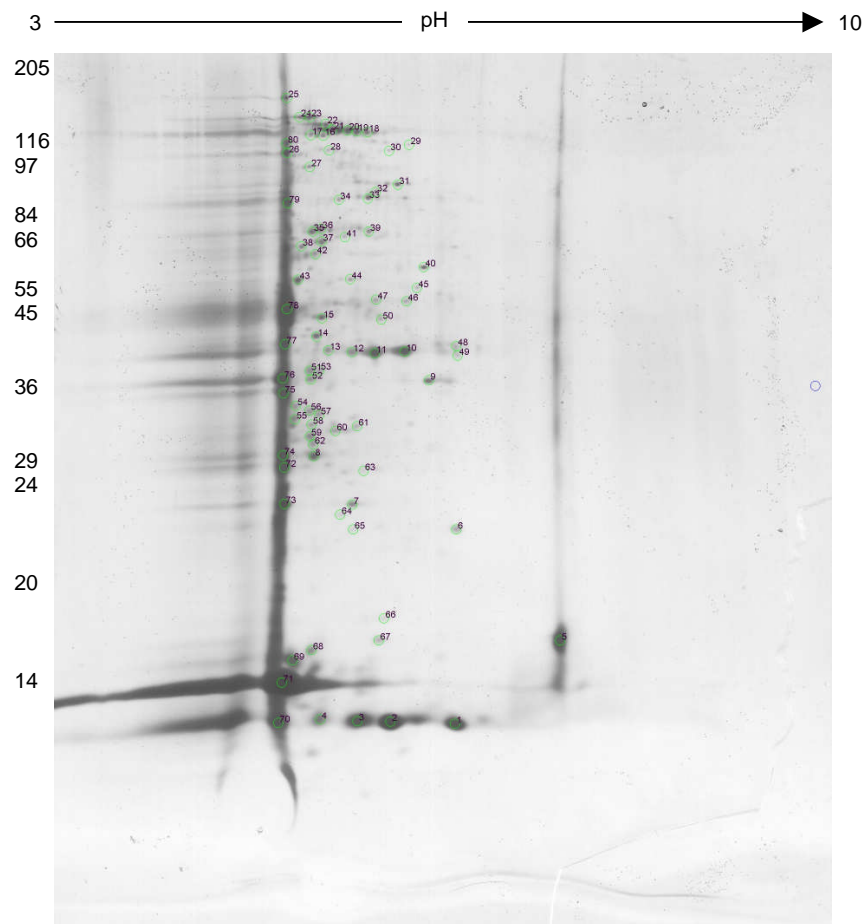


Figure 61 : Séparation bidimensionnelle des protéines du complexe HPM purifié par chromatographie d'immunoaffinité selon un éventail de pH 3-10.

numéro spot	Accession	Identification	Organisme	MW
5	gi 4958915	histidine containing protein (phosphocarrier protein)	Streptococcus bovis	8932
6	gi 19747714	putative ribosome recycling factor	Streptococcus pyogenes	20518
8	gi 17988895	Glycine betaine/L-proline-binding protein prox	Brucella melitensis 16M	31810
9	gi 34808827	FimB	Streptococcus gallolyticus	34547
14	gi 23348647	amino acid-binding protein, putative	Brucella suis 1330	39376
15	gi 15900413	phosphoglycerate kinase	Streptococcus pneumoniae TIGR4	41883
37	gi 15900780	pyruvate kinase	Streptococcus pneumoniae TIGR4	54720
48	gi 417185	Leukocyte elastase inhibitor	Sus scrofa	42486
49	-	pas d'identification	-	-
50	gi 12619268	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Streptococcus pneumoniae	32896
52	-	pas d'identification	-	-
53	gi 55821590	ATP-dependent proteinase ATP-binding subunit	Streptococcus thermophilus LMG 18311	77136
55	gi 15900087	lipoprotein	Streptococcus pneumoniae TIGR4	31158
57	gi 17983192	general L-amino acid-binding periplasmic protein AAPJ precursor / Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	Brucella melitensis 16M	37086
58	gi 2804692	dTDP-L-rhamnose synthase	Streptococcus pneumoniae	32313
65	gi 1813346	dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase	Streptococcus mutans	22350
66	-	pas d'identification	-	-
68	gi 24376916	peroxide resistance protein Dpr	Streptococcus mutans UA159	19577
	gi 28895592	putative peroxide resistance protein	Streptococcus pyogenes SSI-1	19351
69	gi 24376916	peroxide resistance protein Dpr	Streptococcus mutans UA159	19577
	gi 28895592	putative peroxide resistance protein	Streptococcus pyogenes SSI-1	19351
70	gi 4958915	histidine containing protein	Streptococcus bovis	8932
71	gi 4958915	histidine containing protein	Streptococcus bovis	8932
	gi 27528470	superoxide dismutase	Streptococcus infantarius subsp. infantarius	15786
73	gi 39653805	GroEL	Streptococcus bovis	24040
74	gi 55820218	heat shock protein, chaperonin	Streptococcus thermophilus LMG 18311	64738
75	gi 13623082	putative elongation factor TS	Streptococcus pyogenes M1 GAS	37204
77	gi 34102992	probable ABC transporter, periplasmic binding protein	Chromobacterium violaceum ATCC 12472	39134
78	gi 50590038	COG5295: Autotransporter adhesin	Streptococcus suis 89/1591	50944

Tableau 7 : Identification des protéines présentes dans complexe HPM par nano LC-MS/MS et séquençage de novo.

7. RECHERCHE DES PRRs

Le complexe HPM présente des activités proinflammatoires *in vitro* encore plus importantes que la fraction S300. La libération des médiateurs tels que l'IL-8 et les PGE₂ pourrait être médiée par des mécanismes impliquant en amont des interactions de PAMPs de *S. infantarius* avec des récepteurs PRRs à la surface des cellules Caco-2. Le but de ce travail a consisté à mettre en évidence ce ou ces PRRs qui pourraient interagir avec le complexe HPM.

Pour cela deux approches ont été développées : l'utilisation du complexe biotinylé et une expérience de « ligand affinity blotting ».

7.1. Biotinylation du complexe HPM

Après purification du complexe HPM sur immunoadsorbant, il est biotinylé sur ces groupements carboxyles et amines avec une solution de biotine. Sa biotinylation est vérifiée par Western Blot, la biotine étant révélée par de l'avidine-HRP. Le Western Blot du complexe HPM biotinylé montre l'existence de deux bandes dont un PAMP majeur de masse moléculaire 50 kDa et l'autre d'environ 100 kDa (figure 62). Ces bandes sont également reconnues par les anticorps anti-HPM, ce qui confirme la biotinylation efficace du complexe.



Figure 62: Western Blot du complexe HPM biotinylé détecté par l'avidine-HRP

7.2. Détermination de deux bandes protéiques par "Ligand Affinity Blotting"

Les extraits membranaires des cellules Caco-2 ou THP-1 séparés par SDS-PAGE 10% dans des conditions dénaturantes puis transférés sur une membrane de PVDF qui est incubée avec le complexe HPM biotinylé. Les protéines biotinyliées sont révélées avec de l'avidine couplée à la HRP. Le Western Blot montre que le complexe HPM se fixe à deux protéines présentes dans les extraits membranaires de THP1 qui migrent à 70 et 30 kDa (figure 63).

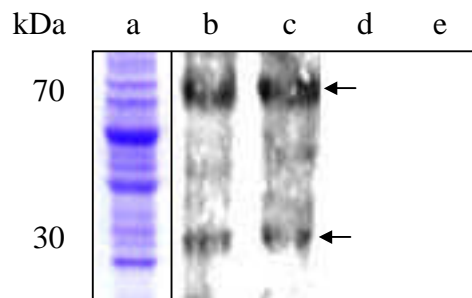


Figure 63 : Mise en évidence par « ligand affinity blotting » des protéines membranaires des cellules THP-1 interagissant avec les protéines du complexe HPM. Extrait membranaire de cellules THP-1 séparé par SDS-PAGE et coloré au bleu de Coomassie (a), membrane incubée avec le complexe HPM biotinylé (b), membrane incubée avec le complexe HPM non marqué reconnu par les IgG anti-HPM (c), contrôle négatif sans complexe HPM biotinylé (d) ou sans IgG anti-HPM (e).

Pour confirmer ces résultats, les mêmes extraits membranaires transférés sur nitrocellulose après SDS-PAGE, sont séquentiellement incubés avec le complexe HPM non-biotinylé (0,1mg/mL), des IgG de lapin anti-HPM (dilués au 1/100 dans PBS 5 mM pH 7,2), des anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase et son substrat chimioluminescent. Les résultats obtenus confirment la présence des deux bandes de 30 kDa et de 70 kDa dans les extraits membranaires des THP-1.

Nous n'avons pas réussi à détecter de signal dans le cas des protéines membranaires des cellules Caco-2 en utilisant le complexe HPM biotinylé ou non.

DISCUSSION

Les voies de recherche actuelles mises en œuvre pour mieux comprendre le rôle de la flore commensale dans l'initiation ou la progression du CCR sont principalement :

le développement de modèles murins qui reproduisent le plus fidèlement possible la multiplicité des facteurs génétiques impliqués dans le CCR sporadique chez l'homme

l'étude des modèles animaux existants pour identifier les composants de cette flore commensale qui favorise l'inflammation intestinale et le CCR

l'exploration des mécanismes par lesquels ces bactéries ou leurs produits pourraient induire ou altérer l'expression de la COX-2

l'exploration des mécanismes par lesquels ces bactéries ou leurs produits agiraient comme mutagènes

et enfin l'étude de l'influence du terrain génétique sur la composition de la flore commensale.

La thématique de laboratoire, qui s'attache à étudier les mécanismes d'implication de *S. infantarius* dans la promotion du cancer colorectal, s'inscrit parfaitement dans ces voies de recherche. L'objectif de ce travail a été de caractériser les PAMPs protéiques de la paroi de *S. infantarius* impliqués dans ses effets proinflammatoires et procancérogènes sur l'épithélium colique.

Nous avons, dans un premier temps, identifié par spectrométrie de masse les protéines constituant une fraction semi-purifiée, que nous avons appelée fraction S300, et celles appartenant à un complexe HPM de très haut poids moléculaire. Cette fraction S300 ainsi que ce complexe HPM présentent un pouvoir proinflammatoire et une activité procancérogène qui ont été démontrés par une approche *in vitro*, en utilisant comme modèle les cellules épithéliales coliques humaines Caco-2, et une approche *in vivo* avec un modèle animal de cancérogenèse colique chimio-induite chez le rat.

La fraction S300 a été isolée à partir du WEA, constitué de l'ensemble des antigènes de la paroi de *S. infantarius*, par deux chromatographies successives, d'abord sur colonne échangeuse d'anions de type MonoQ puis sur colonne d'exclusion de type Sephacryl.

La production chez le lapin d'anticorps polyclonaux dirigés contre le complexe HPM nous a permis de réaliser une colonne d'immunoaffinité qui a abouti à la purification d'un complexe à partir du WEA contenant des protéines majoritaires d'environ 50 et 100 kDa. Les masses de ses protéines laissent à penser que le complexe HPM est un agrégat de protéines qui semble être dissocié en conditions acides.

Nous avons ensuite cherché à déterminer quelles protéines parmi celles qui avaient été identifiées dans la fraction S300 étaient particulièrement responsables de ses effets proinflammatoires et/ou procancéreux.

Enfin nous avons débuté la caractérisation des récepteurs cellulaires ou PRRs associés au complexe HPM qui pourraient être impliqués dans les voies de signalisation activées lors de la libération des médiateurs inflammatoires et/ou de la cancérogenèse colorectale.

Activité pro-inflammatoire des protéines de *Streptococcus infantarius*

Des études antérieures menées au laboratoire avaient montré que la fraction WEA était pro-inflammatoire et pro-cancérogène (Ellmerich *et al.*, 2000b). En poursuivant ces travaux de Ellmerich, nous avons démontré que les protéines de la fraction S300, purifiée à partir du WEA, sont capables d'interagir avec les cellules Caco-2 pour induire la libération d'IL-8, qui favorise le recrutement de leucocytes et pourrait contribuer à la mise en place d'une inflammation chronique. L'activation des leucocytes peut conduire à la libération de multiples médiateurs inflammatoires (ROS et RNS, cytokines, prostaglandines) qui pourraient interagir directement ou indirectement avec la prolifération cellulaire et l'apoptose. De la même façon, Sharma *et al.* ont montré qu'une infection à *H. pylori-cag+* induisait une forte libération d'IL-8 corrélée à la sévérité de la réponse inflammatoire chez les patients (Sharma *et al.*, 1998). Cette bactérie est également associée à un plus grand risque de gastrite atrophique et de carcinome gastrique.

Nous avons ensuite montré que cette fraction S300 induit une libération de PGE₂ de plus de 4 fois plus importante que celle obtenue avec les cellules Caco-2 incubées avec la fraction WEA. Il a été montré, dans une autre étude, que cette libération de PGE₂ est corrélée à une surexpression de COX-2. La surexpression de la COX-2 dans le cancer du côlon ainsi que la réduction de l'incidence de ce cancer chez les individus traités aux AINS suggèrent que les prostaglandines, ainsi que la diminution du stock d'acide arachidonique intracellulaire, sont des acteurs contribuant à la cancérogenèse. En effet, l'activation de la COX-2 peut stimuler la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et inhiber l'apoptose dont les effets peuvent être favorables à l'initiation et au développement d'un cancer.

Nous avons montré que cette fraction S300 induit la libération de CINC/GRO dans les muqueuses de rat. Ces chimiokines sont des homologues de l'IL-8 chez le rat et agissent de la même manière *in vivo* en stimulant les mêmes récepteurs que cette interleukine. La libération d'IL-8 ou de CINC/GRO *in vivo* est associée à un recrutement de neutrophiles ainsi qu'à un taux de mutations important dans l'ADN (Haqqani *et al.*, 2000). Lors de cette expérience

animale, nous avons observé une libération de PGE₂ dans les muqueuses qui confirmait l'activité pro-inflammatoire de la fraction S300.

D'autre part, la mesure de l'activité pro-inflammatoire *in vitro* du complexe HPM a montré que ce dernier induit une forte libération d'IL-8 et de PGE₂ avec des activités spécifiques respectives de 1,5 fois et 1,7 fois celles de la fraction S300.

Activité pro-cancérogène des protéines de *Streptococcus infantarius*

Notre modèle chez le rat consiste à induire chimiquement à l'azoxyméthane des lésions précancéreuses au niveau du côlon de rats puis de tester l'effet des différentes fractions purifiées sur cet état précancéreux. L'azoxyméthane, transformé en méthylazométhanol, provoque des méthylation dans l'ADN entraînant des erreurs de lecture ainsi que des mutations dans les gènes importants dans la cancérogenèse comme *apc* (Maltzman *et al.*, 1997), *Ki-ras* ou *p53* (Erdman *et al.*, 1997). Suite au traitement des rats par l'AOM, les cryptes de la muqueuse développent un caractère anormal en acquérant des propriétés hyperprolifératives. Ces cryptes peuvent ensuite évoluer vers des adénomes ou polypes qui eux-même peuvent se développer en carcinome. Les changements morphologiques chez le rat sont biologiquement et histologiquement très proches de ceux observés chez l'homme, à l'exception de la formation de métastases qui sont inexistantes chez le rat.

L'administration de la fraction S300 ou du complexe HPM aux rats provoque, dans la muqueuse colique, un effet promoteur sur les lésions pré-cancéreuses induites par l'injection d'AOM. Nos résultats sont similaires à ceux montrés par Newman *et al.*, qui ont observé qu'une infection à *C. rodentium* chez la souris induit une hyperprolifération de la muqueuse colique caractérisée par la formation de cryptes anormales (Newman *et al.*, 2001).

L'utilisation de seulement 6 µg/gavage/rat de fraction S300 indique un effet pro-cancérogène nettement supérieur par rapport à celui de la fraction WEA qui a été utilisée à 100 µg/gavage/rat. Le complexe HPM présente lui-même un pouvoir promoteur un peu important encore que la fraction S300, puisque, administré en même quantité, il provoque la formation d'un plus grand nombre de lésions précancéreuses dans la muqueuse coliques des rats.

Les résultats de ces expériences *in vivo* et *in vitro* confirment le lien qui existe entre l'inflammation et la cancérogenèse colorectale. En effet, ces données corroborent l'hypothèse que des bactéries contribuent au développement tumoral, particulièrement dans les cas d'infection et inflammation chroniques où des constituants bactériens peuvent induire la libération de médiateurs qui peuvent entraîner la formation de mutations dans le génôme de

l'hôte et peuvent influencer les cellules en interférant avec les systèmes de régulation de la prolifération cellulaire. Notre système pourrait constituer un modèle de CRC sporadique associé aux bactéries et à l'inflammation et fournir des outils pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus.

Une expérience animale similaire a été réalisée chez des souris à qui des bactéries *H. pylori* avaient été administrées tous les mois pendant 12 mois. Les auteurs montraient qu'une gastrite se déclarait au bout de 6 mois mais qu'il fallait attendre 12 mois pour voir apparaître une hyperprolifération dans la muqueuse gastrique (Touati *et al.*, 2003). Dans notre modèle, les administrations de *S. infantarius* ou de ses PAMPs sont réalisées toutes les semaines sur périodes de 5 semaines seulement. Dans nos conditions, nous avons montré que la bactérie était capable d'aggraver l'état précancéreux chimio-induit mais n'induisait pas la formation de cryptes anormales au niveau de la muqueuse colique. Cependant, une administration plus longue devrait confirmer ou non le fait que *S. infantarius* ne soit pas seulement un promoteur mais pourrait également être un initiateur de cancer.

Caractérisation des protéines de la fraction S300

Limités par les quantités de fraction S300 obtenues après deux chromatographies successives, nous avons poursuivi notre étude pour la caractérisation des protéines de cette fraction par spectrométrie de masse. Une première caractérisation des protéines de la fraction S300 après séparation sur gel 1-D, nous a permis de caractériser 6 bandes protéiques (sur les 9 apparentes) et de les associer à 5 protéines différentes. La séparation sur gel 2-D nous a permis de révéler un nombre plus important de spots mais qui ont été associées à seulement 11 protéines différentes. En effet, la migration bidimensionnelle des protéines permet de séparer plusieurs isoformes d'une même protéine comportant des modifications post-traductionnelles différentes.

Nous avons choisi de concentrer nos efforts sur trois protéines identifiées dans cette fraction S300 : la Dipeptidase A, l'Amino-peptidase C et la Glucose-6-phosphate isomérase (PGI). Au vu des données relevées dans la littérature, ces protéines nous paraissaient les plus intéressantes pour remplir un rôle possible dans l'infection, la virulence ou la pathogénèse liée à *S. infantarius*.

Les autres protéines contenues dans la fraction S300 sont impliquées dans la protection contre les radicaux libres (superoxyde dismutase), dans la synthèse d'acides aminés (NADPH spécifique glutamate déshydrogénase) ou encore dans le métabolisme énergétique (lactate déshydrogénase, aldolase de classe II, éno-lase). La protéine chaperonne, GroEL, qui, par son

caractère ubiquitaire chez les organismes vivants, ne semble pas être un candidat intéressant pour une fonction propre à *S. infantarius* dans la pathogenèse colique. Les autres protéines ne semblent pas intervenir dans l'inflammation, ni dans la cancérogenèse. Cependant, on ne peut pas exclure qu'elles n'aient pas d'autres fonctions, encore inconnues, qui pourraient les favoriser. En effet, des données récentes ont permis de mettre en évidence de nombreuses fonctions pour des protéines du métabolisme énergétique. Par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate a été identifiée comme une protéine liant le plasminogène ou encore liant la transferrine (Modun et Williams, 1999). La superoxyde dimutase a été identifiée comme étant un facteur de virulence localisé dans le périplasme de *Salmonella enterica* serovar typhi et de *Listeria monocytogenes* (Fang *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 1997)

- Dipeptidase A :

IL existe quelques données bibliographiques concernant une association probable entre les protéines identifiées et leur implication dans l'infection ou l'inflammation. Bien que le rôle des dipeptidases reste encore obscur, il semblerait qu'elles puissent participer au complexe protéolytique présent à la surface de la bactérie et intervenant dans la dégradation des protéines de l'hôte agressé et qu'elles puissent être impliquées dans la virulence bactérienne (Rasmussen et Bjorck, 2002). Ji *et al.* ont montré qu'une protéase de surface, la C5a peptidase, jouait un rôle dans la virulence dans un modèle murin (Ji *et al.*, 1996). Goldstein *et al.* ont caractérisé deux protéases chez *S. gordonii*, bactérie qui est impliqué dans le développement de l'endocardite (Goldstein *et al.*, 2001). L'une d'elles, l'arginine aminopeptidase RAP extracellulaire présente une forte homologie de séquence avec des dipeptidases de bactéries à gram +, notamment avec l'une de *S. pyogenes* qui semblerait être exportée à la surface de la bactérie. Ces deux peptidases pourraient jouer un rôle dans la protéolyse du tissu hôte observé habituellement lors des endocardites (Goldstein *et al.*, 2002).

Des études récentes ont montré que la Dipeptidyl peptidase IV était impliqué dans la cancérogenèse en catabolisant les peptides biologiquement actifs qui sont important dans la régulation de l'environnement de la tumeur (Busek *et al.*, 2004).

- Glucose-6-phosphate isomérase ou phosphoglucose isomérase (PGI):

Cette protéine catalyse l'isomérisation du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Mais excrétée hors de la cellule mammifère, la PGI sous forme monomérique fonctionne comme une neuroleukine, un facteur de motilité tumoral (AMF) et un facteur de maturation et de différenciation (MF). Ainsi toutes ces protéines sont capables d'augmenter la survie des

neurones spinaux et sensitifs, d'induire la différenciation des cellules myéloïdes leucémiques humaines (Xu *et al.*, 1996) et de provoquer la migration des cellules cancéreuses (Watanabe *et al.*, 1996). En effet, il a été également montré que la PGI bactérienne pouvait stimuler la motilité des cellules tumorales CT-26 du côlon de souris (Chou *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 1999). Ces résultats sont controversés puisque une étude a montré que la PGI issue de bactéries ou de levures ne stimulait pas la motilité des fibroblastes NIH-3T3 (Amraei et Nabi, 2002)

Cette PGI est, de plus, détectée en forte concentration chez les patients atteints de cancers du sein, des reins et gastro-intestinaux (Baumann *et al.*, 1990). Il s'est également avéré qu'elle favorisait la formation de métastases en induisant l'expression d'intégrines β_1 (Torimura *et al.*, 2001). Sa fonction "isomérase" semble liée à un motif C-X-X-C que l'on retrouve également dans la cytokine MIF, qui a une action inhibitrice de p53. En effet, en mutant ce motif, on empêche son activité enzymatique mais pas son activité cytokine, ni sa liaison au récepteur de l'AMF.

Même si cette protéine ne semble pas agir dans l'initiation des cancers, elle pourrait quand même jouer un rôle important dans le développement d'un cancer associé à *S. infantarius* et dans l'invasion métastatique.

La PGI de *Vibrio vulnificus*, une bactérie marine qui cause des septicémies chez les sujets immunodéprimés, peut être excrétée dans le milieu de culture ou associée à la surface de la membrane. Curieusement, cette enzyme possède une activité aminopeptidase lorsqu'elle est présente sous forme hétérodimérique et une activité isomérase sous forme monomérique (Richards *et al.*, 2004).

- L'Aminopeptidase C :

Les aminopeptidases sont des exopeptidases qui clivent les peptides à partir de leur extrémités amino-terminales. Ces enzymes sont impliquées dans des réactions biologiques diverses telles que la digestion, la maturation et la dégradation des protéines et également la régulation des taux d'hormones et le contrôle du cycle cellulaire. Les aminopeptidases sont reconnus comme des acteurs importants dans certaines pathologies comme l'inflammation, le cancer, les fibroses, le diabète et les infections bactériennes. (Holz *et al.*, 2003; Taylor, 1993a; Taylor, 1993b). Mais le mécanisme d'action de ces aminopeptidases reste encore inconnu.

Ces données confirment que les protéines de la fraction S300 pourraient être associées à la liste des PAMPs pour "pathogens-associated molecular patterns" qui, après s'être liés à leur récepteur PRR pour "pattern recognition receptor" sur les cellules hôtes pourraient interagir

avec diverses voies de signalisation pour induire une réponse inflammatoire, une prolifération cellulaire puis la transformation des cellules.

Nous avons montré que la Dipeptidase, l'Aminopectidase et la PGI sont capables de stimuler une très forte libération des médiateurs de l'inflammation, IL-8 et PGE₂, par les cellules Caco-2. Mais cette activité pro-inflammatoire *in vitro* n'est pas toujours corrélée avec l'effet *in vivo*. En effet, seule l'Aminopectidase semble induire une forte libération, encore plus importante que celle provoquée par la fraction S300, des deux médiateurs inflammatoires dans la muqueuse colique des rats de notre modèle de CCR induit par l'AOM. La Dipeptidase ne semble provoquer un effet important que sur la production de prostaglandine et produit le même effet que le WEA sur la libération de CINC/GRO. Mais seule l'Aminopectidase présente une activité procancérogène plus importante que la fraction S300 dans notre modèle animal. Les deux autres protéines n'ont pas ou très peu de pouvoir cancérogène puisqu'elles n'induit pas plus de cryptes anormales que la fraction WEA voire que l'AOM seul.

Ainsi l'Aminopectidase est la seule protéine parmi les 3 isolées de la fraction S300 à induire une forte réponse inflammatoire *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une aggravation marquée des lésions préinduite par l'AOM dans la muqueuse colique de rats, corrélée à une stimulation de la prolifération ces cellules Caco-2 observée *in vitro*.

La taille du focus de cryptes anormales est un critère important dans l'évolution tumorale et l'observation de ce critère renforce la conclusion du puissant pouvoir promoteur de l'Aminopectidase sur le développement des lésions précancéreuses colique. En effet, elle induit la formation d'un très grand nombre de focus à plus de 6 cryptes, bien plus important que les autres protéines.

Caractérisation du complexe HPM

La séparation de la fraction WEA sur une colonne d'immunoaffinité nous a permis de purifier le complexe HPM dont les protéines ont pu être identifiées par l'analyse du gel bidimensionnel en spectrométrie de masse.

Les protéines identifiées ont des fonctions dans divers processus cellulaires tels :

- le métabolisme énergétique (glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase, phosphoglycérate kinase, pyruvate kinase)
- Protéines de stress (GroEL, chaperonine, superoxide dismutase, Dpr, sous-unité de liaison à l'ATP de la protéinase dépendante de l'ATP)

- Synthèse de la paroi (dTDP-L-rhamnose synthase, dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase)
- Traduction (facteur d'élongation Ts)
- Les protéines de transport ou de liaison (transporteur ABC, protéine phosphocARRIER Hpr, lipoprotéine, adhésine autotransporteur, FimB, glycine betaine/L-proline-binding protein prox)
- Autre catégorie (inhibiteur de l'élastase leucocytaire)

Les Hpr protéines, contenant des histidines, sont des composants du système PTS, système de phosphotransférase du sucre dépendant du phosphoénol-pyruvate, qui est un système majeur de transport actif des sucres.

FimB est un membre de la famille des adhésines LraI et est impliqué dans l'adhérence des souches *S. gallolyticus*, causant des endocardites, au fibrinogène de la matrice extracellulaire. Cette lipoprotéine FimB est trouvée dans l'espace périplasmique des bactéries Gram +. Cette adhésine peut intervenir dans la virulence et l'invasion bactérienne.

Les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette transporter) sont des protéines présentes également dans l'espace périplasmique et peuvent être des systèmes de transport des sucres ou des peptides vers le cytoplasme de la bactérie. Ces systèmes sont constitués d'une sous-unité lipoprotéique ancrée dans la membrane jouant le rôle de canal qui permet le transport actif du substrat et une sous-unité ATPasique qui fournit l'énergie nécessaire au transport. Il a été montré que le transporteur ABC de *S. pneumoniae* pouvait jouer un rôle dans la virulence de la bactérie (Johnston *et al.*, 2004; Whalan *et al.*, 2006).

BIBLIOGRAPHIE

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A and Kemler R (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**:3797-804.
- Agro A, Langdon C, Smith F and Richards CD (1996) Prostaglandin E2 enhances interleukin 8 (IL-8) and IL-6 but inhibits GM-CSF production by IL-1 stimulated human synovial fibroblasts in vitro. *J Rheumatol* **23**:862-8.
- Ahn B and Ohshima H (2001) Suppression of intestinal polyposis in Apc(Min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. *Cancer Res* **61**:8357-60.
- Akira S (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**:5-11.
- Akre K, Ekstrom AM, Signorello LB, Hansson LE and Nyren O (2001) Aspirin and risk for gastric cancer: a population-based case-control study in Sweden. *Br J Cancer* **84**:965-8.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-8.
- Al-Ghoul L, Wessler S, Hundertmark T, Kruger S, Fischer W, Wunder C, Haas R, Roessner A and Naumann M (2004) Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of Helicobacter pylori-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **322**:860-6.
- Aliprantis AO, Weiss DS, Radolf JD and Zychlinsky A (2001) Release of Toll-like receptor-2-activating bacterial lipoproteins in Shigella flexneri culture supernatants. *Infect Immun* **69**:6248-55.
- Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S and Mantovani A (2000) The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev* **177**:141-9.
- Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, Hussain SP, Tzeng EE, Geller DA, Billiar TR and Harris CC (1998) p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nat Med* **4**:1371-6.
- Amraei M and Nabi IR (2002) Species specificity of the cytokine function of phosphoglucose isomerase. *FEBS Lett* **525**:151-5.
- Araki K, Ogata T, Kobayashi M and Yatani R (1995) A morphological study on the histogenesis of human colorectal hyperplastic polyps. *Gastroenterology* **109**:1468-74.
- Arias AM, Brown AM and Brennan K (1999) Wnt signalling: pathway or network? *Curr Opin Genet Dev* **9**:447-54.
- Ashida M, Bito T, Budiyanoto A, Ichihashi M and Ueda M (2003) Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp Dermatol* **12**:445-52.
- Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chang CG, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Loehrs U and Waldman FM (2002) The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* **94**:1421-7.
- Backlund MG, Mann JR and Dubois RN (2005) Mechanisms for the prevention of gastrointestinal cancer: the role of prostaglandin E2. *Oncology* **69 Suppl 1**:28-32.
- Baier PK, Wolff-Vorbeck G, Eggstein S, Baumgartner U and Hopt UT (2005) Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res* **25**:2135-9.
- Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H and Rhee KH (1996) Increased oxidative DNA damage in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Cancer Res* **56**:1279-82.
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R and Vogelstein B (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**:217-21.

- Balentien E, Mufson BE, Shattuck RL, Derynck R and Richmond A (1991) Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation. *Oncogene* **6**:1115-24.
- Balish E and Warner T (2002) Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am J Pathol* **160**:2253-7.
- Ballet M, Gevigney G, Gare JP, Delahaye F, Etienne J and Delahaye JP (1995) Infective endocarditis due to Streptococcus bovis. A report of 53 cases. *Eur Heart J* **16**:1975-80.
- Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F and van Stolk RU (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* **348**:891-9.
- Barragan-Casas JM, Arroyo-Burguillo P, Sanz-Rojas P, Serrano-Heranz R and Sanchez-Fuentes D (2002) [Meningitis due to Streptococcus bovis biotype II. Clinical case and review of the literature]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **20**:537-8.
- Barthold SW (1979) Autoradiographic cytochemistry of colonic mucosal hyperplasia in mice. *Cancer Res* **39**:24-9.
- Barthold SW and Jonas AM (1977) Morphogenesis of early 1, 2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by a variant of Citrobacter freundii. *Cancer Res* **37**:4352-60.
- Baumann M, Kappl A, Lang T, Brand K, Siegfried W and Paterok E (1990) The diagnostic validity of the serum tumor marker phosphohexose isomerase (PHI) in patients with gastrointestinal, kidney, and breast cancer. *Cancer Invest* **8**:351-6.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A and Schall TJ (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**:640-4.
- Beebe JL and Koneman EW (1995) Recovery of uncommon bacteria from blood: association with neoplastic disease. *Clin Microbiol Rev* **8**:336-56.
- Beeching NJ, Christmas TI, Ellis-Pegler RB and Nicholson GI (1985) Streptococcus bovis bacteraemia requires rigorous exclusion of colonic neoplasia and endocarditis. *Q J Med* **56**:439-50.
- Bentires-Alj M, Dejardin E, Viatour P, Van Lint C, Froesch B, Reed JC, Merville MP and Bours V (2001) Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* **20**:2805-13.
- Beral V and Newton R (1998) Overview of the epidemiology of immunodeficiency-associated cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*:1-6.
- Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* **70**:567-90.
- Biarç J, Nguyen IS, Pini A, Gosse F, Richert S, Thierse D, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP and Scholler-Guinard M (2004) Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from Streptococcus infantarius (formerly S.bovis). *Carcinogenesis* **25**:1477-84.
- Bienz M and Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**:311-20.
- Bird RP (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* **37**:147-51.
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.
- Bisno AL (1991) Streptococcal infection, in *Harrison's principles of internal medicine*. (McGraw-Hill ed) pp 563-9, New York.

- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN and Nomura A (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* **55**:2111-5.
- Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P and et al. (1987) Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* **328**:614-6.
- Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE, Botstein D, Staudt LM, Brown PO and Relman DA (2002) Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:972-7.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ and Vogelstein B (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**:293-7.
- Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F and Braesco V (2003) The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* **78**:675-83.
- Bouvet A (1994) Taxonomie des streptocoques et des entérocoques. *Bull. Soc. Fr. microbiol.* **9**:273-277.
- Bouvet A, Geslin P, Kriz-Kuzemenska P, Blanc V, Devine C and Grimont F (1994) Restricted association between biotypes and serotypes within group A streptococci. *J Clin Microbiol* **32**:1312-7.
- Bouvet A, Grimont F, Collins MD, Benaoudia F, Devine C, Regnault B and Grimont PA (1997) *Streptococcus infantarius* sp. nov. related to *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. *Adv Exp Med Biol* **418**:393-5.
- Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC and Burner GC (1994) Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **107**:369-78.
- Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J and Christmas SE (2000) Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* **12**:78-85.
- Brew R, Southern SA, Flanagan BF, McDicken IW and Christmas SE (1996) Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. *Eur J Cancer* **32A**:2142-7.
- Brigati C, Noonan DM, Albini A and Benelli R (2002) Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis* **19**:247-58.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A and et al. (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **368**:258-61.
- Burcham PC (1998) Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* **13**:287-305.
- Burns J, Barton C, Wynford-Thomas D and Lemoine N (1993) In vitro transformation of epithelial cells by ras oncogenes. *Epithelial Cell Biol* **2**:26-43.
- Busek P, Malik R and Sedo A (2004) Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:408-21.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW and Vogelstein B (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**:300-3.

- Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM (2000) Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11280-5.
- Cao Y and Prescott SM (2002) Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* **190**:279-86.
- Cappello M, Keshav S, Prince C, Jewell DP and Gordon S (1992) Detection of mRNAs for macrophage products in inflammatory bowel disease by in situ hybridisation. *Gut* **33**:1214-9.
- Cario E (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**:1182-93.
- Cario E and Podolsky DK (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**:7010-7.
- Catley MC, Chivers JE, Cambridge LM, Holden N, Slater DM, Staples KJ, Bergmann MW, Loser P, Barnes PJ and Newton R (2003) IL-1beta-dependent activation of NF-kappaB mediates PGE2 release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Lett* **547**:75-9.
- Cavusoglu N (2002) Apport de la spectrométrie de masse à l'étude de modifications post-traductionnelles et à la protéomique. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg*.
- Cerretti DP, Nelson N, Kozlosky CJ, Morrissey PJ, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Dosik JK and Mock BA (1993) The murine homologue of the human interleukin-8 receptor type B maps near the Ity-Lsh-Bcg disease resistance locus. *Genomics* **18**:410-3.
- Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM and Boland CR (2002) Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**:C148-54.
- Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC and Wang CJ (2004) Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in Helicobacter pylori-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* **10**:2232-40.
- Chang GT and Ellner PD (1983) Evaluation of slide agglutination methods for identifying group D streptococci. *J Clin Microbiol* **17**:804-6.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG and Zweibaum A (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* **48**:1936-42.
- Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R and Calle EE (2005) Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Jama* **293**:172-82.
- Chen C, Edelstein LC and Gelinas C (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* **20**:2687-95.
- Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF and Karin M (2003) The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* **9**:575-81.
- Cho KR and Vogelstein B (1992) Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* **70**:1727-31.
- Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK and Pyo S (2003) Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by Helicobacter pylori VacA toxin. *Toxicon* **42**:601-11.
- Chou CC, Sun YJ, Meng M and Hsiao CD (2000) The crystal structure of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin complexed with its carbohydrate

- phosphate inhibitors suggests its substrate/receptor recognition. *J Biol Chem* **275**:23154-60.
- Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O and Langenbach R (2000) Genetic disruption of PtgS-1, as well as PtgS-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res* **60**:4705-8.
- Churin Y, Al-Ghoul L, Kepp O, Meyer TF, Birchmeier W and Naumann M (2003) Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol* **161**:249-55.
- Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R and Masini E (2001) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* **121**:1339-47.
- Cohen SM, Purtilo DT and Ellwein LB (1991) Ideas in pathology. Pivotal role of increased cell proliferation in human carcinogenesis. *Mod Pathol* **4**:371-82.
- Coleman RA, Smith WL and Narumiya S (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* **46**:205-29.
- Corthier G, Boschetti E and Charley-Poulain J (1984) Improved method for IgG purification from various animal species by ion exchange chromatography. *J Immunol Methods* **66**:75-9.
- Coussens LM and Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* **420**:860-7.
- Cover TL and Blanke SR (2005) Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* **3**:320-32.
- Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F and Moreno V (2004) Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* **91**:339-43.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P and Matrisian LM (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* **18**:2883-91.
- Crowe SE (2005) Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. *Curr Opin Gastroenterol* **21**:32-8.
- Cummings JH and Macfarlane GT (1997) Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition* **13**:476-8.
- Dalwadi H, Wei B, Kronenberg M, Sutton CL and Braun J (2001) The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric t cell superantigen. *Immunity* **15**:149-58.
- Darjee R and Gibb AP (1993) Serological investigation into the association between Streptococcus bovis and colonic cancer. *J Clin Pathol* **46**:1116-9.
- Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-52.
- Day AS, Su B, Ceponis PJ, Jones NL, Yau E, Sieveking D and Sherman PM (2004) Helicobacter pylori infection induces interleukin-18 production in gastric epithelial (AGS) cells. *Dig Dis Sci* **49**:1830-5.
- De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, de Waal Malefyt R and Mantegazza R (2000) Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* **12**:1329-35.
- Delahaye F, Goulet V, Lacassin F, Ecochard R, Selton-Suty C, Hoen B, Etienne J, Briancon S and Leport C (1995) Characteristics of infective endocarditis in France in 1991. A 1-year survey. *Eur Heart J* **16**:394-401.

- Delattre O, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Remvikos Y, Salmon RJ, Sastre X, Validire P, Feinberg AP and Thomas G (1989) Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* **2**:353-6.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C and Chen ZJ (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**:351-61.
- Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA and Prescott SM (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* **108**:1657-65.
- DuBois RN, Giardiello FM and Smalley WE (1996a) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, eicosanoids, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterol Clin North Am* **25**:773-91.
- DuBois RN, Radhika A, Reddy BS and Entingh AJ (1996b) Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* **110**:1259-62.
- Dwinell MB, Johannesen PA and Smith JM (2003) Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. *Surgery* **133**:601-7.
- Dziarski R (2003) Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell Mol Life Sci* **60**:1793-804.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S and DuBois RN (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* **107**:1183-8.
- Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E and Kagnoff MF (1993) Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* **105**:1689-97.
- Eckmann L, Smith JR, Housley MP, Dwinell MB and Kagnoff MF (2000) Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria Salmonella. *J Biol Chem* **275**:14084-94.
- Eferl R and Wagner EF (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**:859-68.
- Efstratiou A (2000) Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother* **45 Suppl**:3-12.
- Ekbom A, Helmick C, Zack M and Adami HO (1990a) Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* **336**:357-9.
- Ekbom A, Helmick C, Zack M and Adami HO (1990b) Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* **323**:1228-33.
- Ekbom A, Helmick CG, Zack M, Holmberg L and Adami HO (1992) Survival and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* **103**:954-60.
- Ellmerich S, Djouder N, Scholler M and Klein JP (2000a) Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by Streptococcus bovis. *Cytokine* **12**:26-31.
- Ellmerich S, Scholler M, Duranton B, Gosse F, Galluser M, Klein JP and Raul F (2000b) Promotion of intestinal carcinogenesis by Streptococcus bovis. *Carcinogenesis* **21**:753-6.
- Engle SJ, Ormsby I, Pawlowski S, Boivin GP, Croft J, Balish E and Doetschman T (2002) Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice. *Cancer Res* **62**:6362-6.

- Erdman SE, Poutahidis T, Tomczak M, Rogers AB, Cormier K, Plank B, Horwitz BH and Fox JG (2003) CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice. *Am J Pathol* **162**:691-702.
- Erdman SH, Wu HD, Hixson LJ, Ahnen DJ and Gerner EW (1997) Assessment of mutations in Ki-ras and p53 in colon cancers from azoxymethane- and dimethylhydrazine-treated rats. *Mol Carcinog* **19**:137-44.
- Euzeby JP (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* **47**:590-2.
- Facklam RR (1972) Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl Microbiol* **23**:1131-9.
- Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD and Allison AC (1992) Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* **140**:539-44.
- Fang FC, DeGroot MA, Foster JW, Baumler AJ, Ochsner U, Testerman T, Bearson S, Giard JC, Xu Y, Campbell G and Laessig T (1999) Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7502-7.
- Farrow B and Evers BM (2002) Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* **10**:153-69.
- Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, Stanford JL, Risch HA, Gammon MD, Chow WH, Dubrow R, Ahsan H, Mayne ST, Schoenberg JB, West AB, Rotterdam H, Fraumeni JF, Jr. and Blot WJ (1998) Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**:97-102.
- Farrow JA, Jones D, Phillips BA and Collins MD (1983a) Taxonomic studies on some group D streptococci. *J Gen Microbiol* **129** (Pt 5):1423-32.
- Farrow JA, Jones D, Phillips BA and Collins MD (1983b) Taxonomic studies on some group D streptococci. *J Gen Microbiol* **129**:1423-32.
- Farrow JAE, Kruze J, Phillips BA, Bramley AJ and Collins MD (1984) Taxonomic studies on Streptococcus bovis and Streptococcus equinus : description of Streptococcus alactolyticus sp. nov. and Streptococcus saccharolyticus sp. nov. *System Appl Microbiol* **5**:467-82.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW and et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* **247**:49-56.
- Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759-67.
- Feinberg AP and Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**:6-13.
- Figueiredo C, Machado JC and Yamaoka Y (2005) Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. *Helicobacter* **10 Suppl 1**:14-20.
- Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG and Meltzer SJ (2000) Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res* **60**:4864-8.
- Fodde R, Smits R and Clevers H (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **1**:55-67.
- Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE and Mehlen P (2001) The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3416-21.

- Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N and Sitas F (1991) Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Bmj* **302**:1302-5.
- Fox JG, Yan L, Shames B, Campbell J, Murphy JC and Li X (1996) Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* **64**:3673-81.
- Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L and Pierotti MA (2004) Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **10**:4015-21.
- Frenkel K (1992) Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther* **53**:127-66.
- Fridman JS and Lowe SW (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**:9030-40.
- Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, Meltzer SJ and Wilson KT (1999) Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* **116**:1319-29.
- Furrie E, Macfarlane S, Thomson G and Macfarlane GT (2005) Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* **115**:565-74.
- Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA, Monterroso JR, Sanchez-Andrade A and Gonzalez-Ramirez A (2000) Septic arthritis due to *Streptococcus bovis* as presenting sign of 'silent' colon carcinoma. *Rheumatology (Oxford)* **39**:338-9.
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ and Madara JL (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**:1882-5.
- Giacosa A, Frascio F and Munizzi F (2004) Epidemiology of colorectal polyps. *Tech Coloproctol* **8 Suppl 2**:s243-7.
- Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR and Offerhaus GJ (1993) Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **328**:1313-6.
- Gibson P and Rosella O (1995) Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* **37**:536-43.
- Giles RH, van Es JH and Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**:1-24.
- Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA and Allan RN (1994) Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* **35**:1590-2.
- Gimbrone MA, Jr., Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, Hebert CA, Yip YK, Leung DW, Lowe DG, Kohr WJ and et al. (1989) Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* **246**:1601-3.
- Giovannucci E (2002) Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **31**:925-43.
- Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A and Willett WC (1994) Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* **54**:2390-7.
- Glinghammar B and Rafter J (2001) Colonic luminal contents induce cyclooxygenase 2 transcription in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology* **120**:401-10.
- Gobert AP, Bambou JC, Werts C, Balloy V, Chignard M, Moran AP and Ferrero RL (2004) *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by

- macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem* **279**:245-50.
- Gold JS, Bayar S and Salem RR (2004) Association of Streptococcus bovis bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Arch Surg* **139**:760-5.
- Goldstein JM, Banbula A, Kordula T, Mayo JA and Travis J (2001) Novel extracellular x-prolyl dipeptidyl-peptidase (DPP) from Streptococcus gordonii FSS2: an emerging subfamily of viridans Streptococcal x-prolyl DPPs. *Infect Immun* **69**:5494-501.
- Goldstein JM, Nelson D, Kordula T, Mayo JA and Travis J (2002) Extracellular arginine aminopeptidase from Streptococcus gordonii FSS2. *Infect Immun* **70**:836-43.
- Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K, Hayakawa N and Kajiyama G (1999) Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* **5**:1411-5.
- Gough JA and Murray NE (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* **166**:1-19.
- Grady WM (2004) Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**:11-27.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M and Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**:4855-78.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M and et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**:589-600.
- Gupta RA and Dubois RN (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* **1**:11-21.
- Guruge JL, Falk PG, Lorenz RG, Dans M, Wirth HP, Blaser MJ, Berg DE and Gordon JI (1998) Epithelial attachment alters the outcome of Helicobacter pylori infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3925-30.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG and Baldwin AS, Jr. (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* **19**:5785-99.
- Hagenbaugh A, Sharma S, Dubinett SM, Wei SH, Aranda R, Cheroutre H, Fowell DJ, Binder S, Tsao B, Locksley RM, Moore KW and Kronenberg M (1997) Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice. *J Exp Med* **185**:2101-10.
- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K and Sinicrope FA (2002) Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* **62**:1676-81.
- Hansen-Petrik MB, McEntee MF, Jull B, Shi H, Zemel MB and Whelan J (2002) Prostaglandin E(2) protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res* **62**:403-8.
- Haqqani AS, Sandhu JK and Birnboim HC (2000) Expression of interleukin-8 promotes neutrophil infiltration and genetic instability in mutatact tumors. *Neoplasia* **2**:561-8.
- Haqqani AS, Sandhu JK and Birnboim HC (2001) Constitutive expression of interleukin-8 by Mutatact cells markedly affects their tumor biology. *Carcinogenesis* **22**:243-50.
- Hardman AE (2001) Physical activity and cancer risk. *Proc Nutr Soc* **60**:107-13.
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W and Rogler G (2002) Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**:1987-2000.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM and Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-103.

- He TC, Chan TA, Vogelstein B and Kinzler KW (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**:335-45.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**:1509-12.
- Hemmings BA (1997) Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* **275**:628-30.
- Henderson BR (2000) Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* **2**:653-60.
- Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, De Goeij A and Meijer G (2002) Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* **123**:1109-19.
- Herschman HR, Xie W and Reddy S (1995) Inflammation, reproduction, cancer and all that... The regulation and role of the inducible prostaglandin synthase. *Bioessays* **17**:1031-7.
- Hess J, Dietrich G, Gentschev I, Miko D, Goebel W and Kaufmann SH (1997) Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infect Immun* **65**:1286-92.
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M and Hatakeyama M (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**:683-6.
- Hill MJ (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* **6 Suppl** **1**:S43-5.
- Hoën B, Alla F, Selton-Suty C, Beguinot I, Bouvet A, Briançon S, Casalta JP, Danchin N, Delahaye F, Etienne J, Le Moing V, Lepout C, Mainardi JL, Ruimy R and Vandenesch F (2002) Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *Jama* **288**:75-81.
- Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN and Harris CC (2003a) Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med* **34**:955-68.
- Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E and Harris CC (2003b) Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:143-8.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* **253**:49-53.
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC and Wood WI (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* **253**:1278-80.
- Holz RC, Bzymek KP and Swierczek SI (2003) Co-catalytic metallopeptidases as pharmaceutical targets. *Curr Opin Chem Biol* **7**:197-206.
- Horie H, Kanazawa K, Kobayashi E, Okada M, Fujimura A, Yamagiwa S and Abo T (1999) Effects of intestinal bacteria on the development of colonic neoplasm II. Changes in the immunological environment. *Eur J Cancer Prev* **8**:533-7.
- Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S and Richter-Dahlfors A (2002) Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* **195**:559-70.
- Hsu YH, Shaw CK and Chuong CM (2001) Immunohistochemical localization of deleted-in-colon-cancer (DCC) protein in human epithelial, neural, and neuro-endocrine tissues in paraffin sections with antigen retrieval. *Kaohsiung J Med Sci* **17**:351-7.

- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M and Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603.
- Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* **3**:276-85.
- Huycke MM, Abrams V and Moore DR (2002) Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* **23**:529-36.
- Huycke MM and Gaskins HR (2004) Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**:586-97.
- IARC (1994a) Hepatitis viruses. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* **59**.
- IARC (1994b) Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* **61**.
- IARC (1995) Human papillomaviruses. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* **64**.
- IARC (1997) Infections with Epstein-Barr virus, human herpes viruses. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*:70.
- Ibrahim A, Gerner-Smidt P and Sjostedt A (1996) Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. *J Clin Microbiol* **34**:2894-6.
- Inaba T, Sano H, Kawahito Y, Hla T, Akita K, Toda M, Yamashina I, Inoue M and Nakada H (2003) Induction of cyclooxygenase-2 in monocyte/macrophage by mucins secreted from colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2736-41.
- Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettaway CA and Dinney CP (2000) Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* **6**:2104-19.
- Ish-Horowicz D and Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**:2989-98.
- Itoh Y, Joh T, Tanida S, Sasaki M, Kataoka H, Itoh K, Oshima T, Ogasawara N, Togawa S, Wada T, Kubota H, Mori Y, Ohara H, Nomura T, Higashiyama S and Itoh M (2005) IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* **29**:275-82.
- Itzkowitz SH and Yio X (2004) Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G7-17.
- Jacoby RF, Marshall DJ, Newton MA, Novakovic K, Tutsch K, Cole CE, Lubet RA, Kelloff GJ, Verma A, Moser AR and Dove WF (1996) Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. *Cancer Res* **56**:710-4.
- Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G and Lubet RA (2000) The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* **60**:5040-4.
- Jamerson MH, Johnson MD and Dickson RB (2000) Dual regulation of proliferation and apoptosis: c-myc in bitransgenic murine mammary tumor models. *Oncogene* **19**:1065-71.

- Jass JR (2004) HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer* **3**:93-100.
- Jensen ON, Vorm O and Mann M (1996) Sequence patterns produced by incomplete enzymatic digestion or one-step Edman degradation of peptide mixtures as probes for protein database searches. *Electrophoresis* **17**:938-944.
- Ji Y, McLandsborough L, Kondagunta A and Cleary PP (1996) C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. *Infect Immun* **64**:503-10.
- Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K and Nakamura T (1999) Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **29**:209-48.
- Jobin C and Sartor RB (2000a) The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:C451-62.
- Jobin C and Sartor RB (2000b) NF-kappaB signaling proteins as therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **6**:206-13.
- Johnston JW, Myers LE, Ochs MM, Benjamin WH, Jr., Briles DE and Hollingshead SK (2004) Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infect Immun* **72**:5858-67.
- Jolly K, Cheng KK and Langman MJ (2002) NSAIDs and gastrointestinal cancer prevention. *Drugs* **62**:945-56.
- Jones D and Shattock PM (1960) The location of the group antigen of group D *Streptococcus*. *J Gen Microbiol* **23**:335-43.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA and Prescott SM (1993) Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* **268**:9049-54.
- Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ and Marrs JA (1995) Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5067-71.
- Jumarie C and Malo C (1991) Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* **149**:24-33.
- Kado S, Uchida K, Funabashi H, Iwata S, Nagata Y, Ando M, Onoue M, Matsuoka Y, Ohwaki M and Morotomi M (2001) Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice. *Cancer Res* **61**:2395-8.
- Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK and Nathke IS (2001) A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **3**:429-32.
- Karas M, Bahr U, Ingendoh A and Hillenkamp F (1989) Laser desorption ionization mass spectrometry of proteins of mass 100000 to 250000 Daltons. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**:760-761.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA and Jothy S (1995) Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* **55**:2556-9.
- Karin M, Cao Y, Greten FR and Li ZW (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**:301-10.
- Kawahara T, Kuwano Y, Teshima-Kondo S, Sugiyama T, Kawai T, Nikawa T, Kishi K and Rokutan K (2001a) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide from type I, but not type II strains, stimulates apoptosis of cultured gastric mucosal cells. *J Med Invest* **48**:167-74.
- Kawahara T, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K and Rokutan K (2001b) Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun* **69**:4382-9.

- Kawamori T, Uchiya N, Sugimura T and Wakabayashi K (2003) Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis* **24**:985-90.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG and Tessier-Lavigne M (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87**:175-85.
- Kelly CP, Keates S, Siegenberg D, Linevsky JK, Pothoulakis C and Brady HR (1994) IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells. *Am J Physiol* **267**:G991-7.
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ and et al. (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**:1395-9.
- Keusch GT (1974) Opportunistic infections in colon carcinoma. *Am J Clin Nutr* **27**:1481-5.
- Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA and Travis RC (2004) Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr* **7**:187-200.
- Kimura M, Osumi S and Ogihara M (2000) Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostaglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* **404**:259-71.
- Kinzler KW and Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**:159-70.
- Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, Yasui W, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ and Tahara E (1998) Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol* **152**:93-100.
- Klapproth JM, Sasaki M, Sherman M, Babbin B, Donnenberg MS, Fernandes PJ, Scaletsky IC, Kalman D, Nusrat A and Williams IR (2005) *Citrobacter rodentium* *lifA/efal* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia in vivo. *Infect Immun* **73**:1441-51.
- Klapproth JM, Scaletsky IC, McNamara BP, Lai LC, Malstrom C, James SP and Donnenberg MS (2000) A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun* **68**:2148-55.
- Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD and Hiatt RA (1988) The relations of alcoholic beverage use to colon and rectal cancer. *Am J Epidemiol* **128**:1007-15.
- Klein RS, Catalano MT, Edberg SC, Casey JI and Steigbigel NH (1979) *Streptococcus bovis* septicemia and carcinoma of the colon. *Ann Intern Med* **91**:560-2.
- Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JI and Steigbigel NH (1977) Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N Engl J Med* **297**:800-2.
- Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR and Wheelock MJ (1995) Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* **130**:67-77.
- Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, Medzhitov R and Flavell RA (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**:194-9.
- Koh TJ, Bulitta CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A and Wang TC (2000) Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* **106**:533-9.
- Kojima M, Morisaki T, Uchiyama A, Doi F, Mibu R, Katano M and Tanaka M (2001) Association of enhanced cyclooxygenase-2 expression with possible local immunosuppression in human colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* **8**:458-65.
- Kolligs FT, Nieman MT, Winer I, Hu G, Van Mater D, Feng Y, Smith IM, Wu R, Zhai Y, Cho KR and Fearon ER (2002) ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway,

- is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* **1**:145-55.
- Kolonel LN (1988) Variability in diet and its relation to risk in ethnic and migrant groups. *Basic Life Sci* **43**:129-35.
- Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG and Konturek SJ (2005) Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* **56 Suppl 5**:57-73.
- Kopp E and Medzhitov R (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**:396-401.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW and Herschman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* **266**:12866-72.
- Kuper H, Adami HO and Trichopoulos D (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* **248**:171-83.
- Kupferwasser I, Darius H, Muller AM, Mohr-Kahaly S, Westermeier T, Oelert H, Erbel R and Meyer J (1998) Clinical and morphological characteristics in Streptococcus bovis endocarditis: a comparison with other causative microorganisms in 177 cases. *Heart* **80**:276-80.
- Lancefield RC (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* **57**:571-595.
- Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J and Targan SR (2002) Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* **123**:689-99.
- Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD and Marnett LJ (1996) Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:15069-74.
- Langman MJ, Cheng KK, Gilman EA and Lancashire RJ (2000) Effect of anti-inflammatory drugs on overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database. *Bmj* **320**:1642-6.
- Lauw FN, Caffrey DR and Golenbock DT (2005) Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* **26**:509-11.
- Lax AJ (2005) Opinion: Bacterial toxins and cancer--a case to answer? *Nat Rev Microbiol* **3**:343-9.
- Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M and et al. (1993) Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**:1215-25.
- Leibovitch G, Maaravi Y and Shalev O (1991) Multiple brain abscesses caused by Streptococcus bovis. *J Infect* **23**:195-6.
- Lejeune FJ, Ruegg C and Lienard D (1998) Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* **10**:573-80.
- Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**:643-9.
- Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E and et al. (1987) The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* **238**:1411-3.
- Li A, Varney ML and Singh RK (2001) Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* **7**:3298-304.

- Li L, Yuan H, Xie W, Mao J, Caruso AM, McMahon A, Sussman DJ and Wu D (1999a) Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* **274**:129-34.
- Li SD, Kersulyte D, Lindley IJ, Neelam B, Berg DE and Crabtree JE (1999b) Multiple genes in the left half of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for tyrosine kinase-dependent transcription of interleukin-8 in gastric epithelial cells. *Infect Immun* **67**:3893-9.
- Lin EY, Nguyen AV, Russell RG and Pollard JW (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* **193**:727-40.
- Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM, 3rd and Mackay S (2001) Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* **130**:363-9.
- Lindley I, Aschauer H, Seifert JM, Lam C, Brunowsky W, Kownatzki E, Thelen M, Peveri P, Dewald B, von Tschärner V and et al. (1988) Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:9199-203.
- Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR and et al. (1995) Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* **9**:48-55.
- Liu J, Yao F, Wu R, Morgan M, Thorburn A, Finley RL, Jr. and Chen YQ (2002) Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J Biol Chem* **277**:26281-5.
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M and Hershberg RM (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* **113**:1296-306.
- Luster AD (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**:436-45.
- Lynch HT, Smyrk T and Lynch JF (1996) Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). *Int J Cancer* **69**:38-43.
- Maeda S, Chang L, Li ZW, Luo JL, Leffert H and Karin M (2003) IKKbeta is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNFalpha. *Immunity* **19**:725-37.
- Maltzman T, Whittington J, Driggers L, Stephens J and Ahnen D (1997) AOM-induced mouse colon tumors do not express full-length APC protein. *Carcinogenesis* **18**:2435-9.
- Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, Wang TC and Kurt-Jones EA (2004) Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun* **72**:6446-54.
- Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Fontham ET, Mera R, Miller MJ and Correa P (1996) Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* **56**:3238-43.
- Marnett LJ and DuBois RN (2002) COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:55-80.
- Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF and Rhodes JM (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**:80-93.

- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ and Seibert K (2000) Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* **60**:1306-11.
- Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY and Mehlen P (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* **431**:80-4.
- McCain RW, Dessypris EN and Christman JW (1993) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**:28-34.
- McCoy W and Mason J (1951) Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid: report of a case. *J Med Assoc Stat Alab* **21**:162-6.
- McMichael AJ, McCall MG, Hartshorne JM and Woodings TL (1980) Patterns of gastrointestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer* **25**:431-7.
- Medzhitov R and Janeway CA, Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**:298-300.
- Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ and Walboomers JM (1998) Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* **51**:901-9.
- Meinzer U and Hugot JP (2005) Nod2 and Crohn's disease: many connected highways. *Lancet* **365**:1752-4.
- Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G and Finazzi-Agro A (1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* **388**:432-3.
- Michels KB (2005) The role of nutrition in cancer development and prevention. *Int J Cancer* **114**:163-5.
- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O and Tanikawa K (1994) IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* **96**:432-6.
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M and Mori T (1997) Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* **17**:271-2.
- Modun B and Williams P (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* **67**:1086-92.
- Moriguchi T, Kawachi K, Kamakura S, Masuyama N, Yamanaka H, Matsumoto K, Kikuchi A and Nishida E (1999) Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates. *J Biol Chem* **274**:30957-62.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B and Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**:1787-90.
- Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1996) Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7950-4.
- Moser B, Barella L, Mattei S, Schumacher C, Boulay F, Colombo MP and Baggiolini M (1993) Expression of transcripts for two interleukin 8 receptors in human phagocytes, lymphocytes and melanoma cells. *Biochem J* **294** (Pt 1):285-92.
- Mundy R, Petrovska L, Smollett K, Simpson N, Wilson RK, Yu J, Tu X, Rosenshine I, Clare S, Dougan G and Frankel G (2004) Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and roles of this and other secreted proteins in infection. *Infect Immun* **72**:2288-302.

- Nam KT, Oh SY, Ahn B, Kim YB, Jang DD, Yang KH, Hahm KB and Kim DY (2004) Decreased Helicobacter pylori associated gastric carcinogenesis in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Gut* **53**:1250-5.
- Namiduru M, Karaoglan I, Aktaran S, Dikensoy O and Baydar I (2003) A case of septicaemia, meningitis and pneumonia caused by Streptococcus bovis type II. *Int J Clin Pract* **57**:735-6.
- Nardone G, Rocco A and Malfertheiner P (2004) Review article: helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment Pharmacol Ther* **20**:261-70.
- Nateri AS, Spencer-Dene B and Behrens A (2005) Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* **437**:281-5.
- Naumann M and Crabtree JE (2005) Bacterial Protein Toxins, (Lax AJ ed) pp 169-198, Cambridge Univ. Press.
- Neish AS (2004) Molecular aspects of intestinal epithelial cell-bacterial interactions that determine the development of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* **10**:159-68.
- Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS and Madara JL (2000) Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* **289**:1560-3.
- Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C and Buschenfelde KH (1998) Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* **859**:149-59.
- Newman JV, Kosaka T, Sheppard BJ, Fox JG and Schauer DB (2001) Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J Infect Dis* **184**:227-30.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM and et al. (1994) Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* **371**:75-80.
- Niho N, Mutoh M, Kitamura T, Takahashi M, Sato H, Yamamoto H, Maruyama T, Ohuchida S, Sugimura T and Wakabayashi K (2005) Suppression of azoxymethane-induced colon cancer development in rats by a prostaglandin E receptor EP-selective antagonist. *Cancer Sci* **96**:260-4.
- Norat T, Lukanova A, Ferrari P and Riboli E (2002) Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* **98**:241-56.
- Norgauer J, Metzner B and Schraufstatter I (1996) Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells. *J Immunol* **156**:1132-37.
- Nusse R (2001) Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature* **411**:255-6.
- Ohshima H and Bartsch H (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* **305**:253-64.
- O'Neill LA (2002) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**:47-61.
- O'Neill LA, Fitzgerald KA and Bowie AG (2003) The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* **24**:286-90.
- Onoue M, Kado S, Sakaitani Y, Uchida K and Morotomi M (1997) Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer Lett* **113**:179-86.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF and Taketo MM (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **87**:803-9.
- Otte JM, Cario E and Podolsky DK (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **126**:1054-70.

- Owen JD, Strieter R, Burdick M, Haghnegahdar H, Nanney L, Shattuck-Brandt R and Richmond A (1997) Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int J Cancer* **73**:94-103.
- Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N and Roizman B (2004) Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* **14**:453-71.
- Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D and Tarnawski AS (2002) Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* **8**:289-93.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**:74-108.
- Parkin DM and Khlat M (1996) Studies of cancer in migrants: rationale and methodology. *Eur J Cancer* **32A**:761-71.
- Parsonnet J (1995) The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**:45-51.
- Parsonnet J (1999) Introduction, in *Microbes and Malignancy* (Parsonnet J ed) pp 3-15, Oxford University Press, New York.
- Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J and Brynskov J (2005) Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol* **141**:298-306.
- Pereira MA, Barnes LH, Rassman VL, Kelloff GV and Steele VE (1994) Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* **15**:1049-54.
- Pergola V, Di Salvo G, Habib G, Avierinos JF, Philip E, Vailloud JM, Thuny F, Casalta JP, Ambrosi P, Lambert M, Riberi A, Ferracci A, Mesana T, Metras D, Harle JR, Weiller PJ, Raoult D and Luccioni R (2001) Comparison of clinical and echocardiographic characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis with that caused by other pathogens. *Am J Cardiol* **88**:871-5.
- Permin H and Andersen LP (2005) Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter* infection. *Helicobacter* **10 Suppl 1**:21-5.
- Pervin S, Singh R and Chaudhuri G (2001) Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3583-8.
- Peterson HI (1983) Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on tumor growth and vascularization. Experimental studies in the rat. *Invasion Metastasis* **3**:151-9.
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay M, Kedinger M, Haffen K, Fogh J and Zweibaum A (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **47**:323-330.
- Pisani P, Parkin DM, Munoz N and Ferlay J (1997) Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**:387-400.
- Potter JD, Slattery ML, Bostick RM and Gapstur SM (1993) Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* **15**:499-545.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B and Kinzler KW (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**:235-7.
- Poyart C, Quesne G and Trieu-Cuot P (2002) Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (sodA) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. coli' as *Streptococcus*

- lutetiensis sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1247-55.
- Prescott SM and White RL (1996) Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. *Cell* **87**:783-6.
- Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H and Prinz C (2002) The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* **168**:3033-41.
- Ramos HC, Rumbo M and Sirard JC (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* **12**:509-17.
- Rasmussen M and Bjorck L (2002) Proteolysis and its regulation at the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **43**:537-44.
- Rhee SH, Im E, Riegler M, Kokkotou E, O'Brien M and Pothoulakis C (2005) Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:13610-5.
- Richards GP, Hammer CH, Garfield MK and Parveen S (2004) Characterization of a lysyl aminopeptidase activity associated with phosphoglucose isomerase of *Vibrio vulnificus*. *Biochim Biophys Acta* **1700**:219-29.
- Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC and et al. (1983) Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* **14**:931-68.
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E and Auer G (1999) Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* **25**:195-204.
- Rigas B, Goldman IS and Levine L (1993) Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* **122**:518-23.
- Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J and Gross V (1998) Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* **115**:357-69.
- Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* **90**:909-28.
- Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, Acquaviva AM, Del Vecchio Blanco C, Bruni CB and Zarrilli R (1998) *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro. *J Biol Chem* **273**:28560-3.
- Roses DF, Richman H and Localio SA (1974) Bacterial endocarditis associated with colorectal carcinoma. *Ann Surg* **179**:190-1.
- Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T and Bienz M (2003) Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *Embo J* **22**:1101-13.
- Rosin-Arbesfeld R, Townsley F and Bienz M (2000) The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* **406**:1009-12.
- Ruiz PA, Hoffmann M, Szesny S, Blaut M and Haller D (2005) Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* **115**:441-50.
- Ruoff KL, Miller SI, Garner CV, Ferraro MJ and Calderwood SB (1989) Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates. *J Clin Microbiol* **27**:305-8.
- Salvesen GS and Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:401-10.

- Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G and Schilsky R (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**:883-90.
- Sartor RB (1994) Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* **106**:533-9.
- Sasaki S, Hirata I, Maemura K, Hamamoto N, Murano M, Toshina K and Katsu K (2000) Prostaglandin E2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines. *Scand J Immunol* **51**:23-8.
- Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sun W, Gunawan ES and Hori M (1998) Helicobacter pylori infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **59**:313-6.
- Schadendorf, Moller, Algermissen, Worm, Sticherling and Czarnetzki (1994) IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* **153**:3360.
- Schauer DB, Zabel BA, Pedraza IF, O'Hara CM, Steigerwalt AG and Brenner DJ (1995) Genetic and biochemical characterization of Citrobacter rodentium sp. nov. *J Clin Microbiol* **33**:2064-8.
- Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA and Bouvet A (2003a) Reappraisal of the taxonomy of the Streptococcus bovis/Streptococcus equinus complex and related species: description of Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus subsp. nov., S. gallolyticus subsp. macedonicus subsp. nov. and S. gallolyticus subsp. pasteurianus subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:631-45.
- Schlegel L, Grimont F, Collins MD, Regnault B, Grimont PA and Bouvet A (2000) Streptococcus infantarius sp. nov., Streptococcus infantarius subsp. infantarius subsp. nov. and Streptococcus infantarius subsp. coli subsp. nov., isolated from humans and food. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**:1425-34.
- Schlegel L, Grimont F, Grimont PA and Bouvet A (2003b) Identification of major Streptococcal species by rrn-amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* **41**:657-66.
- Schleifer KH and Kilpper-Bälz R (1984) Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **34**:31-4.
- Schleifer KH and Kilpper-Bälz R (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci : a review. *System Appl Microbiol* **10**:1-19.
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Baranov E, Hoffman RM and Lowe SW (2002) Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* **1**:289-98.
- Scholler M, Klein JP and Frank RM (1981) Common antigens of streptococcal and non-streptococcal oral bacteria: immunochemical studies of extracellular and cell-wall-associated antigens from Streptococcus sanguis, Streptococcus mutans, Lactobacillus salivarius, and Actinomyces viscosus. *Infect Immun* **31**:52-60.
- Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K and Kerjaschki D (2002) Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* **161**:947-56.
- Schuchat A (1995) Group B streptococcal disease in newborns: a global perspective on prevention. *Biomed Pharmacother* **49**:19-25.

- Sebkova L, Pellicano A, Monteleone G, Grazioli B, Guarnieri G, Imeneo M, Pallone F and Luzzza F (2004) Extracellular signal-regulated protein kinase mediates interleukin 17 (IL-17)-induced IL-8 secretion in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells. *Infect Immun* **72**:5019-26.
- Seidelin JB and Nielsen OH (2005) Continuous cytokine exposure of colonic epithelial cells induces DNA damage. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **17**:363-9.
- Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF and Backert S (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J* **22**:515-28.
- Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM and Sartor RB (1998) Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **66**:5224-31.
- Seril DN, Liao J, Yang GY and Yang CS (2003) Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* **24**:353-62.
- Shacter E and Weitzman SA (2002) Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* **16**:217-26, 229; discussion 230-2.
- Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H and Monden M (2000) Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* **6**:1229-38.
- Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD and DuBois RN (2000) Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**:33951-6.
- Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ and Kerr LD (1998) Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* **160**:2401-7.
- Sheng H, Shao J and Dubois RN (2001a) K-Ras-mediated increase in cyclooxygenase 2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B1. *Cancer Res* **61**:2670-5.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and DuBois RN (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* **58**:362-6.
- Sheng H, Shao J, Washington MK and DuBois RN (2001b) Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* **276**:18075-81.
- Shibata F, Konishi K and Nakagawa H (2000) Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). *Cytokine* **12**:1368-73.
- Shiff SJ and Rigas B (1997) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology* **113**:1992-8.
- Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N and Sasazuki T (1993) Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* **260**:85-8.
- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M and et al. (1995) Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. *Hepatology* **22**:1027-33.
- Shoji Y, Takahashi M, Kitamura T, Watanabe K, Kawamori T, Maruyama T, Sugimoto Y, Negishi M, Narumiya S, Sugimura T and Wakabayashi K (2004) Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut* **53**:1151-8.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R and Ben-Ze'ev A (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5522-7.

- Siman JH, Forsgren A, Berglund G and Floren CH (1997) Association between *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma in the city of Malmö, Sweden. A prospective study. *Scand J Gastroenterol* **32**:1215-21.
- Singh-Ranger G, Kirkpatrick KL, Clark GM and Mokbel K (2003) Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) mRNA expression correlates with progesterone receptor positivity in human breast cancer. *Curr Med Res Opin* **19**:131-4.
- Sinicrope FA and Gill S (2004) Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**:63-75.
- Sinicrope FA, Half E, Morris JS, Lynch PM, Morrow JD, Levin B, Hawk ET, Cohen DS, Ayers GD and Stephens LC (2004) Cell proliferation and apoptotic indices predict adenoma regression in a placebo-controlled trial of celecoxib in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**:920-7.
- Sitaraman SV, Klapproth JM, Moore DA, 3rd, Landers C, Targan S, Williams IR and Gewirtz AT (2005) Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**:G403-6.
- Slattery ML and Potter JD (2002) Physical activity and colon cancer: confounding or interaction? *Med Sci Sports Exerc* **34**:913-9.
- Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE and Kranenburg O (2005) Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim Biophys Acta*.
- Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV and Gallinger S (1994) Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* **54**:5527-30.
- Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S and Goldberg JB (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* **278**:32552-60.
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J and Koki AT (2000) COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* **89**:2637-45.
- Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998) Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**:1130-4.
- Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S and Mak TW (2001) Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* **8**:317-25.
- Stein E, Zou Y, Poo M and Tessier-Lavigne M (2001) Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* **291**:1976-82.
- Stevens MP, van Diemen PM, Frankel G, Phillips AD and Wallis TS (2002) Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun* **70**:5158-66.
- Stoicov C, Saffari R, Cai X, Hasyagar C and Houghton J (2004) Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene* **341**:1-17.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D and et al. (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* **270**:27348-57.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B and Kinzler KW (1995) APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* **55**:2972-7.
- Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB and Dannenberg AJ (1997) Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* **216**:201-10.

- Suda M, Tanaka K, Natsui K, Usui T, Tanaka I, Fukushima M, Shigeno C, Konishi J, Narumiya S, Ichikawa A and Nakao N (1996) Prostaglandin E receptor subtypes in mouse osteoblastic cell line. *Endocrinology* **137**:1698-705.
- Sun JH, Das KK, Amenta PS, Yokota K, Watari J, Sato T, Kohgo Y and Das KM (2006) Preferential Expression of Cyclooxygenase-2 in Colonic-Phenotype of Gastric Intestinal Metaplasia: Association With Helicobacter Pylori and Gastric Carcinoma. *J Clin Gastroenterol* **40**:122-128.
- Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT and Sinicrope FA (2002) Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* **62**:6323-8.
- Sun YJ, Chou CC, Chen WS, Wu RT, Meng M and Hsiao CD (1999) The crystal structure of a multifunctional protein: phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5412-7.
- Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK and Chan FK (2000) Cyclooxygenase-2 expression in Helicobacter pylori-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* **157**:729-35.
- Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR and Braun J (2000) Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**:23-31.
- Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J and Lochs H (1998) Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer. *Gastroenterology* **115**:281-6.
- Syngal S, Schrag D, Falchuk M, Tung N, Farraye FA, Chung D, Wright M, Whetsell A, Miller G and Garber JE (2000) Phenotypic characteristics associated with the APC gene I1307K mutation in Ashkenazi Jewish patients with colorectal polyps. *Jama* **284**:857-60.
- Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, Satoh T, Takimoto R, Kato J, Sakamaki S and Niitsu Y (2001) Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **121**:599-611.
- Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, Lin SN, Toyokawa T, Okada H, Shiratori Y and Oguma K (2004) Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology* **150**:3913-22.
- Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, DiMagno EP, Carpenter HA, Perez-Perez GI and Blaser MJ (1991) Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection. *J Natl Cancer Inst* **83**:1734-9.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP and He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**:530-5.
- Tanida S, Joh T, Itoh K, Kataoka H, Sasaki M, Ohara H, Nakazawa T, Nomura T, Kinugasa Y, Ohmoto H, Ishiguro H, Yoshino K, Higashiyama S and Itoh M (2004) The mechanism of cleavage of EGFR ligands induced by inflammatory cytokines in gastric cancer cells. *Gastroenterology* **127**:559-69.
- Tatsu K, Hayashi S, Shimada I and Matsui K (2005) Cyclooxygenase-2 in sporadic colorectal polyps: immunohistochemical study and its importance in the early stages of colorectal tumorigenesis. *Pathol Res Pract* **201**:427-33.
- Taylor A (1993a) Aminopeptidases: structure and function. *Faseb J* **7**:290-8.
- Taylor A (1993b) Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *Trends Biochem Sci* **18**:167-71.

- Tetsu O and McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**:422-6.
- Thongboonkerd V, Luengpailin J, Cao J, Pierce WM, Cai J, Klein JB and Doyle RJ (2002) Fluoride exposure attenuates expression of *Streptococcus pyogenes* virulence factors. *J Biol Chem* **277**:16599-605.
- Thorstensen L, Lind GE, Lovig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO and Lothe RA (2005) Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* **7**:99-108.
- Thune I and Furberg AS (2001) Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Med Sci Sports Exerc* **33**:S530-50; discussion S609-10.
- Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda DP, Borovska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P and Kokesova A (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* **93**:97-108.
- Torimura T, Ueno T, Kin M, Harada R, Nakamura T, Kawaguchi T, Harada M, Kumashiro R, Watanabe H, Avraham R and Sata M (2001) Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins. *Hepatology* **34**:62-71.
- Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S and Kuwano M (2000) Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer* **85**:182-8.
- Toshina K, Hirata I, Maemura K, Sasaki S, Murano M, Nitta M, Yamauchi H, Nishikawa T, Hamamoto N and Katsu K (2000) Enprostil, a prostaglandin-E(2) analogue, inhibits interleukin-8 production of human colonic epithelial cell lines. *Scand J Immunol* **52**:570-5.
- Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M and Labigne A (2003) Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* **124**:1408-19.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
- Tsujii M and DuBois RN (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* **83**:493-501.
- Tsujii M, Kawano S and DuBois RN (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3336-40.
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M and DuBois RN (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* **93**:705-16.
- Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT and Fahey TJ, 3rd (1999) Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* **59**:987-90.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N and Schlemper RJ (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* **345**:784-9.
- van der Wiel-Korstanje JA and Winkler KC (1975) The faecal flora in ulcerative colitis. *J Med Microbiol* **8**:491-501.
- van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburger P and Offerhaus GJ (2002) Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol* **196**:171-9.

- Veeman MT, Axelrod JD and Moon RT (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* **5**:367-77.
- Venkatakrishnan G, Salgia R and Groopman JE (2000) Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **275**:6868-75.
- Vestal ML, Juhasz P and Martin SA (1995) Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **9**:1044-1050.
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ and Ferrero RL (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**:1166-74.
- Vicari AP and Caux C (2002) Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**:143-54.
- Vilaichone RK, Mahachai V, Kullavanijaya P and Nunthapisud P (2002) Spontaneous bacterial peritonitis caused by Streptococcus bovis: case series and review of the literature. *Am J Gastroenterol* **97**:1476-9.
- Vince KG, Kantor SR and Descalzi J (2003) Late infection of a total knee arthroplasty with Streptococcus bovis in association with carcinoma of the large intestine. *J Arthroplasty* **18**:813-5.
- Waisberg J, Matheus Cde O and Pimenta J (2002) Infectious endocarditis from Streptococcus bovis associated with colonic carcinoma: case report and literature review. *Arg Gastroenterol* **39**:177-80.
- Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, Das SK, Dey SK and DuBois RN (2004) Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell* **6**:285-95.
- Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T and Raz A (1996) Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res* **56**:2960-3.
- Watson AJ (2004) Apoptosis and colorectal cancer. *Gut* **53**:1701-9.
- Wendum D, Masliah J, Trugnan G and Flejou JF (2004) Cyclooxygenase-2 and its role in colorectal cancer development. *Virchows Arch* **445**:327-33.
- Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, Wilke CA, Gilbert AR and Strieter RM (1993) Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* **151**:2166-75.
- Whalan RH, Funnell SG, Bowler LD, Hudson MJ, Robinson A and Dowson CG (2006) Distribution and genetic diversity of the ABC transporter lipoproteins PiuA and PiaA within Streptococcus pneumoniae and related streptococci. *J Bacteriol* **188**:1031-8.
- Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P and Pals ST (1993) Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* **53**:4754-6.
- Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H and Pals ST (1999) Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* **154**:515-23.
- Willett WC (2005) Diet and cancer: an evolving picture. *Jama* **293**:233-4.
- Willhite DC and Blanke SR (2004) Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* **6**:143-54.
- Williams CS, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps LW, Nanney LB, Beauchamp RD and DuBois RN (1996) Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology* **111**:1134-40.

- Wilson AJ, Byron K and Gibson PR (1999) Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. *Clin Sci (Lond)* **97**:385-90.
- Wilson J and Balkwill F (2002) The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol* **12**:113-20.
- Wodarz A and Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**:59-88.
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H and Ristimäki A (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* **58**:4997-5001.
- Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG and White JM (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* **131**:275-8.
- Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP, Ben-Baruch A, Van Damme J and Wang JM (1998) Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem* **255**:67-73.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL and Simmons DL (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2692-6.
- Xu W, Seiter K, Feldman E, Ahmed T and Chiao JW (1996) The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood* **87**:4502-6.
- Yamamoto H, Itoh F, Senota A, Adachi Y, Yoshimoto M, Endoh T, Hinoda Y, Yachi A and Imai K (1995) Expression of matrix metalloproteinase matrilysin (MMP-7) was induced by activated Ki-ras via AP-1 activation in SW1417 colon cancer cells. *J Clin Lab Anal* **9**:297-301.
- Yamamoto M, Takeda K and Akira S (2004) TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* **40**:861-8.
- Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM and Gaynor RB (1999) Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* **274**:27307-14.
- Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HM, Reddy R, Arnqvist A and Graham DY (2005) Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*.
- Yamashita M and Fenn J (1984a) Electrospray ion source. Another variation on the Free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**:4451-4460.
- Yamashita M and Fenn J (1984b) Negative Ion Production with the electrospray Ion Source. *J. Phys. Chem.* **88**:4671-4675.
- Yan SR, Joseph RR, Rosen K, Reginato MJ, Jackson A, Allaire N, Brugge JS, Jobin C and Stadnyk AW (2005) Activation of NF-kappaB following detachment delays apoptosis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* **24**:6482-91.
- Yao PL, Lin YC, Wang CH, Huang YC, Liao WY, Wang SS, Chen JJ and Yang PC (2005) Autocrine and paracrine regulation of interleukin-8 expression in lung cancer cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**:540-7.
- Yates JRr (2000) Mass spectrometry. From genomics to proteomics. *Trends Genet* **16**:5-8.
- Yin J, Harpaz N, Tong Y, Huang Y, Laurin J, Greenwald BD, Hontanosas M, Newkirk C and Meltzer SJ (1993) p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* **104**:1633-9.
- Yin MJ, Yamamoto Y and Gaynor RB (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**:77-80.

- Younes H, Coudray C, Bellanger J, Demigne C, Rayssiguier Y and Remesy C (2001) Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr* **86**:479-85.
- Youngs SJ, Ali SA, Taub DD and Rees RC (1997) Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* **71**:257-66.
- Yu HG, Yu LL, Yang Y, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE and Schmitz F (2003) Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis. *Oncology* **65**:37-45.
- Yu J and Zhang L (2005) The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:851-8.
- Yu Y and Chadee K (1998) Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* **161**:3746-52.
- Zambello R, Trentin L, Facco M, Siviero M, Galvan S, Piazza F, Perin A, Agostini C and Semenzato G (2000) Analysis of TNF-receptor and ligand superfamily molecules in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* **96**:647-54.
- Zarembek KA and Godowski PJ (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* **168**:554-61.
- Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB and De Marzo AM (2004) Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* **215**:1-20.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA and Ghosh S (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**:1522-6.
- Zhang H and Sun XF (2002) Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* **97**:1037-41.
- Zhang JT, Wang MW, Zhu ZL, Huo XH, Chu JK, Cui DS, Qiao L and Yu J (2005) Increased expression of cyclooxygenase-2 in first-degree relatives of gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* **11**:4918-22.
- Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW and Vogelstein B (2000) Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* **290**:989-92.