



HAL
open science

Impact du dioxyde de titane sur le microbiote intestinal et sur la carcinogénèse colique

Delphine Boucher

► To cite this version:

Delphine Boucher. Impact du dioxyde de titane sur le microbiote intestinal et sur la carcinogénèse colique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Clermont Auvergne (UCA), Clermont-Ferrand, FRA., 2024. <tel-04794241>

HAL Id: tel-04794241

<https://hal.science/tel-04794241v1>

Submitted on 20 Nov 2024

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

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



HAL Authorization

Université Clermont Auvergne

**Rapport d'activité pour l'obtention de
L'Habilitation à Diriger des Recherches**

Présentée et soutenue par

Delphine BOUCHER

le 30 mai 2024

***Impact du dioxyde de titane sur le microbiote intestinal
et sur la carcinogénèse colique***

Maître de conférences en Microbiologie (CNU 64), Institut Universitaire de Technologie,
Département Génie Biologique, Aubière

Laboratoire Microbes intestin inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH)
UMR 1071 Inserm/Université Clermont Auvergne, USC-INRAE 1382, Clermont-Ferrand

Composition du jury

Rapporteurs :

Dr. Shaynoor DRAMSI, Institut Pasteur, Paris.

Pr. Benoît FOLIGNE, INFINITE U1286 INSERM/Université de Lille/CHU, Lille.

Dr. Muriel MERCIER-BONIN, Toxalim UMR 1331 INRAE, Toulouse.

Examineurs :

Pr. Mathilde BONNET, M2iSH, UMR1071 Inserm/UCA/USC-INRAE 1382, Clermont-Ferrand.

Pr. Emmanuel BUC, EnCoV, Institut Pascal, UMR 6602 CNRS/UCA/SIGMA, Clermont-Ferrand.

Pr. Frédéric DELBAC, LMGE, UMR 6023 CNRS/UCA, Clermont-Ferrand.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement les membres du jury qui me font l'honneur et le plaisir d'évaluer ce travail. Madame la Directrice de Recherche Shaynoor Dramsi, Madame la Directrice de Recherche Muriel Mercier-Bonin et Monsieur le Professeur Benoît Foligné, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapportrices et rapporteur de ce travail, d'avoir pris du temps pour lire mon manuscrit et de rédiger un rapport malgré un emploi du temps que j'imagine bien chargé. Je remercie également Monsieur le Professeur Emmanuel Buc et Monsieur le Professeur Frédéric Delbac d'avoir examiné ce travail. Madame la Professeure Mathilde Bonnet, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury ; merci de m'avoir proposé de venir travailler avec toi sur la partie cancer dès que je suis arrivée au laboratoire ; merci très sincèrement pour tes conseils, ta bienveillance, ta confiance, ton soutien... (tout cela allant bien au-delà du côté professionnel).

Je voudrais ensuite remercier Nicolas Barnich. Nicolas, merci de m'avoir donné l'opportunité de venir travailler dans ton laboratoire et de m'avoir soutenue et accueillie après une période bien difficile. Je te suis profondément reconnaissante pour ton aide, tes encouragements... que ce soit pour la partie recherche ou enseignement.

Monique Alric, merci aussi à toi qui a été présente quand il le fallait.

Je remercie tous les collègues et étudiants que j'ai pu côtoyer dans les différents laboratoires auxquels j'ai appartenu ou que je côtoie encore et qui m'ont tant apporté sur les aspects scientifique ou personnel :

- Au LMGE : Didier Debroas, merci de m'avoir fait découvrir la recherche en écologie microbienne. Si j'en suis à ce stade aujourd'hui, je dois reconnaître quand même que c'est en partie grâce à vous. Peut-être même que nous allons retravailler ensemble sur les bactériophages après 18 ans de séparation 😊. Merci Christophe Portelli, les deux Jean-Claude (Romagoux et Demeure) pour les bons moments passés sur le terrain, Mathilde Richardot-Le Breton, Agnes Vellet, Aurélie Thénot pour l'aide technique. Merci ensuite à Corinne Biderre-Petit : quel plaisir de travailler avec toi, de discuter et de se faire de bons repas arrosés mais je ne te remercie pas pour les gros mots qui m'échappent constamment depuis que je t'ai côtoyée... 😊 Brigitte Chebance, Anne Moné, Cécile Militon, Jérémie

Denonfoux, Sébastien Terrat, Eric Dugat-Bony, Nicolas Parisot, Frédéric Delbac, Hicham El Alaoui, Marie Diogon merci à vous tous.

- EA CIDAM : Monique Alric, Céline Ribière, Cyrielle Gasc, Stéphanie Blanquet-Diot, Sylvain Denis, Valérie Hoffart, Eric Beyssac, Ghislain Garrait, Sandrine Chalancon.
- A l'ensemble du laboratoire M2iSH : vous êtes bien trop nombreux pour que je puisse tous vous citer mais merci à tous !

Merci aux différents stagiaires et étudiants de Master 2 et de thèse que j'ai pu encadrer ou co-encadrer et sans qui je ne serai pas là : Céline, Cyrielle, Cécile (x2), Valérie, Maxime, Thomas, Théo, Gwenaëlle et la petite 😊 dernière : Charline. J'espère que tu vas prendre autant de plaisir que moi j'en ai eu pendant ma thèse.

Merci également à l'ensemble du personnel et collègues de l'IUT et plus particulièrement : Agathe Gélot (une vraie pile !) et Eric Peyretailade (les chefs de départements) ; Jérémy, Nicolas et Lucie les microbiologistes (Lucie, j'ai une tendre pensée pour toi, merci pour ton soutien et promis tu auras bientôt ta valise...) ; Catherine (qui est partie à la retraite l'année dernière) et Laureine, les techniciennes en microbiologie ; Florence et Pascale, les secrétaires du département. Bien sûr, je n'oublie pas Myriam Antri, Pierre Daumar, Philippe Luccarini avec qui les discussions sont souvent très animées !

Nombre des personnes citées précédemment sont devenues des amis. Elles se reconnaîtront.

D'un point de vue plus personnel, cette HDR est l'occasion pour moi de remercier aussi tous les amis et proches en dehors du laboratoire. Cécile Lépère (ou tata Cécile pour les enfants), j'aurai pu te mettre dans les remerciements du laboratoire mais notre relation va bien au-delà du professionnel. Merci pour tout ce que tu as fait et que tu continues de faire pour moi mais aussi pour Antoine et les enfants. Tu fais partie de la famille 😊 Merci à Maéliane, ma petite sœur de cœur ; Cathy et Stephen ; Karine, Marie et JC ; toutes les copines de danse : Nadège, Manon, Rachel, Juliette, Estelle, Emilie, Hélène... Merci à mes parents et à mes beaux-parents.

Pour finir, car on garde le meilleur pour la fin 😊, je voudrais vous remercier tous les trois : Antoine, Gaël et Agathe ou plutôt Toinou, Gaëlou et Agathoune. Antoine, mon pilier, je

te suis reconnaissante d'être là à mes côtés depuis le début. Qu'est-ce que tu en as supporté entre la thèse, le parcours en tant que Maître de Conférences sur Aurillac et sur Clermont-Ferrand, et maintenant l'HDR... tu as été d'un soutien sans faille en gérant en plus le quotidien. Je suis fière de toi et de ce que nous sommes devenus et des enfants que nous avons eus. Gaël, mon doux rêveur, judoka, handballeur, waterpolo man, CrossFiteur et maintenant lutteur à l'humour décapant (un peu trop parfois mais on sait de qui tu tiens !) je te souhaite de trouver ta voie et de t'épanouir dans le chemin que tu suivras. Agathe, ma souriante et pétillante danseuse aux yeux bridés (là par contre on ne sait pas de qui tu tiens !), c'est bien grâce à toi en partie que je passe mon HDR. Je ne sais plus combien de fois je t'ai entendu me dire : « bon c'est quand que tu passes ton HDR ? » Ta détermination te mènera loin je l'espère. Merci donc à tous les trois de m'avoir soutenue et supportée mais je ne comprends définitivement pas les différents petits surnoms que vous m'avez attribués : Dragma, Mumzilla, Calimodo, Palpatine, Reverend mother ...

Abréviations

| | |
|---|--|
| ADN : Acide Désoxyribonucléique | FITC : Isothiocyanate de fluorescéine |
| ADNr : ADN ribosomique | HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique |
| APase : Alcaline Phosphatase | HMP : « Human Microbiome Project » |
| αGlcase : α -Glucosidase | HNPCC : « Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer » |
| AGCC : Acides Gras à Chaînes Courtes | IARC : « International Agency for Research on Cancer » |
| ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail | IL : Interleukine |
| AOM : azoxymethane | IMC : Indice de Masse Corporelle |
| APC, Apc : « Adenomatous Polyposis Coli » | INRS : Institut National sur la Recherche et la Sécurité |
| APC^{min/+} : « Adenomatous Polyposis Coli multiple intestinal neoplasia/+ » | LCN-2 : Lipocaline 2 fécale |
| APHP : Assistance publique-Hôpitaux de Paris | LAPase : Leucine aminopeptidase |
| ARDRA : « Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis » | MET : Microscope électronique à transmission |
| ARN : Acide Ribonucléique | MetaHIT : « Metagenomics of the Human Intestinal Tract » |
| ARNr : ARN ribosomique | MC : Maladie de Crohn |
| BaP : Benzo[a]pyrène | MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin |
| βGlcase : β -Glucosidase | MMR : « MisMatch Repair » |
| CCB : Composition de la Communauté Bactérienne | MO : Matière Organique |
| CCR : Cancer Colorectal | MOI : « Multiplicity Of Infection » |
| CDT : « Cytolethal Distending Toxin » | Muc1 : « Mucin-1 » |
| Cif : « cycle inhibiting factor » | Muc2 : « Mucin-2 » |
| CEI : Cellules Épithéliales Intestinales | NGS : « Next Generation Sequencing » |
| CHU : Centre Hospitalier Universitaire | NP : Nanoparticules |
| CICS : Centre Imagerie Cellulaire Santé | OTU(s) : « Operational Taxonomic Units », Unité(s) Taxonomique(s) Opérationnelle(s) |
| CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer | PAF : Polypose Adénomateuse Familiale |
| CNF : «Cytotoxic Necrotizing Factor » | PC : Poids Corporel |
| CoPEC : <i>Escherichia coli</i> productrices de colibactine | PCNA : « Proliferating cell nuclear antigen » |
| CPEC : <i>Escherichia coli</i> productrices de cyclomodulines | PCE : Perchloroéthylène |
| DCCHO : « Dissolved Combined Carbohydrates », polysaccharides dissous | PCR : « Polymerase Chain Reaction » |
| DCE : Dichloroéthylène | PCRq : « Polymerase Chain Reaction » quantitative |
| DFCHO : « Dissolved Free Carbohydrates », monosaccharides dissous | pks : « polykétide synthase » |
| DEH : Dose Équivalente Humaine | RCH : Rectocolite hémorragique |
| DGGE : « Denaturing Gradient Gel electrophoresis » | ROS : « reactive oxygen species », espèces réactives de l'oxygène |
| EDS : « energy-dispersive X-ray spectroscopy », spectroscopie de rayons X à Dispersion d'Énergie | RT-PCRq : « reverse transcriptase-PCR » quantitative |
| EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments | SIMS : « Nanoscale secondary ion mass spectrometry » |
| ETBF : « Enterotoxinogen <i>Bacteroides Fragilis</i> » | SOMIVAL : Société de Mise en Valeur de l'Auvergne et du Limousin |
| FCA : Foyer de Cryptes Aberrantes | TCE : Trichloroéthylène |
| FISH : « Fluorescent In Situ Hybridization » | TiO₂ : Dioxyde de titane |
| | TiO₂ NP : Dioxyde de titane nanoparticulaire |
| | TNFα : « Tumor Necrosis Factor alpha » |
| | T-RF : « Terminal-Restriction Fragment » |
| | T-RFLP : « Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism » |

TTGE : « Temporal Temperature Gel electrophoresis »

VC : Chlorure de Vinyle

WT : « Wild Type »

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Partie 1 : Curriculum vitae..... | 1 |
| Fonctions universitaires et positions..... | 2 |
| Cursus et diplômes..... | 3 |
| Activités pédagogiques..... | 3 |
| Responsabilités pédagogiques..... | 5 |
| Responsabilités collectives, missions d'intérêt général..... | 5 |
| Demandes de financement, participations à des projets..... | 6 |
| Collaborations actuelles..... | 8 |
| Participation à des congrès..... | 8 |
| Participation à des jurys de thèse, à des comités de thèse..... | 12 |
| Distinction-prix..... | 13 |
| Liste des travaux et publications..... | 13 |
| Activités d'encadrement..... | 16 |
| Partie 2 : Synthèse des activités de recherche..... | 20 |
| Introduction..... | 21 |
| I. Structure, dynamique et activité des communautés procaryotiques en milieu lacustre..... | 26 |
| 1. Contexte du travail et objectifs..... | 26 |
| 2. Structure et dynamique de la communauté procaryotique planctonique lacustre..... | 27 |
| 3. Relation entre l'activité, la structure de la communauté procaryotique et les paramètres environnementaux..... | 29 |
| II. Perturbations anthropiques sur la structure et l'activité des communautés bactériennes en milieux artificiels et naturels..... | 31 |
| 1. En milieu artificiel : système de biodégradation des graisses..... | 31 |
| 2. En milieu naturel : écosystèmes terrestre, aquatique et murin..... | 33 |
| a. Environnement terrestre contaminé par des hydrocarbures aliphatiques..... | 34 |
| b. Environnement aquatique et présence d'alcènes chlorés..... | 35 |
| c. Environnement digestif et hydrocarbures aromatiques polycycliques..... | 38 |
| Partie 3 : Projet de recherche..... | 43 |
| I. Le cancer colorectal..... | 44 |
| 1. Généralités..... | 44 |
| 2. De la cellule normale à l'adénocarcinome..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| a. Structure de la paroi..... | 45 |
| b. Evènements tissulaires et cellulaires du CCR..... | 45 |
| c. Bases moléculaires de la carcinogénèse colorectale..... | 46 |
| 2. Etiologie et facteurs de risque..... | 47 |
| a. Facteurs génétiques..... | 47 |
| b. Antécédents personnels ou antécédents familiaux..... | 47 |
| c. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin..... | 48 |
| d. Age et sexe..... | 48 |
| e. Facteurs environnementaux..... | 48 |
| II. Microbiote intestinal et carcinogénèse colique..... | 51 |
| 1. Fonctions du microbiote intestinal..... | 51 |
| 2. Composante bactérienne du microbiote intestinal..... | 51 |
| 3. Microbiote intestinal et cancer colorectal..... | 53 |
| 4. <i>Escherichia coli</i> productrice de colibactine et cancer colorectal..... | 55 |
| III. Le dioxyde de titane..... | 58 |
| 1. Généralités sur les nanomatériaux et les nanoparticules..... | 58 |
| 2. Le dioxyde de titane..... | 58 |
| 3. Le dioxyde de titane, un potentiel carcinogène au niveau intestinal ?..... | 59 |
| a. Toxicité du TiO ₂ , système digestif et carcinogénèse colorectale..... | 59 |
| b. TiO ₂ et microbiote intestinal..... | 60 |
| IV. Axes de recherche..... | 61 |
| Tache 1 : Etude des interactions entre souches cliniques CoPEC et cellules épithéliales intestinales..... | 62 |
| Tache 2 : impact du TiO ₂ sur la capacité de colonisation des CoPEC en modèle murin prédisposé à développer un CCR..... | 65 |
| Tache 3 : les bactériophages de CoPEC : rôle et implication au sein du microbiote intestinal..... | 71 |
| Références bibliographiques..... | 75 |

Curriculum vitae

Delphine BOUCHER, née RIGAUDIERE

Née le 09/06/1977 à Aurillac (Cantal), mariée, 2 enfants

Coordonnées personnelles :

28 rue de l'écorchade
63400 Chamalières

Coordonnées professionnelles :

M2iSH, UMR U1071 Inserm/UCA-USC INRAE 1382
CBRV – 28, Place Henri Dunant
63001 Clermont-Ferrand Cedex
☎ : 04 73 17 70 84 / 04 73 17 83 43
✉ : delphine.boucher@uca.fr

FONCTIONS UNIVERSITAIRES ET POSITIONS

2016 : Intégration du laboratoire Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), UMR1071 Inserm/Université Clermont Auvergne (UCA) - USC INRAE 1382. Directeur : Pr Nicolas Barnich

Sujet de recherche : Etude de l'impact de molécules contaminantes sur le microbiote intestinal dans le cadre de pathologies digestives chroniques.

2012 : Intégration de l'équipe de recherche Equipe d'Accueil 4678 Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament (EA4678 CIDAM) de l'Université d'Auvergne (UdA). Directrice : Pr Monique Alric

Sujet de recherche : Etude de l'impact de polluants aromatiques polycycliques sur le microbiote intestinal.

2010 : Mobilité de l'IUT du site d'Aurillac vers l'IUT du site d'Aubière.

2007 : Maître de Conférences, section CNU 64, auprès de l'UdA - Institut Universitaire Technologique (IUT) d'Aurillac, département Génie Biologique (GB).

Sujet de recherche : Etude des communautés bactériennes et de leurs capacités métaboliques épuratrices dans divers environnements pollués.

Laboratoire d'accueil : Laboratoire Microorganisme : Génome et Environnement (LMGE), UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière. Directeur : Dr Christian Amblard, Equipe : Génomique Intégrée des Interactions Microbiennes, responsable : Pr Pierre Peyret.

2006-2007 : Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (temps complet) à l'UdA - IUT d'Aurillac, département GB. Laboratoire d'accueil : LMGE, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière.

Sujet de recherche : Etude des communautés bactériennes de sols pollués par des hydrocarbures, sous la responsabilité du Pr Pierre Peyret.

2006 : Stage post-doctoral. INRA UMR Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et Ecosystèmes Limniques (CARRTEL - Thonon les Bains). Directeur : Dr Jean François Humbert.

Sujet de recherche : Diversité et fonctionnement des communautés procaryotiques dans le lac du Bourget par des approches d'empreintes moléculaires et de métagénome.

CURSUS ET DIPLOMES

2002-2005 : Doctorat d'Université en Biologie – Spécialité : Ecologie Microbienne, soutenu le 22 novembre 2005 à l'université Blaise Pascal (UBP), Clermont-Ferrand. *Mention Très Honorable avec les Félicitations du Jury.*

- **Sujet** : Structure, dynamique et activité des communautés procaryotiques en milieu lacustre. Etude du lac-réservoir de la Sep (Puy de Dôme - France).
- Directeur de thèse : Pr Didier Debroas.
- Financement : convention CIFRE avec l'entreprise SOMIVAL (Clermont-Ferrand).
- Laboratoire d'accueil : Université Blaise Pascal, LMGE, UMR CNRS 6023, 63177 Aubière.

2001 : Diplôme d'Etude Approfondie Ecologie des Systèmes Continentaux, option Aquatique. *Mention Bien.*

Sujet : Etude des conditions d'amplification de l'ADNr 16S et de la diversité bactérienne dans les sédiments d'un lac eutrophe (Aydat – Massif Central). Laboratoire d'accueil : LMGE, UMR CNRS 6023.

Université Paul Sabatier - Toulouse III, UBP- Clermont-Ferrand II, Université Sciences et Techniques du Languedoc - Montpellier II.

2000 : Maîtrise Biologie des Populations et des Ecosystèmes, mention Environnement. *Mention Assez Bien.*

UBP - Clermont-Ferrand II.

1999 : Licence Biologie des Organismes. *Mention Assez Bien.*

UBP - Clermont-Ferrand II.

ACTIVITES PEDAGOGIQUES

AU SEIN DE L'UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

➤ Enseignements à l'IUT, département Génie Biologique (GB)

Les enseignements que j'assure actuellement (CM, TD, TP), sur une base de 192h équivalent TD, concernent la **microbiologie générale et médicale** ainsi que la **biologie moléculaire**. Ils sont dispensés au sein du département Génie Biologique sur le site d'Aubière en Bachelor Universitaire de Technologie (BUT) Génie Biologique dans les parcours Biologie médicale et biotechnologie (BMB) et Diététique et Nutrition (DN) (anciennement Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) option Analyses Biologiques et Biochimiques (ABB) et Diététique (Diet)).

J'ai la responsabilité de 5 modules d'enseignements (4 ressources et 1 Situation d'apprentissage et d'évaluation (SAE)) ainsi que d'un TP de microbiologie et d'un TP de biologie moléculaire en BUT2. Je suis également co-responsable des enseignements des TP de microbiologie médicale en BUT1 et BUT2.

Lorsque j'étais sur le site d'Aurillac, j'étais responsable de tous les modules et

enseignements de microbiologie pour les trois options du département (Bioinformatique, Agronomie et Environnement).

| Diplôme national | Niveau | Intitulé | Nature | Volume horaire | % |
|--|--------|------------------------------------|--------|----------------|------|
| IUT Génie Biologique – site d’Aubière | | | | | |
| BUT | Bac+1 | Microbiologie générale | CM | 11 | 10,5 |
| BUT | Bac+2 | Microbiologie générale et médicale | CM | 13 | |
| BUT | Bac+1 | Microbiologie générale | TD | 17,5 | 15,5 |
| BUT | Bac+2 | Microbiologie générale et médicale | TD | 8 | |
| BUT | Bac+2 | Biologie moléculaire | TD | 10 | |
| BUT | Bac+1 | Microbiologie générale et médicale | TP | 78 | 74 |
| BUT | Bac+2 | Microbiologie générale et médicale | TP | 46 | |
| BUT | Bac+2 | Biologie moléculaire | TP | 45 | |
| De 2007 à 2010 – IUT Génie Biologique – Site d’Aurillac | | | | | |
| DUT | Bac+1 | Microbiologie générale | CM | 12 | 8,9 |
| DUT | Bac+2 | Microbiologie de l’eau | CM | 10 | |
| DUT | Bac+1 | Microbiologie générale | TD | 64 | 30,8 |
| DUT | Bac+2 | Microbiologie de l’eau | TD | 12 | |
| DUT | Bac+1 | Microbiologie générale | TP | 100 | 60,3 |
| DUT | Bac+2 | Microbiologie de l’eau | TP | 49 | |

J’ai également dispensé en 2014 et en 2015 des CM (15h) sur les bases de la biologie en **Diplôme Universitaire de Sciences Fondamentales pour la Technologie (DUFST)**.

Activités pédagogiques annexes :

- Encadrements de projets tutorés en 1^{ère} (ABB1) et 2^{nde} année (ABB2).
- Participation au jury des soutenances de projets tutorés de 1^{ère} et 2^{nde} année ABB.
- Suivis et visites des étudiants en stage (ABB2, BMB2).
- Soutenance de stages ABB2, BMB2.
- Etude des dossiers pour le recrutement des étudiants en 1^{ère} année d’IUT Génie Biologique.

➤ **Enseignements en Master 1 Biologie et Santé**

2017-2020 :

- CM : techniques d’analyses du microbiote intestinal (3h)

EN DEHORS DE L’UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

➤ **Enseignements en Master 2 Méthodes de Recherche en Environnement-Santé-Toxicologie-Ecotoxicologie (M-RESTE) de l’université Joseph Fourier (Grenoble)**

2012-2015 : CM : microorganismes et bioremédiation des écosystèmes pollués (3h).

RESPONSABILITES PEDAGOGIQUES

RESPONSABILITES AU SEIN DU DEPARTEMENT GENIE BIOLOGIQUE

- **Depuis septembre 2020 : Directrice des Etudes des étudiants du BUT2 option BMB (et auparavant du DUT2 option ABB2) sur le site d'Aubière.**

Taches inhérentes à la direction des études :

- Effectuer le suivi régulier des étudiants qui composent la promotion (environ une centaine).
 - Assurer le recrutement des étudiants (entre 14 et 20 étudiants chaque année) qui candidatent directement en 2^{ème} année de BUT BMB *via* la plateforme e-candidat.
 - Créer et gérer au quotidien l'emploi du temps (EDT) pour les BUT2 pour les ressources et SAE communes pour les 2 options BMB et DN soit pour 126 étudiants (CM, 5 groupes TD et 10 groupes TP) ainsi que les ressources et SAE spécifiques pour l'option BMB soit 99 étudiants (CM, 4 groupes TD et 8 groupes TP).
 - Gestion des notes et des absences.
 - Participer aux journées portes ouvertes de l'IUT et à Infosup/Auversup.
- **Depuis septembre 2023 : correspondante pour l'AFGSU (Attestation de Formation aux Gestes et Soins d'Urgence) du département GB de l'IUT (site d'Aubière).**
 - **2019 : gestion de l'EDT des 112 étudiants de 1^{ère} année de DUT (ABB1 et DIET1) du département GB à l'IUT sur le site d'Aubière.**
 - **De septembre 2008 à juin 2010 : responsable de l'EDT de la 2^{nde} année du DUT GB, option Environnement sur le site d'Aurillac (42 étudiants) (CM, TD (2 groupes), TP (3 groupes)).**

RESPONSABILITES COLLECTIVES, MISSIONS D'INTERET GENERAL

PARTICIPATION A DES CONSEILS DE COMPOSANTES, DE LABORATOIRES

- **Depuis 2023 : membre nommé du conseil de perfectionnement du département GB63 de l'UCA.**
- **Depuis 2023 : membre nommé de la commission de recrutement en BUT2 et BUT3 de l'UCA.**
- **2019-2020 : membre nommé du conseil scientifique de l'IUT de Clermont-Ferrand.**
- **Depuis 2017 : membre élu au Conseil de Département Génie Biologique, IUT, UCA.**
- **Depuis 2016 : membre du conseil de laboratoire M2iSH.**

PARTICIPATIONS A DES COMMISSIONS, DES JURYS DE CONCOURS

- **2023 : membre du comité de sélection pour le poste de maitre de Conférences** à l'IUT de Clermont-Ferrand, site d'Aurillac : COS 64 MCF 0132 – G 125 – IUT CA BIO 15 / UMR.
- **2023 : membre de la commission pour le recrutement du poste d'ATER 01 Bio 63** à l'IUT de Clermont-Ferrand, site d'Aubière.

PARTICIPATIONS A DES RESEAUX

- **Depuis 2022 : membre du réseau Nutrition Activité physique Cancer Recherche** (Réseau NACRe).
- **Depuis 2021 : « contact scientifique » de l'UCA auprès de l'European Food Safety Authority (EFSA)** pour le thème 4.9 « Chemical contaminants ».
- **Depuis 2017 : membre du « programme transversal microbiote » (PTM) de l'Inserm** (coordinateur : Pr Nadine Cerf-Bensoussan, Institut Imagine, Paris).

AUTRES

- **2017 et 2021 : participation au jury des journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement** de l'UCA.
- **Depuis 2022 : participation au jury de soutenance de stages de recherche d'étudiants en médecine** pour l'obtention d'équivalence de Master 1.
- **Participation au jury de soutenance de stages du Master 1 et/ou 2 Microbiologie Parcours : Génome, écologie et physiologie microbienne (tous les ans, soit en brigade volante soit en brigade fixe).**

DEMANDE DE FINANCEMENTS, PARTICIPATIONS A DES PROJETS

Porteur de projet :

2020-2021 : Projets exploratoires, département MICA (INRAE). ECOLOGIE : Impact de facteurs environnementaux sur la colonisation de bactéries impliquées dans des pathologies chroniques intestinales. Coordinateur : Dr Delphine Boucher, M2iSH, Clermont-Ferrand. (30 000 euros).

2018-2019 : Association François Aupetit. Impact de facteurs environnementaux sur la colonisation de bactéries impliquées dans la maladie de Crohn. Coordinateur : Dr Delphine Boucher, M2iSH, Clermont-Ferrand. (20 000 euros).

Plusieurs autres projets ont été déposés au cours des dernières années au sein du laboratoire M2iSH (Pack Ambition Recherche à la région, ANR, I-Site émergence...).

Comme partenaire dans un projet multi-équipes :

2019-2020 : Ligue contre le Cancer. Radioimmunothérapie ciblant la TSPAN8 : preuve de concept dans un modèle murin de développement spontané de tumeurs colorectales. Coordinateur : Dr Françoise Degoul, IMOST, Clermont-Ferrand.

2012-2014 : Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO). EcChlore : Rôle des microorganismes déhalorespirants dans le cycle du chlore et dans le fonctionnement d'un écosystème d'eau douce non pollué. Coordinateur : Dr. C. Biderre-Petit, LMGE, UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand.

2012 : SITA remédiation. Evaluation du traitement anaérobie des sites pollués par des solvants chlorés ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Coordinateur : Pr Pierre Peyret, EA 4678 CIDAM, Clermont-Ferrand.

2009-2012 : ANR EmergenceBio09. Supplément alimentaire pour diminuer la production de méthane chez le ruminant. (INRA Clermont-Theix). Coordinateur : Dr Diego Morgavi, INRA Theix, Clermont-Ferrand.

2009-2012 : ANR BioEnergies. Valorisation des coproduits agricoles et industriels *via* la production d'hydrogène utilisant des souches microbiennes anaérobies mésophiles. Coordinateur : Pr. Christian Larroche, Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique (LGCB), Clermont-Ferrand.

2008-2011 : ANR Génomique Microbienne à Grande Echelle. METASOIL. Découverte et compréhension de la communauté microbienne des sols par l'approche métagénomique. Coordinateur : Pr. Timothy Vogel, Ecole Centrale de Lyon, Environmental Microbial Genomics Group, Lyon.

2008-2009 : EC2CO Microbien. Caractérisation d'un consortium bactérien dégradant des hydrocarbures aromatiques polycycliques par une nouvelle approche biopuces ADN. Coordinateur : Dr. Pascal Poupin, Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE) – UMR 7146, Metz.

2008-2009 : EC2CO Microbien. Evaluation expérimentale en microcosmes de l'impact d'exemples d'herbicides (phénylurée, tricétone) sur les microorganismes d'écosystèmes aquatiques : complémentarité des approches de génétiques et métabolomiques. Coordinateur : Pr. Jacques Bohatier, LMGE, UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand.

2007-2011 : ANR-07-PRECODD (PRogramme ECotechnologies et Développement Durable). Evaluation et Développement du Traitement Anaérobie des Sites Pollués par les Solvants Chlorés (EVASOL). Coordinateur : Dr. Jean-Yves Richard, Société SITA Remédiation, Lyon.

2007-2009 : EC2CO. Microbiologie Environnementale (MicrobiEn). Methanolac : METHANogenèse et Méthanotrophie dans la zone anoxique d'un LAC méromictique (Lac Pavin, Massif Central). Coordinateur : Dr. Gérard Fonty, LMGE, UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand.

2007 : Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Etude de la composition et de

la dynamique microbienne de fontaines de biodégradation des graisses. Coordinateur : Pr. P. Peyret, LMGE, UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand.

COLLABORATIONS ACTUELLES

Dr Christophe Massard et Dr Oscar Awitor : Laboratoire de Physique de Clermont (LPC) UMR CNRS 6533 - IN2P3.

Dr Frédérick Barreau : Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD), UMR1220 Inserm, Toulouse.

Dr Romain Villéger : Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions (EBI) - UMR CNRS 7267, Poitiers.

PARTICIPATIONS A DES CONGRES

- **Communications orales : 26 dont 6 en tant qu'oratrice (soulignée)**

Juban C, Sauvaitre T, Devaux A, Roche G, Ledieu C, Brugiroux S, Godfraind C, Massard C, Awitor O, Barnich N, Bonnet M, **Boucher D**. « Impact du dioxyde de titane, sous forme d'additif alimentaire E171, sur la carcinogenèse colique et sur le microbiote intestinal en modèle murin APC^{min/+} ». 16 novembre 2023. 4èmes Automnales du Groupe Cancer Clermont Auvergne (GCCA).

Sauvaitre T, Brugiroux S, Roche G, Ledieu C, Chevarin C, Godfraind C, Massard C, Awitor O, Barnich N, Bonnet M, **Boucher D**. 2021. Food additive E171 promotes colonic tumorigenesis and induces changes in gut microbiota composition in APC^{min/+} murine model. CLARA, 29 mars-2 avril, Lyon, France (distanciel).

Ribiere C, Peyretailade E, Parisot N, Darcha C, Barnich N, **Boucher D**, Peyret P. 2014. Impact of Oral Exposure to a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, the Benzo(a)Pyrene, on Intestinal Microbiota in C57BL/6N Mice. ROWETT-INRA symposium, 16-19 juin, Aberdeen, Scotland.

Rivière C, **Boucher D**, Peyretailade E, Parisot N, Gallois N et al. 2013. Reconstruction de génomes complets de microorganismes d'intérêt au sein d'environnements complexes par une approche innovante de capture de gènes en solution. AFEM, 22-25 octobre, Parent, France.

Popova M, Parisot N, Ribière C, Denonfoux J, Dugat-Bony E, **Boucher D**, Peyretailade E, Morgavi D, Peyret P. 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce methane production by affecting rumen methanogenic Archaea diversity in wethers. GGAA, 23-26 juin, Dublin, Irlande.

Peyretailade E, Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E, **Boucher D**, Peyret P. Traitement des données de 454 : exemple de traitement. (ETEGE ; 2012 ; Aussois France).

Denonfoux J, Parisot N, Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, **Boucher D**, Morgavi DP, Peyretailade E and Peyret P. 2012. Targeted metagenome exploration by solution hybridization-selection capture coupled with next generation sequencing. ISME, Copenhagen, Denmark.

Peyret P, Denonfoux J, Parisot N, Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, **Boucher D**, Fonty G, Peyretaillade E. 2011. La capture de la fonction par des approches haut débit. Colloque de Génomique Environnementale, Lyon, France.

Denonfoux J, Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, **Boucher D**, Peyretaillade E, Peyret P. 2011. Metagenomics exploration by solution hybridization-targeted capture. FEMS 2011: 4th Congress of European Microbiologists, 26-30 juin, Geneva, Suisse.

Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, **Boucher D**, Peyretaillade E, Denonfoux J, Jaziri F, Moné A, Chebance B, Peyret P. 2011. Identification of microbial biodegradation capacities on multiple contaminated sites by functional DNA microarrays. P.11th Conference on Bacterial Genetics and Ecology - BAGECO 11, mai, Corfou, Grèce.

Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, Denonfoux J, Jaziri F, Parisot N, **Boucher D**, Moné A, Chebance B, Peyretaillade E, Peyret P. 2011. Suivi des capacités de biodégradation des solvants chlorés par des approches biopuces ADN. Journées de l'école Doctorale SVSAE, avril, Clermont-Ferrand, France.

Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, Denonfoux J, Jaziri F, Parisot N, **Boucher D**, Moné A, Chebance B, Peyretaillade E, Peyret P. 2011. Suivi des capacités de biodégradation des solvants chlorés par des approches biopuces ADN. 8ème Rencontre des Microbiologistes du pôle clermontois, avril, Clermont-Ferrand, France.

Peyret P, Jaziri F, Denonfoux J, Dugat-Bony E, Rimour S, Hill D, Curvers C, Richard JY, Peyretaillade E, **Boucher D**, Biderre-Petit C. 2011. Exploring microbial biodiversity to improve bioremediation. BIT's 1st Annual World Congress of Marine Biotechnology, 25-29 avril, Dalian, Chine.

Peyret P, Jaziri F, Denonfoux J, Dugat-Bony E, Rimour S, Hill D, Peyretaillade E, **Boucher D**, Biderre-Petit C. 2011. Complex diversity of bacterial communities during bioremediation of aliphatic hydrocarbons-contaminated soil. BIT's 1st Annual World Congress of Marine Biotechnology, 25-29 avril, Dalian, Chine.

Peyret P, Dugat-Bony E, Jaziri F, Denonfoux J, **Boucher D**, Biderre-Petit C, Hill D, Curvers C, Richard JY, Rimour S, Peyretaillade E. 2011. Probe Design Software for Explorative Phylogenetic and Functional DNA Microarrays Development in Microbial Ecology. BIT's 1st Annual World Congress of Marine Biotechnology, 25-29 avril, Dalian, Chine.

Boucher D, Debroas D. 2006. Impact de la composition de la communauté bactérienne et des facteurs environnementaux sur des activités ectoenzymatiques en milieu lacustre. VIIIème Congrès International des Limnologues d'Expression Française, 17-21 mars, Hammamet, Tunisie.

Boucher D, Jardillier L, Debroas D. 2005. Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. The 9th Symposium of Aquatic Microbial Ecology, 21-26 Août, Helsinki, Finlande.

Boucher D, Jardillier L, Debroas D. 2005. Succession de la composition de la communauté bactérienne dans deux écosystèmes aquatiques : un lac naturel et un lac-réservoir. 2^{ème} rencontre des microbiologistes du pôle Clermontois. 1er avril, Clermont-Ferrand, France.

Sime-Ngando T, Pradeep Ram AS, **Boucher D**, Debroas D and Romagoux JC. 2005. Seasonal phage bacteriolysis equals protistan bacterivory in a freshwater reservoir: coupling with the physical environment. The 1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology, 2-4 Février, Thonon-Les-Bains, France.

Sime-Ngando T, Pradeep Ram AS, **Boucher D**, Debroas D, Romagoux JC. 2004. Viral lysis, protistan bacterivory, and bacterial production in the Sep Reservoir: coupling with the physical environment. Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions, 6-8 Octobre, Pallanza, Italie.

Jardillier L, **Boucher D**, Personnic S, Jacquet S, Thénot A, Sargos D, Amblard C, Debroas D. 2004. Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status. Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions, 6-8 Octobre, Pallanza, Italie.

Jacquet S, Bettarel Y, Sime-Ngando T, Pradeep Ram AS, **Boucher D**, Jardillier L, Debroas D, Domaizon I, Personnic S, Dorigo U, Duhamel S. 2004. Quantification, diversité et rôle fonctionnel des bactériophages en milieu lacustre (quelques cas d'étude en France). VIèmes Journées de l'Ecologie Fonctionnelle, 10-12 mars, Rennes, France.

Lefranc M, **Boucher D**, Vera A, Thénot A, Desvilettes C et Debroas D. 2004. Structure et dynamique du picoplancton eucaryote dans deux écosystèmes lacustres. VIèmes Journées de l'Ecologie Fonctionnelle, 10-12 mars, Rennes, France.

Boucher D. 2003. Succession spatiale et temporelle des Eubactéries dans deux écosystèmes lacustres. Séminaire UMR CARTELE (Savoie) – UMR CNRS 6023 (Auvergne), décembre, Clermont-Ferrand, France.

Boucher D, Richardot M, Jardillier L et Debroas D. 2003. Etude des relations entre l'activité et la structure des communautés bactériennes en milieu lacustre. VIIème Congrès International des Limnologues d'Expression Française, 27 juillet-1er août, Montréal, Canada.

Jardillier L, **Boucher D**, Basset M, Amblard C, Richardot M et Debroas D. 2003. Contrôle ascendant et descendant de la structure de la communauté bactérienne dans la zone euphotique d'un lac-réservoir d'eau douce. Vèmes Journées de l'Ecologie Fonctionnelle, 12-14 mars, Nancy, France.

• **Communications affichées (20 dont 6 en tant que présentatrice)**

Ziad Al Nabhani, Caroline Carlé, **Delphine Boucher**, Luisa Morelli, Kawthar Boumessid, Nicolas Barnich, Gilles Dietrich, Sandrine Menard, Emmanuel Mas, camille Larue, Marie Carriere, Frédérick Barreau. 2023. Influence of perinatal foodborne titanium dioxide exposure on susceptibility to develop colitis in adult mice. Digestive Disease Week, 6-9 mai, Chicago, Etats-Unis.

Sauvaitre T, Brugiroux S, Roche G, Ledieu C, Chevarin C, Godfraind C, Massard C, Awitor O, Barnich N, Bonnet M, **Boucher D**. 2021. Food additive E171 promotes colonic tumorigenesis and induces changes in gut microbiota composition in APC^{min/+} murine model. CLARA, 29 mars-2 avril, Lyon, France.

Brugiroux S, Sauvaitre T, Roche G, Ledieu C, Chevarin C, Godfraind C, Massard C, Awitor O, Barnich N, Bonnet M, **Boucher D**. 2019. Impacts of additive food E171 (titanium dioxide) on the gut microbiota and colorectal carcinogenesis in APC^{min/+} murine model. Digestive Disease Week, 18-21 mai, San Diego, Etats-Unis.

Ribiere C, **Boucher D**, Parisot N, Darcha C, Barnich N, Peyret P and Peyretaillade E. 2015. Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and the gut microbiota of mice. 3rd International congress of Translational Research in Human Nutrition, 26-27 juin, Clermont-Ferrand, France.

Parisot N, Denonfoux J, Ribière C, Gasc C, Beugnot R, **Boucher D**, Peyretaillade E, Peyret P. 2014. Capturing diversity to illuminate ecosystem functioning. ISME, 24-29 aout, Séoul, Corée du Sud.

Ribière C, **Boucher D**, Peyretaillade E, Parisot N, Gallois N, Gasc C et Peyret P. 2013. Reconstruction de génome complets de microorganismes d'intérêt au sein d'environnements complexes par une approche innovante de capture de gènes en solution. AFEM, 22-25 octobre, Parent, France.

Parisot N, Denonfoux J, Ribière C, Jaziri F, Comtet S, et al. 2013. Détermination de sondes oligonucléotidiques pour outils moléculaires à haut-débit. AFEM, 22-25 octobre, Parent, France.

Popova M, Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E, **Boucher D**, Peyretaillade E, Morgavi D, Peyret P. 2013. Changes in rumen methanogenic Archaea diversity in wethers fed an antimethanogenic feed supplement. AFEM, 22-25 octobre, Parent, France.

Biderre-Petit C, Mege M, Dugat-Bony E, Denonfoux J, Parisot N., **Boucher D**, Debroas D, Peyretaillade E, Peyret P. 2012. Etude du rôle écologique des Dehalococcoidetes (microorganismes déhalorespirants) dans le fonctionnement d'un écosystème lacustre peu anthropisé, le lac Pavin. JILO, Octobre, Clermont-Ferrand, France.

Denonfoux J, Parisot N, Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, **Boucher D**, Morgavi DP, Peyretaillade E, Peyret P. 2012. Exploration métagénomique ciblée par une approche innovante de capture de gènes en solution couplée à du séquençage haut-débit. (Journées de l'école doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand, France).

Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E, **Boucher D**, Biderre-Petit C, Rimour S, Peyret P, Peyretaillade E. 2012. AFFILGOOD: An Innovative Strategy for Accurate Taxonomic Classification of Metagenomic Sequences. Ecole Thématique d'Experts en Génomique Environnementale, avril, Aussois, France.

Denonfoux J, Jaziri F, Missaoui M, Dugat-Bony E, Terrat S., Bouzid O, Dumas E, Mone A, Chebance B, Petit-Biderre C, **Boucher D**, Goncalves O, Peyretaillade E, Peyret P. 2010. Microbial communities adaptation induced by global change. ACCAE, 20-22 octobre, Clermont-Ferrand, France.

Denonfoux J, Jaziri F, Missaoui M, Dugat-Bony E, Terrat S, Bouzid O, Dumas E, Moné A, Chebance B, **Boucher D**, Goncalves O, Peyretaillade E, Peyret P. 2010. Metagenomics

exploration by microarray-based operon capture. International Society for Microbial Ecology, 22-27 août, Seattle, Etats Unis.

Etien S, **Boucher D**, Jardillier L, Lepère C, Mallet C, Debroas D. 2006. Structure and activity of Archaeal community in the oxic zone of lacustrine ecosystems. The 11th International Symposium on Microbial Ecology, 20-25 Août, Vienne, Autriche.

Pradeep Ram AS, **Boucher D**, Sime-Ngando T, Debroas D, Romagoux JC. 2005. Phage bacteriolysis, protistan bacterivory potential, and bacterial production in a freshwater reservoir: coupling with temperature. International Symposium on the Dynamics of the Ocean Biosystem, 15-18 novembre. Tokyo, Japon.

Etien S, **Boucher D**, Jardillier L, Lepère C, Mallet C, Debroas D. 2005. Structure and activity of Archaeal community in the oxic zone of lacustrine ecosystems. The 9th Symposium of Aquatic Microbial Ecology, 21-26 Août, Helsinki, Finlande.

Lepère C, **Boucher D**, Jardillier L, Domaizon I, Debroas D. 2005. Structure et facteurs de régulation du picoplancton eucaryote en milieu lacustre. Colloque d'Ecologie Microbienne, 9-12 mai, Obernay, France.

Boucher D, Richardot M, Thénot A, Debroas D. 2004. Effets de la température et des ressources sur la contribution des Eubactéries et des Archaea à la production microbienne en milieu lacustre. VIèmes Journées de l'Ecologie Fonctionnelle, 10-12 mars, Rennes, France.

Jardillier L, **Boucher D**, Amblard C, Richardot M, Debroas D. 2003. Contrôle ascendant et descendant de la structure et du fonctionnement de la communauté bactérienne dans la zone euphotique de lacs de niveau trophique différent : étude in situ en microcosmes. Colloque d'Ecologie Microbienne, 25-28 mai, Carry Le Rouet, France.

Boucher D, Richardot M, Jardillier L, Debroas D. 2003. Etude des relations entre l'activité et la structure des communautés bactériennes dans deux écosystèmes lacustres. Journées de l'Ecole Doctorale, mars, Clermont-Ferrand, France.

PARTICIPATION A DES JURYS DE THESE

2015 : Céline Ribière. « Impact d'un polluant environnemental, le benzo[a]pyrène, sur le microbiote intestinal en modèle murin ». EA 4678 CIDAM, UCA. 10 décembre 2015.

PARTICIPATION A DES COMITES DE THESE

2024 : Siméon Bakyonon, Epidémiologie des infections à entérovirus A71 depuis 2016 en France et en Europe. LMGE Equipe EPIE – UMR CNRS 6023/UCA.

2023, 2022 : Akossi Réginald, Rôle des ARNnc dans l'interaction hôte-parasite : modèle homme-microsporidies. LMGE Equipe IHP – UMR CNRS 6023/UCA

2020, 2021 : Elora Fournier. Microplastics (MPs) Fate in *in vitro* human digestive environment and study of the dialogue between epithelium, microbiota and mucus. UMR 454 UCA/INRAE MEDIS.

2020, 2021 : Thomas Merciecca. Système de sécrétion de type VI chez *Klebsiella pneumoniae* : dialogue moléculaire et / ou arme antibactérienne ? LMGE Equipe CMES – UMR CNRS 6023/UCA.

2017 : Manon Defaye. Un parasite intestinal *Blastocystis* : Une nouvelle piste dans le syndrome de l'intestin irritable. LMGE UMR CNRS 6023/UCA et Neurodol UMR1107 Inserm/UCA.

2015 : Cyrielle Gasc. Capture de gènes par hybridation couplée au séquençage de nouvelle génération pour l'exploration d'échantillons métagénomiques. EA 4678 CIDAM, UCA.

2014 : Johan Gagnière. Rôle de souches d'*Escherichia coli* dans la carcinogénèse colique : implication du stress oxydant. M2iSH, UMR1071 Inserm/UCA - USC INRA 2018.

2013, 2014 : Céline Ribière. « Impact d'un polluant environnemental, le benzo[a]pyrène, sur le microbiote intestinal en modèle murin ». EA 4678 CIDAM, UCA.

DISTINCTION-PRIX

2023. Juban C, Sauvaitre T, Devaux A, Roche G, Ledieu C, Brugiroux S, Godfraind C, Massard C, Awitor O, Barnich N, Bonnet M, **Boucher D**. « Impact du dioxyde de titane, sous forme d'additif alimentaire E171, sur la carcinogénèse colique et sur le microbiote intestinal en modèle murin APC^{min/+} ». 16 novembre 2023. 4èmes Automnales du Groupe Cancer Clermont Auvergne (GCCA). **Prix du public pour la meilleure présentation orale.**

2019. Brugiroux S, Sauvaitre T, Roche G, Ledieu C, Chevarin C, Godfraind C, Massard C, Awitor O, Barnich N, Bonnet M, **Boucher D**. Impacts of Additive Food E171 (Titanium Dioxide) on the Gut Microbiota and Colorectal Carcinogenesis in Apc^{min/+} Murine Model. **Distinction du Poster**, Digestive Disease Week (DDW), San Diego, Etats-Unis.

Liste des travaux et publications

| | 1 ^{er} auteur | 2 ^{ème} auteur | Avant dernier auteur | Dernier auteur | Autre place | Total |
|---|------------------------|-------------------------|----------------------|----------------|-------------|-------|
| Revue internationale avec comité de lecture | 4 | 6 | 2 | 1 | 4 | 17 |
| Revue, éditorial, chapitre d'ouvrage | 1 | 1 | 1 | | 2 | 5 |
| Revue sans comité de lecture | | 1 | | | | 1 |

• **Publications dans des revues internationales**

[P17] Carlé C, **Boucher D**, Morelli L, Larue C, Ovtchinnikova E, Battut L, Boumessid K, Airaud M, Quaranta-Nicaise M, Ravanat JL, Dietrich G, Menard S, Eberl G, Barnich N, Mas E, Carriere M, Al Nabhani Z, Barreau F. 2023. Perinatal foodborne titanium dioxide exposure-mediated dysbiosis predisposes mice to develop colitis through life. *Part Fibre Toxicol*. PMID: 37996842.

[P16] Ribiere C, Peyret P, Parisot N, Darcha C, Déchelotte P, Barnich N, Peyretailade E, **Boucher D**. 2016. Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Scientific Reports*. PMID: 27503127.

[P15] Biderre-Petit C, Dugat-Bony E, Mege M, Parisot N, Lorenz A, Moné A, Denonfoux J, Peyretailade E, Debroyas D, **Boucher D**, Peyret P. 2016. Distribution of *Dehalococcoidia* in the anaerobic deep water of a remote meromictic crater lake and detection of *Dehalococcoidia*-derived reductive dehalogenase homologous gene. *Plos One*. PMID: 26734727.

[P14] Jaziri F, Parisot N, Abid A, Denonfoux J, Ribière C, Gasc C, **Boucher D**, Brugère JF, Mahul A, Hill DRC, Peyretailade E., Peyret P. 2014. PhyIOPDb: a 16S rRNA oligonucleotide probe database for prokaryotic identification. *DATABASE*. PMID: 24771669.

[P13] Lepère C, Domaizon I, Taïb N, Mangot JF, Bronner G, **Boucher D** and Debroyas D. 2013. Geographic distance and ecosystem size determine the distribution of smallest protist in lacustrine ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*. PMID: 23448250.

[P12] Denonfoux J, Parisot N, Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, **Boucher D**, Morgavi D, Le Paslier D, Peyretailade E, Peyret P. 2013. Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration. *DNA research*. PMID: 23364577.

[P11] Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, Jaziri F, David MM, Denonfoux J, Lyon DY, Richard JY, Curvers C, **Boucher D**, Vogel TM, Peyretailade E and Peyret P. 2012. In situ TCE degradation mediated by complex dehalorespiring communities during biostimulation processes. *Microbial Biotechnology*. PMID: 22432919.

[P10] **Boucher D**, Laffaire JB, Jaziri F, David C, Biderre-Petit C, Duquenne P, Peyretailade E and Peyret P. 2011. Bacterial community composition of biological degreasing systems and health risk assessment for workers. *Microbial Ecology*. PMID: 21698403.

[P9] Biderre-Petit C, **Boucher D**, Kuever J, Alberic P, Jézéquel D, Chebance B, Borrel G, Fonty G and Peyret P. 2011. Identification of sulfur-cycle prokaryotes in a low-sulfate lake (Lake Pavin) using *aprA* and 16S rRNA gene markers. *Microbial Ecology*. PMID: 21107833.

[P8] Militon C, **Boucher D**, Vachelard C, Perchet G, Barra V, Troquet J, Peyretailade E, Peyret P. 2010. Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbons-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*. PMID: 21044099.

[P7] Terrat S, Peyretailade E, Gonçalves O, Dugat-Bony E, Gravelat F, Mone A, Biderre-Petit C, **Boucher D**, Troquet J and Peyret P. 2010. Detecting variants with Metabolic Design, a new

software tool to design probes for explorative functional DNA microarray development. BMC Bioinformatics. PMID: 20860850.

[P6] **Boucher D**, Debroas D. 2009. Impact of environmental factors on couplings between bacterial community composition and ectoenzymatic activities in a lacustrine ecosystem. FEMS Microbiology Ecology. PMID: 19622070.

[P5] **Boucher D**, Richardot M, Thénot A, Debroas D. 2006. Incorporation of 3H-Thymidine by different prokaryotic groups in relation to temperature and nutrient levels in a lacustrine ecosystem. Microbial Ecology. PMID: 16770684.

[P4] **Boucher D**, Jardillier L, Debroas D. 2006. Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. FEMS Microbiology Ecology. PMID: 16420617.

[P3] Lepère C, **Boucher D**, Jardillier L, Domaizon I, Debroas D. 2006. Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin). Applied and Environmental Microbiology. PMID: 16598004.

[P2] Pradeep Ram AS, **Boucher D**, Sime-Ngando T, Debroas D, Romagoux JC. 2005. Phage bacteriolysis, protistan bacterivory potential, and bacterial production in a freshwater reservoir: coupling with temperature. Microbial Ecology. PMID: 16052381.

[P1] Jardillier L, **Boucher D**, Personnic S, Jacquet S, Thenot A, Sargos D, Amblard C, Debroas D. 2005. Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status: microcosm experiments. FEMS Microbiology Ecology. PMID: 16329961.

• **Revues, chapitres d'ouvrage, editorial**

[R5] **Boucher D**, Barnich N. 2022. Phage Therapy Against Adherent-invasive E. coli: Towards a Promising Treatment of Crohn's Disease Patients? J Crohns Colitis. PMID : 35796668. Editorial.

[R4] Villéger R, Lopès A, Veziat J, Gagnière J, Barnich N, Billard E, **Boucher D**, Bonnet M. 2018. Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis. World J Gastroenterol. PMID : 29904241.

[R3] Ribière C, Beugnot R, Parisot N, Gasc C, Defois C, Denonfoux J, **Boucher D**, Peyretaillade E, Peyret P. Targeted Gene Capture by Hybridization to Illuminate Ecosystem Functioning. Methods in Molecular Biology. Book: Microbial environmental genomics. Springer, New York: Humana Press, 2016. PMID : 26791503

[R2] Gasc C, Ribière C, Parisot N, Beugnot R, Defois C, Petit-Biderre C, **Boucher D**, Peyretaillade E, Peyret P. 2015. Capturing prokaryotic dark matter genomes. Research in Microbiology. PMID : 26100932.

[R1] Peyretaillade E, **Boucher D**, Parisot N, Gasc C, Butler R, Pombert JF, Lerat E, Peyret P. 2015. Exploiting the architecture and the features of the microsporidian genomes to investigate

diversity and impact of these parasites on ecosystems. *Heredity*. 114 : 441-449. PMID : 25182222.

- **Publication dans des revues sans comité de lecture**

David C, **Boucher D**, Laffaire JB, Peyret P, Duquennes P, Brugnot C. 2009. Suivi de la flore microbiologique des fontaines de biodégradation des graisses. *Hygiène et sécurité du travail*. 214 : 25-35.

- **Rapports d'activités contractuelles**

2012. Contrat SITA remédiation. Etude des capacités métaboliques des populations microbiennes présentes dans les eaux de nappes phréatiques polluées par des chloroéthènes. Utilisation de la biopuce ADN fonctionnelle « DechlorArray ».

2008. Contrat INRS. Etude de la composition et de la dynamique microbienne des fontaines de biodégradation des graisses.

2004. (Collectif). Retenue de la Sep : étude de la qualité des eaux – Rapport d'activité 2004.

2003. (Collectif). Retenue de la Sep : étude de la qualité des eaux – Rapport d'activité 2003.

2002. (Collectif). Retenue de la Sep : étude de la qualité des eaux – Rapport d'activité 2002.

ACTIVITES D'ENCADREMENT

THESE EN COURS

Depuis le 1^{er} octobre 2023 : Charline Juban. « Impact des particules de dioxyde de titane sur la colonisation des bactéries *Escherichia coli* B2 impliquées dans le cancer colorectal ». Co-encadrement (50%) avec le Pr Mathilde Bonnet (50%).

THESES SOUTENUES

2012-2015 : Céline Ribière. « Impact d'un polluant environnemental, le benzo[a]pyrène, sur le microbiote intestinal en modèle murin ». EA 4678 CIDAM, UCA. Co-encadrement (50%) avec le Dr Eric Peyretailade (50%). Devenir : scientifique suivi de projet, Vaiomer, Labège.

Participation à l'encadrement de :

Cécile Militon (2004-2007) : « Caractérisation des communautés procaryotiques impliquées dans la bioremédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures et le développement d'outils d'analyse à haut débit : les biopuces ADN ». LMGE, UMR CNRS 6023, UCA. Devenir : Maitre de Conférences, Institut Méditerranéen d'Océanographie, Marseille.

Cyrielle Gasc (2013-2016) : « Capture de gènes par hybridation couplée au séquençage de nouvelle génération pour l'exploration d'échantillons métagénomiques. ». EA 4678 CIDAM, UCA. Devenir : responsable des opérations NGS et bioinformatiques, MaaT Pharma, Lyon.

MASTER 2

2022-2023 : Charline Juban. Master II (M2), Microbiologie, Parcours : Génome, écologie et physiologie microbienne, UCA. « Étude de l'impact du dioxyde de titane, sous forme nanoparticulaire et sous forme d'additif alimentaire (E171), sur des cellules épithéliales intestinales et sur une souche d'*Escherichia coli* impliquée dans le cancer colorectal ». M2iSH, UCA. Encadrement : Co-encadrement (50%) avec le Pr Mathilde Bonnet (50%).

2019-2020 : Théo Gonzales-Micheli. Master II (M2), Microbiologie, Parcours : Génome, écologie et physiologie microbienne, UCA. « Étude de l'impact du dioxyde de titane sous forme d'additif alimentaire E171 sur les communautés bactériennes intestinales et sur l'inflammation ». M2iSH, UCA. Encadrement : 100%. Devenir : technicien laboratoire ICARE, Clermont-Ferrand.

2017-2018 : Thomas Sauvaître. M2 Biologie Santé (BS), parcours Génétique et Physiologie, Pathologies, UCA. « Caractérisation de l'effet du TiO₂ sous forme d'additif alimentaire E171 sur la carcinogénèse colique et sur le microbiote intestinal en modèle murin APC^{min/+}. » M2iSH, UCA. Co-encadrement (50%) avec le Pr Mathilde Bonnet (50%). Devenir : Doctorat, scientifique modèles précliniques, chargé de projets, Danone Nutricia research, Saclay.

2015-2016 : Gwenaëlle Roche. M2R spécialité Génétique et Physiologie, UCA. « Etude du rôle de la protéine tétraspanine 8 dans la carcinogénèse colique au sein du modèle murin APC^{min/+}/Tspan8^{-/-}. » M2iSH, UCA. Co-encadrement (50%) avec le Pr Mathilde Bonnet (50%). Devenir : Technicienne en expérimentation animale, M2iSH, Clermont-Ferrand.

2012-2013 : Cyrielle Gasc. Master 2 Professionnel Microbiologie : Génome, Ecologie et Biotechnologies (M2P MGEb), Université Blaise Pascal (UBP). « Etude des capacités métaboliques des populations microbiennes présentes dans des environnements pollués par du lindane ». LMGE, UBP. Co-encadrement (80%) avec le Pr Pierre Peyret (20%). Devenir : responsable des opérations NGS et bioinformatiques, MaaT Pharma, Lyon.

2010 - 2011 : Valérie George, Master 2 Recherche (M2R), Université d'Aberdeen (Erasmus). « Study of microorganisms involved in reductive dechlorination in a natural freshwater ecosystem (Pavin lake, France) ». LMGE, UBP. Encadrement : 100%. Devenir : analyste en recherche criminelle, gendarmerie, Bourges.

2009 - 2010 : Maxime Ossédât, M2R MGEb, UBP. « Mise en place d'une approche innovante de capture en vue d'identifier les microorganismes et les voies métaboliques impliqués dans la biodégradation des solvants chlorés. » LMGE, UBP. Co-encadrement (50%) avec le Dr Corinne Biderre-Petit (50%). Devenir : formateur en Master MEEF (Biotechnologies et biologie en lycée technologique), Seine Saint Denis.

2003-2004 : Cécile Fourmarier, M2P (anciennement DESS), UBP. « Evolution des communautés planctoniques et des flux de carbone dans le réservoir de la Sep ». LMGE, UBP. Co-encadrement (80%) avec le Pr Didier Debroyas (20%). Devenir : Directrice des Services Techniques adjointe au cadre de vie et environnement, Villenave d'Ornon.

MASTER 1

2021-2022 : Charline Juban, Master I (M1), Microbiologie, Parcours : Génome, écologie et physiologie microbienne, UCA. « Étude de l'impact du dioxyde de titane, sous forme nanoparticulaire et sous forme d'additif alimentaire (E171), sur des cellules épithéliales intestinales et sur une souche d'*Escherichia coli* impliquée dans le cancer colorectal ». Encadrement : 100%.

2002-2003 : Eléonore Attard, Maitrise Biologie des Populations et des Ecosystèmes, UBP. « Suivi spatio-temporel de la matière organique dissoute dans un lac-réservoir oligomésotrophe (Sep, Massif Central) ». LMGE, UBP. Encadrement : 100%. Devenir : Ingénieur de recherche, UMR 5254 IPREM, Pau.

LICENCE PROFESSIONNELLE

2018-2019 : Célia Ledieu, Licence professionnelle Bio-industries et Biotechnologies : Études moléculaires, cellulaires et intégrées des molécules bio-actives, UCA. « Étude de l'impact du dioxyde de titane, sous forme d'additif alimentaire E171, sur la carcinogenèse colique et sur le microbiote intestinal en modèle murin APC^{min/+} ». M2iSH, UCA. Licence professionnelle réalisée en alternance. Encadrement : 100%. Devenir : technicienne, IGBMC, Illkirch-Graffenstaden.

LICENCE 3

2012-2013 : Nicolas Gallois, L3 Parcours Biologie Cellulaire et Physiologie, UBP. « Etude des capacités métaboliques des populations microbiennes présentes dans les eaux de nappes phréatiques polluées par des chloroéthènes. Utilisation de la biopuce ADN fonctionnelle « dechloarray ». EA 4678 CIDAM, Université d'Auvergne. Encadrement : 100%. Devenir : post-doctorant, UMR CNRS LIEC, Vandoeuvre-les-Nancy.

DUT

2012-2013 : Mélanie Blanc, DUT Génie Biologique, Université d'Auvergne. « Mise en place d'un diagnostic PCR pour la détection de gènes codant les enzymes impliquées dans la voie de la déchloration réductrice. Application à des sites pollués par des chloroéthènes ». EA 4678 CIDAM, Université d'Auvergne. Encadrement : 100%. Devenir : post-doctorante, France Energies Marines, Plouzané.

2011-2012 : Stella Baret, DUT Génie Biologique, Université d'Auvergne. « Mise en place d'une approche innovante de capture de gènes en solution en vue d'identifier de manière exhaustive le symbiome bactérien et archéen d'arthropodes ». EA 4678 CIDAM, Université d'Auvergne. Encadrement : 100%. Ingénieur agronome, chef de produit, V. Mane Fils arômes et parfums, Grasse.

2010 - 2011 : Lauriane Roux, DUT Génie Biologique, Université d'Auvergne. « Etude de populations bactériennes impliquées dans la déchloration réductrice par des approches de biologie moléculaire dans un écosystème naturel non pollué, le lac Pavin ». LMGE, UBP.

Encadrement : 100%. Devenir : Ingénieur - doctorat biologie, responsable du laboratoire biologie, Greentech, Clermont-Ferrand.

BTS

2010-2011 : Anaïs Bacconnier, BTS Biotechnologies, Le puy en Velay. « Mise en place de l'approche CARD-FISH en vue de l'identification et de la quantification de microorganismes ayant des capacités de déchloration réductrice dans le lac Pavin ». LMGE, UBP.
Encadrement : 100%. Devenir : technicienne en biochimie, IUT, Clermont-Ferrand.

Synthèse des activités de recherche

Le domaine dans lequel s'inscrit l'ensemble de mes activités de recherche est l'écologie microbienne. Cette discipline vise à mieux **comprendre la structure et l'activité des communautés microbiennes, la biogéographie des microorganismes ou encore le rôle de ces derniers dans le fonctionnement des écosystèmes en faisant appel à des théories écologiques**. Mes travaux de recherche se focalisent principalement sur les procaryotes et plus spécifiquement sur la **réponse des communautés bactériennes à différents types de perturbations (d'origine naturelles ou anthropiques) que ce soit en milieux artificiels ou en milieux naturels (environnements aquatique, terrestre et intestinal)**.

INTRODUCTION

Les microorganismes procaryotiques représentent, de loin, un des plus grands réservoirs de diversité génétique sur terre. En effet, l'accumulation des mutations, qui se sont produites au cours des 3,5 milliards d'années passées, a conduit à l'apparition de très fortes variations aussi bien au niveau phénotypique que génétique (Sogin et al., 2006). Leur abondance sur terre est estimée entre 4 et 6 x 10³⁰ cellules et leur biomasse est évaluée à 350-500 x 10¹⁵ grammes de carbone (Whitman et al., 1998 ; Forney et al., 2004). De ce fait, il constitue un des groupes biologiques les plus importants sur Terre.

Les procaryotes sont répartis en deux domaines bien distincts : les bactéries et les *Archaea* (Woese, 1987 ; Wheelis et al., 1992). Leur petite taille, leur cycle cellulaire rapide ainsi que leur versatilité métabolique leur permettent d'être largement distribués au sein de la biosphère. En effet, ils peuvent coloniser toutes les niches écologiques concevables (milieux pélagiques ou benthiques, lacustres ou océaniques, habitats terrestres, rhizosphériques, environnements intestinaux, atmosphère...) y compris celles qualifiées comme étant extrêmes voire hostiles par l'Homme et où aucun autre organisme ne pourrait survivre. Les microorganismes procaryotiques sont des acteurs des processus importants. Ils ont une importance considérable dans les cycles biogéochimiques, dans le stockage des éléments nutritifs ou encore dans la régulation des flux de matières et d'énergie (Azam et al., 1983). Leur influence dans les changements climatiques globaux tout comme leur origine dans la très grande majorité des composés bioactifs commercialisés à l'heure actuelle ou encore leur responsabilité dans le déclenchement de pathologies chez l'Homme, l'animal ou la plante témoignent de **l'étendue de leur implication dans le fonctionnement de la biosphère. L'étude des microbiotes associés à différents environnements (terrestre, aquatique, intestinal...),**

connue sous le terme d'écologie microbienne, est devenue un des domaines les plus fructueux de la recherche en biologie au cours des deux dernières décennies, **les objectifs étant de mieux comprendre la physiologie, les interactions que les microorganismes établissent entre eux et avec l'environnement de manière générale ainsi que de déterminer l'impact des facteurs biotiques et abiotiques de leur environnement de l'échelle individuelle aux communautés dans l'écosystème.**

Les microorganismes procaryotes sont largement répartis à la surface de notre planète avec un rôle crucial dans l'organisation, l'évolution et le fonctionnement des écosystèmes. Leur diversité phylogénétique n'en reste pas moins considérable. En effet, si l'exploration des communautés procaryotiques a été limitée pendant de nombreuses années par les approches traditionnelles de mise en culture, les années 1990 ont représenté une réelle transition dans le champ de l'écologie microbienne en levant des verrous technologiques avec l'application des outils moléculaires pour les études environnementales (Pace, 1995). Ainsi, le ciblage de biomarqueurs d'intérêt tel que le gène codant pour la petite sous-unité du ribosome (ARNr 16S) par des techniques d'empreinte génétique (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) / Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE), Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)), d'hybridation *in situ* fluorescente (Fluorescent *In Situ* Fluorescent (FISH)) ou encore de techniques de clonage suivi par un séquençage de type Sanger, a permis d'approfondir nos connaissances sur la structure procaryotique de différents écosystèmes (Muyzer et al., 1993; Gray et Herwig, 1996; Liu et al., 1997; Fisher et Triplett, 1999; Giraffa et Neviani, 2001). Par la suite, autour des années 2000, l'émergence de la métagénomique (Handelsman, 1998) combinée au développement des technologies de séquençage haut débit ou séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing (NGS)) avec notamment les techniques de pyroséquençage 454 (Roche), SOLiD (sequencing by oligonucleotide ligation and detection), Ion Torrent, ILLUMINA® (Solexa), PacBio et Nanopore, a révolutionné notre vision de la diversité taxonomique procaryotique (i.e. (Sanger et al., 1977; Quince et al., 2009; Milani et al., 2013; Ribière et al., 2016b; Earl et al., 2018; Matsuo et al., 2021). Ainsi, à l'heure actuelle, **près de 104 phyla procaryotes (89 bactériens et 15 archéens) sont répertoriés dont un peu moins de la moitié (39 : 37 bactériens et 2 archéens) correspondent à des divisions candidates** (SILVA rRNA database project, <https://www.arb-silva.de/contact/>), divisions pour lesquelles aucun représentant cultivé n'est connu ou n'a encore été décrit à ce jour (Rappé et Giovannoni, 2003).

Cette importante diversité phylogénétique des procaryotes s'accompagne également d'une très grande diversité fonctionnelle. Madigan et Martinko (2007) ont défini les fonctions comme l'ensemble des activités physiologiques, biochimiques ou physiques qui se produisent à différents niveaux et qui vont avoir une influence sur le détenteur de la fonction mais également sur son environnement que ce soit de manière directe ou indirecte. Les fonctions peuvent alors être considérées soit au niveau de l'organisme, où elles sont liées à l'expression du génome et sont donc dépendantes du métabolisme, soit au niveau de la communauté où elles auront alors un impact sur l'ensemble de l'écosystème et notamment sur son fonctionnement. **Ainsi, les fonctions individuelles sont déterminantes des fonctions écologiques que l'on peut observer au niveau de l'environnement.**

La diversité taxonomique influe sur la façon dont les écosystèmes fonctionnent (Bell et al., 2005). Les microorganismes procaryotiques sont, d'une part, extrêmement diversifiés phylogénétiquement, et d'autre part, présents au sein de différents biotopes (aquatique, terrestre, atmosphérique, intestinal...). Ils subissent par conséquent des pressions de sélection complexes dues aux fluctuations au cours du temps des différents paramètres biotiques et abiotiques. **Ces modifications environnementales s'apparentent donc à des perturbations.** Ces dernières peuvent ainsi avoir deux origines bien distinctes : une origine naturelle (variations climatiques : intempéries, sécheresse, inondations, incendies...) et une origine anthropique (modifications géomorphologiques, adjonction de fertilisants, introduction de polluants dans l'environnement...). La définition d'une perturbation reste difficile à établir et dépend à la fois de l'échelle environnementale et du contexte écologique. Les perturbations ont toutefois pour conséquences soit d'altérer l'environnement immédiat en déclenchant des changements physiques ou chimiques impactant par la suite les communautés locales, soit d'affecter directement les communautés présentes dans l'écosystème (Glasby et Underwood, 1996). Les perturbations apparaissent à des échelles à la fois spatiale et temporelle avec des différences en termes de fréquence (nombre d'évènement par unité de temps), d'intensité (magnitude de la perturbation), d'étendue (proportion de l'écosystème affecté) et de périodicité (régularité des occurrences) (Grimm et Wissel, 1997). Elles sont également souvent classées selon leur durée. Ainsi, les **perturbations sporadiques** (de type « pulse »), correspondant généralement à des évènements souvent intenses, imprévisibles et de courte durée, **se distingueront des perturbations chroniques** (de type « press ») caractérisées par des évènements continus, de longue durée, exerçant un niveau de pression constant (Bender et al., 1984). Les communautés procaryotiques étant au cœur du fonctionnement de ces derniers, des modifications de leur

structure (c'est-à-dire de leur richesse, de leur diversité et/ou de leur composition) peuvent ainsi, en réponse à la présence de modifications environnementales, se produire et par la suite se traduire par une incidence potentielle sur les processus métaboliques de l'environnement. Cependant, ces communautés peuvent également résister aux perturbations environnementales si certaines de ses espèces présentent une flexibilité métabolique mais également une tolérance physiologique aux conditions changeantes de l'écosystème. De ce fait, **la notion de perturbation ne peut être dissociée de celle de stabilité.**

La stabilité d'un système peut être séparée en deux composantes : la première étant basée sur la stabilité de la dynamique de ce dernier alors que la seconde concerne la stabilité par rapport aux changements (McCann, 2000). Dans ce dernier cas, apparaissent alors les **concepts de résistance** (capacité du système à résister aux changements face à une perturbation) **et de résilience** (capacité du système à revenir à son état d'origine après une perturbation) (Pimm, 1984). Ceux-ci peuvent être **interprétés en se basant soit sur des paramètres taxonomiques** en prenant en compte la composition de la communauté microbienne (Allison et Martiny, 2008) **soit sur des critères fonctionnels** (Little et al., 2008) les deux pouvant être parfois reliés (Balvanera et al., 2006; Cardinale et al., 2006). Ainsi, la résistance sera définie plus spécifiquement par le degré auquel la composition de la communauté microbienne reste inchangée après une perturbation (Allison et Martiny, 2008) ou par la capacité du système à maintenir, grâce à la réorganisation de la composition de ces membres, les fonctions exercées lors d'une perturbation (Harrison, 1979). De même, la résilience est caractérisée par le degré auquel la communauté microbienne retourne à sa composition initiale (Allison et Martiny, 2008) ou par la vitesse à laquelle le système recouvre l'ensemble des activités initiales après une perturbation (Pimm, 1984). De ce contexte de diversité-stabilité de l'écosystème, Yachi et Loreau, en 1999, ont fait émerger « l'hypothèse d'assurance » temporelle, selon laquelle la diversité biologique jouerait le rôle d'une assurance face aux modifications environnementales si les espèces sont complémentaires d'un point de vue fonctionnel dans le temps. Ainsi, une **forte diversité d'espèces dans un écosystème conduirait à une meilleure stabilité des communautés suite à une perturbation.** En d'autres termes, la diversité biologique pourrait donc avoir un rôle potentiel dans la stabilité du système face à une perturbation. En effet elle pourrait fournir la ou les espèces alternatives qui pourrai(en)t assurer l'opération continue des fonctions principales pendant que les conditions environnementales changent. Dans cette hypothèse, les espèces sont donc fonctionnellement redondantes à un moment donné pour les processus se déroulant au sein de l'écosystème.

La diversité taxonomique influence donc la façon dont fonctionnent les écosystèmes. **L'établissement de liens entre la diversité des espèces, la diversité fonctionnelle et les processus existant au sein des écosystèmes** revêt par conséquent un aspect fondamental pour la compréhension du fonctionnement de ces derniers (Tilman et al., 1997 ; Loreau et Hector, 2001; Worm et al., 2002). Cependant, si l'identité des micro-organismes procaryotes peut actuellement être aisément appréhendée par les différentes techniques de biologie moléculaire, et si de nouvelles approches ont émergé (culturomique, transcriptomique, métabolomique, protéomique...) afin d'étudier leurs larges potentialités métaboliques, il n'en reste pas moins que leurs fonctions dans les processus de maintien ou de déstabilisation des écosystèmes restent encore à déterminer. Afin d'améliorer la compréhension du fonctionnement des écosystèmes, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les processus microbiens et par conséquent d'établir un lien entre les populations procaryotiques identifiées et les capacités métaboliques qui sont présentes dans l'environnement et ceci même à de très faibles niveaux d'abondance. Il est également clairement établi que le fonctionnement de l'écosystème dépend à la fois de facteurs et/ou de processus biotiques (tels que la diversité et les fonctions des espèces ou les interactions entre espèces) et de contraintes abiotiques (tels que le climat ou encore la géologie). L'évaluation de la contribution relative de ces deux facteurs généraux sur les processus inhérents à l'écosystème représente la principale question dans le débat sur la diversité et le fonctionnement de l'écosystème (Huston et McBride, 2002). **C'est ainsi dans un contexte de fonctionnement des écosystèmes via l'étude de la structure et de l'activité des communautés procaryotiques en réponse à différents types de perturbations que se positionne une partie de mes activités de recherche.**

Le **premier volet de ce chapitre** « synthèse des activités de recherche » s'attachera donc à présenter les **travaux de recherche réalisés au cours de mon contrat doctoral**, travaux qui avaient pour objectif d'étudier la structure, la dynamique et l'activité des communautés procaryotiques en milieu lacustre et en particulier dans le lac-réservoir de la Sep situé dans le Puy de Dôme. Cet écosystème artificiel qui a été créé pour subvenir aux besoins en eau durant les périodes d'étiage, est donc soumis à des perturbations d'ordre physique, correspondant à l'ouverture des vannes du barrage, qui peuvent alors influencer sur les communautés présentes dans la retenue et par voie de conséquence sur le fonctionnement de l'écosystème.

Le **deuxième volet** concernera une partie des travaux réalisés au cours de mes **contrats post-doctoraux et suite à mon recrutement en tant que maître de conférences**. Seront alors

décrits les effets de perturbations sur la structure et l'activité des communautés bactériennes en milieux artificiels (fontaines de biodégradation des graisses) et naturels (écosystèmes terrestre, aquatique et marin). Dans le cadre de cette partie, le terme de perturbation sera pris dans le sens d'une modification des compositions des communautés bactériennes liée à l'apport de divers composants (métaux, graisses, huiles ...) ou à la présence d'un polluant (hydrocarbures aliphatiques, solvants chlorés, hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP)). **La dernière partie du bilan de mes activités de recherche, qui correspond au projet de recherche développé actuellement, sera intégrée dans la partie « projet de recherche ».**

I. STRUCTURE, DYNAMIQUE ET ACTIVITE DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES EN MILIEU LACUSTRE

Mon doctorat a été réalisé au sein du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE) UMR CNRS 6023 dirigé alors par le Dr Christian Amblard. Mon doctorat a été effectué dans le cadre d'une convention CIFRE avec l'entreprise SOMIVAL (SOCIÉTÉ de MISE en Valeur de l'Auvergne et du Limousin) à Clermont-Ferrand dont l'objectif était d'assurer le suivi de la qualité des eaux de la retenue de la Sep (Puy de Dôme). Mon projet de thèse portait plus spécifiquement sur l'étude de la structure, de la dynamique et de l'activité des communautés procaryotiques en milieu lacustre avec comme modèle d'étude le lac-réservoir de la Sep. Cependant, afin de valider les résultats obtenus sur les successions de populations bactériennes sur ce même site, le lac Pavin (Puy de Dôme), considéré comme stable de par ses caractéristiques hydrogéologiques, a servi d'écosystème de référence.

1. Contexte du travail et objectifs

Dans les pays industrialisés et dans les pays en voie de développement, les ressources hydriques sont exposées à une dégradation pernicieuse due au retour d'une eau insuffisamment épurée et/ou à d'autres impacts liés aux activités humaines tels que la contamination par des métaux lourds, les polluants organiques mais également l'apport excessif de nutriments menant alors à une eutrophisation accélérée des eaux. L'eutrophisation des lacs et des réservoirs, qui est considérée comme le processus naturel de vieillissement de tous les plans d'eaux, est l'un des principaux problèmes de dégradation de la qualité des eaux à travers le monde, ce qui peut engendrer des répercussions négatives sur les plans écologique, sanitaire, social et économique. Les retenues, qui peuvent être étudiées dès leur création, constituent alors de puissants modèles

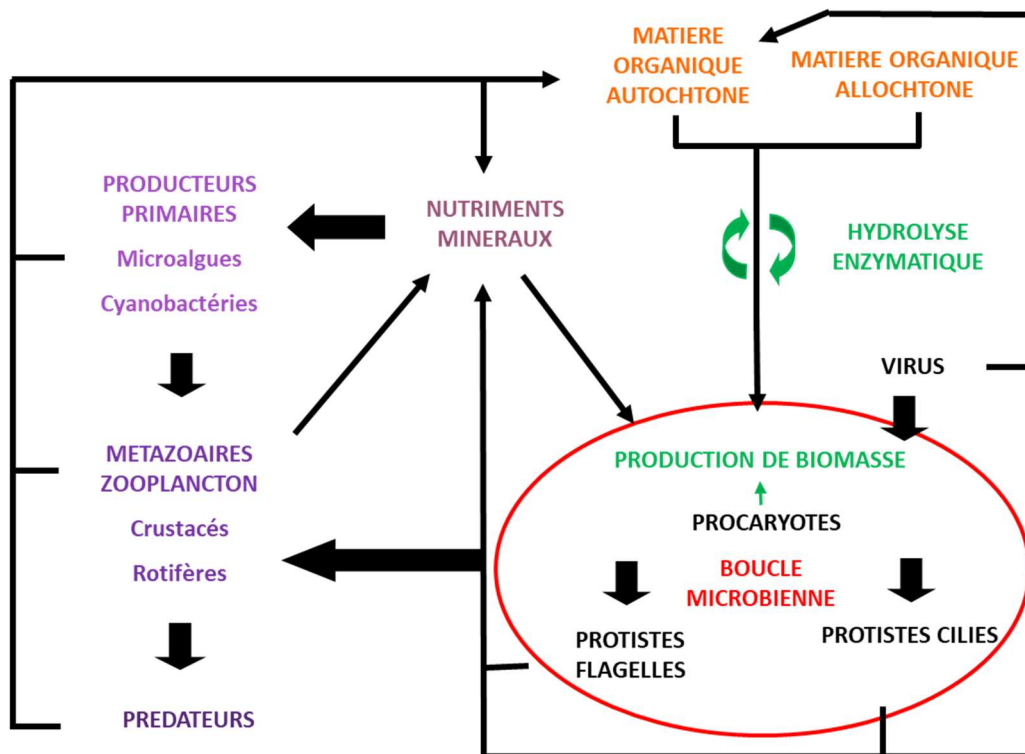


Figure 1. Importance des communautés procaryotiques dans les réseaux trophiques des écosystèmes aquatiques. Les populations bactériennes, qui jouent un rôle fondamental dans la régulation des flux de matière et d'énergie, font partie de la boucle microbienne (Azam et al., 1983).



Figure 2. Lac-réservoir de la Sep (photo de gauche) et lac Pavin (photo de droite).

d'études. C'est donc dans le cadre d'une action de recherche contractualisée visant à obtenir un maintien de la qualité des eaux et regroupant de nombreux partenaires (Agence de l'eau Loire-Bretagne, Ministère de l'Environnement, SOMIVAL...), que le lac-réservoir de la Sep, a été étudié dès sa mise en eau afin d'identifier des facteurs et de comprendre les phénomènes de dégradation de la qualité de l'eau en vue d'une meilleure gestion des écosystèmes aquatiques continentaux.

L'établissement de modèles prévisionnels en vue d'un maintien de la qualité des eaux nécessitent la connaissance des processus d'évolution temporelle de toutes les communautés biologiques participant au fonctionnement de l'écosystème. Si certains travaux conduits sur des retenues, et notamment sur celle de la Sep, avaient permis d'appréhender la composition et la succession des communautés phytoplanctoniques (e.g., Tadonléré et al., 2002) et zooplanctoniques (e.g., Thouvenot et al., 2000), **la structure, la dynamique et l'activité du bactérioplancton en milieu lacustre, et plus particulièrement dans les réservoirs, restaient encore peu connues en raison notamment des limitations méthodologiques importantes.** L'originalité de ce travail de thèse était, par conséquent, double : d'une part, améliorer l'état des connaissances sur le compartiment bactérien dans les lacs (les bactéries hétérotrophes jouant un rôle essentiel au sein de l'écosystème aquatique puisqu'elles permettent le transfert des flux de matière et d'énergie aux niveaux trophiques supérieurs *via* le concept de boucle microbienne ; [figure 1](#)) et d'autre part développer des outils méthodologiques permettant d'associer structure et fonctionnement à l'échelle des communautés procaryotiques.

2. Structure et dynamique de la communauté procaryotique planctonique lacustre.

Dans un premier temps, nous nous sommes donc intéressés à étudier la **composition et les successions spatio-temporelles de la communauté bactérienne planctonique, sur deux années consécutives, dans deux lacs du Massif Central : le lac-réservoir de la Sep et le lac Pavin** et ceci au niveau de deux zones d'échantillonnage : l'épilimnion (zone de surface) et l'hypolimnion (zone profonde) ([Figure 2](#)). Contrairement au lac Pavin, qui nous a servi d'écosystème de référence, les apports hydriques importants et le temps de renouvellement des eaux relativement court (220 jours) font que le réservoir de la Sep est un système instable et donc soumis à de fortes perturbations du point de vue hydrologique. La structure de la communauté bactérienne de ces deux écosystèmes lacustres a été déterminée par **clonage-séquencage de l'ADNr 16S** et par une technique de fingerprint : la **T-RFLP** (Terminal-Fragment Length Polymorphism). La comparaison des T-RFs (Terminal Restriction

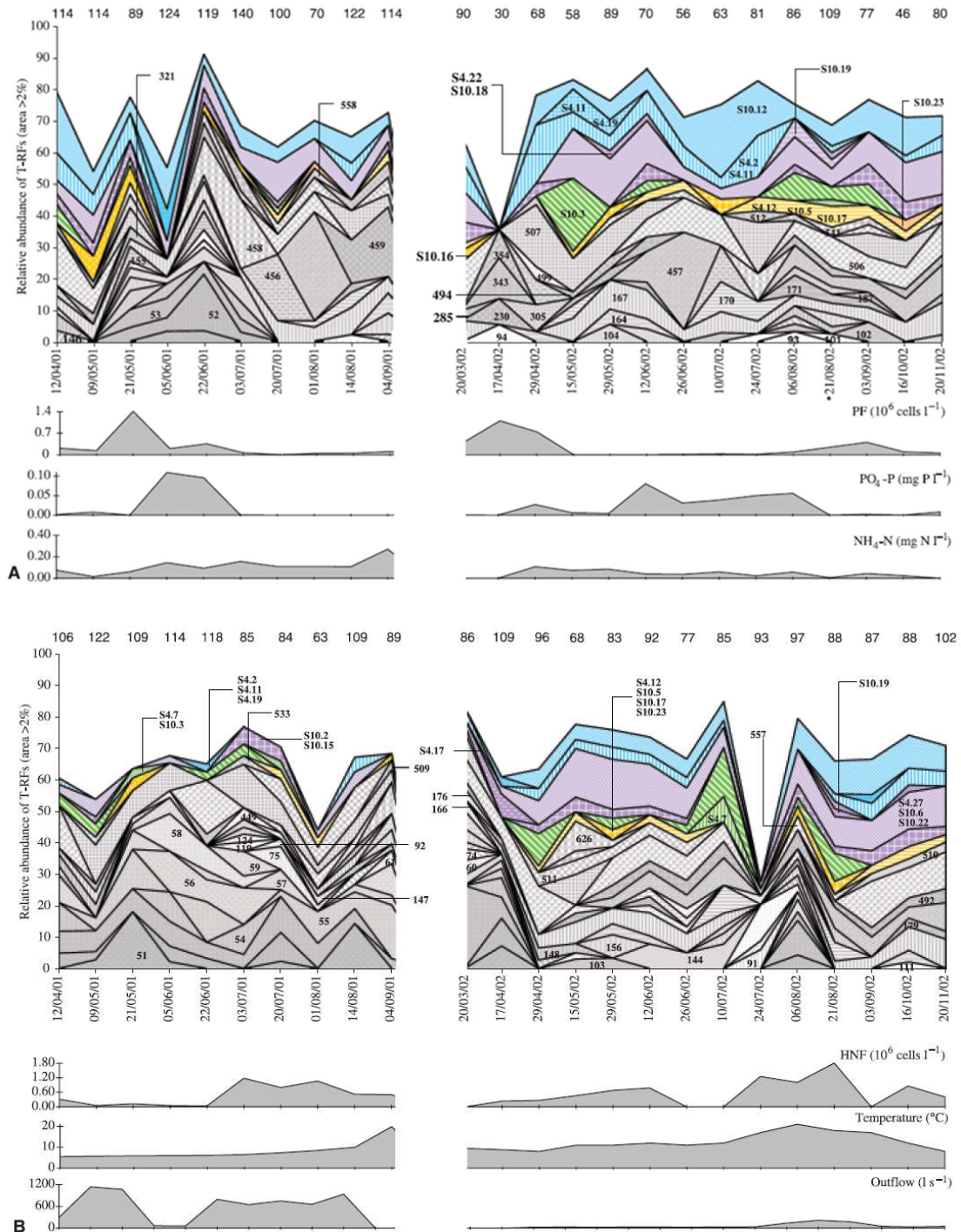


Figure 3. Variations saisonnières, pour l'épilimnion (A) et l'hypolimnion (B) du réservoir de la Sep, du nombre et de l'abondance relative des différentes unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) détectées par l'analyse T-RFLP de l'ADNr 16S digéré par *Msp* I, représentant plus de 2% de l'aire totale. Les aires en bleu, vert, pourpre et jaune représentent respectivement les Betaproteobacteria, les Verrucomicrobiota, les Actinobacteriota et les Bacteroidota. Les nombres au-dessus des profils correspondent au nombre total d'OTUs détectés par *Msp* I pour chaque échantillon. Les nombres sur les profils T-RFLP correspondent à la longueur des T-RFs en pb. Les variables environnementales présentées dans cette figure sont celles qui expliquent statistiquement le plus les variations des T-RFs dominants, selon l'analyse canonique des correspondances (Boucher et al., 2006).

Fragments) obtenus sur les clones aux T-RFs obtenus à partir du profil environnemental de T-RFLP a alors permis d'identifier une partie des T-RFs et donc de suivre les différents phylotypes sur toute la période de l'étude.

Les résultats obtenus ont mis en évidence que la **composition de la communauté bactérienne (CCB)** des deux sites d'étude était, pour chaque date d'échantillonnage, **dominée par un faible nombre de taxons** et que les **Actinobactéries et les β -Protéobactéries** représentaient les deux divisions bactériennes les plus abondantes (Figure 3) (Boucher et al., 2006a). Les travaux ont mis en évidence que, sur les deux années consécutives, il **existait une structure générale assez stable du bactérioplancton à l'échelle des divisions bactériennes ce qui contrastait avec une succession plus rapide des populations à une échelle phylogénétique plus fine**. L'étude pluriannuelle réalisée sur ces deux écosystèmes lacustres a mis par ailleurs en évidence l'**absence de succession claire de la communauté bactérienne en fonction des saisons**. En raison de la taille de son bassin versant, de son temps de renouvellement des eaux et des flux hydriques, de tels résultats étaient attendus pour le réservoir de la Sep (Lindström et al., 1998). Cependant, ces résultats pouvaient être, en première analyse, plus surprenants pour un écosystème considéré comme « stable » tel le lac Pavin.

Nos résultats ont montré que si la disponibilité des nutriments et les facteurs de mortalité coïncidaient avec les variations temporelles de la CCB à toutes les profondeurs d'échantillonnage, **les nutriments (NH₄-N, NO₃-N)**, mais aussi **la prédation** (flagellés pigmentés et hétérotrophes, zooplancton), **expliquaient significativement les variations rapides de la CCB seulement pour le réservoir de la Sep**. Le rôle des nutriments (N, P et carbone organique (glucose)) dans le contrôle de la CCB au niveau de la zone euphotique du réservoir de la Sep a, de plus, été significativement confirmé par une approche expérimentale à l'aide de la technique MicroFISH (microautoradiographie combinée à la technique FISH) (Boucher et al., 2006b). Concernant la partie prédation, nos résultats complétaient les travaux de Jardillier et al. (2005a, 2005b) qui avaient montré que l'abondance et la CCB étaient contrôlées par les flagellés mixotrophes et les cladocères dans cet écosystème. La prédation exercée par les bactériophages pourrait aussi provoquer des remaniements très rapides des populations bactériennes d'après la théorie du « kill the winner » (Weinbauer, 2004). Cependant, elle n'aurait que très peu d'effet sur la structure de la communauté bactérienne du réservoir de la Sep (Jardillier et al., 2005a), même si elle pourrait, dans des conditions climatiques exceptionnelles (canicule de 2003), jouer un rôle significatif sur la communauté bactérienne totale (Pradeep Ram et al., 2005). Les **facteurs reliés aux forces saisonnières**

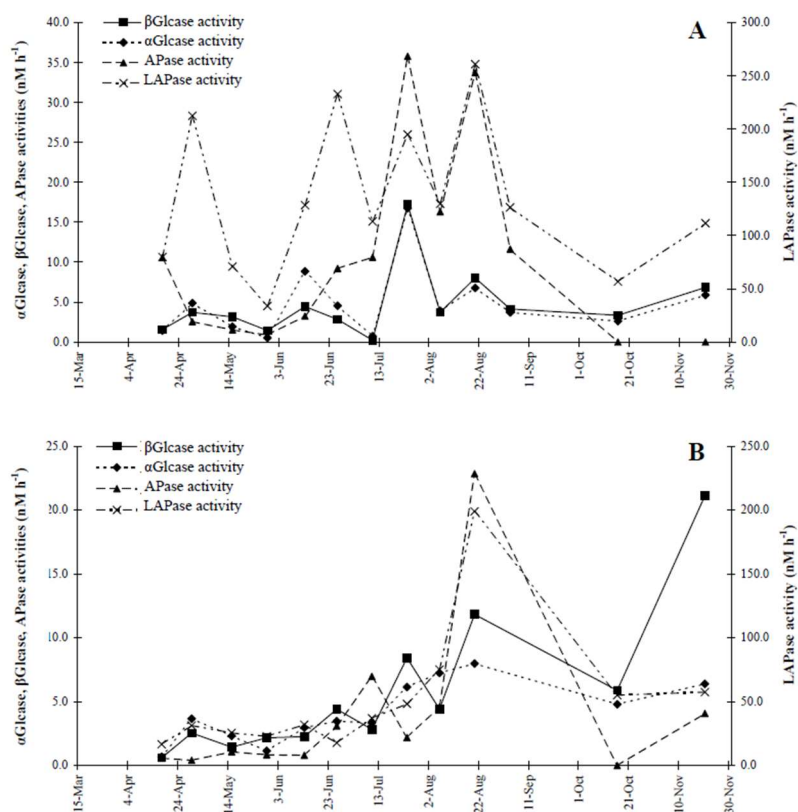


Figure 4. Evolution temporelle (en nM.h⁻¹) des activités αGlcase (α-Glucosidase), βGlcase (β-Glucosidase), APase (Alcaline Phosphatase) et LAPase (Leucine aminopeptidase) dans le Réservoir de la Sep à 1 m au-dessous de la surface (A) et 1 m au-dessus des sédiments (B) (Boucher et al., 2009).

Tableau 1. Résultats de l'analyse de redondance : pourcentage de variation des activités ectoenzymatiques expliqué significativement ($p < 0.05$) par les différents paramètres de biodiversité et environnementaux dans le Réservoir de la Sep. Pour les paramètres de biodiversité, les valeurs entre parenthèses correspondent à la fréquence de détection des T-RFs 1 m au-dessous de la surface et 1 m au-dessus des sédiments, respectivement. DFCHO : dissolved free carbohydrates ; DCAA : dissolved combined amino-acid (Boucher et al., 2009).

| | | | βGlcase | αGlcase | Apase | LAPase | |
|--------------------------|--|------------|---------|---------|-------|--------|-----|
| Biodiversity parameters | T-RFs (bp) | 101 (2-0) | | | 68.6 | | |
| | | 128 (1-0) | | | | 3.5 | |
| | | 160 (1-1) | 15.1 | | | | |
| | | 183 (4-1) | | | 14.9 | | |
| | | 296 (7-7) | | | | | |
| | | 305 (4-4) | | 7.9 | | 3.6 | |
| | | 457 (7-8) | | 7.5 | | 1.7 | |
| | | 458 (1-0) | 29.4 | 54.8 | | | |
| | | 461 (10-9) | | | | | 0.8 |
| | | 510 (4-2) | 8.3 | | | | |
| | | 540 (0-1) | | | | 7.1 | |
| Environmental parameters | Inflow (L s ⁻¹) Temperature (°C) PO ₄ -P (mg PL ⁻¹) NH ₄ -N (mg NL ⁻¹) DCAA (mg L ⁻¹) PO ₄ -P of tributaries (mg PL ⁻¹) NH ₄ -N of tributaries (mg NL ⁻¹) DCAA of tributaries (mg L ⁻¹) | 26.1 | | | 5.1 | | |
| | | | | | 50.5 | | |
| | | 9.2 | | | 10.5 | | |
| | | | 9.2 | | | | |
| | | | | | 4.8 | | |
| | | | | 3.8 | | | |
| | | | | | | | |

(température pour les deux sites d'étude et flux hydriques sortants pour le réservoir de la Sep) **expliquaient**, par ailleurs, **significativement les variations de la CCB uniquement dans les zones d'échantillonnage les plus profondes** et ceci **pour les deux sites d'étude**. Les flux entrant ou sortant ont une influence importante sur la dynamique des populations planctoniques dans les réservoirs (Lindström et Bergström, 2004). Ils pourraient également impacter la composition et l'origine des communautés bactériennes. En effet, le **pourcentage d'OTUs et de clones d'origine non aquatique était plus important pour le réservoir de la Sep**. Cette différence entre les deux écosystèmes, qui concernaient principalement des séquences affiliées aux Verrucomicrobiota et aux Bacteroidota (anciennement Bacteroidetes), est probablement lié au temps de résidence des eaux plus court pour le lac-réservoir.

3. Relation entre l'activité, la structure de la communauté procaryotique et les paramètres environnementaux

Dans un second temps, l'établissement ou non d'une relation entre la CCB et le fonctionnement de l'écosystème a été recherché, au sein du réservoir de la Sep, à travers un processus bactérien majeur dans le cadre du fonctionnement du réseau trophique microbien : la dégradation de la matière organique (MO) *via* l'activité de certaines ectoenzymes (α -Glucosidase (α Glcase), β -Glucosidase (β Glcase), Alcaline Phosphatase (APase), Leucine aminopeptidase (LAPase)).

Les résultats obtenus ont mis en évidence que les profils temporels des activités ectoenzymatiques étudiées, à l'instar de ceux de la CCB, ont présenté des variations marquées (Figure 4). **Les activités hydrolytiques ont, par ailleurs, été reliées à la structure de la communauté bactérienne**. Cependant, la richesse bactérienne serait moins importante que la composition dans la détermination du fonctionnement des écosystèmes. Aussi, parmi les différents paramètres biotiques testés (abondance, production, structure), **seule la présence/absence ou l'aire des T-RFs dominants (>2%) expliquaient, de manière significative, les variations des activités ectoenzymatiques**. La part explicative de la structure de la communauté bactérienne dans les variations d'activités ectoenzymatiques restait, cependant, plus ou moins importante selon l'activité hydrolytique considérée puisque **la CCB représentait une part importante du contrôle de l'expression uniquement de l' α -Glcase, de la β Glcase et de l'APase (Tableau 1)**. Certaines populations bactériennes auraient ainsi la capacité de dégrader des substrats variés puisqu'elles interviennent de manière significative

dans la régulation de plusieurs activités ectoenzymatiques. **Les populations intervenant dans les variations d'activités ectoenzymatiques ont principalement été identifiées comme des populations que l'on peut considérer comme rares.** Ainsi, la perte ou l'introduction d'une espèce au sein de l'écosystème aurait des conséquences mesurables en termes de fonctionnement. Cette constatation met ainsi en exergue **la singularité des espèces** (Naeem, 2002) qui expose que, chaque espèce, que l'on nomme alors espèce clé, a un rôle primordial et bien défini au sein de l'écosystème. **Cependant, les communautés bactériennes peuvent également être fonctionnellement redondantes**, comme ont pu le montrer Fernandez et al. (2000). En effet, différentes populations (i.e. T-RFs) interviendraient dans la régulation d'une même activité ectoenzymatique dans le réservoir de la Sep ([Tableau 1](#)).

Les paramètres abiotiques ont également une influence sur l'activité de dépolymérisation de la MO par les bactéries. **Les facteurs environnementaux diffèrent en termes de nature et d'origine (réservoir ou tributaires) selon l'activité hydrolytique considérée** ([Tableau 1](#)). Les activités ectoenzymatiques du réservoir de la Sep étaient dépendantes en partie des nutriments minéraux ou organiques, cependant aucune relation n'a été observée entre un substrat et/ou le produit d'hydrolyse ou l'activité hydrolytique, comme par exemple entre l'activité β Glcase et les DFCHO (Dissolved Free Carbohydrates) ou les DCCHO (Dissolved Combined Carbohydrates), qui peuvent respectivement activer ou inhiber l'expression ou la synthèse de cette enzyme (Chrost, 1998). Or lors de l'étude menée par Richardot et al. (2000), les variations des activités ectoenzymatiques étaient régulées par les polysaccharides. Ces différences pourraient être expliquées par les changements de MO (allochtone, autochtone) depuis la mise en eau du réservoir. Les relations mises en évidence par l'analyse statistique suggéreraient plutôt un effet indirect des paramètres testés que des phénomènes de régulation *stricto sensu* sur les activités ectoenzymatiques.

Ce travail de doctorat a été une **étude pionnière dans le cadre de l'écologie microbienne des environnements aquatiques**. En effet, c'est la première étude qui a permis de suivre i) sur deux années consécutives les effets des changements temporels de la CCB à l'aide d'une approche de « fingerprint » (T-RFLP) et de clonage-séquençage et, ii) sur une année les effets des modifications de la CCB et des facteurs environnementaux (physico-chimiques et biotiques) sur les activités ectoenzymatiques potentielles (α -Glcase, β Glcase, APase et LAPase) dans un lac-réservoir (réservoir Sep, France). Ce travail a pu être valorisé par 3 publications en premier auteur (Boucher et al., 2006a, 2006b; Boucher et Debroas, 2009).



Figure 5. Fontaine de dégraissage à solvant (à gauche) et fontaine de biodégradation des graisses (à droite).

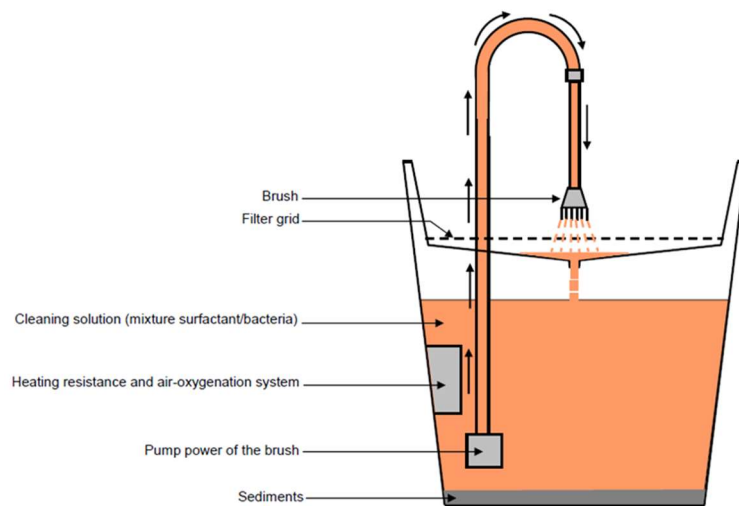


Figure 6. Représentation schématique d'un système de biodégradation des graisses (Boucher et al., 2011).

II. PERTURBATIONS ANTHROPIQUES SUR LA STRUCTURE ET L'ACTIVITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EN MILEUX ARTIFICIELS ET NATURELS

1. En milieu artificiel : système de biodégradation des graisses.

Les recherches et résultats présentés dans cette partie concernent les travaux réalisés au sein de l'équipe Génomique Intégrée des Interactions microbiennes (GIIM) du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE, UMR CNRS 6023). Ces travaux s'inscrivaient dans le cadre d'un contrat avec l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) dont j'étais la responsable scientifique. Il s'agissait alors d'étudier la **composition et la dynamique bactérienne de fontaines de biodégradation des graisses afin d'évaluer les risques biologiques potentiels pour les utilisateurs**. Sept systèmes de dégraissage biologique commercialisés par 2 fournisseurs ont ainsi été étudiés mensuellement au sein de deux entreprises françaises différentes : un manufacturier et une compagnie de transport en commun.

Les industries de métallurgie exigent l'utilisation de **graisses pour lubrifier les surfaces en métal** pendant les opérations de fabrication, de recyclage ou de maintenance. Aussi, les **résidus de ces lubrifiants doivent être enlevés** pour protéger et améliorer l'aspect du produit final. Le dégraissage des pièces métalliques s'effectue traditionnellement dans des fontaines de dégraissage à l'aide de solvants (trichloroéthylène, tétrachloroéthylène, dichlorométhane) dans des bacs placés le plus souvent directement sur des fûts (Figure 5). L'utilisation de ces solvants organiques reste toutefois controversée en raison, d'une part, des risques encourus par les travailleurs (risques cancérigènes et mutagènes, dangers pour la reproduction), et d'autre part, des effets néfastes observés sur l'environnement (libération de composés organo-volatils). Aussi, afin de pallier ses différents problèmes, une solution alternative a été trouvée dans l'**utilisation de fontaines de biodégradation des graisses** (Figures 5 et 6). Leur innovation repose sur l'utilisation d'un cocktail de microorganismes sélectionnés pour leur potentialité à dégrader les graisses et les huiles en eau et CO₂ pour leur besoin nutritif et leur croissance (Callahan et al., 2001). Ces systèmes de dégraissage utilisent ainsi une **solution de tensioactifs pour nettoyer et émulsionner les huiles et/ou les graisses et des bactéries pour la digestion des produits émulsifiés**. La biodégradation se fait dans des conditions d'oxygénation permanente et autour de 37°C. Ces systèmes sont essentiellement autorégulés puisque l'activité microbienne s'ajuste elle-même à la quantité d'huile et de graisse

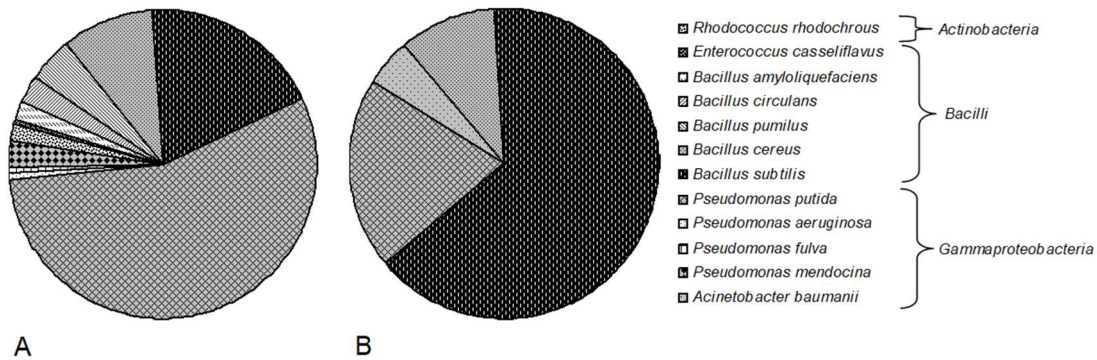


Figure 7. Composition des communautés bactériennes déterminées par clonage-séquençage de l'ADNr 16S dans les inocula servant à ensemercer les fontaines de biodégradation des graisses et ceci pour 2 fabricants différents (A et B) (Boucher et al., 2011).

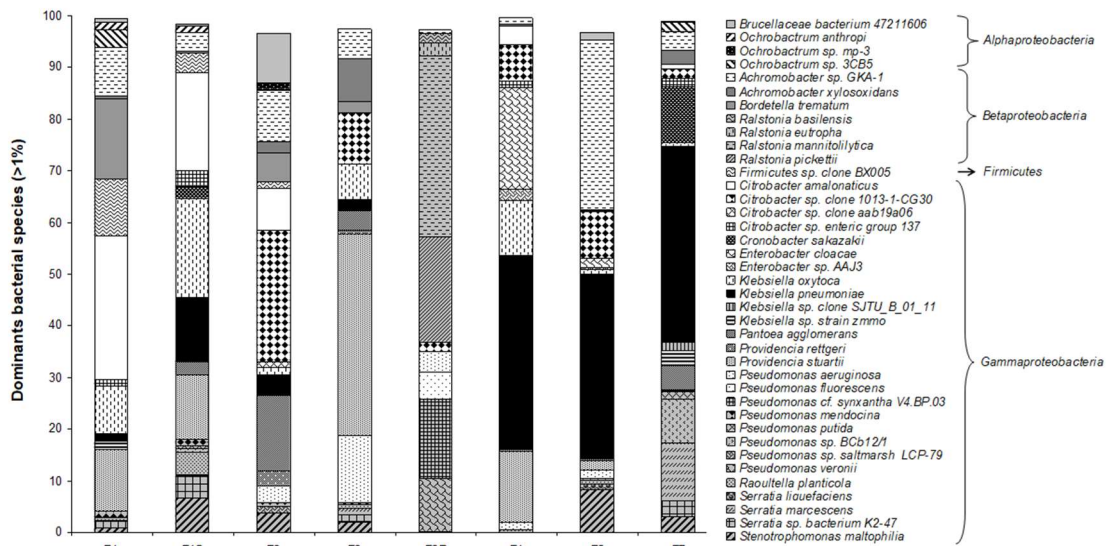


Figure 8. Composition des communautés bactériennes déterminée par clonage et séquençage de l'ADNr 16S dans les différents systèmes de dégraissage biologique (F1, F2, F3, F3B, F4, F5 et F7) tant pour la solution de nettoyage que pour les sédiments F1 (F1S) (Boucher et al., 2011).

présentes. Le mélange commercial de microorganismes utilisés dans ces systèmes étant inconnu, il était donc impératif d'évaluer les risques biologiques potentiels pour les utilisateurs en cas de contamination par exposition soit directe avec la peau, soit orale (*via* la présence d'aérosols ou le fait de porter les mains contaminées à la bouche).

L'identification des communautés bactériennes par clonage-séquençage de l'ADNr 16S, à la fois des *inocula* bactériens et des échantillons prélevés dans les sept systèmes de dégraissage biologique, a mis en évidence que ces derniers **ne fonctionnaient pas avec les populations bactériennes d'origine**. En effet, pour la plupart des systèmes de dégraissage biologique, la CCB des deux *inocula* différaient radicalement de celle des différentes solutions de nettoyage. Ainsi, des bactéries ayant des capacités à produire des agents surfactants (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) ou à dégrader des hydrocarbures aliphatiques (*Acinetobacter baumannii*) ou des composés aromatiques complexes (*Rhodococcus rhodochrous*) ont été identifiées dans les cocktails servant à ensemercer les fontaines de dégraissage biologique (Figure 7) alors que des fortes proportions de *Citrobacter* (*C. amalonaticus*), *Klebsiella* (*K. oxytoca*, *K. pneumoniae*), *Ralstonia*, *Pantoea agglomerans* ou encore *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*) ont été mises en évidence dans les échantillons prélevés mensuellement (Figure 8) (Boucher et al., 2011). **Des bactéries issues de l'environnement seraient ainsi capables de coloniser rapidement les fontaines et de supplanter la communauté bactérienne initiale**. Ces bactéries colonisatrices peuvent provenir de l'environnement de travail c'est-à-dire de l'air, des pièces métalliques à usiner, du type de graisses ou des fluides de coupe utilisés lors des opérations industrielles d'usinage et de meulage, mais également des utilisateurs (microbiote cutané, aérosols *via* la toux) lorsqu'ils travaillent sans gants. Une **dynamique importante des populations bactériennes a par ailleurs été observée**. En effet, ces dernières fluctuent rapidement au moindre changement du milieu, celui-ci pouvant être dû à une augmentation ou à une baisse de l'apport en graisse ou en liquide, à une modification de la température lors de l'arrêt des fontaines, à un changement de la nature des graisses ou bien encore à un réensemencement.

Parmi les différentes bactéries qui ont été identifiées tant dans les *inocula* que dans la solution des systèmes de dégraissage biologique, **certaines espèces** (*P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, et *K. pneumoniae*) sont **répertoriées comme faisant partie du groupe 2** dans la classification des agents biologiques par l'Union Européenne. Elles sont considérées comme des **agents pathogènes opportunistes** et peuvent induire des maladies telles que des irritations cutanées,

des kératites ou encore des infections des voies urinaires ou respiratoires. Certaines peuvent également être responsables de pneumopathie d'hypersensibilité (*S. maltophilia*, *P. agglomerans*) (Bernstein et al., 1995; Laitinen et al., 1999) qui restent cependant difficiles à diagnostiquer. Ainsi, il existe une réelle difficulté à établir un lien direct entre des symptômes et l'utilisation de ces systèmes de dégraissage biologique qui sont une nouvelle technologie très peu étudiée. *In fine*, nous avons pu établir des **recommandations en termes de mesures de prévention des risques liés à ces nouvelles fontaines pour les travailleurs**, à savoir la protection des plaies mais également le port de gants, de lunettes de protection oculaire et de vêtements de travail protégeant la peau (Boucher et al., 2011).

2. En milieu naturel : écosystèmes terrestre, aquatique et murin.

Depuis plusieurs décennies les activités humaines engendrent une production de plus en plus importante de produits chimiques (dont les hydrocarbures aliphatiques, les chloroéthènes ou encore les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)) qui peuvent contaminer différents types d'écosystèmes entraînant alors un dysfonctionnement de ceux-ci. De par la toxicité et les effets cancérigènes de certaines de ces molécules, ces dernières représentent de plus une préoccupation majeure pour les autorités publiques et sanitaires. La restauration des sites contaminés peut être effectuée à l'aide de techniques physiques et/ou chimiques (Kalin, 2004; Khan et al., 2004) qui permettent l'extraction, la destruction et/ou l'immobilisation des polluants. Ces approches restent très invasives pour les écosystèmes traités et extrêmement onéreuses à mettre en place. La **bioremédiation** constitue une alternative à ces techniques en **utilisant les capacités des microorganismes à décontaminer les environnements de façon naturelle grâce à des machineries enzymatiques adaptées** (Serrano et al., 2008). La réussite des traitements dépend des conditions physicochimiques du site pollué mais également des capacités de dégradation de la microflore indigène. Aussi, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus, d'améliorer les rendements de dépollution mais également de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation des microorganismes suite à des perturbations, il est nécessaire de **mieux connaître, tant sur le plan taxonomique que fonctionnel, les populations bactériennes impliquées**. Les travaux présentés par la suite ont également été réalisés au sein de l'équipe GIIM du LMGE puis de l'Equipe d'Accueil Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament 4678 (CIDAM).

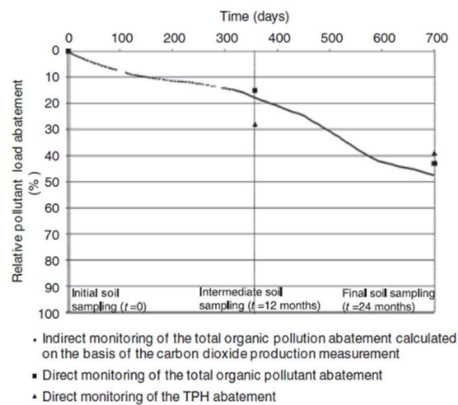


Figure 9. Suivi de l'abattement de la charge en polluants dans le réacteur pilote. (Milton et al., 2010).

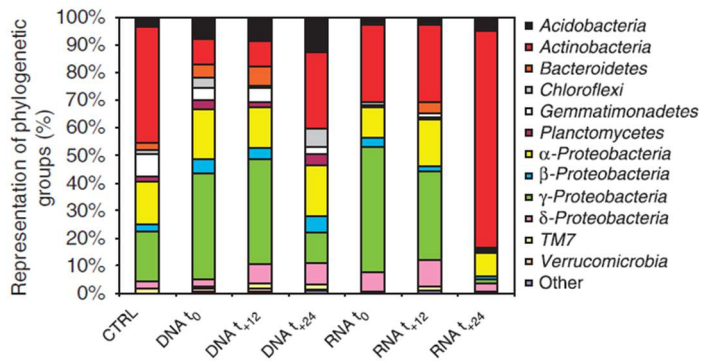


Figure 10. Distribution des groupes phylogénétiques observés au cours du processus de bioremédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures aliphatiques au sein d'un réacteur pilote. Des phylotypes ont été identifiés par clonage-séquençage de l'ADNr 16S (ADN) et de l'ARNr 16S (ARN). t0, avant le début du processus ; t+12, après 12 mois ; t+24, après 24 mois. CTRL : bibliothèque d'ADN obtenue à partir du sol pollué sans biostimulation après 24 mois. (Milton et al., 2010).

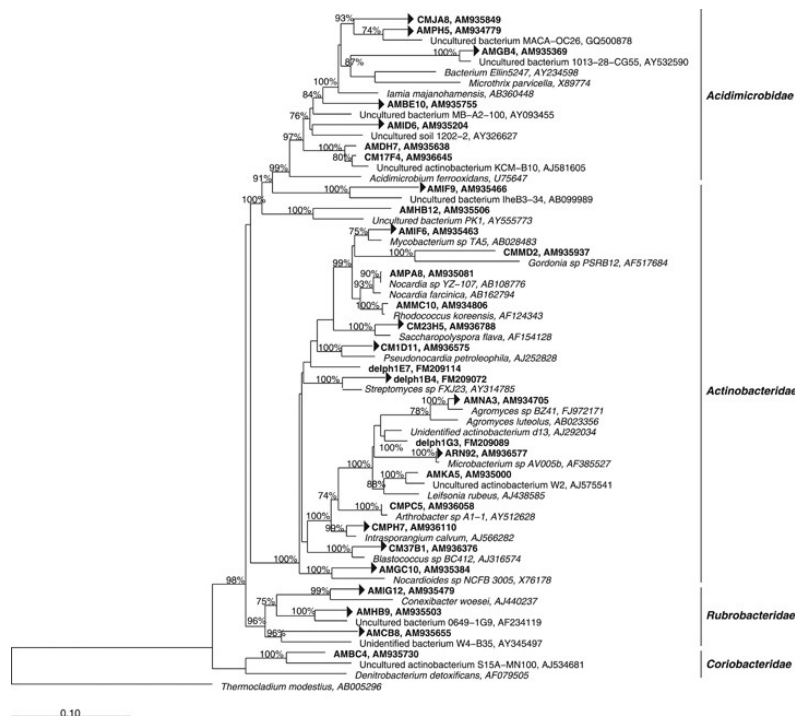


Figure 11. Arbre phylogénétique des séquences d'OTUs (Operationnal Taxonomic Units) d'Actinobactéries basé sur l'alignement des gènes SSU rRNA et des séquences d'ARNr provenant des bibliothèques de sols pollués par les hydrocarbures (noms en gras) ainsi que des séquences représentatives de la bibliothèque d'arb. L'arbre a été enraciné avec l'archaea *Thermocodium modestius* (AB005296). Les numéros d'accèsion sont également indiqués. Les valeurs de Bootstrap de >70% (pour 1000 itérations) sont indiquées. Les barres d'échelle représentent une distance de 10 %. (Milton et al., 2010).

a. Environnement terrestre contaminé par des hydrocarbures aliphatiques.

Les sols sont le support trophique de la production végétale et à ce titre un des déterminants de la qualité et de la sécurité alimentaire. Ils déterminent de plus la qualité des eaux superficielles et souterraines de par leurs rôles dans les processus de ruissellement et d'infiltration des eaux. Les sols peuvent subir de nombreuses pollutions résultant d'accidents industriels, de dépôts ou de transport de matières dangereuses. Parmi les différents polluants retrouvés au niveau des environnements terrestres, les hydrocarbures aliphatiques, qui présentent des risques toxicologiques, mutagènes voire même cancérigènes pour de nombreux organismes dont l'Homme (Spencer et al., 2002) sont ceux qui sont les plus importants d'un point de vue quantitatif.

Ainsi, dans le cadre des travaux de thèse de Cécile Militon, nous nous sommes intéressés à caractériser les microorganismes présents au niveau d'un sol alluvial pollué accidentellement par des hydrocarbures aliphatiques (issus d'huiles de laminage) au cours d'un procédé de biostimulation par apport continu d'oxygène en réacteurs pilotes (Biobasic Environnement®). La composition ainsi que la dynamique des communautés bactériennes de ce sol ont été étudiées, au début, après 12 mois et 24 mois de traitement, par une approche de clonage-séquençage ciblant l'ARNr 16S mais également le gène codant pour l'ARNr 16S, permettant ainsi la caractérisation des communautés bactériennes métaboliquement actives et totales (actives, quiescentes et mortes) respectivement. L'aération a permis d'induire une dégradation constante des polluants, celle-ci étant due probablement à une combinaison d'actions physiques et d'actions biotiques par la biostimulation des communautés microbiennes (Figure 9). En effet, la quantification des polluants lors du processus de bioremédiation a montré une **diminution de la teneur en polluant de 15% après 12 mois et de 43% après 24 mois de biostimulation**. L'analyse des bibliothèques de clones a révélé que les communautés bactériennes présentaient de nombreux phylotypes rares. Parallèlement à l'abattement en hydrocarbures aliphatiques, des modifications ont été observées pour la CCB pour chaque date d'échantillonnage. En effet, avant le démarrage du processus de bioremédiation au moment où la pollution est maximale, les communautés bactériennes étaient dominées par des bactéries affiliées aux Gamma-Proteobacteria et aux Alpha-Proteobacteria (Figure 10). Après 24 mois de traitement une diminution de ces deux classes bactériennes a pu être observée au profit des Actinobacteriota. Ce changement était particulièrement important pour les bactéries métaboliquement actives puisque les Actinobacteriota ont augmenté de 30% à 80% entre le début et la fin du procédé de bioremédiation. Concernant l'identification des phylotypes (Figure 11), 70 % de ceux affiliés

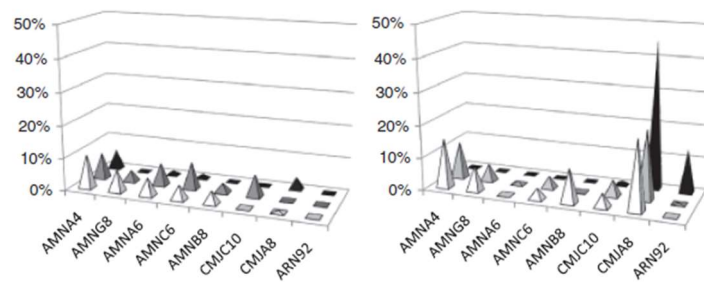


Figure 12. Proportion et changement des phylotypes dominants au cours du processus de biorémédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures aliphatiques. Les proportions des phylotypes dominants ont été caractérisées dans les bibliothèques obtenues à partir de l'ADNr 16S (à gauche) et de l'ARNr 16S (à droite) à l'échelle pilote du sol pollué par les hydrocarbures (t0 en blanc ; t1 : 12 mois en gris clair ; t2 : 24 mois en gris foncé) (Milton et al., 2010).

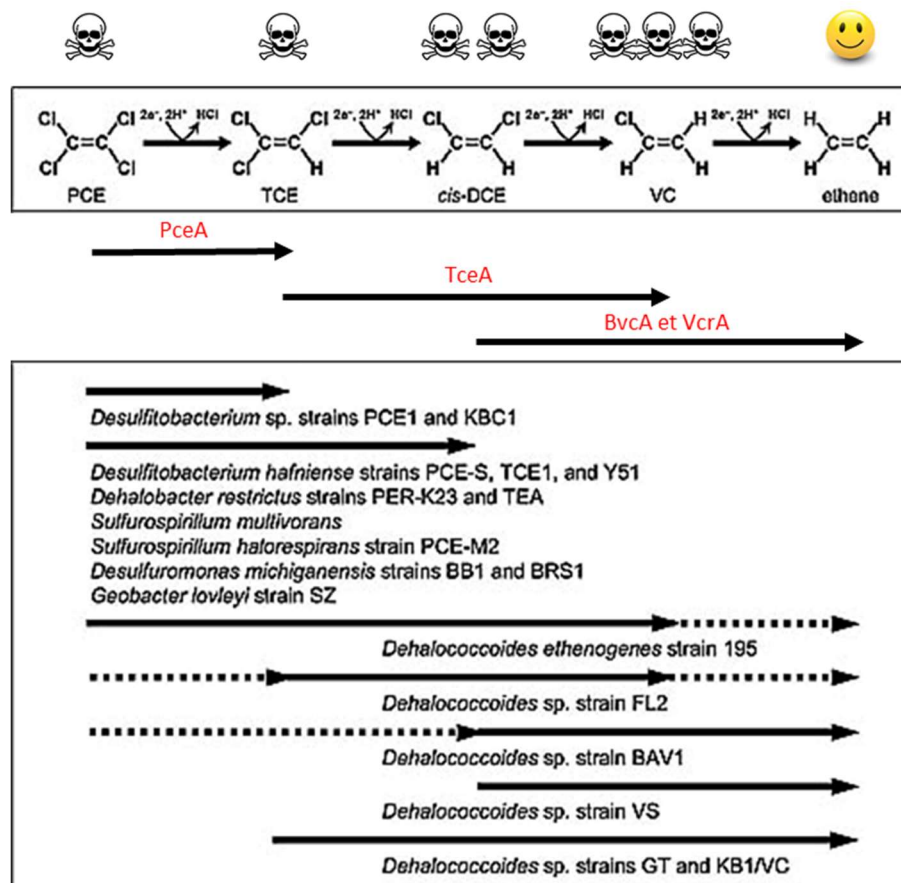


Figure 13. Déchloration réductrice des alcènes chlorés par les bactéries déhalorespirantes (Futagami *et al.*, 2008). PCE = perchloroéthylène ; TCE = trichloroéthylène ; DCE = dichloroéthylène ; VC = chlorure de vinyle. En rouge sont indiquées les déhalogénases réductrices intervenant dans les différentes étapes de la déchloration réductrice. PceA = PCE déhalogénase ; TceA = TCE déhalogénase ; BvcA et VcrA = Vinyl chloride réductases. Les flèches pleines indiquent les procédés de déchloration réductrice et celles en pointillées, les étapes de déchloration co-métabolique. Le degré de toxicité des composés est exprimé par les pictogrammes.

aux Actinobacteriota n'étaient que faiblement apparentés (97 % de similarité de séquence) à des phylotypes connus et un seul représentait près de 74% des séquences d'Actinobacteriota. Le **procédé de biostimulation par aération a induit en particulier la sélection de phylotypes bactériens actifs appartenant aux Actinobacteriota**. Deux phylotypes apparentés au genre *Acidimicrobium* (CMJA8) et *Microbacterium* (ARN92) ont été plus particulièrement stimulés dont un a représenté jusqu'à plus de 40% de la communauté bactérienne active à la fin du procédé de biostimulation (Figure 12), suggérant ainsi leur implication dans le processus de restauration de l'écosystème terrestre (Milton et al., 2010).

b. Environnement aquatique et présence d'alcènes chlorés.

Les solvants chlorés et plus particulièrement les alcènes (perchloroéthylène (PCE), trichloroéthylène (TCE), dichloroéthylène (DCE) et chlorure de vinyle (VC)) sont des molécules issues principalement de la chimie de synthèse, très volatiles, et largement utilisées au niveau industriel pour des procédés de nettoyage ou comme intermédiaires de synthèse (fabrication d'insecticides, anesthésiques, ...) (Furukawa, 2006). Certains de ces composés sont persistants, potentiellement capables d'être bioaccumulés, et surtout toxiques voire cancérogènes (Contreras Lopez, 2003). Ils sont peu présents dans les eaux de surface et n'étant pas retenus par les argiles, ils vont avoir tendance à se déposer dans la partie basse des nappes phréatiques. Leur rejet dans l'environnement représente donc un risque pour la pérennité des environnements mais également pour l'Homme. La biodégradation des solvants chlorés par les bactéries s'effectue à la fois en présence et en absence d'oxygène. En aérobiose, elle résulte le plus souvent d'une réaction d'oxydation (assimilation aérobie (Mattes et al., 2010) et co-métabolisme aérobie (Arp et al., 2001)) alors qu'en anaérobiose, elle se fait par déchloration réductrice, également appelée halo-respiration ou déshalorespiration (Vogel et McCarty, 1985; Vogel et al., 1987) (Figure 13). Toutes les étapes cataboliques sont alors assurées par des enzymes spécifiques appelées déshalogénases réductrices (Furukawa, 2006). Six genres bactériens (*Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, *Desulfitobacterium*, *Desulfuromonas*, *Geobacter* et *Sulfurospirillum*) sont capables d'utiliser les alcènes chlorés mais seule la souche *Dehalococcoides ethenogenes* 195 est capable de réaliser la minéralisation complète du PCE en éthylène (Futagami et al., 2008) (Figure 13).

Afin d'orienter et d'adapter site par site les stratégies de bioremédiation à mettre en œuvre pour les environnements contaminés par des chloroéthènes, **une biopuce ADN**

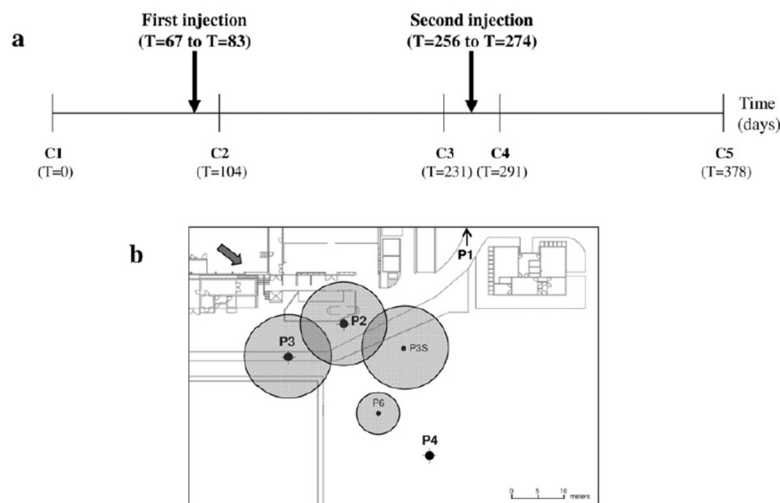


Figure 14. Vue d'ensemble du schéma stratégique de décontamination du site pollué par les chloroéthènes. a : Représentation chronologique des périodes d'échantillonnage et de la biostimulation par injection de lactate. b : Localisation des puits d'injection et de surveillance et distribution limite du lactate immédiatement après l'injection (cercles gris). P2, P3, P3S et P6 : puits d'injection. P1, P2, P3 et P4 : puits de surveillance. Le puits de surveillance en amont P1 est situé hors de la carte. La flèche indique la direction d'écoulement des eaux souterraines (Dugat-Bony et al., 2012).

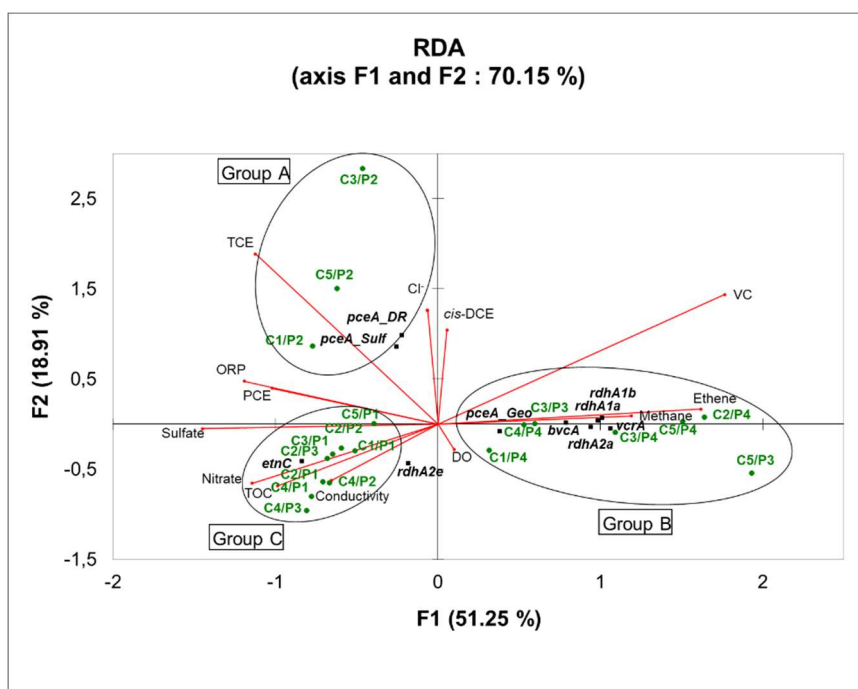


Figure 15. Analyse de redondance (RDA) permettant d'expliquer les variations des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la dégradation des chloroéthènes pour le site B. La longueur de la flèche est corrélée à la force de la relation entre les variables de réponse. Les flèches pointent dans la direction du changement maximal pour la variable associée. Carrés noirs : gènes individuels. Étoiles vertes : dates d'échantillonnage et points de prélèvement des eaux souterraines. (Dugat-Bony et al., 2012).

fonctionnelle « DechloArray » a été mise au point dans le cadre de la thèse de Eric Dugat-Bony (Dugat-Bony et al., 2011). Cette biopuce, qui permet la **détection simultanée de tous les gènes impliqués dans les trois voies majeures** précédemment citées de la **biodégradation métabolique des chloroéthènes**, a notamment été utilisée sur des prélèvements effectués au niveau d'une nappe d'eaux souterraines polluée par du TCE issu d'un site industriel français (Dugat-Bony et al., 2012). La nappe phréatique était traitée par un procédé de biostimulation qui consistait à injecter du lactate afin de servir de donneur d'électrons. Le suivi du site a été réalisé sur une année et les prélèvements ont été effectués à partir de plusieurs puits répartis sur l'ensemble du site (zone source de contamination, panache de diffusion et zone non polluée) afin de caractériser la dynamique spatio-temporelle des communautés microbiennes impliquées dans la biodégradation des chloroéthènes en réponse aux injections de lactate et d'identifier les principaux facteurs physico-chimiques impliqués dans les changements des communautés bactériennes (Figure 14). Les résultats obtenus ont mis en évidence une diminution importante de la charge en polluants avec la détection de l'ensemble des sous-produits de dégradation du TCE (DCE, VC et éthylène). Une seule voie métabolique, la **déchloration réductrice anaérobie, semblait être utilisée au regard de la détection des gènes des déhalogénases réductrices**. La biodégradation complète du TCE s'est ainsi produite grâce à une large diversité de populations déhalorespirantes impliquant notamment les genres *Sulfurospirillum*, *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium*, *Geobacter* et *Dehalococcoides*. Plus précisément, alors que les espèces affiliées aux genres *Sulfurospirillum* et *Dehalobacter* seraient à l'origine de la dégradation du TCE en DCE, ce serait *Geobacter* qui serait responsable de cette première étape dans le panache là où les concentrations en TCE sont plus faibles (Figure 15). Par ailleurs, la détection simultanée, au niveau du panache, des gènes *vcrA* et *bvcA*, codant pour des Vinyl Chloride réductases, suggère qu'au moins deux espèces différentes de *Dehalococcoides* sont probablement responsables de la dégradation du DCE et du VC en éthylène. Les analyses statistiques ont par ailleurs révélé l'importance de certains paramètres environnementaux pour le bon déroulement du processus de déchloration réductrice *in situ*. La proportion des différents accepteurs d'électrons (TCE, DCE, VC ou d'autres accepteurs alternatifs comme le nitrate et le sulfate), le potentiel redox ou encore la concentration en carbone organique totale influent fortement sur la dynamique spatio-temporelle des microorganismes déhalorespirants.

Le développement de cette biopuce pour la détection des gènes de dégradation des chloroéthènes s'est révélée être une approche pertinente pour évaluer la performance d'un processus de bioremédiation *in situ* afin de permettre aux industriels d'adapter ou d'optimiser

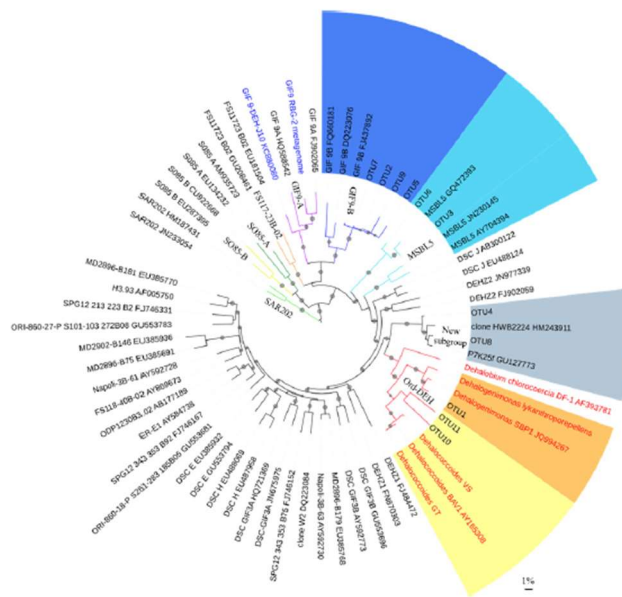


Figure 16. Arbre phylogénétique des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des *Dehalococcoidia* (DEH) mettant en évidence la position phylogénétique des 11 OTUs obtenus dans la colonne d'eau du lac Pavin. L'analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide de la méthode du « neighbor-joining ». Les séquences de cette étude se répartissent en trois classes définies par Wasmund et al. (2014) : GIF-9B en bleu foncé, MSBL5 en bleu clair et Ord-DEH en orange (*Dehalogenimonas*) et en jaune (*Dehalococcoides*). Les séquences des DEH cultivées sont surlignées en rouge. La barre d'échelle représente une divergence de séquence de 1 % (Biderre-Petit et al., 2016).

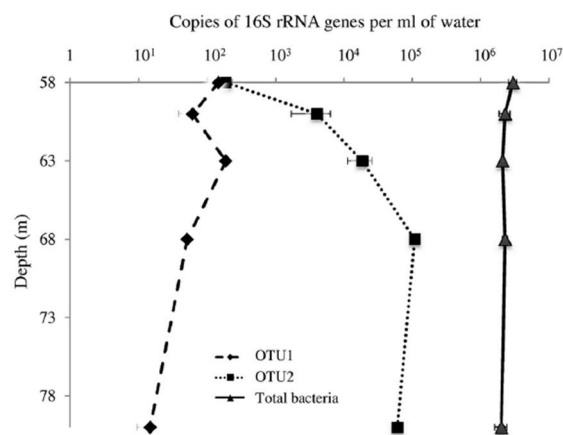


Figure 17. Quantification de l'abondance totale de l'ADNr 16S et de deux phylotypes liés aux *Dehalococcoidia* (OTUs 1 et 2) dans la colonne d'eau du lac Pavin. (Biderre-Petit et al., 2016).

les systèmes de biotraitement. Elle a, par la suite, été utilisée dans le cadre d'un contrat dont j'avais la responsabilité scientifique. Ce contrat établi avec l'entreprise SITA remédiation, qui était déjà impliquée dans les travaux précédemment cités, avait ainsi pour objectif d'étudier les capacités métaboliques des populations microbiennes présentes dans des aquifères pollués par des chloroéthènes (PCE, TCE, DCE ou VC).

Au cours des dernières décennies, les activités humaines, et plus particulièrement les activités industrielles, ont ainsi généré de nombreux composés organochlorés et provoqué des pollutions importantes du fait de leur rejet massif et de leur accumulation dans l'environnement. Ce qui est moins connu, c'est que la **nature peut également être à l'origine de la formation de molécules organochlorées en abondance** et qui, dans certains cas, peuvent correspondre à des composés identiques à ceux synthétisés par l'Homme. Ainsi, certaines algues marines seraient capables de produire du TCE et du PCE (Abrahamsson et al., 1994) et la formation naturelle de VC a pu être mise en évidence dans les sols (Keppler et al., 2002). Certains groupes bactériens vont donc être capables d'utiliser ces composés en tant que substrats pour leur croissance. Le fait de mieux comprendre le rôle écologique des populations déhalorespirantes dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique naturel non anthropisé est donc nécessaire afin d'approfondir nos connaissances pour des applications en bioremédiation. Afin de pouvoir répondre à cette problématique, des études ont été conduites sur le lac Pavin qui représente un excellent modèle d'étude de par ses caractéristiques géo-physico-chimiques. Par une approche de clonage-séquençage de l'ADNr 16S et par une approche de PCR quantitative, nous avons ainsi pu mettre en évidence une **diversité naturelle de bactéries affiliées à la classe des Dehalococcoidia à différentes profondeurs de la zone anoxique du lac Pavin** qui est un lac méromictique (Biderre-Petit et al., 2016). Les Dehalococcoidia détectées étaient phylogénétiquement diversifiées et la majorité des séquences d'ADNr 16S présentaient moins de 91 % de similarité avec des séquences d'ADNr 16S de Dehalococcoidia précédemment isolées (Figure 16). Afin de prédire le potentiel métabolique des Dehalococcoidia détectés et d'évaluer si ces bactéries présentaient des gènes codant pour des enzymes capables de transformer les composés halogénés, un enrichissement de l'ADN génomique affilié aux Dehalococcoidia a été réalisé en utilisant une approche de capture de gènes (Denonfoux et al., 2013; Ribière et al., 2016a) à l'aide de sondes ciblant l'ARNr 16S de Dehalococcoidia, des gènes de déhalogénases réductrices et des séquences d'insertion adjacentes connues. **Deux nouvelles séquences homologues de déshalogénase réductrice ont été identifiées** à partir de l'ADN génomique enrichi en Dehalococcoidia (Figure 17), et les gènes marqueurs situés à

proximité directe ont bien confirmé que les fragments de gènes provenaient de *Dehalococcoidia*. La faible similarité de séquence avec les gènes connus de la déshalogénase réductrice suggère donc un **potentiel catabolique encore inconnu dans la zone anoxique du lac Pavin**.

c. Environnement digestif et hydrocarbures aromatiques polycycliques

Suite à une mobilité de l'équipe GIIM du LMGE vers l'EA 4678 CIDAM dirigée par le Pr Monique Alric, j'ai dû initier une nouvelle thématique en lien avec l'environnement digestif. Je me suis donc intéressée à étudier **l'impact d'un polluant environnemental, le benzo[a]pyrène (B[a]P), sur le microbiote intestinal en modèle murin**. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Céline Ribière que j'ai co-encadrée.

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des populations microbiennes qui peuplent le tractus gastro-intestinal. Cette communauté microbienne intestinale, qui est considérée comme un organe à part entière, a co-évolué avec son hôte et joue ainsi un rôle crucial dans l'homéostasie du tractus digestif, et plus globalement dans celle de son hôte *via* des fonctions métaboliques, immunologiques, structurales et de protection contre la colonisation par des microorganismes pathogènes. Bien que le microbiote intestinal semble être largement bénéfique à son hôte, des modifications de la CCB, ou dysbiose, sont associées à un dysfonctionnement du système digestif qui peuvent alors conduire à l'apparition de maladies inflammatoires chroniques digestives, de type maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ou cancer colorectal, ou des pathologies chroniques extra-digestives telles que des allergies, des maladies arthritiques, l'obésité, des syndromes métaboliques ou encore des maladies auto-immunes. Plusieurs facteurs externes sont susceptibles de provoquer ces modifications du microbiote intestinal dont la qualité de l'environnement. En effet, des études ont mis en évidence que certains composés chimiques toxiques pour l'environnement tels que le cadmium ou encore les biphényles polychlorés pouvaient avoir un impact sur le microbiote intestinal dans des modèles *in vivo* (Choi et al., 2013; Liu et al., 2014). La qualité de l'environnement, avec notamment la présence de molécules contaminantes, pourrait donc, en association avec des facteurs génétiques, immunologiques et d'autres facteurs environnementaux (comme le stress ou encore le régime alimentaire) jouer un rôle clé dans l'initiation, le développement ou l'expression clinique de maladies *via* des altérations du microbiote intestinal.

Parmi les différentes substances toxiques actuellement répertoriées, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) font partie de la catégorie des polluants organiques persistants, plus communément retrouvés sous le sigle POP. Ces derniers représentent un réel danger pour la santé humaine et font par conséquent l'objet d'une surveillance et d'une réglementation particulièrement accrues selon le protocole d'Aarhus et la Convention de Stockholm signés respectivement en 1998 et en 2001. La catégorie des POP regroupent des molécules organiques complexes sur la base de quatre propriétés différentes, à savoir : i) leur persistance dans l'environnement (ils sont résistants à tout type de dégradation), ii) leur capacité de bioaccumulation (ils s'accumulent dans les tissus vivants avec une augmentation de leur concentration à chaque maillon de la chaîne alimentaire), iii) leur mobilité en raison de leur semi-volatilité dans l'air (ce qui leur permet d'être déplacés sur de longues distances et de pouvoir être déposés loin des sources d'émission), et iv) leur toxicité (effets immunotoxiques, neurotoxiques, tératogènes et/ou cancérigènes) (Vandecasteele et Ourisson, 2005). **Le benzo[a]pyrène (BaP) est le membre le plus caractérisé et le plus toxique de cette famille des HAP.** En effet, plusieurs effets mutagènes, pro-inflammatoires et cancérigènes ont été démontrés dans différents modèles animaux (Baird et al., 2005; Qamar et al., 2012). L'induction de tumeurs dans plusieurs organes a par ailleurs conduit le BaP à être classé comme **cancérogène de groupe 1** pour l'Homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). La contamination de l'Homme par le BaP est inévitable et peut se faire selon 3 voies différentes : l'inhalation de fumée de tabac ou d'air pollué, le contact direct avec un environnement pollué (retombées de poussières atmosphériques, eau ou sol pollué), et l'ingestion d'eaux ou d'aliments contaminés (principalement de viandes et de poissons grillés ou fumés au charbon de bois, ou de légumes mal nettoyés). Si l'appareil respiratoire est particulièrement sensible aux polluants atmosphériques (Atkinson et al., 2001), le système digestif n'en est pas moins épargné en raison de l'absorption de sols (effet particulièrement prononcé chez les enfants) (Calabrese et al., 1997), d'aliments ou d'eau contaminées (Phillips, 1999), ou encore de BaP venant de l'arbre pulmonaire par le phénomène de clairance mucociliaire. La compréhension de l'impact de ces POP, et notamment du BaP, sur la santé humaine, et plus particulièrement sur le système digestif, est essentielle et apparaît donc comme une priorité suite au Grenelle de l'environnement et aux différents travaux santé/environnement.

L'objectif des premiers travaux de thèse de Céline Ribière était par conséquent **d'étudier en modèle murin l'impact du BaP sur le microbiote à la fois fécal et associé à la**

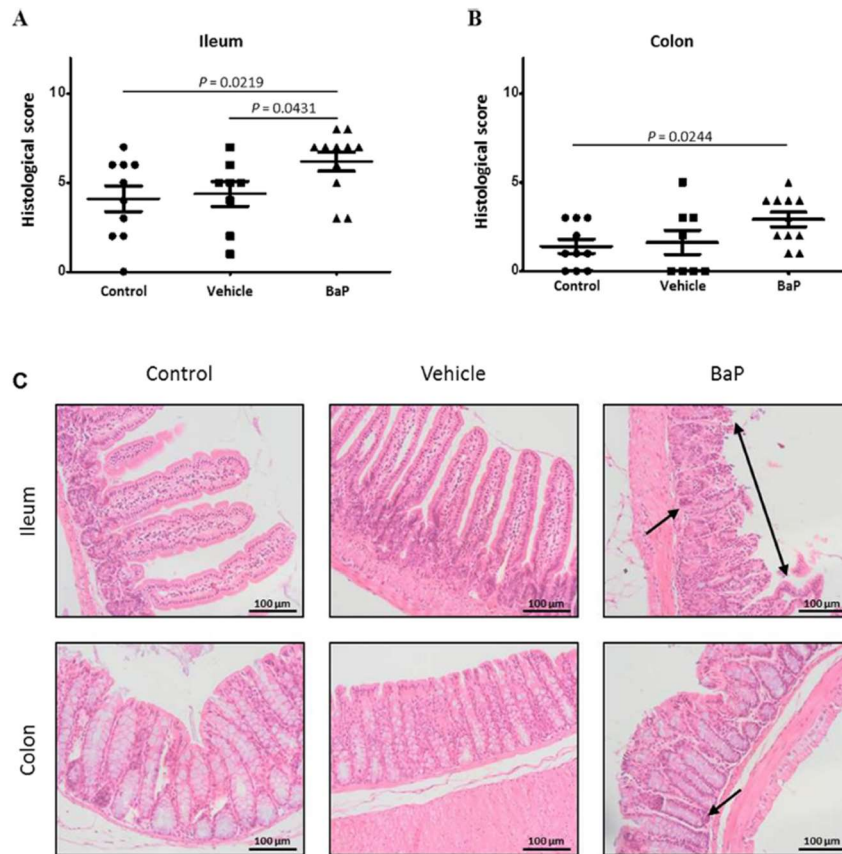


Figure 18. Développement d'une inflammation modérée chez les souris traitées au benzo[a]pyrène (BaP). A, B : Score histologique déterminé au niveau de l'iléon et du colon respectivement. C : histologie (coloration HPS) de l'iléon et du côlon de souris exposées par voie orale à une solution saline physiologique stérile (contrôle), à de l'huile de tournesol (véhicule) ou à du BaP. Chaque symbole représente une souris individuelle. Les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM (erreur standard de mesure) et les valeurs p (A, B) sont issues d'un test de Mann-Whitney. L'érosion épithéliale (flèche doublée) et l'augmentation du nombre de cellules dans les cryptes (flèche) sont également montrées (C) (Rivière et al., 2016).

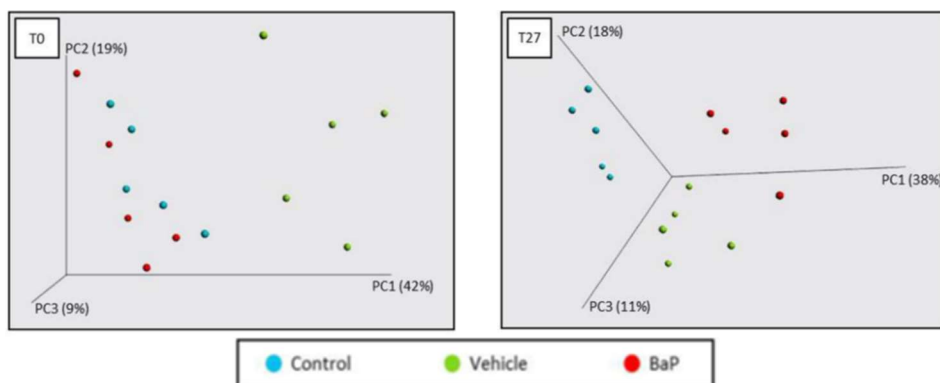


Figure 19. Composition de la communauté bactérienne fécale des souris contrôles, des souris traitées au véhicule (huile de tournesol) et des souris traitées au BaP, différenciée par l'analyse en coordonnées principales (PCoA) à partir d'une matrice de distance UniFrac. Les souris témoins, les souris traitées au véhicule et les souris traitées au BaP sont représentées en bleu, en vert et en rouge, respectivement, à T0 (avant l'exposition) et à T27 (Rivière et al., 2016).

muqueuse intestinale. En effet, nous avons émis l'hypothèse que le BaP pourrait altérer la composition des communautés microbiennes de l'intestin, induisant alors une réponse inflammatoire ainsi qu'une altération des fonctions intestinales ce qui pourrait alors favoriser l'émergence ou l'aggravation des pathologies chroniques associées à une dysbiose du microbiote intestinal. Une étude de surexposition chronique orale, par gavage, au BaP à une dose de 50mg/kg de poids corporel (Labib et al., 2012) durant 28 jours a par conséquent été menée chez des souris C57BL6. Trois groupes ont été étudiés : un groupe contrôle (groupe ayant reçu de l'eau), un groupe « véhicule » (groupe où les souris ont reçu de l'huile de tournesol) et un groupe « BaP » (souris ayant reçu le BaP dissout dans de l'huile de tournesol). A l'issue des 28 jours d'exposition, des signes d'inflammation modérée de la muqueuse intestinale ont été observés à la fois au niveau iléal et colique chez les souris du groupe BaP en comparaison aux deux autres groupes. Les analyses histologiques ont mis en évidence que la muqueuse iléale était significativement plus lésée que la muqueuse colique (Figure 18). L'infiltration de l'épithélium par les polynucléaires était significativement augmentée dans les deux tissus de la muqueuse des souris exposées au BaP. Le nombre de cellules inflammatoires (polynucléaires) ainsi que des lésions au niveau des cryptes ont également été observées au niveau iléal et colique avec dans les cas les plus graves, la présence d'une érosion multifocale. L'approche de séquençage haut débit (Illumina), ciblant la région V4 du gène codant pour l'ARNr 16S, a été entreprise afin d'étudier les effets du BaP sur la structure (richesse, diversité et composition) de la communauté bactérienne fécale et associée à la muqueuse intestinale (iléale, colique proximale et colique distale). Les résultats ont mis en évidence l'**absence d'effet significatif de l'exposition orale au BaP sur les paramètres de l'alpha-diversité** (nombre d'unités taxonomiques opérationnelles (OTUs), indice Chao1, indice de Shannon, mesures basées sur la divergence (Phylogenetic Distance)) et ceci quel que soit le type d'échantillon biologique (fèces ou muqueuse) auquel on s'intéressait. Alors que les Bacteroidota, suivi par les **Bacillota (anciennement Firmicutes) et les Verrucomicrobiota ont dominé la CCB fécale** et ceci quel que soit le groupe de souris auquel on s'intéressait, ce sont les Bacillota qui étaient prédominants avec ensuite les **Bacteroidota et les Verrucomicrobiota au niveau de la muqueuse intestinale iléale et colique** (proximale et distale). Les analyses en coordonnées principales, basée sur une matrice de distance calculée grâce à l'indice de β -diversité « Weighted Unifrac », ont cependant montré une séparation des souris en fonction du traitement qu'elles ont reçu (contrôle, véhicule et BaP) à la fois pour les échantillons fécaux et de muqueuses coliques (Figure 19). Cette clusterisation a donc suggéré que l'exposition orale au **BaP induit des changements significatifs dans la composition et l'abondance relative**

principalement au niveau des familles et des genres bactériens. Ainsi, par exemple, aucune diminution des Bacillota n'a été détectée après l'exposition orale au BaP, alors que les *Lactobacillaceae* et plus particulièrement les *Lactobacillus* étaient moins représentés à la fin de l'expérimentation. Dès le début de l'expérience, le microbiote intestinal a semblé résister à l'impact des polluants avec l'augmentation de bactéries bénéfiques telles que *Akkermansia muciniphila*. En effet, ses capacités à dégrader le mucus et à produire du propionate, qui stimule notamment le système immunitaire et les fonctions de la barrière intestinale, ont été démontrées (Derrien et al., 2004). L'augmentation d'*A. muciniphila* un jour après la première administration de BaP semblerait témoigner d'un effet protecteur sur l'épithélium intestinal. Cependant, cet effet protecteur ne semblait être que temporaire puisqu'une diminution globale de l'abondance relative de cette bactérie a été observée par la suite. D'autres taxa bactériens, reconnus comme bénéfiques ont également été affectés sélectivement au cours et à la fin de l'expérimentation au BaP, tels que *Mucispirillum*, *Ruminococcaceae* et *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus*). Ces différents appauvrissements en taxa bactériens semblaient se produire parallèlement à l'apparition d'un environnement intestinal pro-inflammatoire avec des abondances plus élevées des membres des familles *Porphyromonadaceae*, *Paraprevotellaceae* et *Alcaligenaceae* qui sont connues pour être associées à des états inflammatoires (Chen et al., 2012; Schwab et al., 2014; Walujkar et al., 2014). Afin de se replacer dans un contexte d'écologie microbienne, les **taxa bactériens ont été classés en trois catégories : dominants ($1\% \leq$ abondance relative), communs ($0,1\% <$ abondance relative $< 1\%$) ou rares (abondance relative $\leq 0,1\%$). En effet, si les populations dominantes ont un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes, les populations rares ne sont pas moins importantes. Si elles contribuent faiblement à l'abondance totale de la communauté, ces membres peuvent toutefois représenter des contributeurs substantiels au fonctionnement de l'écosystème (Pedrós-Alió, 2012). Lorsque les écosystèmes microbiens sont soumis à des perturbations, ces populations peuvent avoir un rôle déterminant notamment dans les phénomènes de résistance et de résilience. Les **taxa de la « biosphère rare » peuvent ainsi constituer un réservoir de capacités métaboliques permettant de répondre aux changements des conditions de l'environnement.** Il s'agit de la théorie de « seed bank ». Cette « seed bank » est constituée d'un ensemble de microorganismes dormants qui peuvent devenir actifs et se développer lorsque les conditions environnementales leur sont favorables. Ces organismes dormants diminuent au maximum leurs activités métaboliques pour réduire drastiquement leur dépense énergétique afin d'attendre des conditions plus favorables pour leur croissance (Lennon et Jones, 2011). Ainsi, les membres rares des communautés bactériennes fécales et associées à la**

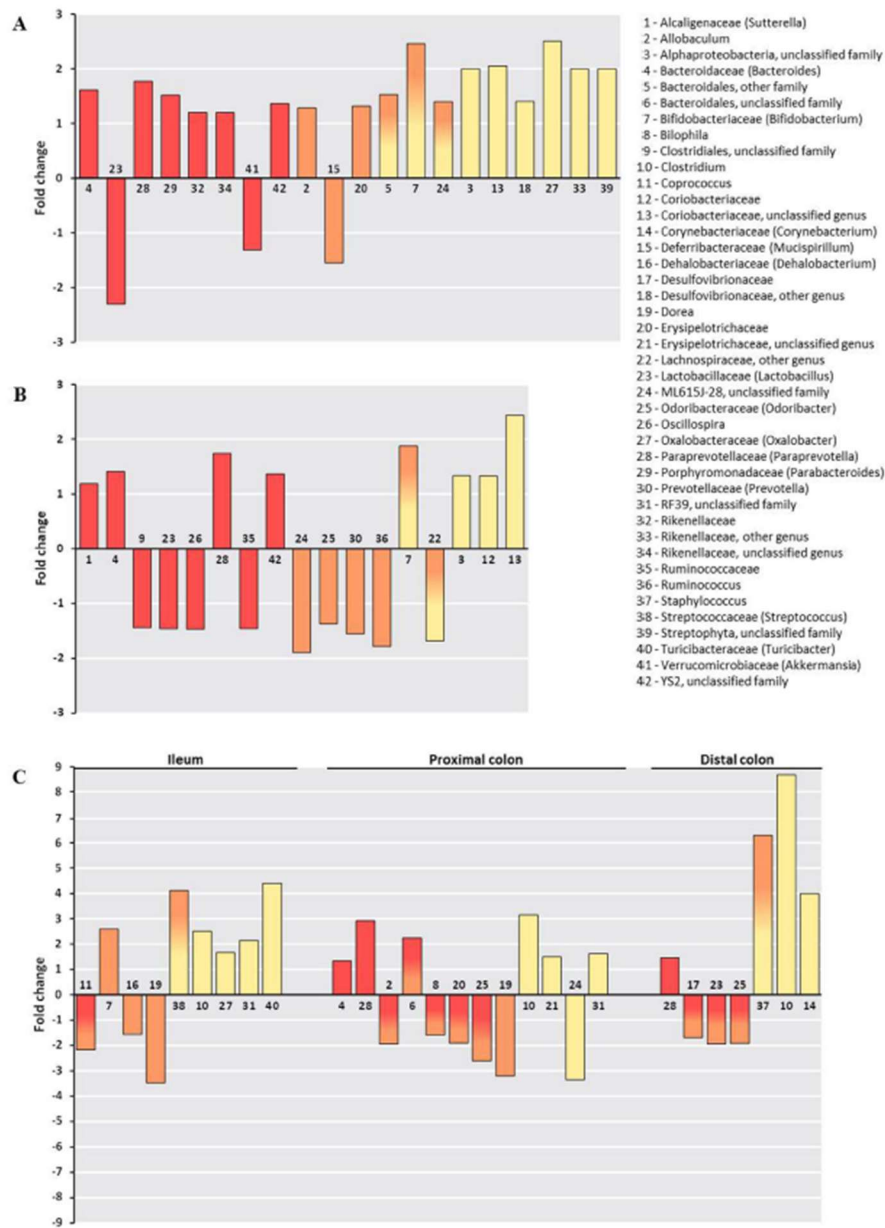


Figure 20. “Fold change” des taxa bactériens fécaux et associés aux muqueuses iléales et coliques murines significativement perturbés en raison de l'exposition orale au BaP. A : microbiote fécal dans le groupe BaP à T0 par rapport à T27. (B) Microbiote fécal à T27 dans le groupe BaP par rapport au groupe témoin. (C) Microbiote associé aux muqueuses dans le groupe BaP par rapport au groupe témoin. Les taxons en jaune ont été considérés comme des membres rares de la CCB (< 0,1 % en abondance relative), ceux en rouge ont été considérés comme des membres dominants (> 1 % en abondance relative). Le gradient de couleur allant du rouge à l'orange indique les taxons qui étaient initialement dominants et ont ensuite été considérés comme étant communs (entre 0,1 % et 1 %). Le gradient de couleur allant du jaune à l'orange indique le passage de taxons rares à des taxons communs. Les variations significatives de l'abondance de la population bactérienne ont été évaluées à l'aide du test de Mann-Whitney (valeur $p < 0,05$) (Rivière et al., 2016).

muqueuse lors de nos travaux ont subi des changements temporels, tout comme les membres dominants suite à l'exposition orale au BaP. Ils pourraient jouer un rôle important dans la physiologie et l'homéostasie du tractus gastro-intestinal. L'augmentation de l'abondance de taxa rares bénéfiques comme les *Bifidobacteriaceae* (*Bifidobacterium*) (Figure 20) au niveau de la muqueuse intestinale chez les souris exposées au BaP tendrait à souligner le rôle du recrutement de certains de ces taxa rares pour maintenir l'homéostasie intestinale. Cependant, il ne serait également pas surprenant que d'autres taxa rares avec des effets plutôt nocifs pour l'environnement intestinal voit leur abondance augmentée. Ainsi, l'exposition orale au BaP pourrait conduire au développement d'un environnement favorable pour des populations également non bénéfiques pour l'hôte.

L'exposition orale chronique au BaP a provoqué une inflammation plus prononcée au niveau iléal que colique. Cette différence pourrait être due à l'épaisseur de la couche de mucus plus faible au niveau iléal qui conférerait une protection moins importante en comparaison au niveau colique. De plus, l'intestin est un organe cible connu pour la toxicité du BaP et la formation d'adduits à l'ADN a été démontrée dans l'intestin de souris exposées par voie orale au BaP (Uno et al., 2004). L'intestin est le premier segment à participer au métabolisme médié par l'enzyme P450 des xénobiotiques (Van Herwaarden et al., 2007). La forte activité des enzymes P450 dans ce segment intestinal pourrait également expliquer cette inflammation plus importante au niveau iléal.

L'ensemble des travaux décrits dans cette partie « étude de perturbations anthropiques sur la structure et l'activité des communautés bactériennes en milieux artificiels et naturels » a été valorisé *via* la publication de 6 articles scientifiques (Milton et al., 2010; Boucher et al., 2011; Dugat-Bony et al., 2012; Denonfoux et al., 2013; Ribière et al., 2016b; Biderre-Petit et al., 2016), d'une revue (Gasc et al., 2015), d'un chapitre de livre (Ribière et al., 2016a) et d'un article de vulgarisation destiné à l'hygiène et à la sécurité au travail (David et al., 2009).

Projet de recherche

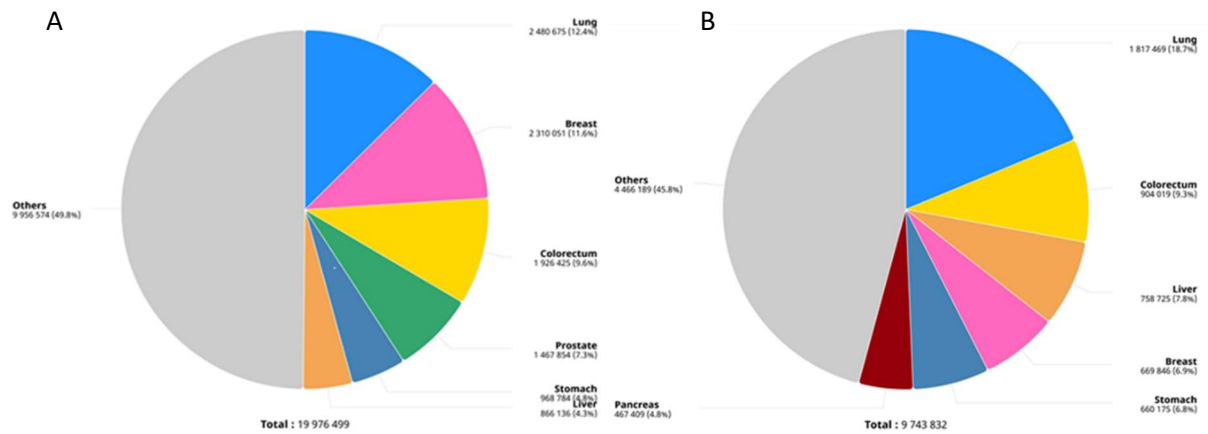


Figure 21. Incidence (A) et mortalité (B) par cancer dans le monde (International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN, 2022).

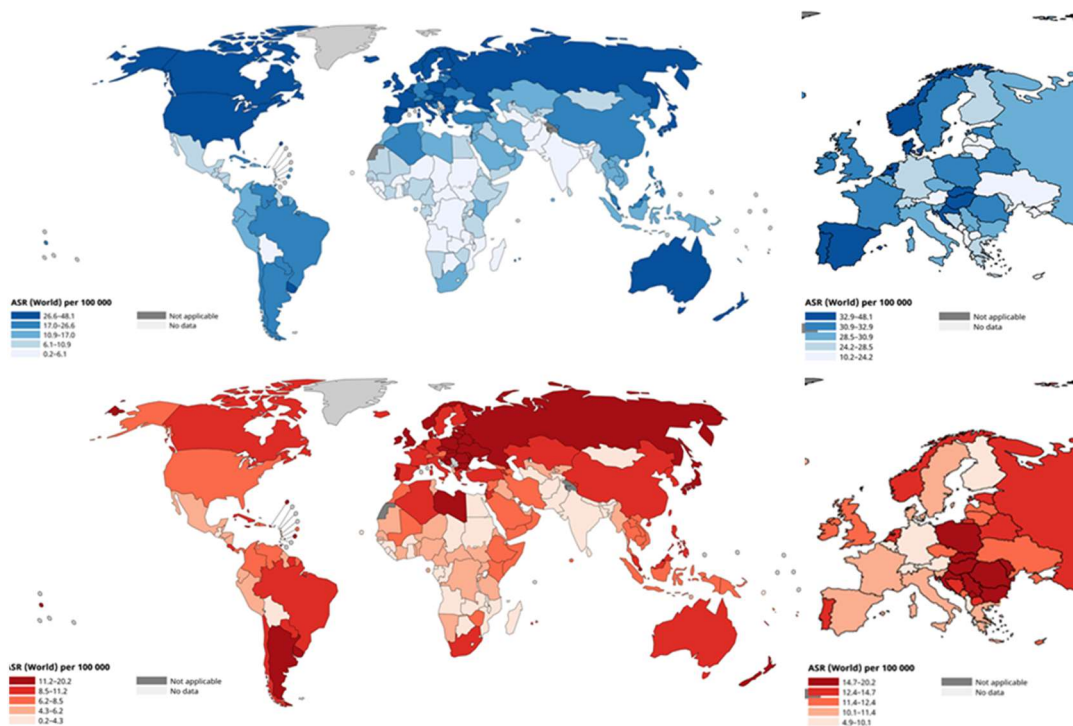


Figure 22. Répartition géographique de l'incidence (en bleu) et de la mortalité (en rouge) du cancer colorectal dans le monde et en Europe. (International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN, 2022).

Le projet de recherche que je développe actuellement a été initié suite à un changement de laboratoire en 2016. **Il est réalisé au sein du laboratoire Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH) UMR1071 Inserm/UCA - USC INRAE 1382** dirigé par le Pr Nicolas Barnich et en collaboration avec le Pr Mathilde Bonnet. Il concerne l'**impact de molécules contaminantes telles que le dioxyde de titane (TiO₂) sur le microbiote intestinal dans le cadre du cancer colorectal (CCR)**. En effet, les facteurs environnementaux, et plus particulièrement la présence de molécules telles que les nanoparticules de TiO₂, que l'on peut retrouver dans l'alimentation, pourraient jouer un rôle prépondérant dans le développement du CCR. **Ces molécules pourraient intervenir dans l'étiologie de cette pathologie en induisant notamment des perturbations au niveau de la structuration et du fonctionnement de l'écosystème microbien intestinal.**

I. LE CANCER COLORECTAL

1. Généralités

Le cancer colorectal (CCR) est une pathologie chronique intestinale touchant deux organes du tube digestif : le côlon et/ou le rectum. Au niveau mondial, il représente le **3^{ème} cancer le plus fréquemment observé et la 2^{ème} cause de mortalité par cancer** avec plus de 1 926 400 nouveaux cas et 9 743 800 décès en 2022 (Figure 21). C'est le 2^{ème} cancer le plus diagnostiqué chez la femme et le 3^{ème} chez l'Homme. L'incidence et le taux de mortalité par CCR varient de manière importante selon la localisation géographique, les taux les plus élevés étant observés dans les pays les plus développés (Australie, Nouvelle Zélande, Europe et Amérique du Nord). En Europe, la France représente le 12^{ème} taux d'incidence le plus élevé (19^{ème} pour l'homme et 8^{ème} pour la femme) et le 9^{ème} taux de mortalité le plus bas (12^{ème} pour l'homme et 10^{ème} pour la femme) (Figure 22). En France, le CCR est également le 3^{ème} cancer en termes d'incidence et le 2^{ème} cancer en termes de mortalité. Le taux de survie (standardisé par rapport à l'âge) au-delà de 5 ans est estimé à 63% tous stades de gravité confondus. Malgré les progrès du dépistage et de la prise en charge thérapeutique de la maladie, le CCR reste donc un problème majeur de santé publique.

2. De la cellule normale à l'adénocarcinome

La majorité des cas de CCR sont des adénocarcinomes qui se développent à partir des

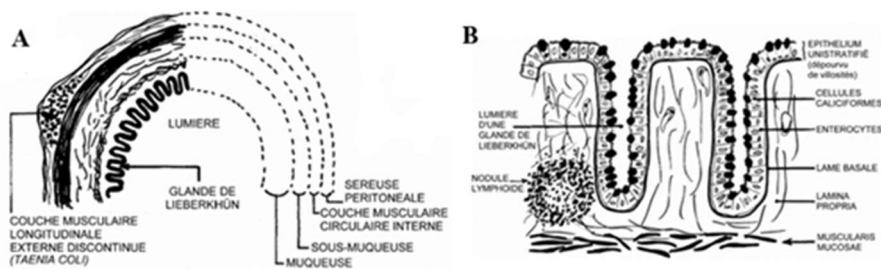


Figure 23. Schéma de la structure de la paroi et de l'épithélium colique. A : Schéma d'une coupe transversale du colon. La paroi intestinale est composée de 4 couches, de la lumière intestinale vers les couches plus profondes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. B : Schéma d'une coupe transversale de la muqueuse colique. Cette dernière est constituée de trois couches qui sont un épithélium stratifié, la *lamina propria* et la musculaire muqueuse. Quatre types de cellules différenciées composent l'épithélium : les cellules à mucus (ou cellules caliciformes), les cellules entéroendocrines, les entérocytes et les cellules de Paneth (Pr Daniel Balas).

entérocytes de l'épithélium.

a. Structure de la paroi

Le colon est la portion du tube digestif qui suit l'intestin grêle et qui précède le rectum. Les rôles physiologiques spécifiques du côlon sont la réabsorption hydroélectrolytique, la dégradation des composés non digestibles et le stockage des selles avant la défécation. Le rectum constitue la dernière partie du tube digestif. Il fait suite au côlon et s'étend jusqu'à l'anus. Il sert essentiellement de réservoir aux selles qui sont ensuite évacuées par l'anus. De ces différentes fonctions intestinales découle une organisation histologique spécifique. La paroi intestinale est ainsi constituée de quatre tuniques qui sont, de la lumière du tube digestif vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Figure 23). La muqueuse est la tunique la plus complexe. Elle est composée i) d'un épithélium monostratifié et organisé en cryptes (ou glandes de Lieberkühn) qui sont le siège de la prolifération et de la différenciation cellulaire, ii) d'une lame basale, iii) d'une lamina propria (ou chorion) riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, et iv) d'une fine couche musculaire de soutien appelée musculaire muqueuse (Figure 23). L'épithélium quant à lui, est composé de 4 populations cellulaires dans des proportions différentes : les entérocytes (cellules absorbantes et sécrétrices d'enzymes hydrolytiques), les cellules caliciformes (sécrétion du mucus), les cellules de Paneth (sécrétion d'agents antimicrobiens) et les cellules entéro-endocrines (sécrétion de diverses hormones) (Barker et al., 2008).

b. Evènements tissulaires et cellulaires du CCR

La carcinogenèse colorectale débute dans la majorité des cas à partir d'une cellule épithéliale intestinale de la muqueuse suite à une mutation initiatrice ou une modification épigénétique. D'un point de vue histologique, le foyer de crypte aberrante (FCA) est la première anomalie décelable au sein de la muqueuse colique. Dans 95% des cas, cette lésion reste bénigne, elle ne possède pas d'atypies cellulaires et reste hyperplasique. Cependant, dans 5% des cas, le FCA devient dysplasique et définit alors un micro-adénome. À l'échelle macroscopique, l'adénome se présente souvent sous forme de polype c'est-à-dire d'une excroissance de la muqueuse venant envahir la lumière intestinale. Le risque d'évolution d'un adénome vers un cancer est d'autant plus grand que la dysplasie est importante. Selon le degré de dysplasie, on distingue les adénomes précancéreux dits de bas grade des adénomes dits de

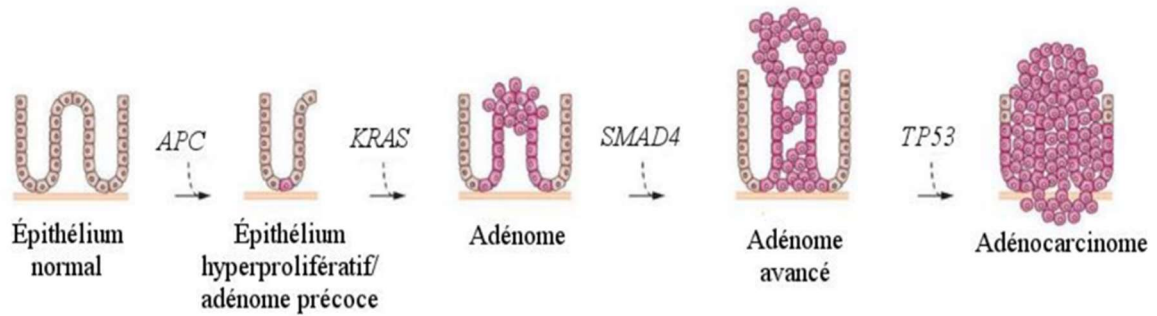


Figure 24. Modifications moléculaires conduisant à la carcinogène colorectale de type sporadique. La séquence d'événements moléculaires adénome-cancer a été évoquée pour la première fois par Fearon et Vogelstein (1990). À chaque étape de la séquence intervient une ou plusieurs altérations génomiques qui s'ajoutent à la précédente et induit des modifications cellulaires et histologiques (modifiée d'après Grady et al., 2014).

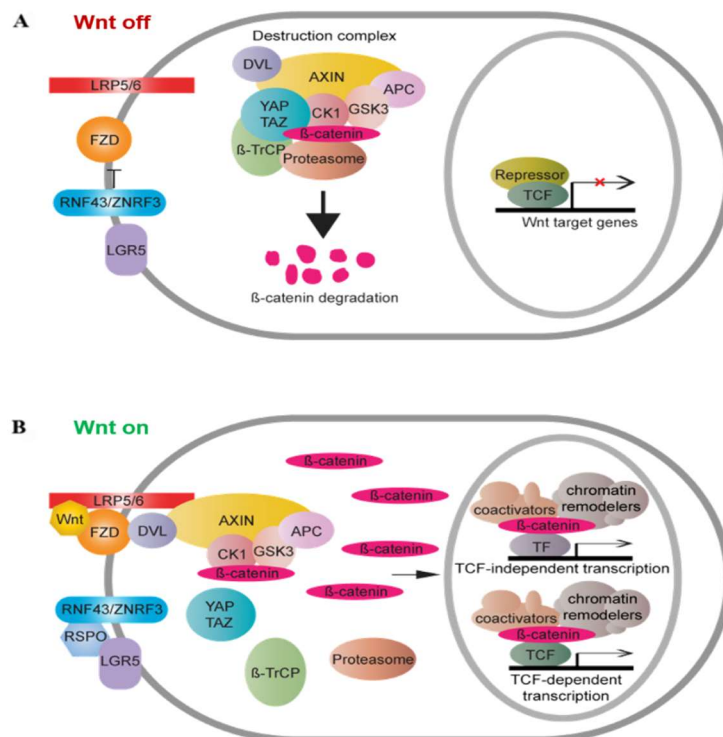


Figure 25 : Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/APC/β-caténine. A : En absence d'un ligand WNT, le complexe de destruction (constitué notamment d'APC, AXIN, GSK3 et CK1) se lie et phosphoryle la β-caténine cytoplasmique qui sera ensuite dégradée grâce au protéasome. B : En présence de WNT, une liaison entre le ligand et le récepteur FZD-LRP5/6 entraîne l'inhibition de la phosphorylation de la β-caténine cytoplasmique et le désassemblage du complexe de destruction. Cela entraîne la stabilisation de la β-caténine et sa translocation nucléaire où elle pourra alors activer la transcription de gènes cibles dont des oncogènes. Suite à une altération du gène *APC* dans le cadre du CCR, la formation du complexe de destruction est impossible, entraînant alors une activation aberrante de la voie Wnt malgré l'absence du ligand (modifiée d'après Bian et al., 2020).

haut grade. Sur 1000 adénomes, 25 évolueront en adénocarcinomes dans un délai de 10 à 20 ans. Ces derniers, d'abord limités à l'épithélium, s'étendent progressivement en profondeur, franchissent la lame basale (adénocarcinome intra-muqueux *in situ*), la *lamina propria* puis la musculaire de la muqueuse colique et deviennent des adénocarcinomes invasifs (Jass, 2007). Les cellules tumorales peuvent alors disséminées aux ganglions et aux autres viscères (essentiellement le foie et les poumons) par voie sanguine et/ou lymphatique (Scheele et al., 2005).

c. Bases moléculaires de la carcinogénèse colorectale

La séquence qui décrit la transformation d'un épithélium sain en adénocarcinome invasif, et qui a été baptisée par Fearon et Volgenstein la séquence adénome-cancer, va de pair avec des évènements moléculaires (Figure 24) (Fearon et Vogelstein, 1990). Environ 6 à 10 altérations génomiques seraient nécessaires au cours de l'évolution pour conduire de la cellule normale jusqu'à l'adénocarcinome. Dans 75 à 80% des CCR sporadiques, l'altération la plus fréquemment identifiée est celle du gène suppresseur de tumeur *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) qui conduit à une activation de la voie constitutionnelle de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et donc à une prolifération anarchique et continue des cellules coliques (Gregorieff et Clevers, 2005). En effet, lors du développement normal et en absence du ligand WNT, la β -caténine cytosolique est phosphorylée par le complexe multi-protéique APC-Axine-GSK3 puis dégradée par le protéasome (situation « Wnt off ») (Figure 25). Cependant, lorsque le ligand WNT est présent, il va se fixer sur les récepteurs de surface activant alors la voie Wnt/ β -caténine ce qui empêche la phosphorylation de la β -caténine et donc sa dégradation (Figure 25). La β -caténine est alors transloquée dans le noyau où elle s'associe à des facteurs de transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose (situation Wnt on). Dans le CCR, la voie Wnt est activée constitutivement. En effet, lorsque le gène *APC* est muté, la protéine résultante est alors tronquée et incapable de former le complexe APC-Axine-GSK3 qui ne peut pas phosphoryler la β -caténine. On se retrouve alors dans la situation « Wnt on » de manière constitutive en absence de ligand.

Un modèle animal de référence de la carcinogénèse colique spontanée est la souris *APC^{min/+}* (Min, Multiple intestinal neoplasia) (Jackstadt et Sansom, 2016). Ces souris possèdent une mutation non-sens au niveau du codon 850 d'un allèle du gène *Apc* induisant la formation d'un codon stop. Ainsi, elles développent des centaines de polypes adénomateux au niveau de

l'intestin grêle et les animaux plus âgés présentent des tumeurs localement invasives et des adénocarcinomes au niveau du côlon.

3. Etiologie et facteurs de risque

a. Facteurs génétiques

Certains syndromes génétiques peuvent prédisposer au développement du CCR (environ 5% des CCR). Il s'agit principalement de la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) et du syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer). La PAF représente environ 1% des CCR. Elle se caractérise par le développement, dès l'adolescence, de multiples polypes (>100) dans le colon. Le risque de développer un CCR chez ces patients avant l'âge de 40 ans est presque de 100% en l'absence de traitement. Deux gènes sont connus pour être impliqués dans la PAF : le gène *APC* à transmission autosomique dominante et le gène *MYH* (ou *Mut-YH*) à transmission autosomique récessive (Reya et Clevers, 2005; Half et al., 2009). Le syndrome de Lynch, quant à lui, représente 3% des CCR. Il se caractérise par la formation de polypes mais en plus faible nombre que pour la PAF et le risque pour les patients atteints de ce syndrome de développer un CCR à 70 ans est de l'ordre de 70% pour les hommes et de 40% pour les femmes. L'anomalie touche un des gènes du système MisMatch Repair (MMR) qui contrôle la réparation des défauts d'appariement de l'ADN survenant lors de la duplication de l'ADN. Les patients touchés par ce syndrome sont prédisposés à développer des CCR mais également d'autres cancers touchant l'endomètre, les ovaires ou encore les voies biliaires.

b. Antécédents personnels ou antécédents familiaux

Chez un individu ayant un antécédent familial de CCR, le risque de cancer est accru sans que des facteurs génétiques soient toujours identifiés. Ce risque augmente avec le nombre d'apparentés atteints, le degré de parenté avec la ou les personnes atteintes ainsi que leur âge lors du diagnostic. Ainsi, les personnes i) ayant un antécédent personnel de CCR ou d'un (ou plusieurs) adénome (s), ii) présentant un parent au 1^{er} degré ayant été atteint d'un CCR ou d'un adénome de plus de 1 cm de diamètre avant 65 ans, ou iii) ayant deux parents au premier degré qui ont été atteints de ce type de cancer et ceci quel que soit leur âge au moment du diagnostic, présentent 4 à 10 fois plus de risques de développer un CCR que les personnes à risque moyen.

c. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les CCR associés aux maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) représentent 0,5% des CCR diagnostiqués (Beaugerie et al., 2013). Les MICI, auxquelles appartient la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), augmentent le risque de développer un CCR de 1,5 à 3 fois chez les patients ayant des antécédents de RCH et de MC ; toutefois, la valeur exacte du risque peut varier selon les études, les périodes et les facteurs de risque individuels (Sato et al., 2023). L'augmentation du risque est liée notamment à l'âge au début de la maladie, à la durée d'évolution de la maladie (le risque devenant plus important après 10 ans d'évolution) ou encore à l'étendue des lésions montrant le rôle de l'inflammation chronique dans le développement de ces CCR (Eaden, 2001; Murthy et al., 2021).

d. Age et sexe.

Le CCR est caractérisé par une **prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,25** (Globocan, 2022). Cette différence reste incertaine mais elle pourrait être liée à des différences hormonales ou à des modes de vie différents entre les hommes et les femmes. L'âge est également un facteur de risque important du CCR. Si avant 40 ans les CCR sont relativement rares, le **risque de développer un CCR augmente à partir de 50 ans** et s'accroît jusqu'à 80 ans. Ainsi, 94 % des cancers colorectaux se manifestent chez les personnes de plus de 50 ans. De manière générale, l'incidence du cancer augmente avec l'âge et le vieillissement peut être considéré à la fois par rapport à l'individu mais également par rapport à l'échelle cellulaire. Cependant, la proportion de patients diagnostiqués avec un CCR avant l'âge de 50 ans a constamment augmenté au cours de la dernière décennie (Boardman et al., 2020). De plus, des études épidémiologiques prédisent une augmentation de 27,7 % des diagnostics précoces de cancer du côlon d'ici 2030 (Mauri et al., 2019).

e. Facteurs environnementaux

Facteurs de risques nutritionnels

La **consommation chronique d'alcool** est reconnue comme étant un **facteur de risque pour le développement du CCR**. Cette constatation est basée sur des preuves de consommation supérieure à 30 g par jour ce qui équivaut à environ deux verres par jour. En

effet, le risque de CCR est augmenté de 23 % pour les consommateurs de 30 g d'alcool par jour et de 41 % pour 45 g d'alcool par jour par rapport aux non buveurs (Cho, 2004). Les mécanismes impliqueraient soit un effet mutagène de l'acétaldéhyde, soit un effet de l'alcool sur le métabolisme des folates (Giovannucci, 2004).

De nombreux rapports ont établi un lien entre la **consommation de viandes rouges ou de viandes transformées (incluant la charcuterie) et le risque de développer un CCR**. En 2015, le CIRC a ainsi classé la consommation de viandes transformées comme cancérigène pour l'homme (Groupe 1) et la consommation de viandes rouges comme probablement cancérigène pour l'homme (Groupe 2A) (IARC, 2015). En 2018, le CIRC a publié une monographie où le niveau de preuve de l'augmentation du risque de CCR était convaincant pour la consommation de charcuteries et probable pour la consommation de viandes rouges (IARC, 2018). Les mécanismes mis en jeu pourraient être liés à un excès de fer héminique, qui générerait un stress oxydant au niveau des lipides induisant la formation de composés génotoxiques, mais également à la présence de composés N-nitrosés venant des sels nitrités utilisés pour la conservation ou encore des amines hétérocycliques aromatiques cancérigènes ou des HAP formés lors de la cuisson excessive. La consommation quotidienne de 50 g de viande transformée augmenterait ainsi le risque de CCR de 18%.

Le surpoids et l'obésité sont également considérés comme des facteurs favorisant le développement du CCR. En effet, il a été montré que l'indice de masse corporel (IMC) était corrélé positivement au risque de CCR. Ainsi, à partir d'un IMC supérieur à 25 kg/m² (surpoids), ce dernier augmenterait régulièrement (Kyrgiou et al., 2017). Les individus présentant un IMC > 30 kg/m² (obésité) aurait un pourcentage d'augmentation du risque de CCR estimé à 41% par rapport aux individus ayant un IMC inférieur à 23 kg/m² (Ma et al., 2013 ; Dong et al, 2017 ; Liu et al, 2019a). Le pourcentage d'augmentation du risque de CCR a été estimé à 20-30 % chez l'homme et à 10% chez la femme pour une augmentation de l'IMC de 5 kg/m². L'augmentation du risque de CCR chez les personnes obèses serait notamment liée au tissu graisseux viscéral dont la physiologie anormale se traduirait par une insulino-résistance, une sécrétion élevée de cytokines pro-inflammatoires et de certaines adipokines (Van Kruijsdijk et al., 2009).

Facteurs de risque liés au mode de vie

La **sédentarité**, qui correspond au fait de passer plus de 8h en position assise ou allongée

dans la journée, **et l'insuffisance d'activité physique**, qui est caractérisée par une pratique inférieure à 30 minutes par jour, contribueraient à augmenter le risque de CCR. A l'inverse, les individus pratiquant une activité physique régulière pourraient ainsi réduire de 24% le risque de développer un CCR (Wolin et al., 2009). Cet effet bénéfique semblerait être lié à l'accélération du transit intestinal réduisant alors l'exposition de la muqueuse digestive aux cancérogènes d'origine alimentaire et également à la diminution du risque de prise de surpoids et d'obésité qui sont eux-mêmes des facteurs de risque du CCR.

Le **tabagisme** augmente d'environ 15-20% le risque de développer un CCR chez les fumeurs, à la fois chez les hommes et chez les femmes (Botteri et al., 2020). Ce dernier augmente en fonction du nombre d'années de tabagisme et du nombre de cigarettes fumées par jour. Par exemple, le risque de CCR est augmenté de 25 à 30 % chez les personnes fumant 40 cigarettes par jour ou chez ceux qui fument depuis 50-60 ans (Liang et al., 2009; Botteri et al., 2020; Amitay et al., 2020).

Facteurs de risque liés à la qualité de l'environnement

Même si cela n'a pas encore été clairement établie et que les observations faites découlent de corrélations, la **pollution de l'air, pourrait jouer un rôle dans le développement du CCR**. Ainsi, des risques élevés de CCR ont été observés chez des sujets ayant été exposés à des concentrations élevées en émission de diesel en comparaison à des individus non exposés (Kachuri et al., 2016). Des méta-analyses d'étude épidémiologiques ont notamment mis en évidence une association entre les particules fines de diamètre inférieur à 2,5 µm (PM_{2.5}) et le CCR (Pritchett et al., 2022). Une exposition chronique au dioxyde d'azote (NO₂) semblerait également être associée au risque de développer un CCR (Wei et al., 2023).

La prévention du cancer repose sur l'identification de ses causes. Au regard des différents facteurs précédemment décrits, c'est-à-dire les facteurs liés à la génétique, à la nutrition, au mode de vie ou encore à la qualité de l'environnement, il est clairement établi que le CCR présente une étiologie multifactorielle. Ces facteurs nutritionnels et/ou environnementaux peuvent agir directement sur l'épithélium mais pourraient agir *via* un autre acteur prépondérant de l'homéostasie intestinale : le **microbiote intestinal**.

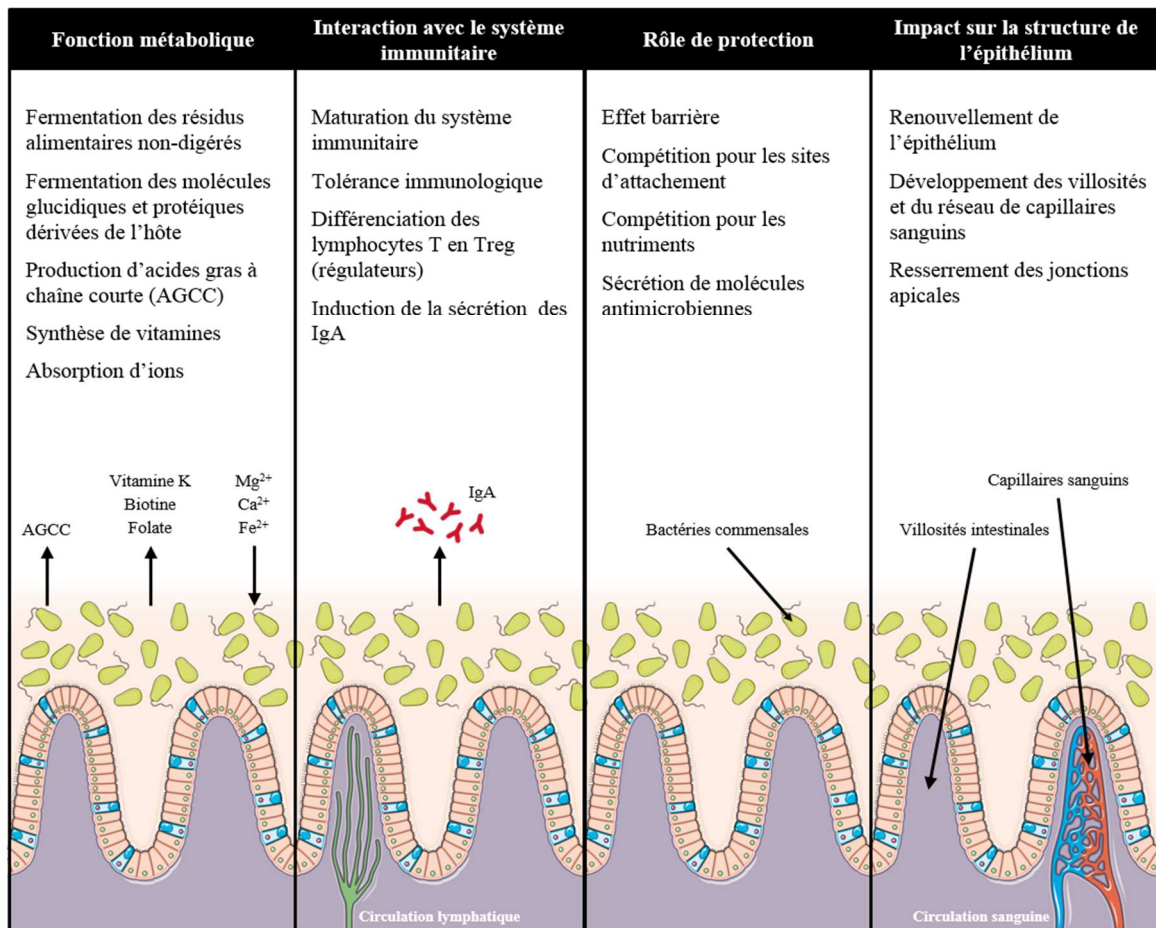


Figure 26. Les fonctions du microbiote intestinal. Les bactéries commensales exercent un panel varié d'effets métaboliques, immunologiques, protecteurs et structuraux sur l'épithélium intestinal (Modifié d'après O'Hara and Shanahan, 2006).

II. MICROBIOTE INTESTINAL ET CARCINOGENESE COLIQUE

1. Fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est l'ensemble des microorganismes qui colonisent le système digestif. Chez l'Homme, celui-ci est composé principalement de bactéries et de virus (principalement des bactériophages), les *Archaea* et les champignons n'en représentant qu'une fraction minoritaire (Lozupone et al., 2012). Environ 10^{11} bactéries/mL et 10^9 virus/g de fèces sont ainsi retrouvés au niveau du tractus gastro-intestinal (Sender et al., 2016; Liang et Bushman, 2021). Considéré aujourd'hui comme un organe à part entière du corps humain, le microbiote intestinal assure de nombreuses fonctions essentielles à la santé de son hôte et au maintien de l'homéostasie du tractus gastro-intestinal (Figure 26). Il assure ainsi des i) **fonctions métaboliques** en participant à la digestion des nutriments, à la dégradation et à la fermentation des résidus alimentaires non digestibles (ce qui aboutit à la production de métabolites assimilables par l'hôte tels que des acides gras à chaîne courte (AGCC) ou encore des vitamines servant ensuite de source d'énergie) (Bernalier-Donadille, 2010), ii) des **fonctions immunologiques** avec sa participation au développement et à la maturation du système immunitaire ; en effet les animaux axéniques présentent notamment un défaut de développement des structures lymphoïdes associées à l'intestin ou encore une réduction du niveau d'immunoglobuline A (IgA) sécrétée (Sekirov et al., 2010), iii) des **fonctions structurales** en contribuant au développement et à la maturation de l'épithélium intestinal en facilitant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et l'angiogenèse dans la muqueuse (Natividad et Verdu, 2013), ou encore iv) des **fonctions de barrière et de protection** pour lutter contre la colonisation de microorganismes pathogènes *via* le resserrement des jonctions serrées au niveau de l'épithélium intestinal, la compétition pour les sites d'attachement épithéliaux et pour la disponibilité des nutriments mais également la production de bactériocines et la stimulation de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (O'Hara and Shanahan, 2006; Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010).

2. Composante bactérienne du microbiote intestinal

Chaque segment du tractus gastro-intestinal (estomac, intestin, colon, rectum) exerce une fonction spécifique qui induit des caractéristiques physico-chimiques différentes aboutissant à la création de niches écologiques variées pouvant héberger des populations

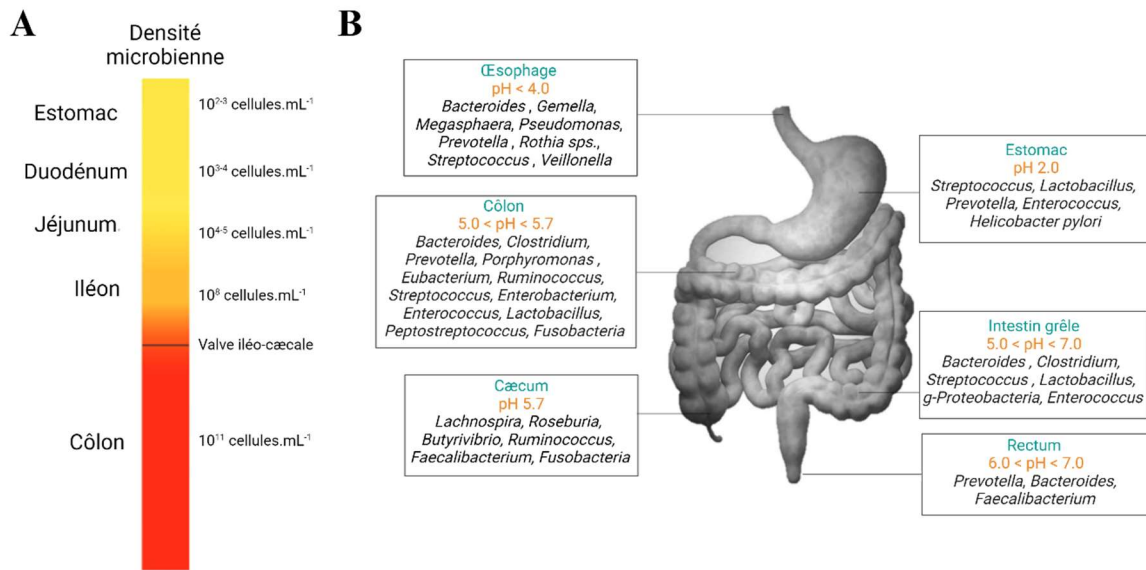


Figure 27. Distribution de la densité et de la composition bactérienne selon les différents compartiments du tractus digestif. A : Le gradient croissant de densité bactérienne le long du tube digestif peut être mis en relation avec l'évolution de son pH, ce dernier participant aux caractéristiques des niches écologiques (modifiée d'après Walter et Ley, 2011). B : Les principaux genres et espèces du microbiote de l'œsophage au côlon (modifiée d'après Jandhyala et al., 2015).

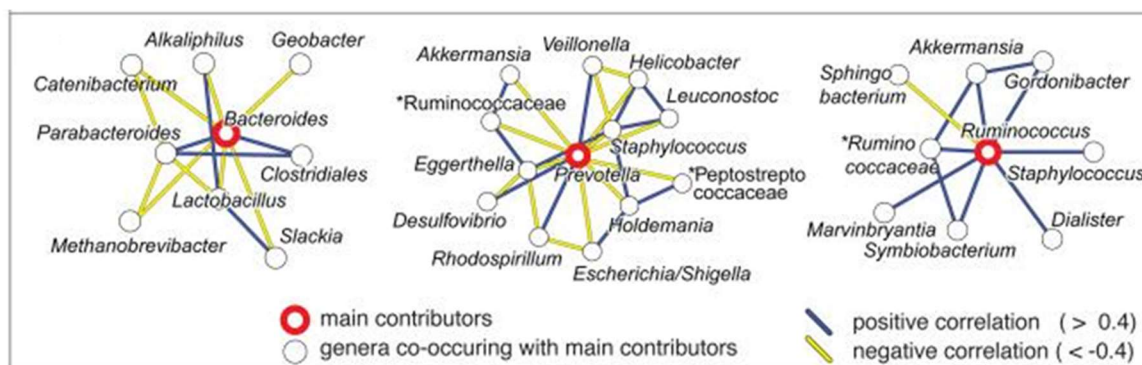


Figure 28. Réseaux de cooccurrence des trois entérotypes issus de plusieurs métagénomes humains. Les principaux contributeurs à chacun de ces entérotypes sont représentés en rouge (Arumugan et al., 2011).

microbiennes différentes. Le microbiote intestinal est largement étudié. Cependant, parmi les bactéries et les virus qui représentent la composante majeure de celui-ci, seules les communautés bactériennes sont largement explorées. Ainsi, un gradient croissant longitudinal (oro-anal) est observé aussi bien en termes de densité qu'en terme de composition des populations bactériennes le long du système digestif (Figure 27). Le **côlon est ainsi le compartiment le plus densément peuplé** avec 10^{11} bactéries/mL mais également **le plus diversifié** avec de nombreux genres bactériens tels que *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* ou encore *Lactobacillus*.

Les travaux qui se sont attachés à étudier le microbiote intestinal aussi bien en termes de richesse, de diversité ou de composition ont été majoritairement menés à partir d'échantillons de selles, ces derniers étant les plus faciles à collecter. Il est actuellement admis que la composition du microbiote fécal reflète celle du microbiote luminal au niveau du côlon distal. Parmi les populations bactériennes identifiées au sein du microbiote fécal, **90% appartiennent à deux phyla : les Bacillota et les Bacteroidota** (Qin et al., 2010). D'autres phyla bactériens minoritaires sont également détectés tels que les Proteobacteria, les Fusobacteriota, les Actinobacteriota ou encore les Verrucomicrobiota. Cette forte conservation du microbiote intestinal au niveau du phylum, avec moins d'une dizaine de phyla représentés, indiquerait l'existence d'une forte pression de sélection au sein de l'environnement intestinal. Cependant, si les bactéries fécales appartiennent à un nombre restreint de phyla, une richesse et une diversité importantes sont observées au niveau des espèces et des souches. De plus, des variations considérables dans la composition de ce microbiote ont été décrites entre les individus aussi bien dans le cadre du « Human Microbiome Project » (HMP) du NIH (Human Microbiome Project Consortium, 2012), du projet européen « Metagenomics of the Human Intestinal Tract » (MetaHIT) (Qin et al., 2010; Le Chatelier et al., 2013) que de nombreuses autres études de populations (e.g. Falony et al., 2016). Malgré cette forte variabilité, il a cependant été mis en évidence, et ceci indépendamment du sexe, du pays ou du continent, l'existence de trois entérotypes ou trois groupes distincts dirigés chacun par un genre discriminant : *Bacteroides* (entérotype 1), *Prevotella* (entérotype 2) et *Ruminococcus* (entérotype 3) (Figure 28) (Arumugam et al., 2011). Des changements dans les entérotypes ont toutefois été observés sur une année pour 45% des personnes d'une cohorte suédoise (Olsson et al., 2022). Les entérotypes reflètent ainsi probablement la variation du régime alimentaire, du temps de transit et de la consistance des selles dans les populations normales. Plus récemment, Frioux et al. (2023), ont établi un modèle à base de 5 entéro-signatures (*Bacteroides*, Bacillota, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*) qui permet d'identifier des

changements préjudiciables dans la composition du microbiote intestinal et de fournir des hypothèses sur ces modifications.

Le microbiote intestinal présente également **un gradient axial en raison notamment de la présence de mucus et d'un gradient en oxygène**. Différents types de microbiote associé à la muqueuse colique vont pouvoir alors être mis en évidence en fonction de leur localisation spécifique. On parlera alors de microbiote associé au mucus (externe et interne), à l'épithélium et aux cryptes. Un gradient décroissant en oxygène étant observé de la surface de l'épithélium à la lumière intestinale, seuls des taxa aéro-anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts sont retrouvés au niveau de cette dernière (Espey, 2013). Ainsi, la région luminale serait principalement colonisée par les familles *Bacteroidaceae*, *Enterococcaceae* et *Lactobacillaceae* alors que la muqueuse colique de souris serait enrichie en *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* (Nava et al., 2011). La couche de mucus retrouvée au niveau de l'épithélium intestinal peut servir de barrière pour protéger l'épithélium sous-jacent de la fixation d'agents pathogènes mais également de source de nutriments pour les bactéries commensales. Ainsi, elle va former une niche écologique particulière qui va pouvoir être colonisée par des genres bactériens pouvant être différents de ceux retrouvés au niveau du microbiote fécal tels que des taxa mucolytiques comme *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al., 2004).

Les communautés bactériennes associées à la muqueuse intestinale colique, de par leur proximité avec l'épithélium sous-jacent, joueraient un rôle notamment dans les échanges d'éléments nutritifs et l'induction du système immunitaire inné de l'hôte (Sonnenburg et al., 2004). Il semble par conséquent plus pertinent d'étudier le microbiote associé à la muqueuse colique que le microbiote fécal. Cependant la richesse et la diversité de celui-ci sont moins explorées que celles du microbiote fécal. En effet, l'échantillonnage des communautés bactériennes associées à la muqueuse, par macrobiopsie du tissu intestinal, est un acte invasif et donc plus difficile à mettre en œuvre qu'une collecte de fèces, en particulier chez des donneurs sains.

3. Microbiote intestinal et cancer colorectal

Comme il a été décrit précédemment, le microbiote intestinal, de par les nombreuses fonctions qu'il remplit, joue un rôle primordial dans l'homéostasie du tractus digestif et plus

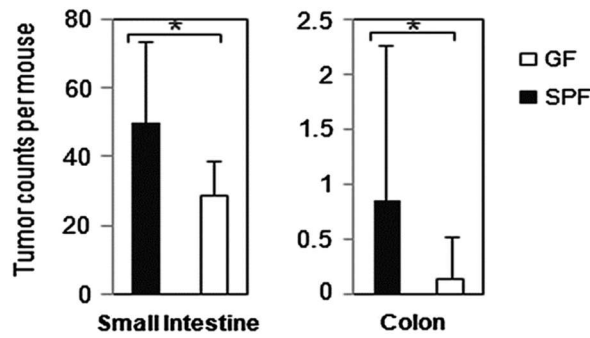


Figure 29. La charge tumorale des souris APC^{Min/+} est régulée par la présence du microbiote intestinal. La croissance tumorale est réduite chez les souris APC^{Min/+} axéniques. Les barres d'erreur représentent la déviation standard. Le niveau de signification de $p < 0,05$ (test de somme des rangs de Wilcoxon) est indiqué par un astérisque (Li et al., 2012).

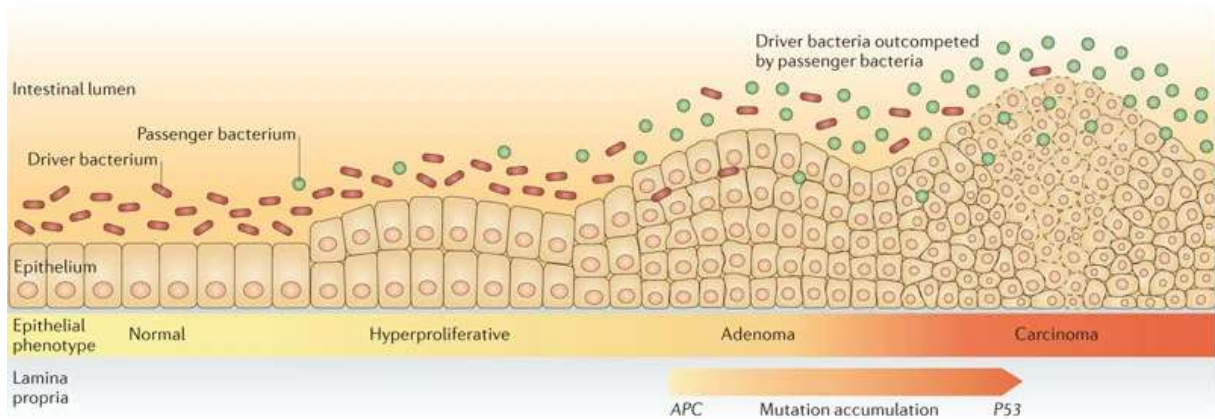


Figure 30. Modèle Driver-passenger pour le cancer colorectal. La muqueuse colique des patients présentant un risque de cancer colorectal (CCR) est colonisée par des membres pathogènes du genre *Bacteroides* (tels que *Bacteroides fragilis* entérotoxigène (ETBF)) ou de la famille des *Enterobacteriaceae* ou par d'autres bactéries qui peuvent jouer le rôle de "moteurs" du CCR ; ces moteurs peuvent provoquer une inflammation, une prolifération cellulaire accrue et/ou la production de substances génotoxiques qui contribuent à l'accumulation de mutations au cours de la séquence adénome-carcinome. Comme l'ont suggéré Fearon et Vogelstein, la séquence de mutations commence dans le gène *APC*, provoquant la transition vers un adénome, et se termine par une mutation de *P53* qui provoque la transition vers un carcinome. Le processus oncogène s'accompagne d'une rupture et d'une hémorragie du tissu cancéreux, ce qui modifie le microenvironnement et la pression sélective sur le microbiote local. Ces changements facilitent le remplacement progressif des bactéries pilotes par des "passagers", c'est-à-dire des pathogènes opportunistes (*Fusobacterium* ou *Streptococcus* spp.), des bactéries commensales ou d'autres bactéries ayant un avantage concurrentiel dans la niche tumorale (Tjalsma et al., 2012).

globalement dans celle de son organisme hôte. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des **perturbations de ce microbiote intestinal, appelées dysbioses, associées à un état pathologique et notamment au CCR**. Il a, par ailleurs, été mis en évidence que des souris axéniques colonisées par le microbiote de souris développant des CCR (modèle d'induction chimique AOM/DSS) présentaient un nombre de tumeurs plus important que des souris axéniques colonisées par le microbiote de souris conventionnelles suggérant ainsi qu'un microbiote dysbiotique était capable de favoriser la carcinogenèse colorectale (Zackular et al., 2013). De même, la charge tumorale des souris APC^{Min/+} semble être régulée par la présence des populations microbiennes intestinales puisque le nombre de tumeurs est significativement réduit chez des souris APC^{Min/+} axéniques en comparaison à des souris APC^{Min/+} non axéniques (Figure 29) (Li et al., 2012). Les bactéries pourraient être impliquées dans la carcinogénèse colique selon le modèle « Driver-passengers » proposé par Tjalsma et al. (2012) (Figure 30). Dans un premier temps, certaines bactéries commensales définies comme « drivers » seraient initiatrices du développement du CCR en induisant des dommages à l'ADN des cellules épithéliales. Les altérations du microenvironnement intestinal conduiraient alors au remplacement de ces bactéries par d'autres populations dites « passagers » qui, elles, seraient promotrices de la carcinogénèse colique.

Le microbiote intestinal semble donc être particulièrement important dans le développement de la carcinogénèse colique et il est apparemment primordial de caractériser ces dysbioses. Des études focalisées sur la composante bactérienne utilisant le séquençage à haut débit du gène codant pour l'ARNr 16S bactérien et la métagénomique ont ainsi mis en évidence des **modifications de la richesse, de la diversité et de la composition bactérienne chez les patients atteints de CCR** par rapport aux individus sains. Cependant, des résultats divergents peuvent apparaître selon les études réalisées en raison des différents paramètres biologiques (l'âge de l'individu ; les stades de la maladie ; le type d'échantillon i.e. échantillons de selles, de muqueuse ou de tumeur ; la localisation du tissu prélevé i.e. prélèvement effectué au niveau du colon droit, du colon gauche ou au niveau du rectum), environnementaux (alimentation, sédentarité...) ou des approches techniques ou méthodologiques utilisées (le type de procédures d'extraction d'ADN ; l'approche moléculaire utilisée : métagénomique, séquençage de l'ADNr 16S ; les régions de l'ADNr 16S ciblées, les bases de données de l'ADNr 16S utilisées pour réaliser les affiliations). Ainsi, selon les études, la richesse spécifique (évaluée par le nombre d'OTUs observés, l'estimateur de couverture basé sur l'abondance ou les indices de Chao) ou la diversité des communautés (valeurs de Shannon et de Simpson) sont réduites (Chen et al., 2012;

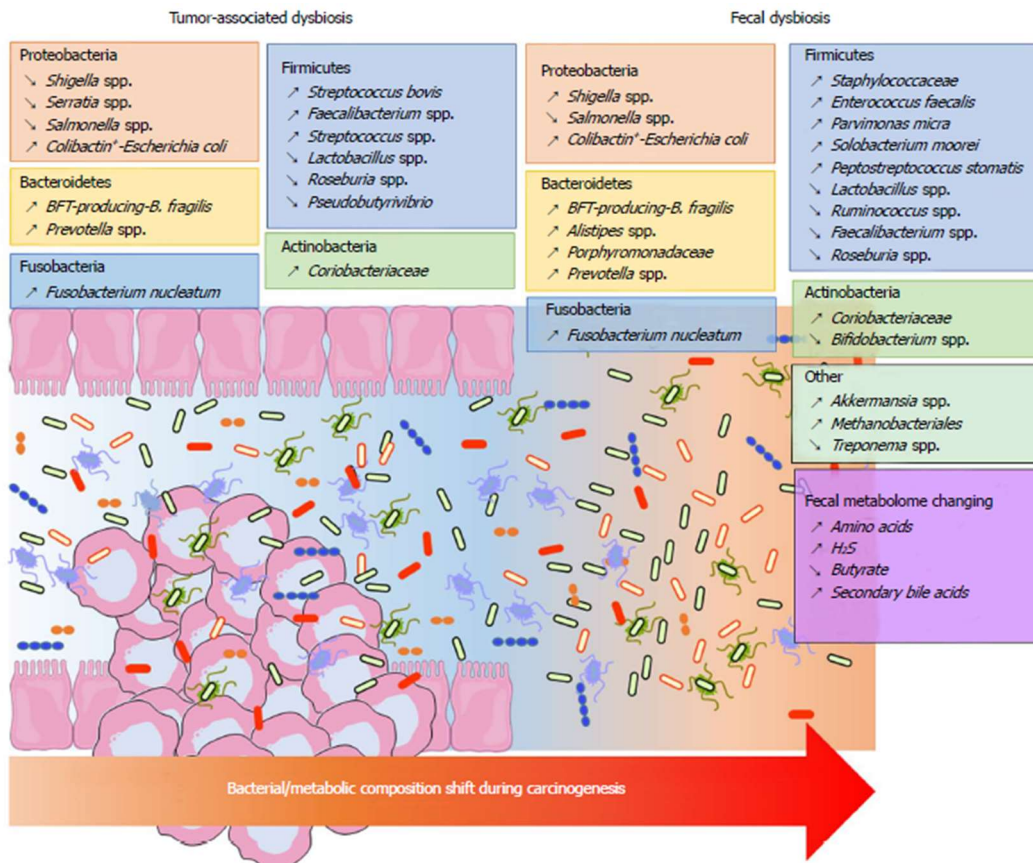


Figure 31. Changement de la composition bactérienne et des métabolites au cours de la carcinogénèse colique (Villéger et al., 2018).

Liu et al., 2020), augmentées (Burns et al., 2015; Lu et al., 2016) ou inchangées (Zhong et al., 2022; Alexander et al., 2023) en comparaison à celles des sujets sains. En ce qui concerne la CCB, **les phyla Bacteroidota (anciennement Bacteroidetes) et Bacillota (anciennement Firmicutes) apparaissent comme dominant la structure de la communauté bactérienne des différents types d'échantillons de CCR** suivis par les Pseudomonadota (anciennement Proteobacteria), Actinobacteriota, Fusobacteriota et Verrucomicrobiota (Kneis et al., 2023; Russo et al., 2023). Cependant des **différences** sont observées en termes **d'abondance et de populations bactériennes à une échelle phylogénétique plus fine entre les échantillons de selles, de muqueuse (côlon droit et gauche) ou de tumeurs**. Des études ont également révélé une augmentation en certains taxa bactériens chez les patients atteints de CCR et notamment en *Streptococcus gallolyticus* (anciennement connu sous le nom de *Streptococcus bovis*), *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium septicum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Dialister* ou encore *Intestimonas* (Balamurugan et al., 2008; Chen et al., 2013; Thomas et al., 2019; Yachida et al., 2019; Okumura et al., 2021; Péricchon et al., 2022; Kneis et al., 2023; Kong et al., 2023; Wang et Fang, 2023) en parallèle d'un appauvrissement en espèces bactériennes commensales considérées comme bénéfiques (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Ruminococcus*) (Mangifesta et al., 2018) (Figure 31). Plus précisément, il a été démontré que certaines espèces bactériennes spécifiques sont connues pour être des pathobiontes associés au CCR, comme *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* entérotoxigène (ETBF) ou encore les ***E. coli* productrices de colibactine également appelées CoPEC** (Bonnet et al., 2014; Gagnière, 2016; Cheng et al., 2020; Liu et al., 2020; Dougherty et Jobin, 2023; Wang et Fang, 2023).

4. *Escherichia coli* productrice de colibactine et cancer colorectal

Les bactéries *E. coli* sont des bacilles à paroi Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, qui appartiennent au phylum des Pseudomonadota (Proteobacteria) et à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles colonisent le microbiote intestinal humain dès la naissance et ne représentant qu'environ 0,1% de celui-ci à l'âge adulte (Eckburg et al., 2005). En raison d'une forte plasticité génomique, **certaines souches de cette espèce sont capables d'acquérir des propriétés physiologiques et de virulence leur permettant de s'adapter à différentes niches écologiques** (Hacker et Kaper, 2000; Dobrindt et Hacker, 2001). Plusieurs phylogroupes ont ainsi été identifiés, chacun présentant des caractéristiques distinctes, notamment en termes des

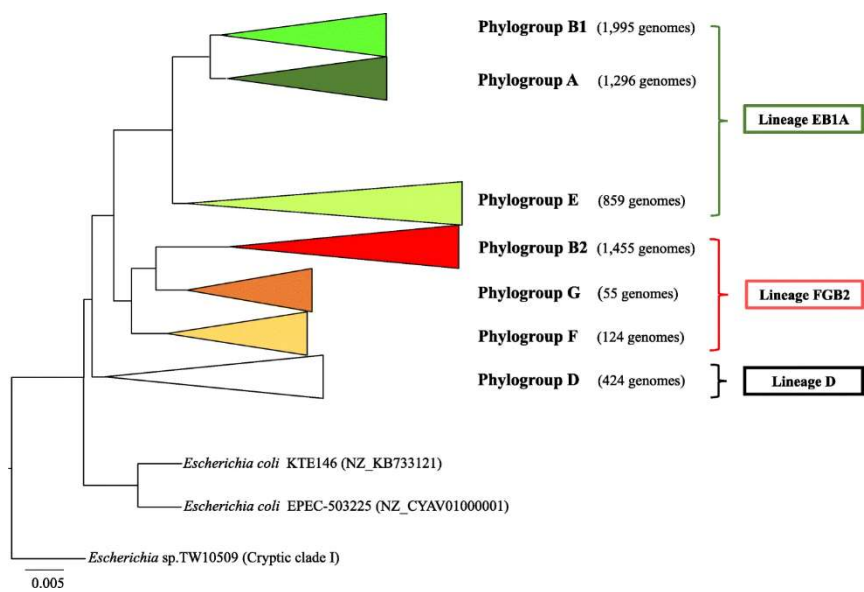


Figure 32. Reconstruction phylogénétique des souches d'*Escherichia coli*. Le phylogroupe C établi n'a pas pu être distingué dans le phylogroupe B1. Le clade cryptique I a été inclus en tant qu'outgroup dans la reconstruction (Gonzales-Alba et al., 2019).

facteurs de virulence, de spécificité d'hôte et de prévalence dans différents environnements (Figure 32). Le phylogroupe B2 contient des souches ayant de plus grandes capacités d'adhésion aux cellules intestinales et d'invasion, ce qui peut être associé à la colonisation des tissus tumoraux dans les cas de CCR, mais également des gènes de virulence les rendant plus susceptibles de provoquer des dommages cellulaires et une inflammation chronique. Parmi les facteurs de virulence acquis par les *E. coli*, la capacité à produire des toxines jouerait un rôle majeur dans le potentiel carcinogène de certaines souches. Ces toxines interféreraient avec le fonctionnement normal de la cellule eucaryote en ciblant la prolifération, l'apoptose et la différenciation, tous ces processus étant associés à la carcinogénèse. Certaines de ces toxines, les **cyclomodulines**, sont ainsi **capables d'interagir avec le cycle cellulaire de la cellule hôte** en agissant sur l'ADN soit directement *via* des dommages (toxines CDT et colibactine) soit indirectement *via* les acteurs protéiques du cycle cellulaire (facteurs cif et CNF) (Nougayrède et al., 2005, 2006).

Dans les études de prévalence chez les patients atteints de CCR, la colibactine est la cyclomoduline la plus fréquemment retrouvée (CPEC, Cyclomodulin-producing *E. coli*) et les **souches d'*E. coli* productrices de colibactine sont appelées CoPEC** (Colibactin-producing *E. coli*). En effet, une forte prévalence des CoPEC a été observée dans les tissus des patients atteints de CCR (50-68%) en comparaison à des biopsies de patients sains (20,8%) (Buc et al., 2013; Dejea et al., 2018). Une étude réalisée au sein du laboratoire M2iSH a, de plus, mis en évidence que la prévalence des CoPEC dans la muqueuse intestinale était plus fréquente chez les patients atteints de CCR de stade TNM (Tumor-Node-Metastasis) III/IV que chez ceux atteints de CCR de stade I, suggérant un lien possible avec l'agressivité du cancer (Bonnet et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes (Périchon et al., 2022; De Oliveira Alves et al., 2024). De Oliveira Alves et al. (2024) ont également mis en évidence que les patients atteints d'un cancer au niveau du colon droit et colonisés par des CoPEC présentaient une survie globale plus faible à des stades TNM III/IV. Cependant, dans d'autres études la survie ne semble pas être altérée (Arima et al., 2022; Miyasaka et al., 2024). Une détection des CoPEC à des stades précoces de la carcinogénèse colique a également été mise en évidence et suggère ainsi un rôle de ces dernières aux premières étapes de la carcinogénèse (Viljoen et al., 2015; Nakatsu et al., 2018; Miyasaka et al., 2024). Les souches CoPEC sont porteuses de l'îlot de pathogénicité de la polykétide synthase (îlot *pks*) qui code pour une chaîne d'assemblage conduisant entre autres à la production de la colibactine. Cette dernière induit des alkylations puis des cassures double-brin de l'ADN dans les cellules épithéliales, un stress oxydant (Nougayrède et al., 2006; Cuevas-Ramos et al., 2010; Wilson et al., 2019), ainsi que

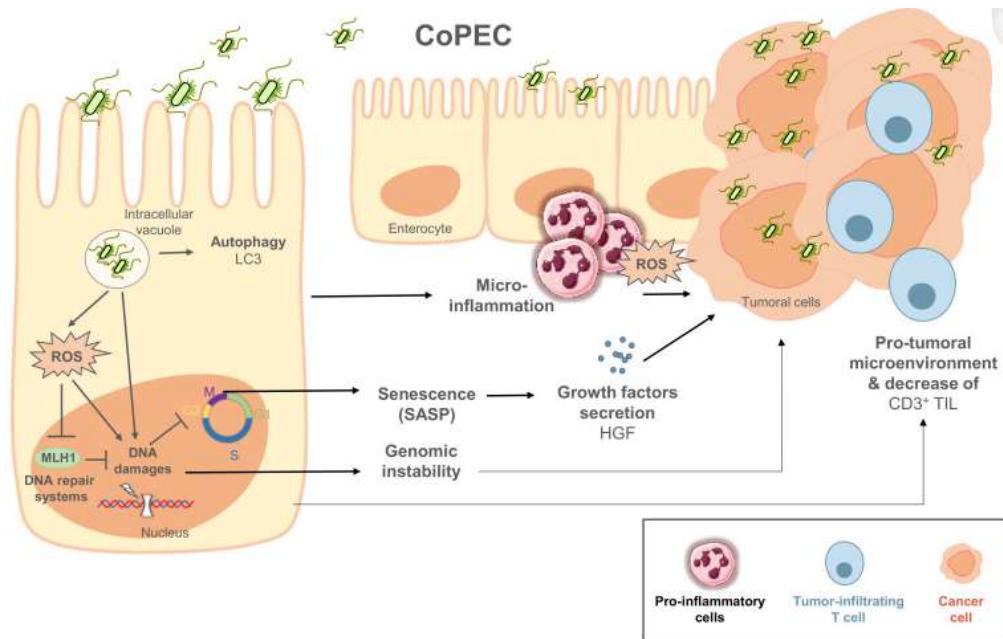


Figure 33. Activités pro-carcinogènes des CoPEC au sein de la muqueuse colique. L'échappement des CoPEC à l'autophagie dans les cellules épithéliales infectées pourrait conduire la colibactine à alkyler l'ADN, puis à causer des dommages à l'ADN et ensuite un arrêt du cycle cellulaire. En outre, les CoPEC induisent un stress oxydant cellulaire, ce qui entraîne l'inhibition de la protéine de réparation de l'ADN MLH1. Tous ces mécanismes participent à l'instabilité génomique des cellules épithéliales infectées. De plus, les CoPEC induisent la sénescence des cellules épithéliales infectées, accompagnée de la sécrétion de médiateurs inflammatoires et de la croissance, favorisant la prolifération des cellules adjacentes non infectées. Ils pourraient également affecter le microenvironnement immunitaire de la tumeur, même à distance du site tumoral, par le biais de la réduction des lymphocytes T CD3⁺ infiltrant la tumeur (Veziat et al., 2021).

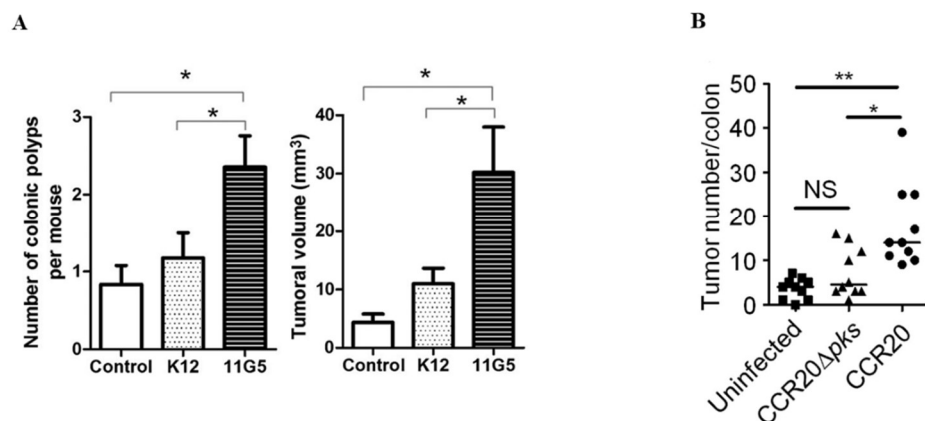


Figure 34. CoPEC et promotion du cancer colorectal. A : La souche 11G5 d'*E. coli* associée au cancer du côlon persiste dans les cellules épithéliales intestinales et stimule le développement de tumeurs du côlon chez les souris APC^{Min/+}. Nombre et volume des tumeurs coliques visibles chez les souris infectées par la souche 11G5 d'*E. coli* associée au cancer du côlon, la souche K12-commensale d'*E. coli* ou gavées avec le PBS (contrôle) *, $p < 0,05$ (Bonnet et al., 2014). B : La souche clinique *E. coli* pks⁺ (CCR20) favorise la tumorigénèse dans un modèle de souris AOM/DSS au regard du nombre augmenté de tumeurs par souris à la fin du protocole AOM/DSS ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS, non significatif (Cougnoux et al, 2014).

des altérations moléculaires retrouvées dans les tumeurs CCR chez l'Homme (Dziubańska-Kusibab et al., 2020; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020; Iftekhar et al., 2021; Georgeson et al., 2023), suggérant qu'elle peut participer à l'instabilité génomique nécessaire au développement du CCR. Cette action est renforcée de plus par une inactivation du système MMR (Gagnière et al., 2017; Dougherty et al., 2023). Les souches CoPEC sont également capables d'induire une sénescence cellulaire associée à la production de facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance hépatocytaire, ce qui entraîne la prolifération des entérocytes voisins non infectés (Figure 33) (Cougnoux et al., 2014; Dalmaso et al., 2014). Elles peuvent modifier le microenvironnement tumoral en altérant la réponse antitumorale des lymphocytes B (Lopès et al., 2020) et en déséquilibrant le métabolisme lipidique (De Oliveira Alves et al., 2024). Les différents mécanismes d'action des CoPEC sont résumés sur la Figure 33 (Veziat et al., 2021). Les effets pro-carcinogènes des CoPEC pourraient toutefois être limités par l'autophagie (Lucas et al., 2020). En modèle murin, il a été mis en évidence que les CoPEC favorisaient la formation de CCR chez des souris APC^{Min/+} (Bonnet et al., 2014), chez des souris traitées par azoxymethane-dextran sodium sulfate (AOM-DSS) (Cougnoux et al., 2014), chez des souris déficientes en IL10 (IL10^{-/-}) traitées par AOM (Arthur et al., 2012) et chez des souris APC^{Min/+}; IL10^{-/-} (Tomkovich et al., 2017) (Figure 34). L'effet pro-carcinogène des CoPEC a également été montré chez des souris sans susceptibilité génétique mais avec une colite induite au DSS (Salesse et al., 2021). Une augmentation de l'effet pro-carcinogène des CoPEC a de plus été mise en évidence chez les souris présentant un déficit d'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales (Salesse et al., 2021). Dans tous les cas, une susceptibilité de l'hôte (génétique et/ou pro-inflammatoire) est nécessaire pour observer les effets pro-carcinogènes des CoPEC. Récemment, une méta-analyse a montré, par ailleurs, que les patients qui suivent un régime occidental « western diet » présentent un risque significativement plus élevé de CCR lorsqu'ils sont colonisés par des souches CoPEC (Arima et al., 2022). De plus, l'expression de la colibactine serait dépendante de la concentration en oxygène (Bossuet et al., 2023).

Les modifications de la composition et de l'abondance des communautés bactériennes et plus particulièrement de certaines bactéries pathogènes telles que les CoPEC, peuvent être la résultante d'un environnement digestif modifié dû à de nombreux facteurs environnementaux capables d'induire des perturbations. **La qualité de l'environnement**, qui n'est pas clairement établie comme étant un facteur avéré participant à l'initiation, à la promotion de la carcinogénèse colique, **pourrait cependant jouer un rôle essentiel dans le déterminisme du**

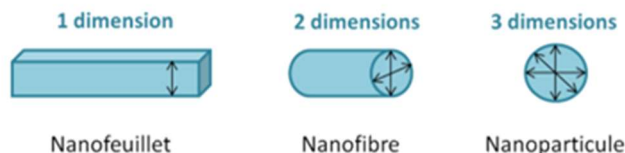


Figure 35. Représentation schématique des différents nano-objets. Selon le nombre de dimension se situant à l'échelle du nanomètre (entre 1 et 100 nm), ici représenté par les flèches, 3 catégories sont définies : le nanofeuillet, la nanofibre et la nanoparticule.

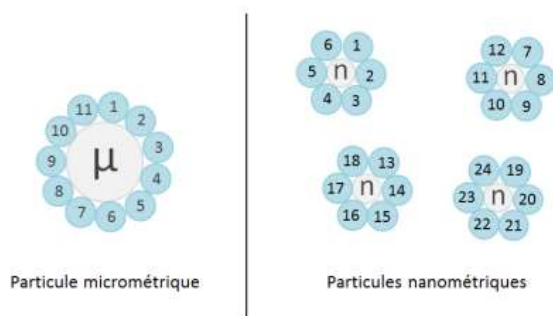


Figure 36. Représentation schématique du potentiel d'interaction des particules micro- et nanométriques. Pour une même masse, la surface externe des nanoparticules de TiO_2 (ν) est plus importante que celle des particules micrométriques (μ). Par conséquent, leur potentiel d'interaction est supérieur, ce qui leur confère des propriétés différentes.

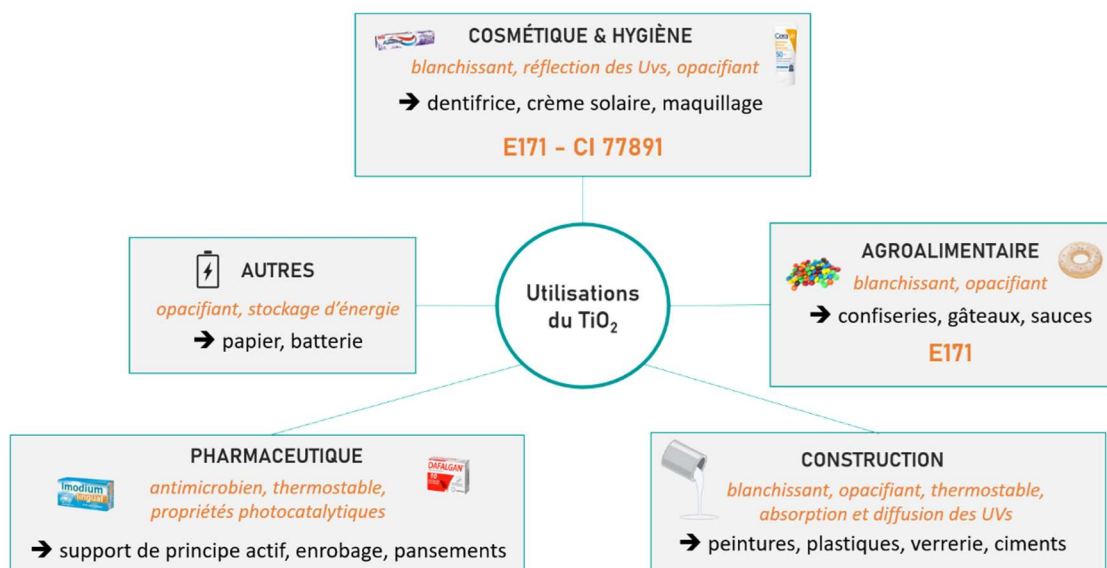


Figure 37. Différents domaines d'utilisation du dioxyde de titane (modifiée d'après Musial et al., 2020).

CCR. La prévalence des souches CoPEC dans cette pathologie pourrait être notamment due à l'exposition de l'environnement digestif à des substances contaminantes telles que les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂).

III. LE DIOXYDE DE TITANE

1. Généralités sur les nanomatériaux et les nanoparticules

En 2011, la Commission Européenne a défini un nanomatériau comme un « matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». Pour des raisons liées notamment à la protection de l'environnement et à la santé publique, le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille peut parfois être remplacé par un seuil compris entre 1 % et 50 % (Loi : 2011/696/UE : JOUE n° L275- 20.10.2011). Au sein des nanomatériaux se trouve la famille des nano-objets, où les nanoparticules (NP) présentent 3 dimensions externes à l'échelle du nanomètre (Figure 35). Ces dernières sont omniprésentes dans l'environnement et leur utilisation repose sur leur petite taille qui leur confère une surface spécifique externe plus grande et donc un potentiel d'interaction plus important que les particules de taille supérieure (Figure 36). De ce fait, **les NP sont susceptibles d'induire des perturbations de l'environnement dans lequel elles sont retrouvées**. Les NP produites par l'Homme sont appelées nanomatériaux manufacturés et le TiO₂ correspondent aux NP les plus abondantes.

2. Le dioxyde de titane

À l'état naturel, le TiO₂ existe sous 3 formes cristallines : rutile, brookite et anatase, cette dernière étant la forme majoritairement retrouvée dans les produits du quotidien. Le TiO₂ est utilisé sous forme de poudre blanche, composée de micro et de nanoparticules. Il est retrouvé dans les industries de la construction (peintures, fabrication de ciments et de verres), de la pharmaceutique (galénique), de la cosmétique (protection solaire, dentifrice) ou encore de l'agroalimentaire (confiseries, pâtisserie) notamment en raison de ses propriétés blanchissantes, opacifiantes et de ses capacités d'absorption des rayons ultra-violets (Figure 37) (Musial et al., 2020). Dans les produits de consommation courante, le TiO₂ est retrouvé sous la dénomination

CI 77891 ou E171. L'E171 est un additif alimentaire qui comporte une proportion variable en NP : entre 6 et 55 % par rapport au nombre de particules totales (Saisine n° 2019-SA-0036, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)). Au cours de la dernière décennie, la présence d'E171 a été quantifiée dans de nombreux produits alimentaires (Weir et al., 2012; Peters et al., 2014; Lim et al., 2018). Les confiseries, pâtisseries ou encore les sauces figurent parmi les catégories d'aliments présentant le taux le plus élevé de E171. La quantité moyenne de particules de TiO₂ ingérées par individu est difficile à évaluer en raison des différences d'habitude alimentaire mais également d'âge. L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) estime cependant que l'exposition quotidienne au TiO₂ varierait d'une moyenne de 0,4 mg.kg⁻¹ de poids corporel (PC) chez les personnes de plus de 65 ans à une moyenne de 10,4 mg.kg⁻¹ de PC chez les jeunes enfants (EFSA, 2021).

3. Le dioxyde de titane, un potentiel carcinogène au niveau intestinal ?

a. Toxicité du TiO₂, système digestif et carcinogénèse colorectale

Le TiO₂ peut se retrouver au niveau du tractus gastrointestinal par ingestion mais également par le phénomène de clairance mucociliaire après inhalation. Bien que les études de biodisponibilité orale aient montré une absorption systémique limitée du TiO₂ (de 0,1 à 0,6 % de la dose initiale) (Jones et al., 2015), une teneur élevée en NP de TiO₂ a été observée chez l'Homme dans le foie et la rate (Heringa et al., 2018). Des particules de TiO₂ ont également été observées au niveau des plaques de Peyer d'enfants suspectés d'avoir une MICI (Hummel et al., 2014) ou au niveau du pancréas de patients atteints de diabète de type 2 (Heller et al., 2019). En modèle *in vivo*, il a été montré que la TiO₂ pouvait s'accumuler dans le foie, la rate, l'intestin (Wang et al., 2007; Chen et al., 2009; Onishchenko et al., 2012; Talamini et al., 2019; Akagi et al., 2023; Cai et al., 2023), les agrégats lymphoïdes et les plaques de Peyer de personnes atteintes ou non de pathologies chroniques digestives (Powell et al., 1996; Brun et al., 2014).

Des travaux visant à évaluer la toxicité du TiO₂ *in vitro* (sur des cellules épithéliales intestinales (CEI)) mais également *in vivo* ont montré que ce dernier, que ce soit sous forme nanoparticulaire ou sous forme d'E171, entraînait une augmentation des marqueurs de l'inflammation (Nogueira, 2012; Dorier et al., 2019; Pedata et al., 2019; Pinget et al., 2019; Yan et al., 2020), des dommages à l'ADN (Li et al., 2010) ou encore un stress oxydant (Kang

et al., 2008). Les NP de TiO₂ sont en effet susceptibles de s'accumuler au niveau de l'intestin. Le TiO₂ peut traverser la barrière intestinale (Coméra et al., 2020) et induire une augmentation de la perméabilité intestinale (Rodríguez-Ibarra et al., 2024) et une toxicité *via* la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la génotoxicité (Gerloff et al., 2012; Shi et al., 2013; Dorier et al., 2017; Proquin et al., 2017; Charles et al., 2018; Dorier et al., 2019; Vieira et al., 2022; Vignard et al., 2023), altérant alors l'homéostasie immunitaire intestinale et systémique (Bettini et al., 2017). Des travaux *in vivo*, ont par ailleurs, montré que l'E171 était capable d'induire une modification de l'expression de certains gènes potentiellement liés aux processus tumoraux au niveau du côlon chez des souris (Proquin et al., 2018), d'accélérer la transformation néoplasique dans un modèle de cancer associé à la colite (Urrutia-Ortega et al., 2016), d'initier au niveau colique des lésions préneoplasiques et le développement de cryptes aberrantes chez des rats (Bettini et al., 2017) et également d'entraîner la modulation de gènes impliqués dans la formation de tumeurs dans un modèle murin inactivé pour le gène *Apc* (Bischoff et al., 2022).

b. TiO₂ et microbiote intestinal

Le TiO₂, de par ses propriétés bactéricides (Liou et Chang, 2012), peut altérer la croissance de certaines populations bactériennes et est donc susceptible d'induire des dysbioses au niveau intestinal. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence que le TiO₂ inhibait la croissance de certaines souches de *Lactobacillus lactis* et d'*E. coli* (e.g. Radziwill-Bienkowska et al., 2018). Si le TiO₂ semble avoir un impact limité sur les différents paramètres de l'alpha-diversité (Li et al., 2018; Mao et al., 2019; Pinget et al., 2019; Mu et al., 2019; Perez et al., 2021; Carlé et al., 2023), la composition des communautés bactériennes, semble cependant être affectée avec plus particulièrement certains phyla et genres bactériens qui sont significativement augmentés ou diminués comme les Bacillota, les Bacteroidota, les bactéries affiliées aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Allobaculum* ou encore *Muscispirillum* (i.e. (Mu et al., 2019; Chen et al., 2019; Pinget et al., 2019; Khan et al., 2019; Cao et al., 2020; Carlé et al., 2023). Les résultats observés concernant ces modifications de la CCB diffèrent en fonction du type de TiO₂ utilisé (nanoparticulaire ou E171), de la dose et de la durée d'exposition du TiO₂, du type d'échantillon analysé (fèces ou muqueuse) ou encore des approches méthodologiques utilisées (type d'extraction d'ADN, type de séquençage...). L'exposition à l'E171 semble également favoriser la formation de biofilm par des bactéries

commensales et perturber la sécrétion de métabolites comme les AGCC (Cao et al., 2020; Pinget et al., 2019).

IV. AXES DE RECHERCHE

Le TiO₂ a été classé, en 2006, par l'Union Européenne (UE) comme produit carcinogène par inhalation sous forme de poudre. Suite à des recours déposés par des industriels, l'UE n'ayant finalement pas trouvé de preuves formelles de toxicité chez l'Homme, mais n'ayant pas pu exclure non plus toute toxicité, le tribunal de la Cour de justice de l'UE a annulé, fin 2022, la classification du TiO₂ en tant que substance cancérogène par inhalation sous forme de poudre. Concernant l'additif alimentaire E171, l'ANSES a émis des incertitudes concernant son innocuité et a révélé un manque de données conduisant à la suspension de sa mise sur le marché ainsi que celle des produits en contenant uniquement dans le domaine de l'agroalimentaire dès 2018 en France (Art. 53, loi Egalim n°2018-938). Après la publication d'avis supplémentaires de la part de l'EFSA, l'utilisation de l'E171 et la production de denrées alimentaires en comportant a été interdite à l'échelle européenne dès le 7 août 2022 (règlement (CE) n°2022/63 du 18 janvier 2022), avec toutefois une possibilité d'écoulement des stocks. Le TiO₂ reste donc une molécule particulièrement surveillée dont il est nécessaire d'évaluer toute toxicité éventuelle au niveau digestif.

Même si la classification du TiO₂ comme agent pro-carcinogène par inhalation n'est plus à l'ordre du jour, les données de la littérature suggèrent qu'il pourrait participer à la carcinogenèse colique. La présence de TiO₂ notamment dans l'alimentation pourrait jouer un rôle dans la structuration de l'écosystème microbien intestinal et par conséquent dans le développement du CCR en induisant notamment une dysbiose et en favorisant potentiellement la sélection et l'augmentation de la prévalence de pathobiontes tels que les bactéries CoPEC dont l'implication dans le CCR est reconnue. L'objectif du projet de recherche que je développe actuellement est donc d'étudier l'impact du TiO₂ sous forme nanoparticulaire et sous forme d'additif alimentaire E171 dans le cadre de la carcinogénèse colique en s'attachant notamment à ses effets sur les interactions entre les cellules coliques et le microbiote intestinal dont les CoPEC par des approches *in vitro* et *in vivo*. Le projet est ainsi organisé en trois tâches. Pour chacune d'entre elles, sont décrits les résultats préliminaires qui ont été obtenus par les différents étudiants que j'ai encadrés ou co-encadrés sur cette thématique « molécules contaminantes, microbiote intestinal et carcinogénèse colique » (Thomas Sauvaître, Célia

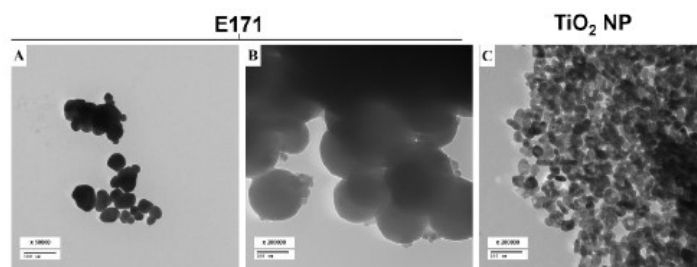


Figure 38. Observations de solutions de dioxyde de titane (E171 et nanoparticules (NP) de TiO_2) en microscopie électronique à transmission. L'E171 contient à la fois des microparticules et des NP regroupées en agrégats (A, B). Des NP sont observées en amas dans le TiO_2 NP (C).

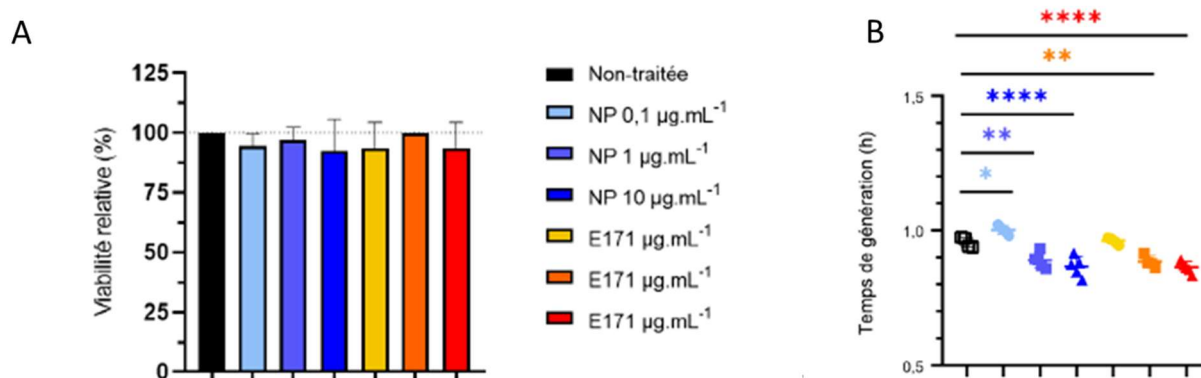


Figure 39. Viabilité et temps de génération des bactéries CoPEC 11G5 exposées à différentes concentrations de TiO_2 (NP et E171). A : La viabilité des bactéries CoPEC 11G5 exposées à différentes concentrations de TiO_2 NP et d'E171 pendant 24h a été estimée par dénombrement sur géloses. La figure est représentative de 3 réplicats biologiques. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à la condition non traitée. Tests statistiques : Kruskal Wallis et test des comparaisons multiples de Dunn ($p \leq 0,05$). B : La croissance bactérienne des bactéries CoPEC 11G5 exposées à différentes concentrations de TiO_2 et d'E171 a été évaluée sur l'appareil Spark® Cyto (Tecan) par mesure de l'absorbance. Les temps de doublement ont été calculés au cours de la phase exponentielle de croissance. La figure est représentative de 3 réplicats biologiques. Pour la représentation, seules les variations significatives avec la condition non traitée sont indiquées. Tests statistiques : ANOVA 1F et test post hoc de Dunnett (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; **** : $p < 0,0001$).

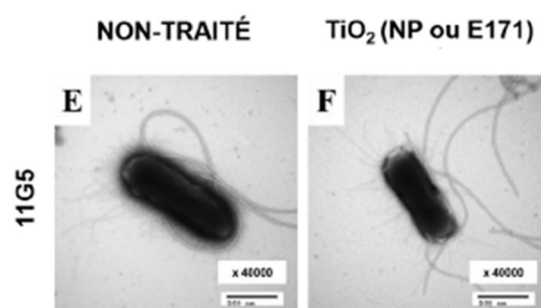


Figure 40. Souches bactériennes CoPEC 11G5 exposées à des solutions de TiO_2 (E171 et NP) et observées en microscopie électronique à transmission. L'exposition au TiO_2 semble entraîner chez ces souches bactériennes des pili moins nombreux, plus épais et mieux organisés (F) en comparaison à la condition contrôle (E).

Ledieu, Charline Juban) ainsi que les travaux envisagés par la suite (dont une partie dans le cadre de la thèse de Charline Juban, actuellement en 1^{ère} année de doctorat).

Tache 1 : Etude des interactions entre souches cliniques CoPEC et cellules épithéliales intestinales

1. Impact du TiO₂ sur les capacités d'adhésion, d'invasion et de survie de souches cliniques CoPEC en cellules épithéliales intestinales

L'E171 que nous utilisons était commercialisé par une société spécialisée pour la vente de produits et d'ingrédients destinés à la cuisine et à la pâtisserie. Une diffraction aux rayons X ainsi que les analyses thermogravimétriques qui ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Oscar Awitor et le Dr Christophe Massard du Laboratoire de Physique de Clermont-Ferrand, ont révélé que l'E171 utilisé était une poudre minérale, sous forme d'anatase et que la taille des cristallites d'E171 n'excédait pas 28 nm. Une observation au microscope électronique à transmission (MET) a mis en évidence que l'E171 contenait bien à la fois des micro- et des nanoparticules (Figure 38). Les résultats *in vitro* qui sont présentés par la suite ont été obtenus en étudiant l'effet du TiO₂ sous forme nanoparticulaire et sous forme d'E171 sur la souche clinique CoPEC 11G5 de référence qui est une souche isolée d'une biopsie de muqueuse colique d'un patient atteint d'un CCR sporadique (Collection MiPaCoR, N°DC-2017-2972). Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques et de ne pas forcer l'impact potentiel du TiO₂, nous avons choisi de travailler à des concentrations proches de la concentration réaliste atteignant l'intestin humain (0,14 µg.mL⁻¹) (Guo et al., 2017).

Modifications structurales et internalisation

Après avoir exposé durant 24h la souche clinique CoPEC 11G5 à des concentrations de 0,1 et 1 µg.mL⁻¹ soit de NP de TiO₂ soit d'E171, les résultats préliminaires ont montré, d'une part, l'absence de modification significative du pourcentage relatif de viabilité de la souche clinique CoPEC de référence, et d'autre part, une diminution du temps de génération de cette dernière (Figure 39). Une observation en microscopie électronique à transmission (MET) a mis en évidence des modifications structurales chez certaines bactéries de cette souche clinique avec notamment la présence de pili de type 1 moins nombreux mais plus épais et mieux organisés autour de la cellule en comparaison à la souche bactérienne non exposée (Figure 40).

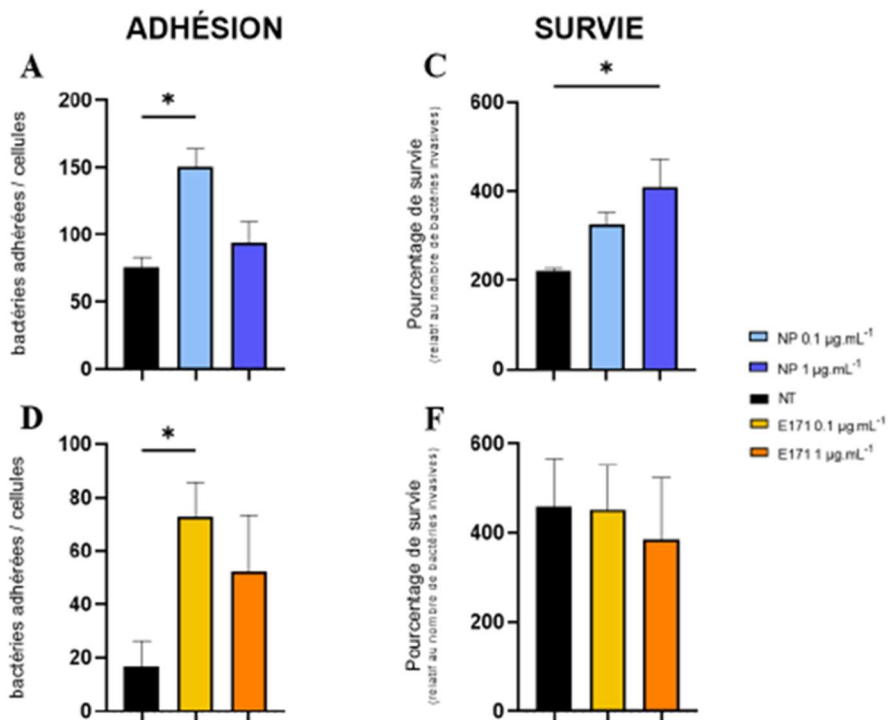


Figure 41. Capacités d'adhésion et de survie de la souche CoPEC 11G5 exposée à différentes concentrations de TiO₂ (NP et E171). La souche 11G5 a été cultivée dans du milieu LB à différentes concentrations de TiO₂ nanoparticulaire et d'E171 pendant 24h (0,1 ; 1µg/mL-1). Les cellules épithéliales intestinales HT29 ont ensuite été infectées avec la souche exposée ou non aux différentes conditions à une MOI 100 pendant 3h et 24h afin de mesurer les capacités d'adhésion (A, D) et de survie (C, F) respectivement. La figure est représentative de 3 réplicats biologiques. Tests statistiques : Kruskal-Wallis et test des comparaisons multiples de Dunn (*: $p \leq 0,05$).

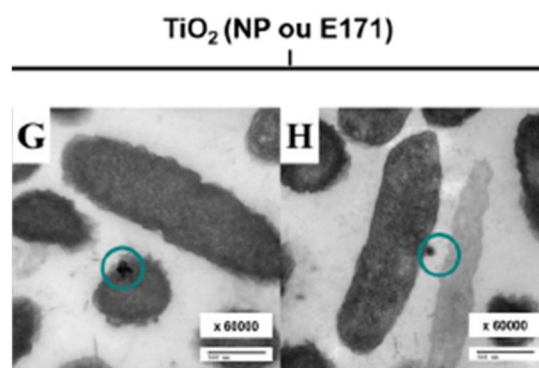


Figure 42. Souches bactériennes CoPEC 11G5 exposées à des solutions de TiO₂ (E171 et nanoparticulaire (NP)) et observées en microscopie électronique à transmission. Des nanoparticules (entourées) sont observées comme pouvant être internalisées (G) ou adsorbées à la paroi (H).

Les pili de type 1 sont des structures impliquées dans la pathogénicité bactérienne de par leur rôle dans l'adhésion à différents types de cellules eucaryotes y compris les cellules épithéliales coliques *via* la reconnaissance de résidus mannosides (e.g. Wold et al., 1990). Il est cependant nécessaire de vérifier cette observation de réorganisation structurale des pili notamment en essayant de quantifier le nombre de pili, en effectuant des mesures de longueur de ces derniers au MET mais également en testant la capacité des pili à interagir notamment avec le mannose. La mesure, avant et après exposition au TiO₂, de l'expression de gènes candidats impliqués dans la synthèse de ces pili, tels que *fimH* par une approche ciblée de RT-qPCR, permettrait de confirmer également cette observation. Les pili étant des structures possédant des propriétés biomécaniques et participant au processus d'adhésion des bactéries, les modifications morphologiques observées pourraient alors expliquer la meilleure capacité d'adhésion et de survie aux cellules HT29 constatée pour la souche 11G5 exposée au TiO₂ (Figure 41). Une fois entrée à l'intérieur des cellules eucaryotes, la souche 11G5 exposée au TiO₂, et plus particulièrement à la forme nanoparticulaire, semble se multiplier de façon plus importante en comparaison à la souche non exposée. Le TiO₂ pourrait ainsi potentialiser les effets pro-carcinogènes des CoPEC en favorisant leur interaction avec les cellules hôtes. Ces données n'ont été obtenues qu'avec une seule souche CoPEC. Ces résultats sont donc à confirmer sur d'autres souches CoPEC de la collection MiPACor qui est disponible au laboratoire. La réalisation d'une étude similaire sur des cellules HT29-MTX, qui sont des cellules productrices de mucus, permettra aussi de se rapprocher des conditions physiologiques.

Des coupes ultrafines de ces mêmes échantillons de la souche clinique CoPEC 11G5 exposée aux deux types de TiO₂ et inclus en paraffine ont mis en évidence que des NP, avec une taille comprise entre 22 et 40 nm, semblaient être adsorbées à la paroi bactérienne et/ou à l'intérieur de la cellule bactérienne (Figure 42). La MET associée à une identification chimique type EDS (Spectroscopie de rayons X à Dispersion d'Énergie), en collaboration avec le Centre Imagerie Cellulaire Santé (CICS) de Clermont-Ferrand, permettrait de confirmer cette potentielle internalisation. Cependant cette dernière n'est pas obligatoirement impliquée dans les mécanismes conduisant aux modifications morphologiques des pili. En effet, nos observations montrent qu'une majorité des bactéries présentent ces modifications morphologiques alors que l'internalisation est un phénomène beaucoup moins fréquent comme observé aussi par Radziwill-Bienkowska et al. (2018).

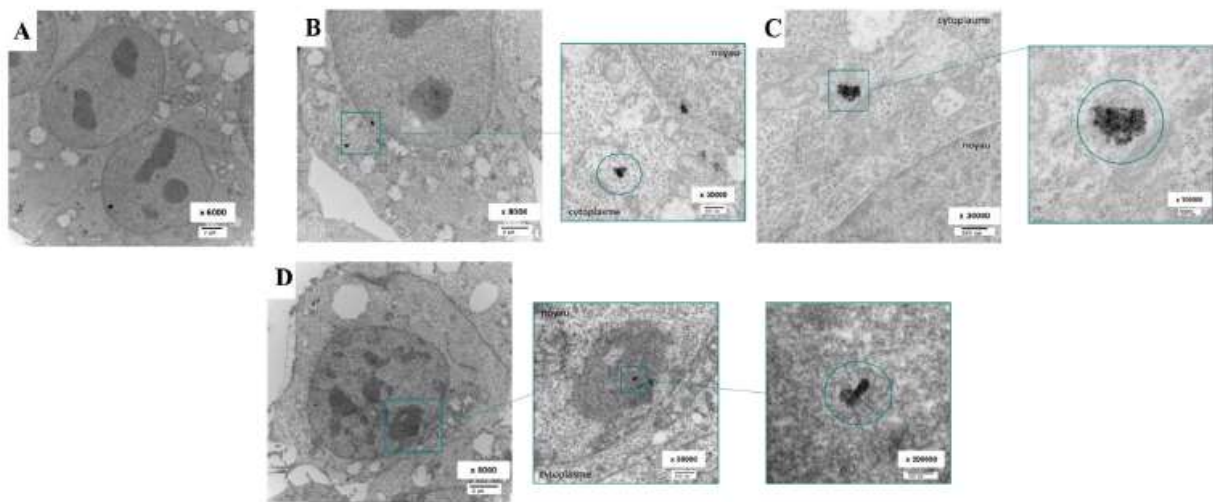


Figure 43. Interaction du TiO_2 (E171 ou nanoparticulaire (NP)) avec les cellules épithéliales intestinales HT29 au microscope électronique à transmission. Que ce soit pour l'E171 ou le TiO_2 NP, les cellules présentent moins de jonctions serrées et des mitochondries gonflées (A). Des NP (cercles bleus) sont observées « libres » dans le cytoplasme de la cellule (B), ou bien vacuolisées (C). Des NP de TiO_2 sont également retrouvées dans le noyau et semblent s'accrocher avec sa chromatine (D).

Les CEI HT29 ont également été exposées aux mêmes concentrations de TiO₂ et observées en MET. Des modifications structurales ont été observées sur les cellules exposées telles que des cellules paraissant moins jointives mais également des mitochondries fortement modifiées (Figure 43), ce qui pourrait corrélérer avec un stress oxydant et une dissipation du potentiel de membrane mitochondriale (Vigneshwaran et al., 2021). Des agrégats de TiO₂, aussi bien d'E171 que de NP strictes, ont été observés dans le cytoplasme des cellules eucaryotes soit sous forme « libre », soit comme contenu dans une vacuole (Figure 43). Nos observations en MET semblent également montrer l'internalisation du TiO₂ dans les CEI HT29 avec une localisation dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau (Figure 43). Si la localisation dans le cytoplasme est connue (Gitrowski et al., 2014), l'interaction potentielle des NP de TiO₂ avec le matériel génétique des CEI n'a pas encore été démontrée à notre connaissance. Cependant, cette interaction ne serait pas surprenante en raison de la charge positive du TiO₂ (Pagnout et al., 2012). Aussi, il a été observé une fragmentation de la chromatine chez des cellules cancéreuses du foie (HepG2) exposées à des NP de TiO₂ (Shahmoradi et al., 2023) ou encore chez des cellules de Leydig traitées avec des NP d'argent (Ray et Nath, 2022). Il apparait donc comme nécessaire de vérifier par analyse EDS si le TiO₂ est bien internalisé.

Activation des gènes ou des voies liées aux interactions hôtes / pathogènes et à la carcinogénèse

Afin d'analyser les gènes bactériens différentiellement exprimés et les voies de régulation des cellules eucaryotes perturbées par l'exposition au TiO₂, une analyse transcriptomique par RNAseq sera réalisée sur des souches bactériennes CoPEC et sur des cellules HT29 et HT29-MTX exposées ou non 24h et 72h au TiO₂ ainsi que sur ces mêmes cellules épithéliales coliques exposées au TiO₂ puis infectées par les CoPEC. Ceci permettra d'identifier les mécanismes moléculaires induits par le TiO₂ qui favorisent les interactions CoPEC/Entérocytes. L'étude de l'expression de l'ilote génomique codant pour la colibactine sera également entreprise par PCR digitale (plateforme culturomique, fédération SysMic) afin d'avoir une très grande sensibilité en comparaison de l'approche par RT-qPCR classique. L'étude d'exposition de 24h sera, par ailleurs, complétée par l'étude d'une exposition chronique des cellules épithéliales HT29 et HT29-MTX pendant 21 jours afin de mimer l'impact que la consommation quotidienne d'aliments contaminés aurait sur la prolifération et la différenciation des entérocytes et ainsi sur l'intestin qui se renouvelle continuellement. Les cellules eucaryotes seront ensuite mises en contact avec des souches CoPEC afin d'étudier également par une approche transcriptomique les gènes bactériens et eucaryotes dont l'expression est modifiée par

l'exposition au TiO₂ et à l'infection des CoPEC pour les cellules. Pour cela, les cellules seront triées par cytométrie en flux pour sélectionner les entérocytes présentant des CoPEC persistantes en intracellulaire. L'ensemble des résultats permettra alors d'identifier, au niveau des bactéries et des cellules hôtes, les mécanismes moléculaires induits par le TiO₂ qui favorisent les interactions CoPEC/entérocytes.

2. Impact du TiO₂ sur l'évolution du génome des CoPEC et par conséquent sur les interactions avec les cellules épithéliales intestinales

L'augmentation dans le colon de patients CCR de certaines populations microbiennes, notamment des pathobiontes, pourrait s'expliquer par une meilleure adaptation des bactéries à l'environnement en raison de leur plasticité morphologique. Aussi, nous proposons de sous-cultiver des souches CoPEC (souche 11G5 de référence et 4 autres souches CoPEC de la collection MiPACor) mais aussi une *E. coli* non pathogène (souche K12C600) avec du TiO₂ sous forme de NP et d'additif E171, avec des concentrations allant jusqu'à 1000 fois les doses atteignant l'intestin, toutes les 24h pendant 70 jours afin de générer une population de CoPEC conduisant à une modulation potentielle de la virulence. L'interaction des sous-populations de CoPEC obtenues avec les cellules HT29 et HT29-MTX différenciées sera ensuite étudiée en mesurant leurs capacités d'adhésion et de survie dans les cellules après 24h. Ces souches CoPEC seront séquencées après sous-culture avec du TiO₂ puis leurs génomes seront comparés avec le génome des souches CoPEC de référence avant exposition au TiO₂ afin de mettre en évidence la sélection des potentielles mutations patho-adaptatives. Pour chaque souche CoPEC, 4 sous-cultures seront réalisées pour évaluer la reproductibilité de l'apparition des mutations patho-adaptatives. L'impact des molécules contaminantes sur l'expression des gènes sera aussi déterminé par analyse transcriptomique au regard des modifications patho-adaptatives identifiées.

Tache 2 : impact du TiO₂ sur la capacité de colonisation des CoPEC en modèle murin prédisposé à développer un CCR

1. Caractérisation des altérations de la communauté bactérienne intestinale en modèle murin APC^{min/+}

Des dysbioses ayant été observées chez les patients atteints de CCR que ce soit au niveau

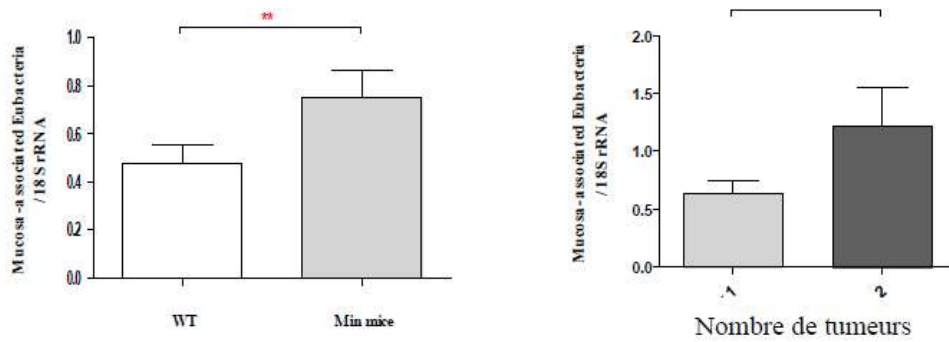


Figure 44. Etude par PCR quantitative du microbiote des souris APC^{min/+} en comparaison des souris WT. Le nombre total de bactéries, a été quantifiées par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S en fonction du génotype des souris (graphique de gauche) et en fonction du nombre de tumeurs observées chez les souris APC^{min/+} (graphique de droite).

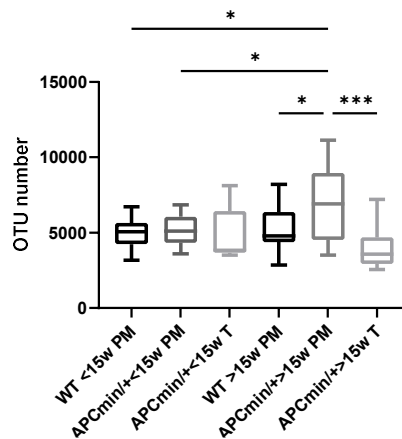


Figure 45. Richesse du microbiote au niveau du colon de souris APC^{min/+} et WT. La richesse a été évaluée par le nombre d'OTUs. PM : muqueuse proximale ; T : tumeur.

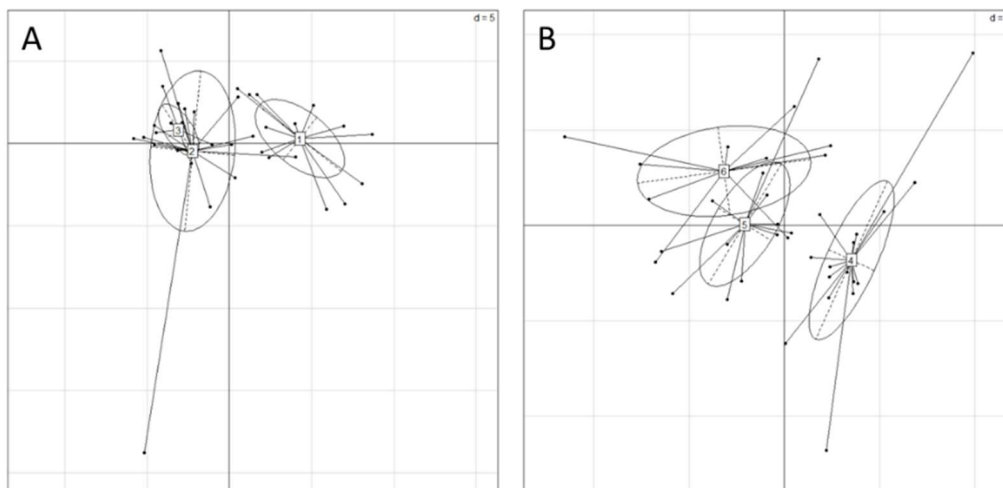


Figure 46. Communautés bactériennes intestinales des souris APC^{min/+} et WT, différenciées par l'analyse en composantes principales (ACP). A : souris âgées de moins de 15 semaines, 1 = muqueuse proximale de souris WT, 2 = muqueuse proximale des souris APC^{min/+}, 3 = tumeurs de souris APC^{min/+} ; B : souris âgées de plus de 15 semaines, 4 = muqueuse proximale de souris WT, 5 = muqueuse proximale des souris APC^{min/+}, 6 = tumeurs de souris APC^{min/+}.

des fèces, de la muqueuse colique ou des tumeurs, il est cependant important de pouvoir définir à quel moment de la carcinogénèse les modifications de la CCB vont apparaître. L'étude sur l'Homme étant difficile à réaliser, il a été choisi de travailler sur le modèle murin APC^{min/+} prédisposé au CCR. La caractérisation du microbiote intestinal de ces souris APC^{min/+} au cours de la carcinogénèse colorectale pourrait apporter des arguments en faveur de l'implication de modifications des populations bactériennes associées aux muqueuses coliques. Dans le cadre des travaux de Master 2 de Johan Gagnière (encadré par le Pr Mathilde Bonnet), il a donc été entrepris d'étudier les modifications du microbiote aux différentes phases de la carcinogénèse afin de mieux comprendre à quelle étape pourrait intervenir certaines bactéries et d'évaluer les conséquences fonctionnelles sur les lésions. Le microbiote, à la fois associé à la muqueuse colique et aux tumeurs, a donc été caractérisé, par une approche de séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Illumina[®] MiSeq), à un stade précoce (souris âgées de moins de 15 semaines) et à un stade avancé (souris âgées de plus de 15 semaines) de la carcinogénèse colorectale et ceci en comparaison à des souris congéniques de type sauvage.

Les résultats ont montré qu'il y avait une augmentation significative des bactéries au niveau de la muqueuse colique (quantifiée par qPCR) chez les souris APC^{min/+} en comparaison aux souris « Wild-Type » (WT), et que cette augmentation corrélait avec le nombre de tumeurs (Figure 44) suggérant ainsi un rôle pro-carcinogène de certaines espèces bactériennes colonisant le tube digestif et/ou la création d'une dysbiose tumoro-induite. L'analyse approfondie de la structure du microbiote intestinal a révélé, de plus, une richesse significativement plus importante des bactéries associées à la muqueuse pour les souris APC^{min/+} à un stade avancé de la carcinogénèse colorectale et en comparaison à la fois à un stade précoce du CCR et aux souris sauvages (Figure 45). Les membres appartenant aux Bacillota, suivis des Bacteroidota et des Proteobacteriota, ont dominé la BCC, quel que soit l'âge (< ou > 15 semaines), le type d'échantillons (muqueuse ou tumeur) ou le génotype de souris. Alors qu'une clusterisation a clairement été établie entre les souris APC^{min/+} et les souris WT que ce soit avant ou après l'âge de 15 semaines, indiquant donc une différence dans l'abondance des populations bactériennes, le microbiote intestinal à un stade avancé de la carcinogénèse colique semblait de plus différer de celui à un stade précoce (Figure 46). Les populations considérées comme dominantes (1% ≤ abondance relative) étaient majoritairement affectées avec une augmentation des bactéries notamment affiliées aux genres *Bacteroides* (résultats confirmés par qPCR) à la fois au niveau des tumeurs et de la muqueuse colique des souris APC^{Min/+} âgées de plus de 15 semaines en comparaison aux souris WT du même âge. Nous avons également pu observer qu'il y avait une

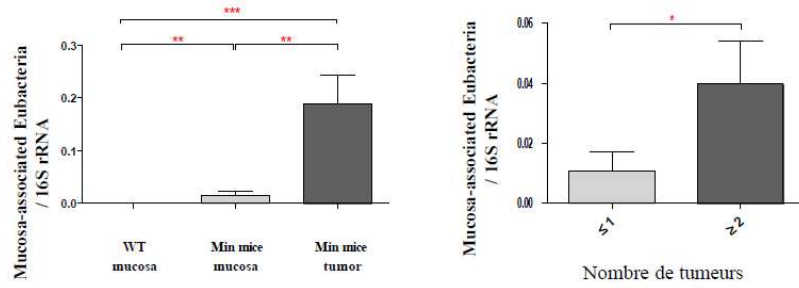


Figure 47. Etude par PCR quantitative de l'espèce *E. coli*. L'étude a été réalisée en fonction du génotype des souris (graphique de gauche) et en fonction du nombre de tumeurs observées chez les souris APC^{min/+} (graphique de droite).

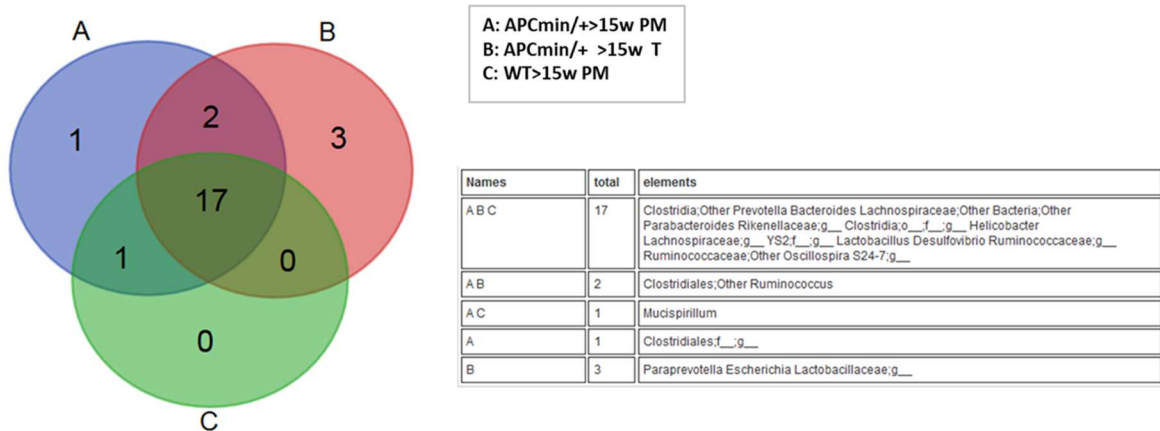


Figure 48. Diagramme de Venn montrant les taxa dominants spécifiques et partagés pour les souris WT et APC^{min/+} âgées de plus de 15 semaines. Le diagramme a été établi à partir des taxa affiliés au niveau du genre. A = muqueuse proximale des souris APC^{min/+}, B = tumeur des souris APC^{min/+}, C = muqueuse proximale des souris WT (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/example.html>).

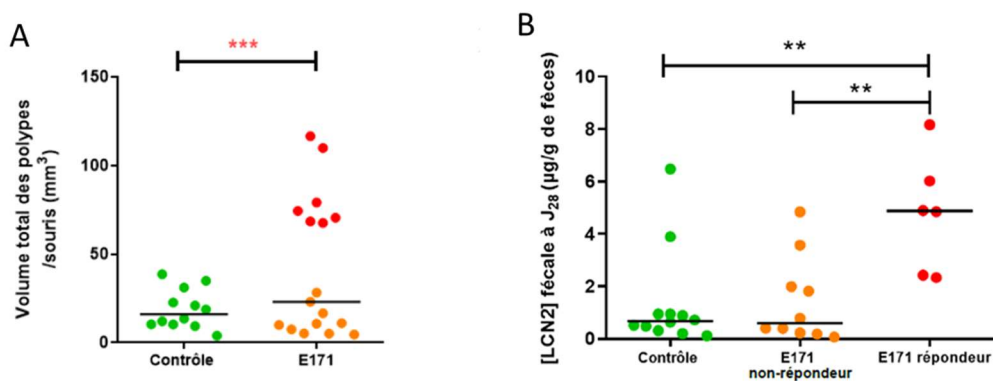


Figure 49. Impact de l'E171 sur des souris APC^{min/+}. Des souris APC^{min/+} ont été exposées à une concentration d'E171 de 10 mg.kg⁻¹ tous les 2 jours pendant 28 jours puis mises à mort. A : le volume total des polypes pour chaque souris a été mesuré. Au sein du groupe traité (en orange), certaines souris (en rouge) présentent des polypes dont le volume est significativement plus important que le groupe contrôle (en vert). B : La microinflammation intestinale a été estimée grâce au dosage de la lipocaline 2 fécale (LCN2) par ELISA sandwich. Une augmentation significative de la LCN2 est mesurée pour les souris comportant des polypes significativement plus volumineux (en rouge).

augmentation significative des *E. coli* au niveau des tumeurs et de la muqueuse colique chez les souris prédisposées à développer un CCR et que cette augmentation corrélait avec le nombre de tumeurs (Figure 47). Il a été intéressant également de voir que seulement 3 genres, à savoir *Escherichia*, *Paraprevotella* et un genre appartenant aux *Lactobacillaceae*, étaient considérés comme dominants uniquement au niveau des tumeurs des souris APC^{Min/+} âgées de plus de 15 semaines (Figure 48).

Les différents résultats obtenus concernant le microbiote ont apporté des arguments en faveur de l'implication de modifications des communautés bactériennes associée aux muqueuses coliques dans la carcinogénèse colorectale. Le rôle initiateur et/ou promoteur de certaines bactéries dans le CCR et la possible création d'une dysbiose par un environnement tumoral sont probablement étroitement liés et complémentaires. Afin de compléter ces travaux, il reste toutefois à corréliser l'ensemble de ces données à l'inflammation intestinale (suivie par imagerie optique), au développement des lésions tumorales, et à différents critères histologiques coliques (nombre de mitoses, infiltrats inflammatoires, présence d'atypies cellulaires...). Afin d'explorer les fonctions existantes au sein du microbiote aux différentes phases de la carcinogénèse, nous utiliserons le logiciel PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) qui vise à prédire les fonctions dans une communauté à partir d'informations phylogénétiques et notamment à partir de séquences d'ADNr 16S (Douglas et al., 2020). Nous pourrions ainsi avoir une analyse prédictive fonctionnelle de notre écosystème intestinal au cours de la carcinogénèse colorectale.

2. Impact du TiO₂ sur le microbiote intestinal en modèle murin APC^{min/+}

Afin de déterminer si le TiO₂ pourrait promouvoir la carcinogénèse colique, nous avons réalisé une expérimentation *in vivo* où des souris APC^{min/+} prédisposées à développer un CCR ont été exposées ou non oralement et chroniquement à de l'E171 à une dose équivalente humaine (DEH) de 10 mg.kg⁻¹ de PC (Bettini et al., 2017).

Les données obtenues *in vivo* ont mis en évidence que deux groupes se distinguaient au sein des souris exposées à l'E171 en ce qui concernait le volume total des polypes par souris : un groupe de souris qualifiées de répondeuses et un groupe de souris définies comme non répondeuses (Figure 49). Nous avons pu mettre en évidence qu'une forte augmentation du volume tumoral total associée à une augmentation de la micro-inflammation (LCN-2 fécale)

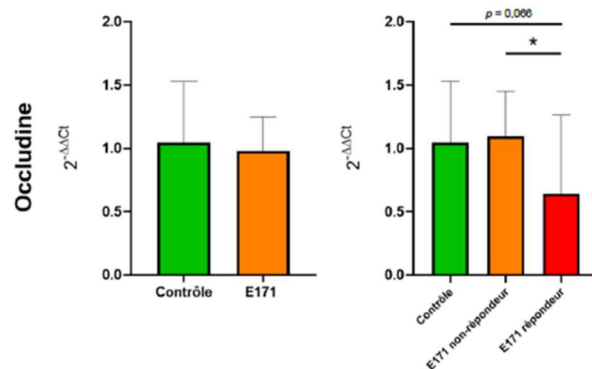


Figure 50. Impact de l'E171 sur l'expression du gène de l'occludine. Les ARN totaux ont été extraits à partir d'une portion de côlon des souris APC^{min/+} afin de réaliser une quantification par RT-PCRq de l'expression du gène codant la protéine de l'occludine. L'expression des gènes étudiés a été normalisée par rapport à l'ADNr 26S à l'aide de la méthode $\Delta\Delta C_t$. A partir du groupe traité E171 en orange (graphique à gauche, 2 groupes sont distingués E171 non répondeur (orange) et E171 répondeur (rouge)). Tests statistiques : Mann Whitney (A, C) et Kruskal Wallis suivi d'un test de Dunn (B, D) ($p \leq 0,05$).

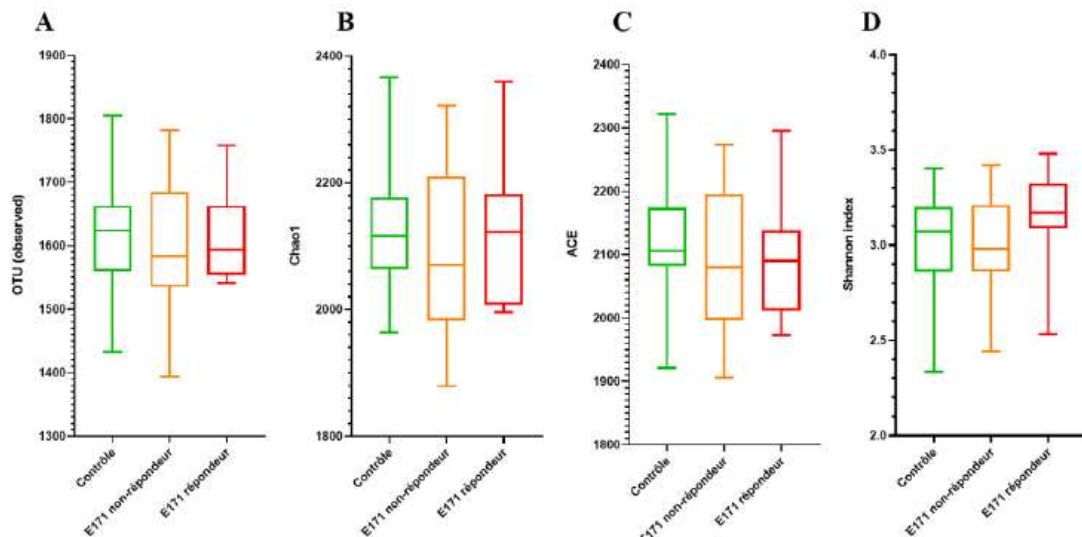


Figure 51. α -diversité des bactéries associées à la muqueuse colique chez les souris APC^{min/+} exposées ou non à l'E171. Le nombre d'OTU (A), les indices Chao1 (B) et ACE (C) indiquent la richesse de la communauté et l'indice de Shannon (D) indique la diversité de la communauté. À partir du groupe traité E171, deux groupes sont distingués : E171 non répondeur et E171 répondeur.

chez les souris E171 répondeuses suggérait alors un effet promoteur (Figure 49). Une tendance à la surexpression du gène marqueur de prolifération cellulaire PCNA associée aux caractéristiques histologiques plus agressives des tumeurs (fréquence plus élevée d'hyperplasie et de dysplasie sévères) du groupe exposé à l'E171 corroborent ces observations et confirment les données de la littérature puisqu'une accélération de la transformation néoplasique en présence d'E171 avait précédemment été mise en évidence dans un modèle de cancer associé à la colite (Urrutia-Ortega et al., 2016) et dans un modèle murin de carcinogenèse chimio-induite (Bettini et al., 2017) pour un temps d'exposition à l'E171 plus long. Cet effet sur la prolifération pourrait donc être induit par l'inflammation mais aussi par les effets génotoxiques et oxydant du TiO₂. Afin de compléter ces données *in vivo*, une gradation histologique précise ainsi que la quantification de l'expression des gènes codant les cytokines inflammatoires (IL6, TNF α) ainsi que ceux impliqués dans la production de mucus (*Muc1*, *Muc2*) seront réalisées. En effet, les observations histologiques montrent une baisse du nombre de cellules caliciformes et une augmentation de l'infiltrat inflammatoire dans les côlons des souris répondeuses. Les souris exposées à l'E171 répondeuses semblaient de plus sous-exprimer l'occludine qui est une protéine transmembranaire des jonctions serrées (Figure 50). En impactant les jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium, l'E171 provoquerait l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale ce qui pourrait permettre la translocation des pathobiontes, tels que les CoPEC, leur permettant d'être en contact direct et prolongé avec l'épithélium intestinal puis d'envahir la *lamina propria* et d'induire une augmentation de la micro-inflammation comme nous avons pu le mettre en évidence. Des tests de fonctionnalité de perméabilité intestinale avec du dextran-FITC et un marquage des cellules immunitaires associées à la muqueuse et à la *lamina propria* sur des souris traitées au TiO₂ sont donc envisagés pour confirmer nos hypothèses.

Le TiO₂ peut impacter l'écosystème digestif aussi bien au niveau de l'environnement digestif que des communautés bactériennes. Nous avons ainsi investigué, par une approche de séquençage haut débit de l'ADNr 16S, le microbiote associé à la muqueuse et nous avons pu mettre en évidence que les phyla Bacillota et Bacteroidota prédominaient la CCB associée à la muqueuse colique des souris exposées ou non à l'E171, ce qui concorde avec les résultats d'autres études conduites sur des échantillons fécaux (Cao et al., 2020). Si l'E171 n'impacte pas significativement l'alpha-diversité (Figure 51), des modifications ont été observées au niveau de la composition des populations bactériennes avec notamment, chez les souris exposées à l'E171, une diminution significative de l'abondance des genres *Truepera* et

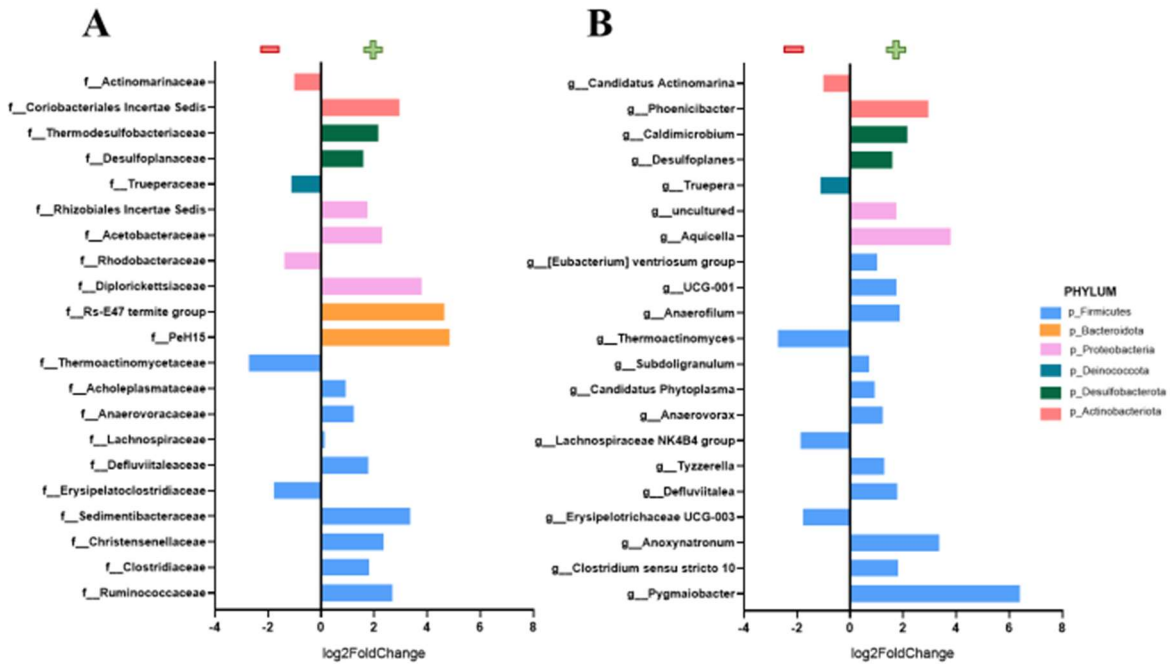


Figure 52. « Fold change » des taxa bactériens associés à la muqueuse colique et significativement impactés par une exposition à l'E171 chez les souris APC^{min/+}. L'outil DESeq2 a permis d'identifier 21 OTUs considérées comme exprimées différemment. Ils sont représentés selon la famille (A) ou le genre (B) à laquelle ou auquel ils appartiennent (axe Y), leur Log 2 Fold Change (axe X) et leur phylum.

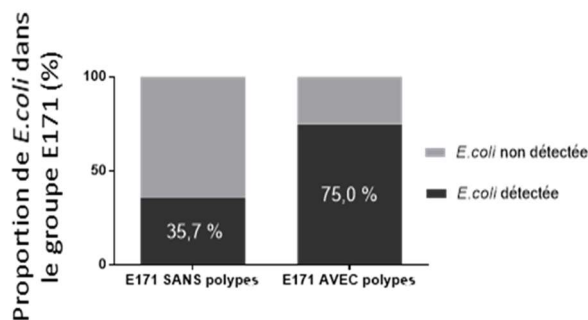


Figure 53. Proportion des souris pour lesquelles les bactéries *E. coli* ont été détectées au niveau de la muqueuse colique des souris exposées à l'E171 à une Dose Equivalente Humaine de 10 mg.kg⁻¹ Poids Corporel. La portion noire représente la proportion de souris pour laquelle *E. coli* a été détectée par PCRq et la portion gris clair celle pour laquelle l'espèce n'a pas pu être détectée.

Lachnospiraceae NK4B4 (Figure 52), considérés comme bénéfiques du fait de la production d'acides gras à chaînes ramifiées et d'AGCC, respectivement (Sun et al., 2021; Weber et al., 2023). Le TiO₂ pourrait ainsi induire des modifications en entraînant une diminution de certaines populations en raison de phénomènes de plasmolyse, de turgescence ou d'internalisation des NP ce qui induirait alors des lésions à la cellule et une mortalité comme précédemment mis en évidence chez des souches d'*E. coli* ou de *Lactobacillus* (Lin et al., 2014; Radziwill-Bienkowska et al., 2018; Janus et al., 2019). La diminution ou la disparition de certaines espèces bactériennes pourrait alors libérer une niche écologique que d'autres espèces pourraient coloniser plus facilement afin d'y proliférer. Ainsi les souris exposées à l'E171 présentaient une augmentation des bactéries affiliées notamment aux *Coriobacteriaceae* dont une forte abondance dans la muqueuse colique de patients atteints de CCR a été corrélée avec un mauvais pronostic de survie (Huo et al., 2022). Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence par une approche de PCRq, d'une part, que les bactéries *E. coli* étaient plus présentes chez les souris exposées à l'E171 par rapport au groupe contrôle, et d'autre part que les *E. coli* étaient plus souvent détectées chez les souris présentant des polypes que chez les souris n'ayant pas de polypes. Ces données suggèrent que le TiO₂ pourrait favoriser l'implantation des *E. coli* (Figure 53). L'augmentation de certaines populations, notamment des pathobiontes, pourrait aussi s'expliquer par une meilleure adaptation des bactéries à l'environnement en raison de leur plasticité morphologique potentialisée par l'exposition au TiO₂. L'analyse de l'abondance que nous avons réalisée concerne les 200 taxa les plus abondants. Or, comme précédemment expliqué, les taxa rares pourraient également jouer un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème. Il est donc nécessaire de compléter cette analyse du microbiote en prenant en compte la totalité des communautés bactériennes identifiées.

La participation de l'E171 à la promotion de la carcinogénèse colique peut se faire *via* une modification de l'environnement ou un impact direct sur le microbiote intestinal. Aussi, afin de déterminer l'implication de la dysbiose dans les phénotypes observés, nous souhaitons mettre en place des transferts de microbiote de souris exposées ou non à l'E171, en modèle murin APC^{min/+} axénique (en collaboration avec la plateforme GNOTAMINA du Programme et Equipements Prioritaires de Recherche : Systèmes Alimentaires, Microbiomes et Santé (PEPR-SAMS)). Différents paramètres seront analysés à savoir le score histologique, l'altération de l'homéostasie de la barrière intestinale (*via* des mesures de la perméabilité intestinale et de l'expression des protéines de la jonction serrée) et les profils transcriptomiques du colon en se focalisant notamment sur les gènes liés à l'inflammation, à l'intégrité de la barrière et aux processus de détoxification.

3. Impact du TiO₂ sur la capacité de colonisation des CoPEC en modèle murin

Nos précédents résultats ont suggéré que le TiO₂ pourrait altérer la perméabilité intestinale ce qui pourrait alors permettre la translocation des pathobiontes, tels que les CoPEC. Afin de vérifier si le TiO₂ pourrait favoriser l'implantation des CoPEC, des souris APC^{min/+} seront exposées chroniquement à l'E171 à la même DEH de 10 mg.kg⁻¹ PC, puis colonisées par la souche clinique CoPEC 11G5 tout en continuant l'exposition à l'E171. La capacité de colonisation des CoPEC sur le microbiote intestinal et par voie de conséquence sur le fonctionnement de ce dernier sera suivi par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC). L'étude spatiale *in situ* de la niche environnementale de la souche CoPEC 11G5 au niveau de la muqueuse colique par méthode FISH et par RNAscope (plateau technique NEURO-DOL, UMR1107 Inserm/UCA) permettra de voir s'il existe une interaction ou une coopération avec d'autres populations bactériennes qui pourrait alors favoriser la tumorigénèse. L'analyse histologique de la muqueuse colique sera également entreprise et certains paramètres de l'hôte (induction des dommages de l'ADN, production de cytokines pro-inflammatoires...) seront également étudiés. Des tests de fonctionnalité de perméabilité intestinale avec du dextran-FITC et un marquage des cellules immunitaires (neutrophiles, CD4, CD8) associées à la muqueuse et à la *lamina propria* seront réalisés. La composition en acides biliaires sera également étudiée (plateforme du CHU Saint Antoine, APHP, Paris) afin de vérifier si l'impact du TiO₂ conduit à une suppression de la biosynthèse des acides biliaires secondaires suite à l'absence de certaines populations bactériennes, ce qui pourrait alors favoriser l'implantation des CoPEC ou autres bactéries potentiellement pathogènes au détriment de bactéries protectrices. Le microbiote associé à la muqueuse colique (séquençage ADNr 16S, Illumina) ainsi que l'activité microbienne seront donc déterminés. L'effet du TiO₂ sur le métabolome des bactéries sera également étudié par une analyse métabolomique non-ciblée (en collaboration avec le Dr Romain Villéger - Projet Permica en deuxième phase à l'ANSES). Le TiO₂ sera, de plus, quantifié dans la muqueuse colique des souris exposées au TiO₂ par spectrométrie de masse à plasma inductif (Inductively Coupled Plasma -Mass Spectrometry, ICP-MS, plateforme analytique CarMa, Laboratoire Magmas et Volcans, UMR6524, CNRS/UCA).

Nous souhaiterions également étudier la localisation du TiO₂ au niveau de la muqueuse intestinale des souris et vérifier s'il existe bien une internalisation au niveau des cellules et tenter une quantification de celui-ci. Pour cela il serait intéressant de coupler le MET au NanoSIMS (Janin, 2023). Le NanoSIMS, pour Nano-scale Secondary Ion Mass Spectrometer,

est une sonde ionique à haute résolution spatiale utilisant un faisceau d'ions O^- ou Cs^+ afin d'analyser des échantillons solides. Cette technique de spectrométrie de masse permet de collecter les isotopes de la plupart des éléments du tableau périodique et donc de cartographier des rapports isotopiques avec une échelle très fine. Le MET permet une analyse de toute l'épaisseur de l'échantillon, tandis que le NanoSIMS fournit une analyse de la surface de l'échantillon qu'il est nécessaire de répéter plusieurs fois pour obtenir une analyse en profondeur. La reconstruction en trois dimensions de la zone analysée au NanoSIMS permettrait ainsi de s'assurer que les NPs sont localisées en profondeur plutôt que sur la surface de la coupe de l'échantillon. La corrélation des images obtenues au MET et au NanoSIMS (plateforme du Museum National d'Histoire Naturelle) permettrait ainsi d'identifier, de localiser et de quantifier les NP dans la muqueuse colique des souris $APC^{min/+}$.

Une autre approche que nous souhaiterions mettre en place dans le cadre de cette partie serait la combinaison du FISH et du NanoSIMS, en ciblant certaines populations bactériennes telles que les *E. coli*. En effet, même s'il ne serait pas possible de différencier par la sonde FISH la souche CoPEC 11G5 des souches bactériennes *E. coli* commensales, nous pourrions tout de même, par comparaison avec les souris non exposées à l'E171 et avec les souris non colonisées par la souche clinique de référence, voir la possible colocalisation des bactéries et des NP au niveau de la muqueuse colique. Une autre possibilité serait de cibler l'ilot pks en RNAscope.

Nous souhaiterions également, d'une part, corréler l'effet aggravant du TiO_2 à la capacité des souches CoPEC à coloniser la muqueuse intestinale et à induire l'inflammation intestinale chez des patients atteints de CCR. Afin d'établir un lien entre une exposition au TiO_2 et la prévalence des CoPEC chez les patients atteints de CCR, nous pourrions réaliser une étude ancillaire du projet METABIOTE (NCT03843905) mais également de la cohorte NutriNet-Santé. En effet, à partir d'un questionnaire établi avec les personnes du réseau NACRe, nous pourrions déterminer l'exposition des patients atteints de CCR au TiO_2 dans leur enfance ou leur vie de jeune adulte et ensuite corréler ces données aux données cliniques des patients.

Tache 3 : les bactériophages de CoPEC : rôle et implication au sein du microbiote intestinal.

Lorsque nous avons recherché, dans le cadre du Master 2 de Charline Juban, s'il y avait un impact du TiO_2 sur la morphologie et la structure de la souche clinique CoPEC 11G5, la

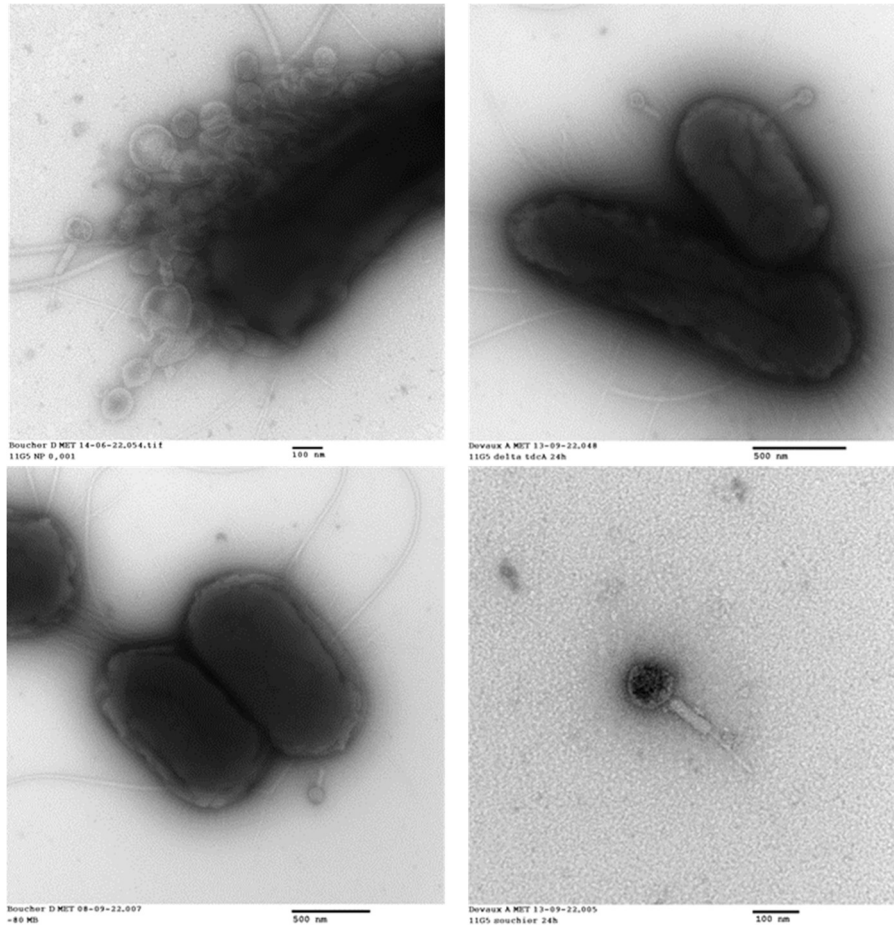


Figure 54. Souches bactériennes CoPEC 11G5 observées en microscopie électronique à transmission. La présence de bactériophages est observée.

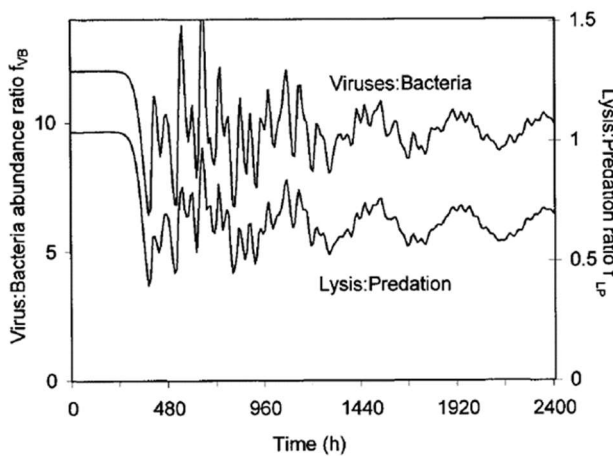


Figure 55. Rapport entre l'abondance des virus et des bactéries et rapport entre la lyse et le taux de perte par prédation (Thingstad, 2000).

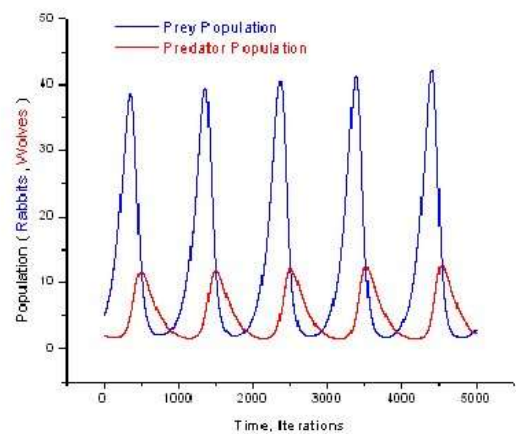


Figure 56. Représentation graphique du modèle de « Lotka-Volterra ». La population des proies est représentée en bleu et celles de prédateur en rouge. (Signes Pont et al., 2023).

MET nous a permis de mettre en évidence la présence de bactériophages (Figure 54) dans notre culture bactérienne qu'elle soit exposée ou non au TiO₂. Ces bactériophages étaient retrouvés libres dans l'échantillon mais également fixés à la paroi de certaines bactéries. Leur détection était encore plus facile lorsque les bactéries CoPEC 11G5 avaient été réensemencées et leur quantité semblait plus importante lorsque celles-ci avaient été exposées au TiO₂. Leur présence nous questionne donc quant à leur rôle vis-à-vis des bactéries CoPEC 11G5, sachant que ces bactériophages n'entraînent pas une lyse de la culture bactérienne.

Les bactériophages, qui sont des virus spécifiques des bactéries, représentent l'entité biologique la plus abondante, quel que soit l'environnement considéré. Ils sont des acteurs clés de la santé et des maladies humaines. Ils peuvent influencer le développement de pathologies humaines telles que le choléra, qui est causé par certaines souches de *Vibrio cholerae* infectées par le bactériophage CTX (Waldor et Mekalanos, 1996), mais aussi être utilisés pour traiter des infections bactériennes. En effet, la thérapie par les phages est utilisée depuis le début du vingtième siècle notamment pour traiter la dysenterie bacillaire, en ciblant *Shigella* l'agent étiologique de la maladie (d'Herelle, 1931). Cependant, l'utilisation des phages dans la pratique clinique a rapidement décliné en Occident en raison de l'avènement des antibiotiques et du manque de données fiables sur leur sécurité et leur efficacité.

Alors que des changements dans la structure des communautés bactériennes ont été observées chez des patients atteints de CCR et que des espèces bactériennes ont clairement été reconnues comme étant impliquées dans la carcinogénèse colique, le rôle des virus intestinaux reste encore largement inexploré. Cependant, les bactériophages représentent plus de 97,7% d'une base de données de virus intestinaux d'adultes occidentaux en bonne santé (Gregory et al., 2020), et leurs interactions constantes avec leurs hôtes, que représentent les bactéries, façonnent les communautés microbiennes de l'intestin ce qui impliquerait donc leur contribution dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Les bactériophages évoluent avec les bactéries selon notamment un concept appelé "kill the winner" (Figure 55) (Thingstad, 2000; Weinbauer, 2004) qui est analogue au modèle de Lotka-Volterra décrivant la dynamique des populations de proies et de prédateurs en écologie (Figure 56). Dans ce modèle, le prédateur que représente le phage ne peut se multiplier que si la population de proies bactériennes est élevée. En plus de réguler les communautés bactériennes en éliminant spécifiquement leurs hôtes bactériens, les phages influencent l'écosystème intestinal en interagissant directement avec les cellules immunitaires et en modulant la réponse immunitaire de l'hôte (Tiamani et al.,

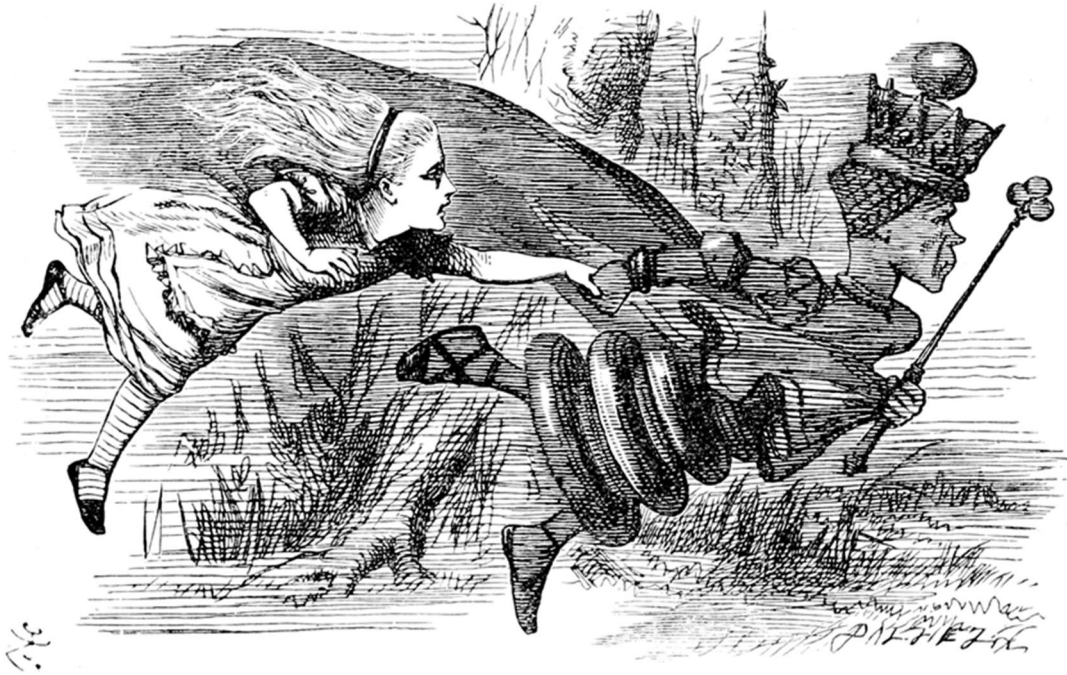


Figure 57. Théorie de la Reine Rouge. La théorie de la Reine Rouge, formulée par Leigh Van Valen en 1973, fait référence à une scène tirée du livre « De l'autre côté du miroir » qui est la suite de « Alice au pays des merveilles » de Lewis Carroll. Au cours de cette scène Alice et la Reine Rouge se lancent dans une course effrénée. Alice regarde autour d'elle avec une grande surprise : « pourquoi je crois que nous sommes restées sous cet arbre pendant tout ce temps ! Tout est comme avant ! ». « Bien sur » dit la reine. « Que voulez-vous qu'il en soit ? » « Eh bien, dans notre pays », dit Alice, toujours un peu haletante, « on arrive généralement à un autre endroit si on court très vite pendant longtemps, comme nous l'avons fait. » « C'est un pays lent », dit la reine. « Ici, voyez-vous, il faut courir autant que l'on peut pour rester au même endroit. Si vous voulez aller ailleurs, vous devez courir au moins deux fois plus vite que cela. » La Reine rouge attire Alice dans une course folle qui leur permet simplement de se maintenir à la même position. Chaque espèce doit ainsi s'adapter en permanence aux changements de celles qui l'entourent. Illustration : John Tenniel, 1871.

2022). Quelques études ont observé des changements significatifs dans le virome fécal, en particulier dans la population de phages, chez les patients atteints de CCR (Hannigan et al., 2018; Nakatsu et al., 2018). Plus spécifiquement une augmentation du nombre d'espèces virales et un enrichissement en 5 bactériophages ciblant les *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Proteus* et *Streptococcus*, ont été mis en évidence chez les tissus de patients atteints de CCR en comparaison à des individus sains (Marongiu et al., 2021). Une autre étude au contraire fait état d'une richesse non impactée chez les patients atteints de CCR et de la diminution de phages ciblant les *Enterobacteriaceae* (Gao et al., 2021). Au regard des quelques données existantes dans la littérature et de nos observations, nous nous posons donc la question de savoir quel est le rôle de ces bactériophages associés aux bactéries CoPEC 11G5 dans le cadre de la carcinogénèse colique. Les bactériophages que nous avons observés ne semblaient pas lyser les cellules bactériennes. Il pourrait donc s'agir de phages tempérés. Bien que ne détruisant pas les populations qu'ils infectent, ces phages tempérés peuvent agir profondément sur les populations bactériennes. En effet, le prophage se propage en infectant de nouveaux hôtes sans les détruire mais en établissant une nouvelle lysogénie. Les prophages vont se comporter comme des envahisseurs et peuvent ainsi contribuer à l'émergence de nouvelles souches bactériennes en conférant de nouveaux avantages à leur hôte. Il peut y avoir également une évolution par exemple vers la pathogénicité, telles que la synthèse augmentée de toxines, une amélioration de la colonisation de l'hôte, une résistance aux acides biliaires ou encore une protection de leur hôte contre une lyse par d'autres bactériophages (Willner et al., 2011) leur permettant alors de mieux s'adapter à l'environnement. Ce phénomène de coévolution rappelle la théorie de la Reine Rouge ou course aux armements où les organismes s'adaptent sans cesse les uns aux autres (Figure 57) (van Valen, 1973). Les changements évolutifs ne sont pas seulement initiés par des changements issus de l'environnement mais ils peuvent également être dus à une dynamique évolutive créée par les êtres vivants eux-mêmes. Récemment, Luo et al. (2023) ont mis en évidence une expansion des phages tempérés chez des souris APC infectées par *Helicobacter pylori* au stade précoce de la carcinogénèse colique avec également une forte prévalence de gènes de virulences codés par ces mêmes phages.

L'étude de la composante bactériophagique revêt donc un intérêt tout particulier et notamment dans le développement du CCR. Il serait ainsi intéressant d'étudier dans un premier temps la structure de la communauté des bactériophages aussi bien en termes d'abondance, de richesse, de structure que de composition en se focalisant plus spécifiquement sur les bactériophages et ceci au niveau de la muqueuse et des tumeurs au sein de cohortes de patients

atteints de CCR déjà établies au sein du laboratoire (Collection MiPaCoR, N°DC-2017-2972 dont est issue la souche CoPEC 11G5 ; Projet METABIOTE - NCT03843905). Des corrélations pourraient alors être établies avec les données déjà obtenues concernant les communautés bactériennes et avec les données cliniques des patients atteints de CCR mais également avec des patients sains.

Il faudrait également isoler le bactériophage identifié comme ciblant la souche CoPEC 11G5 afin de pouvoir séquencer son génome. Nous disposons du génome de ces mêmes bactéries. En comparant les génomes de ces deux derniers nous pourrions identifier si une coévolution a eu lieu.

Il serait également intéressant de réaliser des observations en MET d'autres souches CoPEC issues des cohortes de patients atteints de CCR dont nous disposons afin de voir si d'autres bactériophages peuvent leur être associées comme nous avons pu le voir pour la souche clinique de référence 11G5 afin de voir si c'est un phénomène sporadique ou qui peut être généralisé à d'autres pathobiontes impliqués dans la carcinogénèse colique.

Références bibliographiques

- Abrahamsson, K., Ekdahl, A., Collen, J., Fahlström, E., Pedersen, M., 1994. The natural formation of trichloroethylene and perchloroethylene in sea water, in: Naturally-Produced Organohalogen. pp. 327–331.
- Akagi, J.-I., Mizuta, Y., Akane, H., Toyoda, T., Ogawa, K., 2023. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. Part. Fibre Toxicol. 20, 23. <https://doi.org/10.1186/s12989-023-00533-x>
- Alexander, J.L., Posma, J.M., Scott, A., Poynter, L., Mason, S.E., Doria, M.L., Herendi, L., Roberts, L., McDonald, J.A.K., Cameron, S., Hughes, D.J., Liska, V., Susova, S., Soucek, P., Der Sluis, V.H., Gomez-Romero, M., Lewis, M.R., Hoyles, L., Woolston, A., Cunningham, D., Darzi, A., Gerlinger, M., Goldin, R., Takats, Z., Marchesi, J.R., Teare, J., Kinross, J., 2023. Pathobionts in the tumour microbiota predict survival following resection for colorectal cancer. Microbiome 11, 100. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01518-w>
- Allison, S.D., Martiny, J.B.H., 2008. Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 Suppl 1, 11512–11519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801925105>
- Amitay, E.L., Carr, P.R., Jansen, L., Roth, W., Alwers, E., Herpel, E., Kloor, M., Bläker, H., Chang-Claude, J., Brenner, H., Hoffmeister, M., 2020. Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. Br. J. Cancer 122, 1604–1610. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0803-0>
- Arima, K., Zhong, R., Ugai, T., Zhao, M., Haruki, K., Akimoto, N., Lau, M.C., Okadome, K., Mehta, R.S., Väyrynen, J.P., Kishikawa, J., Twombly, T.S., Shi, S., Fujiyoshi, K., Kosumi, K., Ogata, Y., Baba, H., Wang, F., Wu, K., Song, M., Zhang, X., Fuchs, C.S., Sears, C.L., Willett, W.C., Giovannucci, E.L., Meyerhardt, J.A., Garrett, W.S., Huttenhower, C., Chan, A.T., Nowak, J.A., Giannakis, M., Ogino, S., 2022. Western-Style Diet, pks Island-Carrying *Escherichia coli*, and Colorectal Cancer: Analyses From Two Large Prospective Cohort Studies. Gastroenterology 163, 862–874. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.06.054>
- Arp, D.J., Yeager, C.M., Hyman, M.R., 2001. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. Biodegradation 12, 81–103. <https://doi.org/10.1023/A:1012089908518>
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., Rhodes, J.M., Stintzi, A., Simpson, K.W., Hansen, J.J., Keku, T.O., Fodor, A.A., Jobin, C., 2012. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. Science 338, 120–123. <https://doi.org/10.1126/science.1224820>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium, Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylekama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M’rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Atkinson, R.W., Ross Anderson, H., Sunyer, J., Ayres, J., Baccini, M., Vonk, J.M., Boumghar, A., Forastiere, F., Forsberg, B., Touloumi, G., Schwartz, J., Katsouyanni, K., 2001. Acute Effects of Particulate Air Pollution on Respiratory Admissions: Results from APHEA 2 Project. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164, 1860–1866. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2010138>

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F., 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–114. <https://doi.org/10.1002/em.20095>
- Balamurugan, R., Rajendiran, E., George, S., Samuel, G.V., Ramakrishna, B.S., 2008. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1298–1303. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05490.x>
- Balvanera, P., Pfisterer, A.B., Buchmann, N., He, J., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., Schmid, B., 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol. Lett.* 9, 1146–1156. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00963.x>
- Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., 2008. The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22, 1856–1864. <https://doi.org/10.1101/gad.1674008>
- Beaugerie, L., Svrcak, M., Seksik, P., Bouvier, A., Simon, T., Allez, M., Brixi, H., Gornet, J., Altwegg, R., Beau, P., Duclos, B., Bourreille, A., Faivre, J., Peyrin-Biroulet, L., Fléjou, J., Carrat, F., 2013. Risk of Colorectal High-Grade Dysplasia and Cancer in a Prospective Observational Cohort of Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 145, 166–175.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.044>
- Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436, 1157–1160. <https://doi.org/10.1038/nature03891>
- Bender, E.A., Case, T.J., Gilpin, M.E., 1984. Perturbation Experiments in Community Ecology: Theory and Practice. *Ecology* 65, 1–13. <https://doi.org/10.2307/1939452>
- Bernalier-Donadille, A., 2010. Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, S16–S22. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70016-6](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70016-6)
- Bernstein, D.I., Lumms, Z.L., Santilli, G., Siskosky, J., Bernstein, I.L., 1995. Machine Operator's Lung. *Chest* 108, 636–641. <https://doi.org/10.1378/chest.108.3.636>
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J.-P., Carrière, M., Audinot, J.-N., Pierre, F.H., Guzylack-Piriou, L., Houdeau, E., 2017. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* 7, 40373. <https://doi.org/10.1038/srep40373>
- Biderre-Petit, C., Dugat-Bony, E., Mege, M., Parisot, N., Adrian, L., Moné, A., Denonfoux, J., Peyretailade, E., Debros, D., Boucher, D., Peyret, P., 2016. Distribution of Dehalococcoidia in the Anaerobic Deep Water of a Remote Meromictic Crater Lake and Detection of Dehalococcoidia-Derived Reductive Dehalogenase Homologous Genes. *PloS One* 11, e0145558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145558>
- Bischoff, N., Proquin, H., Jetten, M., Schrooders, Y., Jonkhout, M., Briedé, J., Van Breda, S., Jennen, D., Medina-Reyes, E., Delgado-Buenrostro, N., Chirino, Y., Van Loveren, H., De Kok, T., 2022. The Effects of the Food Additive Titanium Dioxide (E171) on Tumor Formation and Gene Expression in the Colon of a Transgenic Mouse Model for Colorectal Cancer. *Nanomaterials* 12, 1256. <https://doi.org/10.3390/nano12081256>
- Boardman, L.A., Vilar, E., You, Y.N., Samadder, J., 2020. AGA Clinical Practice Update on Young Adult-Onset Colorectal Cancer Diagnosis and Management: Expert Review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 2415–2424. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.05.058>
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., Darfeuille-Michaud, A., 2014. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 859–867. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1343>
- Bossuet, N., Guyonnet, C., Chagneau, C.V., Tang-Fichaux, M., Penary, M., Loubet, D., Branchu, P., Oswald, E., Nougayrede, J.-P., 2023. Oxygen concentration modulates colibactin production. *Gut Microbes* 15, 2222437. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2222437>

- Botteri, E., Borroni, E., Sloan, E.K., Bagnardi, V., Bosetti, C., Peveri, G., Santucci, C., Specchia, C., Van Den Brandt, P., Gallus, S., Lugo, A., 2020. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 115, 1940–1949. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000803>
- Boucher, D., Debroas, D., 2009. Impact of environmental factors on couplings between bacterial community composition and ectoenzymatic activities in a lacustrine ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 66–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00730.x>
- Boucher, D., Jardillier, L., Debroas, D., 2006a. Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 79–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00011.x>
- Boucher, D., Laffaire, J.B., Jaziri, F., David, C., Biderre-Petit, C., Duquenne, P., Peyretailade, E., Peyret, P., 2011. Bacterial community composition of biological degreasing systems and health risk assessment for workers. *Microb. Ecol.* 62, 868–881. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9887-7>
- Boucher, D., Richardot, M., Thénot, A., Debroas, D., 2006b. Incorporation of 3H-thymidine by different prokaryotic groups in relation to temperature and nutrients in a lacustrine ecosystem. *Microb. Ecol.* 52, 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9074-4>
- Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chanéac, C., Carapito, C., Rabilloud, T., Mabondzo, A., Herlin-Boime, N., Carrière, M., 2014. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-13>
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., Bonnet, R., 2013. High Prevalence of Mucosa-Associated E. coli Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLoS ONE* 8, e56964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056964>
- Burns, M.B., Lynch, J., Starr, T.K., Knights, D., Blekhman, R., 2015. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med.* 7, 55. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0177-8>
- Cai, J., Peng, J., Feng, J., Li, R., Ren, P., Zang, X., Wu, Z., Lu, Y., Luo, L., Hu, Z., Wang, Jiaying, Dai, X., Zhao, P., Wang, Juan, Yan, M., Liu, J., Deng, R., Wang, D., 2023. Antioxidant hepatic lipid metabolism can be promoted by orally administered inorganic nanoparticles. *Nat. Commun.* 14, 3643. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39423-3>
- Calabrese, E.J., Stanek, E.J., Barnes, R., 1997. Soil ingestion rates in children identified by parental observation as likely high soil ingesters. *J. Soil Contam.* 6, 271–279. <https://doi.org/10.1080/15320389709383565>
- Callahan, T., Norman, M., Hadju, J., 2001. Field experience with an integrated biological degreasing system. AESF week 2001—AESF/ EPA conference for environmental excellence, Orlando, Florida.
- Cao, X., Zhang, T., DeLoid, G.M., Gaffrey, M.J., Weitz, K.K., Thrall, B.D., Qian, W.-J., Demokritou, P., 2020. Evaluation of the cytotoxic and cellular proteome impacts of food-grade TiO₂ (E171) using simulated gastrointestinal digestions and a tri-culture small intestinal epithelial model. *NanoImpact* 17, 100202. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100202>
- Cardinale, B.J., Srivastava, D.S., Emmett Duffy, J., Wright, J.P., Downing, A.L., Sankaran, M., Jouseau, C., 2006. Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature* 443, 989–992. <https://doi.org/10.1038/nature05202>
- Carlé, C., Boucher, D., Morelli, L., Larue, C., Ovtchinnikova, E., Battut, L., Boumessid, K., Airaud, M., Quaranta-Nicaise, M., Ravanat, J.-L., Dietrich, G., Menard, S., Eberl, G., Barnich, N., Mas, E., Carrière, M., Al Nabhani, Z., Barreau, F., 2023. Perinatal foodborne titanium dioxide exposure-mediated dysbiosis predisposes mice to develop colitis through life. *Part. Fibre Toxicol.* 20, 45. <https://doi.org/10.1186/s12989-023-00555-5>
- Cerf-Bensussan, N., Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744. <https://doi.org/10.1038/nri2850>
- Charles, S., Jomini, S., Fessard, V., Bigorgne-Vizade, E., Rousselle, C., Michel, C., 2018. Assessment of the *in vitro* genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context. *Nanotoxicology* 12, 357–374. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1451567>

- Chen, H.-M., Yu, Y.-N., Wang, J.-L., Lin, Y.-W., Kong, X., Yang, C.-Q., Yang, L., Liu, Z.-J., Yuan, Y.-Z., Liu, F., Wu, J.-X., Zhong, L., Fang, D.-C., Zou, W., Fang, J.-Y., 2013. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *Am. J. Clin. Nutr.* 97, 1044–1052. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.046607>
- Chen, J., Dong, X., Zhao, J., Tang, G., 2009. *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J. Appl. Toxicol.* 29, 330–337. <https://doi.org/10.1002/jat.1414>
- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., Xiang, C., 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS One* 7, e39743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039743>
- Chen, Z., Han, S., Zhou, D., Zhou, S., Jia, G., 2019. Effects of oral exposure to titanium dioxide nanoparticles on gut microbiota and gut-associated metabolism *in vivo*. *Nanoscale* 11, 22398–22412. <https://doi.org/10.1039/C9NR07580A>
- Cheng, W.T., Kantilal, H.K., Davamani, F., 2020. The Mechanism of *Bacteroides fragilis* Toxin Contributes to Colon Cancer Formation. *Malays. J. Med. Sci. MJMS* 27, 9–21. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.4.2>
- Cho, E., 2004. Alcohol Intake and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 8 Cohort Studies. *Ann. Intern. Med.* 140, 603. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00007>
- Choi, J.J., Eum, S.Y., Rampersaud, E., Daunert, S., Abreu, M.T., Toborek, M., 2013. Exercise attenuates PCB-induced changes in the mouse gut microbiome. *Environ. Health Perspect.* 121, 725–730. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306534>
- Chrost, 1998. Characterization and significance of beta-glucosidase activity in lake water. *Limnol. Oceanogr.* 660–672.
- Coméra, C., Cartier, C., Gaultier, E., Catrice, O., Panouille, Q., El Hamdi, S., Tirez, K., Nelissen, I., Théodorou, V., Houdeau, E., 2020. Jejunal villus absorption and paracellular tight junction permeability are major routes for early intestinal uptake of food-grade TiO₂ particles: an *in vivo* and *ex vivo* study in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 17, 26. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00357-z>
- Cougnoux, A., Dalmaso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., Pezet, D., Wodrich, H., Darfeuille-Michaud, A., Bonnet, R., 2014. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 63, 1932–1942. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305257>
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., Nougayrède, J.-P., 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11537–11542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001261107>
- d’Herelle, F., 1931. Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 7, 329–348.
- Dalmaso, G., Cougnoux, A., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Bonnet, R., 2014. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes* 5, 675–680. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969989>
- David, C., Boucher, D., Laffaire, J., Peyret, P., Duquennes, P., Brugnot, C., 2009. Suivi de la flore microbiologique des fontaines de biodégradation des graisses. *Hygiène Sécurité Trav.* 25–35.
- De Oliveira Alves, N., Dalmaso, G., Nikitina, D., Vaysse, A., Ruez, R., Ledoux, L., Pedron, T., Bergsten, E., Boulard, O., Autier, L., Allam, S., Motreff, L., Sauvanet, P., Letourneur, D., Kashyap, P., Gagnière, J., Pezet, D., Godfraind, C., Salzert, M., Lemichez, E., Bonnet, M., Najjar, I., Malabat, C., Monot, M., Mestivier, D., Barnich, N., Yadav, P., Fournier, I., Kennedy, S., Mettouchi, A., Bonnet, R., Sobhani, I., Chamailard, M., 2024. The colibactin-producing *Escherichia coli* alters the tumor microenvironment to immunosuppressive lipid overload facilitating colorectal cancer progression and chemoresistance. *Gut Microbes* 16, 2320291. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2320291>
- Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., DeStefano Shields, C.E., Hechenbleikner, E.M., Huso, D.L., Anders, R.A., Giardiello, F.M., Wick, E.C., Wang, H., Wu, S., Pardoll, D.M., Housseau, F., Sears, C.L., 2018. Patients with familial adenomatous polyposis

- harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 359, 592–597. <https://doi.org/10.1126/science.aah3648>
- Denonfoux, J., Parisot, N., Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Boucher, D., Morgavi, D.P., Le Paslier, D., Peyretailade, E., Peyret, P., 2013. Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 20, 185–196. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst001>
- Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., De Vos, W.M., 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>
- Dobrindt, U., Hacker, J., 2001. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 550–557. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00250-2](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00250-2)
- Dorier, M., Béal, D., Marie-Desvergne, C., Dubosson, M., Barreau, F., Houdeau, E., Herlin-Boime, N., Carriere, M., 2017. Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology* 11, 751–761. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1349203>
- Dorier, M., Tisseyre, C., Dussert, F., Béal, D., Arnal, M.-E., Douki, T., Valdiglesias, V., Laffon, B., Fraga, S., Brandão, F., Herlin-Boime, N., Barreau, F., Rabilloud, T., Carriere, M., 2019. Toxicological impact of acute exposure to E171 food additive and TiO₂ nanoparticles on a co-culture of Caco-2 and HT29-MTX intestinal cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 845, 402980. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.004>
- Dougherty, M.W., Jobin, C., 2023. Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. *Gut Microbes* 15, 2185028. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185028>
- Dougherty, M.W., Valdés-Mas, R., Wernke, K.M., Gharaibeh, R.Z., Yang, Y., Brant, J.O., Riva, A., Muehlbauer, M., Elinav, E., Puschhof, J., Herzon, S.B., Jobin, C., 2023. The microbial genotoxin colibactin exacerbates mismatch repair mutations in colorectal tumors. *Neoplasia N. Y.* N 43, 100918. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2023.100918>
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 38, 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Jaziri, F., David, M.M., Denonfoux, J., Lyon, D.Y., Richard, J.-Y., Curvers, C., Boucher, D., Vogel, T.M., Peyretailade, E., Peyret, P., 2012. In situ TCE degradation mediated by complex dehalorespiring communities during biostimulation processes. *Microb. Biotechnol.* 5, 642–653. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00339.x>
- Dugat-Bony, E., Missaoui, M., Peyretailade, E., Biderre-Petit, C., Bouzid, O., Gouinaud, C., Hill, D., Peyret, P., 2011. HiSpOD: probe design for functional DNA microarrays. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 641–648. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq712>
- Dziubańska-Kusibab, P.J., Berger, H., Battistini, F., Bouwman, B.A.M., Iftekhar, A., Katainen, R., Cajuso, T., Crosetto, N., Orozco, M., Aaltonen, L.A., Meyer, T.F., 2020. Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat. Med.* 26, 1063–1069. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0908-2>
- Eaden, J.A., 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535. <https://doi.org/10.1136/gut.48.4.526>
- Earl, J.P., Adappa, N.D., Krol, J., Bhat, A.S., Balashov, S., Ehrlich, R.L., Palmer, J.N., Workman, A.D., Blasetti, M., Sen, B., Hammond, J., Cohen, N.A., Ehrlich, G.D., Mell, J.C., 2018. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome* 6, 190. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0569-2>
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), Younes, M., Aquilina, G., Castle, L., Engel, K., Fowler, P., Frutos Fernandez, M.J., Fürst, P., Gundert-Remy, U., Gürtler, R., Husøy, T., Manco, M., Mennes, W., Moldeus, P., Passamonti, S., Shah, R., Waalkens-Berendsen, I., Wölfle, D., Corsini, E., Cubadda, F., De Groot, D., FitzGerald, R., Gunnare, S., Gutleb, A.C., Mast, J., Mortensen, A., Oomen, A., Piersma, A., Plichta, V., Ulbrich, B., Van Loveren, H., Benford, D.,

- Bignami, M., Bolognesi, C., Crebelli, R., Dusinska, M., Marcon, F., Nielsen, E., Schlatter, J., Vleminckx, C., Barmaz, S., Carfi, M., Civitella, C., Giarola, A., Rincon, A.M., Serafimova, R., Smeraldi, C., Tarazona, J., Tard, A., Wright, M., 2021. Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA J.* 19. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6585>
- Espey, M.G., 2013. Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radic. Biol. Med.* 55, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.554>
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R.Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., De Sutter, L., Lima-Mendez, G., D'hoel, K., Jonckheere, K., Homola, D., Garcia, R., Tigchelaar, E.F., Eeckhaudt, L., Fu, J., Henckaerts, L., Zhernakova, A., Wijmenga, C., Raes, J., 2016. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352, 560–564. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>
- Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Fernandez, A.S., Hashsham, S.A., Dollhopf, S.L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F.B., Hickey, R.F., Criddle, C.S., Tiedje, J.M., 2000. Flexible Community Structure Correlates with Stable Community Function in Methanogenic Bioreactor Communities Perturbed by Glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4058–4067. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4058-4067.2000>
- Fisher, M.M., Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630–4636. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4630-4636.1999>
- Forney, L., Zhou, X., Brown, C., 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.015>
- Frioux, C., Ansoerge, R., Özkurt, E., Ghassemi Nedjad, C., Fritscher, J., Quince, C., Waszak, S.M., Hildebrand, F., 2023. Enterosignatures define common bacterial guilds in the human gut microbiome. *Cell Host Microbe* 31, 1111–1125.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.024>
- Furukawa, K., 2006. Oxygenases and Dehalogenases: Molecular Approaches to Efficient Degradation of Chlorinated Environmental Pollutants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2335–2348. <https://doi.org/10.1271/bbb.60218>
- Futagami, T., Goto, M., Furukawa, K., 2008. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *Chem. Rec. N. Y. N* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1002/tcr.20134>
- Gagnière, J., 2016. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 501. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501>
- Gagnière, J., Bonnin, V., Jarrousse, A.-S., Cardamone, E., Agus, A., Uhrhammer, N., Sauvanet, P., Déchelotte, P., Barnich, N., Bonnet, R., Pezet, D., Bonnet, M., 2017. Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin. Sci.* 131, 471–485. <https://doi.org/10.1042/CS20160876>
- Gao, R., Zhu, Yefei, Kong, C., Xia, K., Li, H., Zhu, Yin, Zhang, X., Liu, Y., Zhong, H., Yang, R., Chen, C., Qin, N., Qin, H., 2021. Alterations, Interactions, and Diagnostic Potential of Gut Bacteria and Viruses in Colorectal Cancer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 657867. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.657867>
- Gasc, C., Ribière, C., Parisot, N., Beugnot, R., Defois, C., Petit-Biderre, C., Boucher, D., Peyretailade, E., Peyret, P., 2015. Capturing prokaryotic dark matter genomes. *Res. Microbiol.* 166, 814–830. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.06.001>
- Georgeson, P., Steinfeldt, R.S., Harrison, T.A., Pope, B.J., Zaidi, S.H., Qu, C., Lin, Y., Joo, J.E., Mahmood, K., Clendenning, M., Walker, R., Aglago, E.K., Berndt, S.I., Brenner, H., Campbell, P.T., Cao, Y., Chan, A.T., Chang-Claude, J., Dimou, N., Doheny, K.F., Drew, D.A., Figueiredo, J.C., French, A.J., Gallinger, S., Giannakis, M., Giles, G.G., Goode, E.L., Gruber, S.B., Gsur, A., Gunter, M.J., Harlid, S., Hoffmeister, M., Hsu, L., Huang, W.-Y., Huyghe, J.R., Manson, J.E., Moreno, V., Murphy, N., Nassir, R., Newton, C.C., Nowak, J.A., Obón-Santacana, M., Ogino, S., Pai, R.K., Papadimitrou, N., Potter, J.D., Schoen, R.E., Song, M., Sun, W., Toland, A.E., Trinh, Q.M., Tsilidis, K., Ugai, T., Um, C.Y., Macrae, F.A., Rosty, C., Hudson, T.J., Winship, I.M., Phipps, A.I., Jenkins, M.A., Peters, U., Buchanan, D.D., 2023. Genotoxic colibactin mutational signature in colorectal cancer is associated with clinicopathological

- features, specific genomic alterations and better survival (preprint). *Oncology*. <https://doi.org/10.1101/2023.03.10.23287127>
- Gerloff, K., Fenoglio, I., Carella, E., Kolling, J., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., Schins, R.P.F., 2012. Distinctive Toxicity of TiO₂ Rutile/Anatase Mixed Phase Nanoparticles on Caco-2 Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 646–655. <https://doi.org/10.1021/tx200334k>
- Giovannucci, E., 2004. Alcohol, One-Carbon Metabolism, and Colorectal Cancer: Recent Insights from Molecular Studies. *J. Nutr.* 134, 2475S-2481S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2475S>
- Giraffa, G., Neviani, E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 19–34. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00445-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00445-7)
- Gitrowski, C., Al-Jubory, A.R., Handy, R.D., 2014. Uptake of different crystal structures of TiO₂ nanoparticles by Caco-2 intestinal cells. *Toxicol. Lett.* 226, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.014>
- Glasby, T.M., Underwood, A.J., 1996. Sampling to differentiate between pulse and press perturbations. *Environ. Monit. Assess.* 42, 241–252. <https://doi.org/10.1007/BF00414371>
- Gray, J.P., Herwig, R.P., 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4049–4059. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4049-4059.1996>
- Gregorieff, A., Clevers, H., 2005. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 19, 877–890. <https://doi.org/10.1101/gad.1295405>
- Gregory, A.C., Zablocki, O., Zayed, A.A., Howell, A., Bolduc, B., Sullivan, M.B., 2020. The Gut Virome Database Reveals Age-Dependent Patterns of Virome Diversity in the Human Gut. *Cell Host Microbe* 28, 724-740.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.003>
- Grimm, V., Wissel, C., 1997. Babel, or the ecological stability discussions: an inventory and analysis of terminology and a guide for avoiding confusion. *Oecologia* 109, 323–334. <https://doi.org/10.1007/s004420050090>
- Guo, Z., Martucci, N.J., Moreno-Olivas, F., Tako, E., Mahler, G.J., 2017. Titanium Dioxide Nanoparticle Ingestion Alters Nutrient Absorption in an In Vitro Model of the Small Intestine. *NanoImpact* 5, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.01.002>
- Hacker, J., Kaper, J.B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 641–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.641>
- Half, E., Bercovich, D., Rozen, P., 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J. Rare Dis.* 4, 22. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-22>
- Hannigan, G.D., Duhaime, M.B., Ruffin, M.T., Koumpouras, C.C., Schloss, P.D., 2018. Diagnostic Potential and Interactive Dynamics of the Colorectal Cancer Virome. *mBio* 9, e02248-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02248-18>
- Harrison, G.W., 1979. Stability under Environmental Stress: Resistance, Resilience, Persistence, and Variability. *Am. Nat.* 113, 659–669. <https://doi.org/10.1086/283424>
- Heller, A., Coffman, S.S., Friedman, K.A., 2019. Obesity-Dependent Accumulation of Titanium in the Pancreas of Type 2 Diabetic Donors. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 1351–1356. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00304>
- Heringa, M.B., Peters, R.J.B., Bleys, R.L. a. W., van der Lee, M.K., Tromp, P.C., van Kesteren, P.C.E., van Eijkeren, J.C.H., Undas, A.K., Oomen, A.G., Bouwmeester, H., 2018. Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications. *Part. Fibre Toxicol.* 15, 15. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0251-7>
- Hummel, T.Z., Kindermann, A., Stokkers, P.C.F., Benninga, M.A., Ten Kate, F.J.W., 2014. Exogenous Pigment in Peyer Patches of Children Suspected of Having IBD. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 58, 477–480. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000221>
- Huo, R.-X., Wang, Y.-J., Hou, S.-B., Wang, W., Zhang, C.-Z., Wan, X.-H., 2022. Gut mucosal microbiota profiles linked to colorectal cancer recurrence. *World J. Gastroenterol.* 28, 1946–1964. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i18.1946>
- Huston, M., McBride, 2002. Evaluating the relative strengths of biotic versus abiotic controls on ecosystem processes, in: *Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives*. Oxford, UK: Oxford University Press., pp. 47–60.
- IARC, 2015. Consumption of red meat and processed meat.

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2018. Red Meat and Processed Meat, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon (FR).
- Iftekhhar, A., Berger, H., Bouznad, N., Heuberger, J., Boccellato, F., Dobrindt, U., Hermeking, H., Sigal, M., Meyer, T.F., 2021. Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing *E. coli* transform primary colon epithelial cells. *Nat. Commun.* 12, 1003. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21162-y>
- Jackstadt, R., Sansom, O.J., 2016. Mouse models of intestinal cancer. *J. Pathol.* 238, 141–151. <https://doi.org/10.1002/path.4645>
- Janin, M., 2023. Mise au point d'une imagerie corrélative MET/NanoSIMS pour identifier, localiser et quantifier des nanoparticules dans les tissus biologiques. Thèse.
- Janus, M., Kusiak-Nejman, E., Rokicka-Konieczna, P., Markowska-Szczupak, A., Zając, K., Morawski, A.W., 2019. Bacterial Inactivation on Concrete Plates Loaded with Modified TiO₂ Photocatalysts under Visible Light Irradiation. *Molecules* 24, 3026. <https://doi.org/10.3390/molecules24173026>
- Jardillier, L., Bettarel, Y., Richardot, M., Bardot, C., Amblard, C., Sime-Ngando, T., Debroas, D., 2005a. Effects of viruses and predators on prokaryotic community composition. *Microb. Ecol.* 50, 557–569. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-5030-y>
- Jardillier, L., Boucher, D., Personnic, S., Jacquet, S., Thénot, A., Sargos, D., Amblard, C., Debroas, D., 2005b. Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status: microcosm experiments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 429–443. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.01.011>
- Jass, J.R., 2007. Gastrointestinal Polyposis: Clinical, Pathological and Molecular Features. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 36, 927–946. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.08.009>
- Jones, K., Morton, J., Smith, I., Jurkschat, K., Harding, A.-H., Evans, G., 2015. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 233, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.005>
- Kachuri, L., Villeneuve, P.J., Parent, M.-É., Johnson, K.C., Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group, Harris, S.A., 2016. Workplace exposure to diesel and gasoline engine exhausts and the risk of colorectal cancer in Canadian men. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 15, 4. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0088-1>
- Kalin, R.M., 2004. Engineered passive bioreactive barriers: risk-managing the legacy of industrial soil and groundwater pollution. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.014>
- Kang, S.J., Kim, B.M., Lee, Y.J., Chung, H.W., 2008. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 399–405. <https://doi.org/10.1002/em.20399>
- Keppler, F., Borchers, R., Pracht, J., Rheinberger, S., Schöler, H.F., 2002. Natural Formation of Vinyl Chloride in the Terrestrial Environment. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2479–2483. <https://doi.org/10.1021/es0156111>
- Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71, 95–122. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.003>
- Khan, S.T., Saleem, S., Ahamed, M., Ahmad, J., 2019. Survival of probiotic bacteria in the presence of food grade nanoparticles from chocolates: an in vitro and in vivo study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 6689–6700. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09918-5>
- Kneis, B., Wirtz, S., Weber, K., Denz, A., Gittler, M., Geppert, C., Brunner, M., Krautz, C., Siebenhüner, A.R., Schierwagen, R., Tyc, O., Agaimy, A., Grützmann, R., Trebicka, J., Kersting, S., Langheinrich, M., 2023. Colon Cancer Microbiome Landscaping: Differences in Right- and Left-Sided Colon Cancer and a Tumor Microbiome-Ileal Microbiome Association. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 3265. <https://doi.org/10.3390/ijms24043265>
- Kong, C., Liang, L., Liu, G., Du, L., Yang, Y., Liu, J., Shi, D., Li, X., Ma, Y., 2023. Integrated metagenomic and metabolomic analysis reveals distinct gut-microbiome-derived phenotypes in early-onset colorectal cancer. *Gut* 72, 1129–1142. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327156>

- Kyrgiou, M., Kalliala, I., Markozannes, G., Gunter, M.J., Paraskevaïdis, E., Gabra, H., Martin-Hirsch, P., Tsilidis, K.K., 2017. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. *BMJ* j477. <https://doi.org/10.1136/bmj.j477>
- Labib, S., Yauk, C., Williams, A., Arlt, V.M., Phillips, D.H., White, P.A., Halappanavar, S., 2012. Subchronic oral exposure to benzo(a)pyrene leads to distinct transcriptomic changes in the lungs that are related to carcinogenesis. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 129, 213–224. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs177>
- Laitinen, S., Linnainmaa, M., Laitinen, J., Kiviranta, H., Reiman, M., Liesivuori, J., 1999. Endotoxins and IgG antibodies as indicators of occupational exposure to the microbial contaminants of metal-working fluids. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72, 443–450. <https://doi.org/10.1007/s004200050397>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H.B., Juncker, A.S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E.G., Brunak, S., Clément, K., Doré, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., De Vos, W.M., Zucker, J.-D., Raes, J., Hansen, T., MetaHIT consortium, Guedon, E., Delorme, C., Layec, S., Khaci, G., Van De Guchte, M., Vandemeulebrouck, G., Jamet, A., Dervyn, R., Sanchez, N., Maguin, E., Haimet, F., Winogradski, Y., Cultrone, A., Leclerc, M., Juste, C., Blottière, H., Pelletier, E., LePaslier, D., Artiguenave, F., Bruls, T., Weissenbach, J., Turner, K., Parkhill, J., Antolin, M., Manichanh, C., Casellas, F., Boruel, N., Varela, E., Torrejon, A., Guarner, F., Denariáz, G., Derrien, M., Van Hylckama Vlieg, J.E.T., Veiga, P., Oozeer, R., Knol, J., Rescigno, M., Brechot, C., M'Rini, C., Mérieux, A., Yamada, T., Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S.D., Pedersen, O., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>
- Lennon, J.T., Jones, S.E., 2011. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- Li, J., Yang, S., Lei, R., Gu, W., Qin, Y., Ma, S., Chen, K., Chang, Y., Bai, X., Xia, S., Wu, C., Xing, G., 2018. Oral administration of rutile and anatase TiO₂ nanoparticles shifts mouse gut microbiota structure. *Nanoscale* 10, 7736–7745. <https://doi.org/10.1039/C8NR00386F>
- Li, N., Ma, L., Wang, J., Zheng, L., Liu, J., Duan, Y., Liu, H., Zhao, X., Wang, S., Wang, H., Hong, F., Xie, Y., 2010. Interaction Between Nano-Anatase TiO₂ and Liver DNA from Mice In Vivo. *Nanoscale Res. Lett.* 5, 108. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9451-2>
- Li, Y., Kundu, P., Seow, S.W., de Matos, C.T., Aronsson, L., Chin, K.C., Kärre, K., Pettersson, S., Greicius, G., 2012. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice. *Carcinogenesis* 33, 1231–1238. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs137>
- Liang, G., Bushman, F.D., 2021. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 514–527. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>
- Liang, P.S., Chen, T., Giovannucci, E., 2009. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 124, 2406–2415. <https://doi.org/10.1002/ijc.24191>
- Lim, J.-H., Bae, D., Fong, A., 2018. Titanium Dioxide in Food Products: Quantitative Analysis Using ICP-MS and Raman Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 66, 13533–13540. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06571>
- Lin, X., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yang, K., Tong, M., Lin, D., 2014. Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of Particle Size, Crystal Phase and Water Chemistry. *PLoS ONE* 9, e110247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110247>
- Lindström, G., Bergström, S., 2004. Runoff trends in Sweden 1807–2002 / Tendances de l'écoulement en Suède entre 1807 et 2002. *Hydrol. Sci. J.* 49, 69–83. <https://doi.org/10.1623/hysj.49.1.69.54000>
- Lindström, J., Kokko, H., Ranta, E., Lindén, H., 1998. Predicting population fluctuations with artificial neural networks. *Wildl. Biol.* 4, 47–53. <https://doi.org/10.2981/wlb.1998.009>

- Liou, J.-W., Chang, H.-H., 2012. Bactericidal Effects and Mechanisms of Visible Light-Responsive Titanium Dioxide Photocatalysts on Pathogenic Bacteria. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 60, 267–275. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0178-x>
- Little, A.E.F., Robinson, C.J., Peterson, S.B., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2008. Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 375–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Liu, W., Zhang, R., Shu, R., Yu, J., Li, H., Long, H., Jin, S., Li, S., Hu, Q., Yao, F., Zhou, C., Huang, Q., Hu, X., Chen, M., Hu, W., Wang, Q., Fang, S., Wu, Q., 2020. Study of the Relationship between Microbiome and Colorectal Cancer Susceptibility Using 16SrRNA Sequencing. *BioMed Res. Int.* 2020, 7828392. <https://doi.org/10.1155/2020/7828392>
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4516-4522.1997>
- Liu, Y., Li, Y., Liu, K., Shen, J., 2014. Exposing to cadmium stress cause profound toxic effect on microbiota of the mice intestinal tract. *PloS One* 9, e85323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085323>
- Lopès, A., Billard, E., Casse, A.H., Villéger, R., Veziant, J., Roche, G., Carrier, G., Sauvanet, P., Briat, A., Pagès, F., Naimi, S., Pezet, D., Barnich, N., Dumas, B., Bonnet, M., 2020. Colibactin-positive *Escherichia coli* induce a procarcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 146, 3147–3159. <https://doi.org/10.1002/ijc.32920>
- Loreau, M., Hector, A., 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412, 72–76. <https://doi.org/10.1038/35083573>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lu, Y., Chen, J., Zheng, J., Hu, G., Wang, J., Huang, C., Lou, L., Wang, X., Zeng, Y., 2016. Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Sci. Rep.* 6, 26337. <https://doi.org/10.1038/srep26337>
- Lucas, C., Salesse, L., Hoang, M.H.T., Bonnet, M., Sauvanet, P., Larabi, A., Godfraind, C., Gagnière, J., Pezet, D., Rosenstiel, P., Barnich, N., Bonnet, R., Dalmasso, G., Nguyen, H.T.T., 2020. Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing *Escherichia coli* in *ApcMin/+* Mice. *Gastroenterology* 158, 1373–1388. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.12.026>
- Luo, S., Ru, J., Mirzaei, M.K., Xue, J., Peng, X., Ralser, A., Mejías-Luque, R., Gerhard, M., Deng, L., 2023. Gut virome profiling identifies an association between temperate phages and colorectal cancer promoted by *Helicobacter pylori* infection. *Gut Microbes* 15, 2257291. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2257291>
- Madigan, M., Martinko, J., 2007. Brock Biology of organisms, in: *Biologie Des Micro-organismes*. France.
- Mangifesta, M., Mancabelli, L., Milani, C., Gaiani, F., de'Angelis, N., de'Angelis, G.L., Van Sinderen, D., Ventura, M., Turrone, F., 2018. Mucosal microbiota of intestinal polyps reveals putative biomarkers of colorectal cancer. *Sci. Rep.* 8, 13974. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32413-2>
- Mao, Z., Li, Y., Dong, T., Zhang, L., Zhang, Y., Li, S., Hu, H., Sun, C., Xia, Y., 2019. Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles During Pregnancy Changed Maternal Gut Microbiota and Increased Blood Glucose of Rat. *Nanoscale Res. Lett.* 14, 26. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2834-5>
- Marongiu, L., Landry, J.J.M., Rausch, T., Abba, M.L., Delecluse, S., Delecluse, H., Allgayer, H., 2021. Metagenomic analysis of primary colorectal carcinomas and their metastases identifies potential microbial risk factors. *Mol. Oncol.* 15, 3363–3384. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13070>
- Matsuo, Y., Komiyama, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., Kryukov, K., Fukuda, A., Morimoto, Y., Naito, Y., Okada, H., Bono, H., Nakagawa, S., Hirota, K., 2021. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore

- sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiol.* 21, 35. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02094-5>
- Mattes, T.E., Alexander, A.K., Coleman, N.V., 2010. Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 445–475. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00210.x>
- Mauri, G., Sartore-Bianchi, A., Russo, A., Marsoni, S., Bardelli, A., Siena, S., 2019. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol. Oncol.* 13, 109–131. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12417>
- McCann, K.S., 2000. The diversity-stability debate. *Nature* 405, 228–233. <https://doi.org/10.1038/35012234>
- Milani, C., Hevia, A., Feroni, E., Duranti, S., Turrone, F., Lugli, G.A., Sanchez, B., Martín, R., Gueimonde, M., van Sinderen, D., Margolles, A., Ventura, M., 2013. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PloS One* 8, e68739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068739>
- Militon, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., Peyretailade, E., Peyret, P., 2010. Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 669–681. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00982.x>
- Miyasaka, T., Yamada, T., Uehara, K., Sonoda, H., Matsuda, A., Shinji, S., Ohta, R., Kuriyama, S., Yokoyama, Y., Takahashi, G., Iwai, T., Takeda, K., Ueda, K., Kanaka, S., Ohashi, R., Yoshida, H., 2024. *Pks*-positive *Escherichia coli* in tumor tissue and surrounding normal mucosal tissue of colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* cas.16088. <https://doi.org/10.1111/cas.16088>
- Mu, W., Wang, Y., Huang, C., Fu, Y., Li, J., Wang, H., Jia, X., Ba, Q., 2019. Effect of Long-Term Intake of Dietary Titanium Dioxide Nanoparticles on Intestine Inflammation in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 67, 9382–9389. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02391>
- Murthy, S.K., Feuerstein, J.D., Nguyen, G.C., Velayos, F.S., 2021. AGA Clinical Practice Update on Endoscopic Surveillance and Management of Colorectal Dysplasia in Inflammatory Bowel Diseases: Expert Review. *Gastroenterology* 161, 1043-1051.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.05.063>
- Musial, J., Krakowiak, R., Mlynarczyk, D.T., Goslinski, T., Stanisiz, B.J., 2020. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products-What Do We Know about Their Safety? *Nanomater. Basel Switz.* 10, 1110. <https://doi.org/10.3390/nano10061110>
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Naeem, S., 2002. Biodiversity: biodiversity equals instability? *Nature* 416, 23–24. <https://doi.org/10.1038/416023a>
- Nakatsu, G., Zhou, H., Wu, W.K.K., Wong, S.H., Coker, O.O., Dai, Z., Li, X., Szeto, C.-H., Sugimura, N., Lam, T.Y.-T., Yu, A.C.-S., Wang, X., Chen, Z., Wong, M.C.-S., Ng, S.C., Chan, M.T.V., Chan, P.K.S., Chan, F.K.L., Sung, J.J.-Y., Yu, J., 2018. Alterations in Enteric Virome Are Associated With Colorectal Cancer and Survival Outcomes. *Gastroenterology* 155, 529-541.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.018>
- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F., 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.007>
- Nava, G.M., Friedrichsen, H.J., Stappenbeck, T.S., 2011. Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *ISME J.* 5, 627–638. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.161>
- Nogueira, C.M., 2012. Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World J. Gastroenterol.* 18, 4729. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i34.4729>
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., Oswald, E., 2006. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* 313, 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1127059>

- Nougayrède, J.-P., Taieb, F., Rycke, J.D., Oswald, E., 2005. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol.* 13, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.002>
- O’Hara, A.M., Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Okumura, S., Konishi, Y., Narukawa, M., Sugiura, Y., Yoshimoto, S., Arai, Y., Sato, S., Yoshida, Y., Tsuji, S., Uemura, K., Wakita, M., Matsudaira, T., Matsumoto, T., Kawamoto, S., Takahashi, A., Itatani, Y., Miki, H., Takamatsu, M., Obama, K., Takeuchi, K., Suematsu, M., Ohtani, N., Fukunaga, Y., Ueno, M., Sakai, Y., Nagayama, S., Hara, E., 2021. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion. *Nat. Commun.* 12, 5674. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25965-x>
- Olsson, L.M., Boulund, F., Nilsson, S., Khan, M.T., Gummesson, A., Fagerberg, L., Engstrand, L., Perkins, R., Uhlén, M., Bergström, G., Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2022. Dynamics of the normal gut microbiota: A longitudinal one-year population study in Sweden. *Cell Host Microbe* 30, 726–739.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.03.002>
- Onishchenko, G.E., Erokhina, M.V., Abramchuk, S.S., Shaitan, K.V., Raspopov, R.V., Smirnova, V.V., Vasilevskaya, L.S., Gmoshinski, I.V., Kirpichnikov, M.P., Tutelyan, V.A., 2012. Effects of titanium dioxide nanoparticles on small intestinal mucosa in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 154, 265–270. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1928-9>
- Pace, N.R., 1995. Opening the door onto the natural microbial world: molecular microbial ecology. *Harvey Lect.* 91, 59–78.
- Pagnout, C., Jomini, S., Dadhwal, M., Caillet, C., Thomas, F., Bauda, P., 2012. Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward *Escherichia coli*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 92, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.12.012>
- Pedata, P., Ricci, G., Malorni, L., Venezia, A., Cammarota, M., Volpe, M.G., Iannaccone, N., Guida, V., Schiraldi, C., Romano, M., Iacomino, G., 2019. In vitro intestinal epithelium responses to titanium dioxide nanoparticles. *Food Res. Int.* 119, 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.041>
- Pedrés-Alió, C., 2012. The rare bacterial biosphere. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 449–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100948>
- Perez, L., Scarcello, E., Ibouaadaten, S., Yakoub, Y., Leinardi, R., Ambroise, J., Bearzatto, B., Gala, J.-L., Paquot, A., Muccioli, G.G., Bouzin, C., Van Den Brule, S., Lison, D., 2021. Dietary nanoparticles alter the composition and function of the gut microbiota in mice at dose levels relevant for human exposure. *Food Chem. Toxicol.* 154, 112352. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112352>
- Périchon, B., Lichtl-Häfele, J., Bergsten, E., Delage, V., Trieu-Cuot, P., Sansonetti, P., Sobhani, I., Dramsi, S., 2022. Detection of *Streptococcus gallolyticus* and Four Other CRC-Associated Bacteria in Patient Stools Reveals a Potential “Driver” Role for Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 794391. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.794391>
- Peters, R.J.B., van Bommel, G., Herrera-Rivera, Z., Helsper, H.P.F.G., Marvin, H.J.P., Weigel, S., Tromp, P.C., Oomen, A.G., Rietveld, A.G., Bouwmeester, H., 2014. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 62, 6285–6293. <https://doi.org/10.1021/jf5011885>
- Phillips, D.H., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 443, 139–147. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00016-2)
- Pimm, S.L., 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature* 307, 321–326. <https://doi.org/10.1038/307321a0>
- Pinget, G., Tan, J., Janac, B., Kaakoush, N.O., Angelatos, A.S., O’Sullivan, J., Koay, Y.C., Sierro, F., Davis, J., Divakarla, S.K., Khanal, D., Moore, R.J., Stanley, D., Chrzanowski, W., Macia, L., 2019. Impact of the Food Additive Titanium Dioxide (E171) on Gut Microbiota-Host Interaction. *Front. Nutr.* 6, 57. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00057>
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Rosendahl Huber, A., van Hoeck, A., Wood, H.M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmaso, G., Stege, P.B., Paganelli, F.L., Geurts, M.H., Beumer, J., Mizutani, T., Miao, Y., van der Linden, R., van der Elst, S., Genomics England Research Consortium, Garcia, K.C., Top, J., Willems, R.J.L., Giannakis, M., Bonnet, R., Quirke, P.,

- Meyerson, M., Cuppen, E., van Boxtel, R., Clevers, H., 2020. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* 580, 269–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2080-8>
- Powell, J.J., Ainley, C.C., Harvey, R.S., Mason, I.M., Kendall, M.D., Sankey, E.A., Dhillon, A.P., Thompson, R.P., 1996. Characterisation of inorganic microparticles in pigment cells of human gut associated lymphoid tissue. *Gut* 38, 390–395. <https://doi.org/10.1136/gut.38.3.390>
- Pradeep Ram, A.S., Boucher, D., Sime-Ngando, T., Debroas, D., Romagoux, J.C., 2005. Phage bacteriolysis, protistan bacterivory potential, and bacterial production in a freshwater reservoir: coupling with temperature. *Microb. Ecol.* 50, 64–72. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0110-y>
- Pritchett, N., Spangler, E.C., Gray, G.M., Livinski, A.A., Sampson, J.N., Dawsey, S.M., Jones, R.R., 2022. Exposure to Outdoor Particulate Matter Air Pollution and Risk of Gastrointestinal Cancers in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiologic Evidence. *Environ. Health Perspect.* 130, 036001. <https://doi.org/10.1289/EHP9620>
- Proquin, H., Jetten, M.J., Jonkhout, M.C.M., Garduño-Balderas, L.G., Briedé, J.J., De Kok, T.M., Chirino, Y.I., Van Loveren, H., 2018. Gene expression profiling in colon of mice exposed to food additive titanium dioxide (E171). *Food Chem. Toxicol.* 111, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.011>
- Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C.G.J., Urrutia Ortega, I.M., Briedé, J.J., de Kok, T.M., van Loveren, H., Chirino, Y.I., 2017. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis* 32, 139–149. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew051>
- Qamar, W., Khan, A.Q., Khan, R., Lateef, A., Tahir, M., Rehman, M.U., Ali, F., Sultana, S., 2012. Benzo(a)pyrene-induced pulmonary inflammation, edema, surfactant dysfunction, and injuries in rats: alleviation by farnesol. *Exp. Lung Res.* 38, 19–27. <https://doi.org/10.3109/01902148.2011.632064>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, Shaochuan, Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, Shengting, Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Songgang, Qin, N., Yang, H., Wang, Jian, Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, Jun, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M., Read, L.F., Sloan, W.T., 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat. Methods* 6, 639–641. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1361>
- Radziwill-Bienkowska, J.M., Talbot, P., Kamphuis, J.B.J., Robert, V., Cartier, C., Fourquaux, I., Lentzen, E., Audinot, J.-N., Jamme, F., Réfrégiers, M., Bardowski, J.K., Langella, P., Kowalczyk, M., Houdeau, E., Thomas, M., Mercier-Bonin, M., 2018. Toxicity of Food-Grade TiO₂ to Commensal Intestinal and Transient Food-Borne Bacteria: New Insights Using Nano-SIMS and Synchrotron UV Fluorescence Imaging. *Front. Microbiol.* 9, 794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00794>
- Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 369–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>
- Ray, A., Nath, D., 2022. Dose dependent intra-testicular accumulation of silver nanoparticles triggers morphometric changes in seminiferous tubules and Leydig cells and changes the structural integrity of spermatozoa chromatin. *Theriogenology* 192, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.027>
- Reya, T., Clevers, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature03319>
- Rivière, C., Beugnot, R., Parisot, N., Gasc, C., Defois, C., Denonfoux, J., Boucher, D., Peyretailade, E., Peyret, P., 2016a. Targeted Gene Capture by Hybridization to Illuminate Ecosystem

- Functioning. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1399, 167–182. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3369-3_10
- Rivière, C., Peyret, P., Parisot, N., Darcha, C., Déchelotte, P.J., Barnich, N., Peyretailade, E., Boucher, D., 2016b. Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Sci. Rep.* 6, 31027. <https://doi.org/10.1038/srep31027>
- Richardot, M., Debroas, D., Jugnia, L.B., Tadonlécé, R., Berthon, L., Dévaux, J., 2000. Changes in bacterial processing and composition of dissolved organic matter in a newly-flooded reservoir (a three-year study). *Fundam. Appl. Limnol.* 148, 231–248. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/148/2000/231>
- Rodríguez-Ibarra, C., Díaz-Urbina, D., Zagal-Salinas, A.A., Medina-Reyes, E.I., Déciga-Alcaraz, A., Hernández-Pando, R., Chirino, Y.I., 2024. Oral exposure to food grade titanium dioxide (E171) induces intestinal and behavioural alterations in adult mice but limited effects in young mice. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ. Soc. Miner. Trace Elem.* 83, 127409. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2024.127409>
- Russo, E., Gloria, L.D., Nannini, G., Meoni, G., Niccolai, E., Ringressi, M.N., Baldi, S., Fani, R., Tenori, L., Taddei, A., Ramazzotti, M., Amedei, A., 2023. From adenoma to CRC stages: the oral-gut microbiome axis as a source of potential microbial and metabolic biomarkers of malignancy. *Neoplasia* 40, 100901. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2023.100901>
- Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., Damon-Soubeyrand, C., Barnich, N., Godfraind, C., Dalmasso, G., Nguyen, H.T.T., 2021. Colibactin-Producing *Escherichia coli* Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model. *Cancers* 13, 2060. <https://doi.org/10.3390/cancers13092060>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sato, Y., Tsujinaka, S., Miura, T., Kitamura, Y., Suzuki, H., Shibata, C., 2023. Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: Epidemiology, Etiology, Surveillance, and Management. *Cancers* 15, 4154. <https://doi.org/10.3390/cancers15164154>
- Scheele, J., Stangl, R., Altendorf-Hofmann, A., 2005. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: Impact of surgical resection on the natural history. *Br. J. Surg.* 77, 1241–1246. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800771115>
- Schwab, C., Berry, D., Rauch, I., Rennisch, I., Ramesmayer, J., Hainzl, E., Heider, S., Decker, T., Kenner, L., Müller, M., Strobl, B., Wagner, M., Schleper, C., Loy, A., Urich, T., 2014. Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. *ISME J.* 8, 1101–1114. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.223>
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14, e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Serrano, A., Gallego, M., González, J.L., Tejada, M., 2008. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. *Environ. Pollut.* 151, 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.04.015>
- Shahmoradi, S.S., Salehzadeh, A., Ranji, N., Habibollahi, H., 2023. Trigger of apoptosis in human liver cancer cell line (HepG2) by titanium dioxide nanoparticles functionalized by glutamine and conjugated with thiosemicarbazone. *3 Biotech* 13, 195. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03609-9>
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 15. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15>
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Sonnenburg, J.L., Angenent, L.T., Gordon, J.I., 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat. Immunol.* 5, 569–573. <https://doi.org/10.1038/ni1079>

- Spencer, P.S., Kim, M.S., Sabri, M.I., 2002. Aromatic as well as aliphatic hydrocarbon solvent axonopathy. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205, 131–136. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00138>
- Sun, X., Cui, Y., Su, Y., Gao, Z., Diao, X., Li, J., Zhu, X., Li, D., Li, Z., Wang, C., Shi, Y., 2021. Dietary Fiber Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Intestinal Barrier Function Damage in Piglets by Modulation of Intestinal Microbiome. *mSystems* 6, e01374-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01374-20>
- Tadonlélé, R.D., Jugnia, L.B., Sime-Ngando, T., Devaux, J., Romagoux, J.C., 2002. Food web structure in the recently flooded Sep Reservoir as inferred from phytoplankton population dynamics and living microbial biomass. *Microb. Ecol.* 43, 67–81. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-1015-7>
- Talamini, L., Gimondi, S., Violatto, M.B., Fiordaliso, F., Pedica, F., Tran, N.L., Sitia, G., Aureli, F., Raggi, A., Nelissen, I., Cubadda, F., Bigini, P., Diomede, L., 2019. Repeated administration of the food additive E171 to mice results in accumulation in intestine and liver and promotes an inflammatory status. *Nanotoxicology* 13, 1087–1101. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1640910>
- Thingstad, T.F., 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1320–1328. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320>
- Thomas, A.M., Manghi, P., Asnicar, F., Pasolli, E., Armanini, F., Zolfo, M., Beghini, F., Manara, S., Karcher, N., Pozzi, C., Gandini, S., Serrano, D., Tarallo, S., Francavilla, A., Gallo, G., Trompetto, M., Ferrero, G., Mizutani, S., Shiroma, H., Shiba, S., Shibata, T., Yachida, S., Yamada, T., Wirbel, J., Schrotz-King, P., Ulrich, C.M., Brenner, H., Arumugam, M., Bork, P., Zeller, G., Cordero, F., Dias-Neto, E., Setubal, J.C., Tett, A., Pardini, B., Rescigno, M., Waldron, L., Naccarati, A., Segata, N., 2019. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nat. Med.* 25, 667–678. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0405-7>
- Thouvenot, A., Debroas, D., Richardot, M., Bertin Jugnia, L., Dévaux, J., 2000. A study of changes between years in the structure of plankton community in a newly-flooded reservoir. *Fundam. Appl. Limnol.* 149, 131–152. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/149/2000/131>
- Tiamani, K., Luo, S., Schulz, S., Xue, J., Costa, R., Khan Mirzaei, M., Deng, L., 2022. The role of virome in the gastrointestinal tract and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, fuac027. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac027>
- Tilman, D., Lehman, C.L., Thomson, K.T., 1997. Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1857–1861. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1857>
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., 2012. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 575–582. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>
- Tomkovich, S., Yang, Y., Winglee, K., Gauthier, J., Mühlbauer, M., Sun, X., Mohamadzadeh, M., Liu, X., Martin, P., Wang, G.P., Oswald, E., Fodor, A.A., Jobin, C., 2017. Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* 77, 2620–2632. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3472>
- Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2004. Oral Exposure to Benzo[*a*]pyrene in the Mouse: Detoxication by Inducible Cytochrome P450 Is More Important Than Metabolic Activation. *Mol. Pharmacol.* 65, 1225–1237. <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1225>
- Urrutia-Ortega, I.M., Garduño-Balderas, L.G., Delgado-Buenrostro, N.L., Freyre-Fonseca, V., Flores-Flores, J.O., González-Robles, A., Pedraza-Chaverri, J., Hernández-Pando, R., Rodríguez-Sosa, M., León-Cabrera, S., Terrazas, L.I., van Loveren, H., Chirino, Y.I., 2016. Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 93, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.014>
- Van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Van Der Kruijssen, C.M.M., Van Waterschoot, R.A.B., Smit, J.W., Song, J.-Y., Van Der Valk, M.A., Van Tellingen, O., Van Der Hoorn, J.W.A., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H., 2007. Knockout of cytochrome P450 3A yields new mouse

- models for understanding xenobiotic metabolism. *J. Clin. Invest.* 117, 3583–3592. <https://doi.org/10.1172/JCI33435>
- Van Kruijsdijk, R.C.M., Van Der Wall, E., Visseren, F.L.J., 2009. Obesity and Cancer: The Role of Dysfunctional Adipose Tissue. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 2569–2578. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0372>
- van Valen, L., 1973. A new evolutionary law. *Evol Theory.*
- Vandecasteele, J., Ourisson, G., 2005. Microbiologie pétrolière: concepts, implications environnementales, applications industrielles.
- Veziant, J., Villéger, R., Barnich, N., Bonnet, M., 2021. Gut Microbiota as Potential Biomarker and/or Therapeutic Target to Improve the Management of Cancer: Focus on Colibactin-Producing *Escherichia coli* in Colorectal Cancer. *Cancers* 13, 2215. <https://doi.org/10.3390/cancers13092215>
- Vieira, A., Vital, N., Rolo, D., Roque, R., Gonçalves, L.M., Bettencourt, A., Silva, M.J., Louro, H., 2022. Investigation of the genotoxicity of digested titanium dioxide nanomaterials in human intestinal cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 161, 112841. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112841>
- Vignard, J., Pettes-Duler, A., Gaultier, E., Cartier, C., Weingarten, L., Biesemeier, A., Taubitz, T., Pinton, P., Bebeacua, C., Devoille, L., Dupuy, J., Boutet-Robinet, E., Feltrin, N., Oswald, I.P., Pierre, F.H., Lamas, B., Mirey, G., Houdeau, E., 2023. Food-grade titanium dioxide translocates across the buccal mucosa in pigs and induces genotoxicity in an *in vitro* model of human oral epithelium. *Nanotoxicology* 17, 289–309. <https://doi.org/10.1080/17435390.2023.2210664>
- Vigneshwaran, R., Ezhilarasan, D., Rajeshkumar, S., 2021. Inorganic titanium dioxide nanoparticles induces cytotoxicity in colon cancer cells. *Inorg. Chem. Commun.* 133, 108920. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108920>
- Viljoen, K.S., Dakshinamurthy, A., Goldberg, P., Blackburn, J.M., 2015. Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between fusobacterium spp., enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer. *PloS One* 10, e0119462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119462>
- Vogel, T.M., Criddle, C.S., McCarty, P.L., 1987. ES&T Critical Reviews: Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21, 722–736. <https://doi.org/10.1021/es00162a001>
- Vogel, T.M., McCarty, P.L., 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1080–1083. <https://doi.org/10.1128/aem.49.5.1080-1083.1985>
- Waldor, M.K., Mekalanos, J.J., 1996. Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science* 272, 1910–1914. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
- Walujkar, S.A., Dhotre, D.P., Marathe, N.P., Lawate, P.S., Bharadwaj, R.S., Shouche, Y.S., 2014. Characterization of bacterial community shift in human Ulcerative Colitis patients revealed by Illumina based 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Gut Pathog.* 6, 22. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-22>
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li, B., Sun, J., 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.* 168, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.12.001>
- Wang, N., Fang, J.-Y., 2023. *Fusobacterium nucleatum*, a key pathogenic factor and microbial biomarker for colorectal cancer. *Trends Microbiol.* 31, 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.08.010>
- Weber, A.M., Ibrahim, H., Baxter, B.A., Kumar, R., Maurya, A.K., Kumar, D., Agarwal, R., Raina, K., Ryan, E.P., 2023. Integrated Microbiota and Metabolite Changes following Rice Bran Intake during Murine Inflammatory Colitis-Associated Colon Cancer and in Colorectal Cancer Survivors. *Cancers* 15, 2231. <https://doi.org/10.3390/cancers15082231>
- Wei, Y., Danesh Yazdi, M., Ma, T., Castro, E., Liu, C.S., Qiu, X., Healy, J., Vu, B.N., Wang, C., Shi, L., Schwartz, J., 2023. Additive effects of 10-year exposures to PM2.5 and NO2 and primary cancer incidence in American older adults. *Environ. Epidemiol.* 7, e265. <https://doi.org/10.1097/EE9.0000000000000265>

- Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 127–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., von Goetz, N., 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2242–2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>
- Wheelis, M.L., Kandler, O., Woese, C.R., 1992. On the nature of global classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2930–2934. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2930>
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6578–6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Willner, D., Furlan, M., Schmieder, R., Grasis, J.A., Pride, D.T., Relman, D.A., Angly, F.E., McDole, T., Mariella, R.P., Rohwer, F., Haynes, M., 2011. Metagenomic detection of phage-encoded platelet-binding factors in the human oral cavity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4547–4553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000089107>
- Wilson, M.R., Jiang, Y., Villalta, P.W., Stornetta, A., Boudreau, P.D., Carrá, A., Brennan, C.A., Chun, E., Ngo, L., Samson, L.D., Engelward, B.P., Garrett, W.S., Balbo, S., Balskus, E.P., 2019. The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science* 363, eaar7785. <https://doi.org/10.1126/science.aar7785>
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271. <https://doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987>
- Wold, A.E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T., Edén, C.S., 1990. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for Escherichia coli type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.* 58, 3073–3077. <https://doi.org/10.1128/iai.58.9.3073-3077.1990>
- Wolin, K.Y., Yan, Y., Colditz, G.A., Lee, I.-M., 2009. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 100, 611–616. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604917>
- Worm, B., Lotze, H.K., Hillebrand, H., Sommer, U., 2002. Consumer versus resource control of species diversity and ecosystem functioning. *Nature* 417, 848–851. <https://doi.org/10.1038/nature00830>
- Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1463–1468. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463>
- Yachida, S., Mizutani, S., Shiroma, H., Shiba, S., Nakajima, T., Sakamoto, T., Watanabe, H., Masuda, K., Nishimoto, Y., Kubo, M., Hosoda, F., Rokutan, H., Matsumoto, M., Takamaru, H., Yamada, M., Matsuda, T., Iwasaki, M., Yamaji, T., Yachida, T., Soga, T., Kurokawa, K., Toyoda, A., Ogura, Y., Hayashi, T., Hatakeyama, M., Nakagama, H., Saito, Y., Fukuda, S., Shibata, T., Yamada, T., 2019. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nat. Med.* 25, 968–976. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0458-7>
- Yan, J., Wang, D., Li, K., Chen, Q., Lai, W., Tian, L., Lin, B., Tan, Y., Liu, X., Xi, Z., 2020. Toxic effects of the food additives titanium dioxide and silica on the murine intestinal tract: Mechanisms related to intestinal barrier dysfunction involved by gut microbiota. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 80, 103485. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103485>
- Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F., Chen, G.Y., Schloss, P.D., 2013. The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. *mBio* 4, e00692-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00692-13>
- Zhong, X., Wang, Y., Xu, J., Cao, H., Zhang, F., Wang, X., 2022. Gut microbiota signatures in tissues of the colorectal polyp and normal colorectal mucosa, and faeces. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 1054808. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1054808>

