

Université de Montréal

**Caractérisation du microbiote tumoral influençant la
réponse immunitaire et de son importance pronostique
dans le cancer du sein**

par Nicolas Boily

Département de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en sciences biomédicales
option médecine expérimentale

Août, 2017

© Nicolas Boily, 2017

Résumé

Une multitude de processus biologiques, dont l'établissement d'un système immunitaire compétant, sont dépendants des bactéries associées au corps humain qui constituent notre microbiote. L'équilibre des espèces bactériennes qui le composent est primordial puisqu'un débalancement est observé dans plusieurs maladies inflammatoires, dont le cancer. De telles perturbations dans l'intestin peuvent même moduler l'efficacité de certaines immunothérapies ou chimiothérapies. Des études récentes indiquent également que des bactéries peuvent être retrouvées à l'intérieur des tumeurs solides chez l'humain, notamment dans le cancer du sein.

Nous avons émis l'hypothèse que la présence bactérienne dans les tumeurs pouvait jouer un rôle dans la progression du cancer du sein, et ce, en présence ou non de traitements. Nos objectifs étaient d'optimiser une méthode de quantification bactérienne par qPCR, de vérifier la présence de bactéries dans les tumeurs d'une cohorte de patients atteints du cancer du sein et de déterminer si nos résultats pouvaient avoir une signification clinique.

Suite à la validation de la technique de quantification, nous avons montré que des équivalents bactériens sont détectables dans plusieurs fragments des tumeurs de notre cohorte et que ceux-ci sont retrouvés en quantité plus élevée dans le tissu normal adjacent à ces tumeurs. Nous avons aussi montré que la détection de bactéries dans les tumeurs est associée à une meilleure survie des patients. De plus, cette amélioration de la survie en présence de bactéries concerne préférentiellement les tumeurs de grade III ou Luminal HER2⁺.

Nous croyons que l'étude approfondie du microbiote des tumeurs et de la réponse immunitaire anti-tumorale qui y est associée permettra de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et pourra mener à l'amélioration des traitements actuels du cancer du sein.

Mots-clés: Cancer du sein, microbiote tumoral, infiltration bactérienne, réaction quantitative de polymérase en chaîne (qPCR), quantification bactérienne, gène de l'ARN 16S (ADN 16S), *E. coli*, validation technique, caractéristiques cliniques, analyse de survie.

Abstract

Many biological processes, including the establishment of a competent immune system, are dependent on the human-associated bacteria which constitute our microbiota. The bacterial species equilibrium is primordial since an imbalance is observed in several inflammatory diseases, including cancer. Such perturbations in the gut can even modulate the effectiveness of certain immunotherapies or chemotherapies. Recent studies also indicate that bacteria can be found inside solid human tumors, including in breast cancer.

We hypothesized that the presence of bacteria in tumors could play a role in the progression of breast cancer, with or without treatments. Our objectives were to optimize a bacterial quantification method by qPCR, to verify the presence of bacteria in tumors from a cohort of patients with breast cancer and to determine if our results could have a clinical significance.

Following the validation of the quantification technique, we have shown that bacterial equivalents are detectable in several tumor fragments from our cohort and are found at higher levels in the normal tissue adjacent to these tumors. We have also shown that the detection of bacteria in tumors is associated with an enhanced patient survival. Furthermore, this improvement of survival in the presence of bacteria preferably concerns grade III or Luminal HER2⁺ tumors.

We believe that a comprehensive study of the tumor microbiota and its associated anti-tumor immune response will help define new therapeutic targets and lead to improvements of current breast cancer treatments.

Keywords: Breast cancer, tumor microbiota, bacterial infiltration, quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), bacterial quantification, 16S RNA gene (16S DNA), *E. coli*, technical validation, clinical characteristics, survival analysis.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xi
Chapitre 1. Introduction	1
1.1 L'attrait du microbiome en recherche médicale	1
1.1.1 Qu'est-ce que le microbiome?	1
1.1.2 Les techniques avancées d'analyse du microbiome.....	2
A) Le gène de l'ARN 16S.....	2
B) La quantification par qPCR	3
C) Le séquençage de nouvelle génération.....	5
D) Les risques de la contamination.....	5
1.1.3 Le potentiel thérapeutique de cibler le microbiome.....	6
1.2 Les relations entre l'hôte et son microbiome	6
1.2.1 Le microbiome intestinal	6
1.2.2 Les lignes de défense intestinales de l'hôte	8
A) Les défenses de type non immunitaire.....	8
B) Les défenses de type immunitaire	10
1.2.3 Les bienfaits du microbiome pour l'hôte	12
1.2.4 Le microbiome ailleurs dans le système	13
1.3 La dysbiose et la translocation bactérienne.....	15
1.3.1 La dysbiose et ses causes	15
1.3.2 La translocation bactérienne	16
1.3.3 Les pathologies associées à la dysbiose et la translocation bactérienne	17

1.4 Les mécanismes cellulaires impliqués dans le cancer	19
1.4.1 L'ontogénie du cancer.....	19
1.4.2 L'évolution du cancer	21
1.4.3 Le rôle du système immunitaire dans le cancer	21
1.5 Le cancer du sein et ses particularités	23
1.5.1 Les caractéristiques spécifiques au cancer du sein	23
1.5.2 La classification des sous-types de cancers du sein.....	24
1.5.3 Les traitements du cancer du sein	25
1.6 La relation du microbiome avec le cancer	27
1.6.1 Le rôle du microbiome dans l'établissement du cancer	27
1.6.2 Les animaux <i>germ-free</i> (GF) et l'impact de la prise d'antibiotiques dans le cancer	28
1.6.3 L'étude du microbiome tumoral dans le cancer.....	29
1.7 Les thérapies du cancer et le microbiome	31
1.7.1 Le rôle du microbiome dans les traitements contre le cancer	31
1.7.2 La thérapie bactérienne contre le cancer.....	32
1.7.3 La modulation du microbiome pour traiter le cancer.....	34
Chapitre 2. Hypothèse et objectifs	36
2.1 Hypothèse du projet	36
2.2 Objectifs du projet.....	36
Chapitre 3. Matériel et méthodes	37
3.1 Provenance des échantillons et considérations éthiques	37
3.2 Culture et manipulation des bactéries	37
3.3 Extraction de l'ADN de suspensions bactériennes ou d'échantillons de tumeurs	38
3.4 Quantification de l'ADN bactérien par qPCR	39
3.5 Statistiques	40
Chapitre 4. Résultats	41
4.1 Établissement de l'équivalence bactérienne nécessaire à la quantification des bactéries dans un échantillon d'ADN.....	41
4.2 La méthode de détection des bactéries par qPCR est fonctionnelle, précise et reproductible.....	42

4.3 Les patients peuvent être classés selon la moyenne en équivalents bactériens des échantillons d'ADN issus de fragments de leur tumeur.....	47
4.4 L'ADN extrait du tissu normal adjacent à la tumeur est plus concentré en équivalents bactériens que la tumeur.....	50
4.5 La classification selon la détection d'équivalents bactériens par qPCR permet de différencier les patients selon certains paramètres cliniques	52
4.6 Le système de classification par équivalents bactériens peut accentuer certains paramètres associés à la survie	54
Chapitre 5. Discussion	57
5.1 Établissement de la référence pour la méthode de quantification des bactéries dans un échantillon d'ADN	57
5.2 La méthode de quantification bactérienne dans l'ADN tumoral par qPCR est robuste .	60
5.3 Analyse des paramètres cliniques des patients de la cohorte ainsi que de la classification des tumeurs.....	63
5.3.1 La sélection des patients et la distribution de leurs données cliniques permettent une analyse approfondie	63
5.3.2 La détection bactérienne dans l'ADN des tumeurs permet la classification des patients atteints du cancer du sein.....	64
5.4 Les bactéries seraient présentes en nombre plus élevé dans le tissu normal adjacent à la tumeur que dans celle-ci.....	68
5.5 Certains paramètres cliniques des patients, incluant la survie, pourraient être associés à la détection bactérienne tumorale.....	69
5.6 La détection bactérienne dans les tumeurs améliore la prédiction de survie de certains paramètres diagnostiques	76
Chapitre 6. Conclusions	79
6.1 Réalisations	79
6.2 Perspectives.....	80
Bibliographie	81
Annexes	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Les options de thérapies adjuvantes du cancer du sein selon le sous-type.	26
Tableau II.	Caractéristiques cliniques des patients de l'étude selon la détection d'équivalents bactériens dans les tumeurs.	52
Tableau SI.	Description des amorces de qPCR.	i
Tableau SII.	Équivalence bactérienne des standards utilisés dans la courbe standard pour la qPCR.	ii
Tableau SIII.	Caractéristiques cliniques des patients de l'étude.	iii
Tableau SIV.	Définition des sous-types de cancer du sein.	v

Liste des figures

Figure 1.	Représentation des régions variables de l'ADN 16S et variabilité inter-espèces.	3
Figure 2.	Représentation schématique de la barrière intestinale et de ses principaux effecteurs cellulaires.....	9
Figure 3.	La quantité d'ADN totale extraite d'une suspension de <i>E. coli</i> est proportionnelle au nombre de bactéries présentes.	41
Figure 4.	La relation entre le cycle du seuil par qPCR et la quantité d'ADN bactérien de la courbe standard est logarithmique.....	43
Figure 5.	La détection d'ADN bactérien dans l'ADN tumoral par qPCR est sensible jusqu'à la limite de détection.	44
Figure 6.	La technique de détection d'ADN bactérien par qPCR permet de détecter et de quantifier l'ajout de bactéries à des fragments tumoraux.	45
Figure 7.	La technique de détection de l'ADN bactérien par qPCR est reproductible.	46
Figure 8.	Classification des patients selon le nombre d'équivalents bactériens détectés dans les fragments tumoraux.	49
Figure 9.	Le nombre d'équivalents bactériens détecté est plus élevé dans le tissu normal adjacent que dans la tumeur d'un même patient.	51
Figure 10.	Les patients ayant une tumeur classée comme «détectable» en équivalents bactériens ont une meilleure survie.	53
Figure 11.	La différence pronostique en lien avec les équivalents bactériens dans la tumeur semble être reliée à un stade ou un grade avancé.....	54
Figure 12.	La différence pronostique reliée aux équivalents bactériens dans la tumeur est accentuée dans le sous-type Luminal HER2 ⁺	56
Figure S1.	La quantité extraite d'ADN d'un fragment est plus élevée lorsque des équivalents bactériens ne sont pas détectables, mais il n'y a pas de relation entre la quantité extraite et le nombre d'équivalents bactériens.	vi
Figure S2.	L'ADN du tissu normal adjacent à la tumeur est plus difficile à extraire.	vii

Liste des sigles

ADN 16S: gène de l'ARN 16S

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN 16S: ARN ribosomal 16S

ARN: acide ribonucléique

ARNr: ARN ribosomal

BCG: *Bacillus Calmette-Guérin*

cellule M: cellule *Microfold*

cellule NK: cellule de type *natural killer*

CPA: cellule présentatrice d'antigène

CpG: cytidine-phosphate-guanosine

Ct : cycle du seuil

D.O.: densité optique

dNTP: désoxyribonucléotide

EMT: transition épithélio-mésenchymateuse

ER: récepteur des estrogènes

FISH: hybridation *in situ* en fluorescence

GF: *germ-free*

HER2: récepteur 2 du facteur de croissance épithélial humain

IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase

IF: immunofluorescence

IFN: interféron

Ig: immunoglobuline

IL: interleukine

ILC: cellule lymphoïde innée

LPS: lipopolysaccharide

MDSC: cellule myéloïde suppressive

PAMP: motif moléculaire associé aux pathogènes

PCR: réaction en chaîne par polymérase

pIgR: récepteur polymérique d'immunoglobuline
PR: récepteur de la progestérone
qPCR: PCR quantitative
ROS: espèce réactive à l'oxygène
S: Svedberg
SCFA: acides gras à chaîne courte
SFB: bactérie filamenteuse segmentée
SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise
Th17: lymphocyte T auxiliaire de type 17
TLR: récepteur de type Toll
TLS: structure lymphoïde tertiaire
Treg: lymphocyte T régulateur
UFC: unité formant colonie
UV: ultra-violet
VEGF: facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH: virus de l'immunodéficience humaine

Liste des abréviations

Et al. : *Et alii* (latin pour : « et autres »)

Etc. : *Et cætera* (latin pour : « et le reste »)

I.t. : intratumoral(e)

I.v. : intraveineux(se)

Remerciements

Pour débiter, j'aimerais remercier tous les gens qui m'ont soutenu de près ou de loin dans mon cheminement scolaire universitaire et dans l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire et du *lab meeting* pour les commentaires toujours constructifs et pertinents qui ont permis l'avancement de ce projet. Un merci particulier à David pour ses recommandations techniques sur la plupart des méthodes utilisées, à Pamela pour son aide dans la correction de ce mémoire et à Stéphanie pour la gestion de la banque de tissus. Également, je veux remercier Zeid et Anne pour leur implication dans les travaux liés à ce projet.

Je souhaite aussi souligner le soutien financier offert par le réseau ThéCell du FRQ-S et l'Institut du cancer de Montréal, sans qui le projet n'aurait pas pu voir le jour.

Merci Réjean pour ton accueil dans le laboratoire et pour m'avoir proposé ce projet étonnant et captivant. Je tiens à te remercier pour tes nombreux conseils qui ont pu faire avancer le projet, mais qui m'ont également aidé dans le développement de mon esprit scientifique.

Je tiens également à saluer mes compatriotes W qui ont su rendre mon parcours universitaire plus qu'agréable et rempli d'événements cocasses et hors du commun.

Pour finir, un merci incommensurable à Marie-France qui a su me soutenir sans arrêt durant l'ensemble de ma maîtrise et qui m'a donné la force nécessaire pour me rendre jusqu'au bout de cette aventure.

Chapitre 1. Introduction

1.1 L'attrait du microbiome en recherche médicale

1.1.1 Qu'est-ce que le microbiome?

L'étude intégrale des maladies humaines peut difficilement s'effectuer sans vérifier l'influence possible qu'exercent les nombreux micro-organismes associés à l'être humain. En effet, la présence et les interactions constantes avec les cellules humaines que maintiennent ces microbes, notamment les bactéries, peuvent avoir des conséquences parfois défavorables, mais parfois favorables, sur la santé. De plus, leur rôle dans de nombreuses conditions pathologiques reste encore à être défini. C'est dans ce contexte que se situe actuellement la recherche sur le microbiome.

Le microbiome est un terme assez large devenu très populaire dans la littérature scientifique, depuis environ 5 ans, atteignant même en 2016 plus de 7 000 publications qui s'y rattachent dans la banque de données PubMed du *National Center for Biotechnology Information* [1]. Puisque les mots microbiome et microbiote peuvent porter à confusion, il est primordial de bien définir ces deux entités ainsi que les autres termes s'y rapprochant. Tout d'abord, le microbiome correspond à l'ensemble des populations microbiennes (bactériennes, archaebactériennes, fongiques, virales et tout autre micro-organisme), la totalité de leurs gènes, ainsi que l'ensemble de leurs interactions avec le microenvironnement dans lequel se trouvent ces populations [2]. Le microenvironnement d'intérêt peut être le corps humain dans son ensemble, mais pourrait également représenter chaque emplacement spécifique contenant des microbes comme le tube digestif, les voies respiratoires ou la peau. Une autre façon de concevoir cette définition, soit avec un concept tiré de l'écologie, est de considérer le microbiome comme un écosystème. Quant au microbiote, il s'agit plutôt d'un terme désignant directement et seulement les micro-organismes présents dans un environnement donné [2]. Il correspond à l'entière des cellules microbiennes contenues dans un microbiome, mais sans tenir compte de leurs métabolites ou de leurs interactions avec le microenvironnement. Par

exemple, la description des populations ou de la diversité des espèces bactériennes présentes dans un microenvironnement distinct ferait appel à cette notion de microbiote.

D'autre part, le métagénome et le métatranscriptome représentent respectivement l'ensemble des gènes ou de seulement ceux qui sont transcrits contenus dans un microbiote [2]. Ainsi, seuls les acides désoxyribonucléiques (ADN) et ribonucléiques (ARN) des micro-organismes sont impliqués lors de l'utilisation de ces deux concepts. Plusieurs des nouvelles techniques de caractérisation du microbiome, comme celles qui seront décrites dans cet ouvrage, sont basées sur l'analyse partielle ou complète de ces acides nucléiques.

Par mesure de simplification dans ce mémoire, l'utilisation des termes préalablement définis ne tiendra compte que des bactéries et non des autres types de micro-organismes. Il en sera ainsi en raison de l'emphase spécifique sur l'étude des bactéries du présent projet.

1.1.2 Les techniques avancées d'analyse du microbiome

A) Le gène de l'ARN 16S

L'ARN ribosomal 16S (ARN 16S) est un type d'ARN ribosomal (ARNr) présent seulement dans les cellules procaryotes et qui fait partie intégrante des ribosomes [3]. Le ribosome bactérien, comme celui eucaryote, est composé de deux sous-unités d'ARN, chacune complexée de plusieurs protéines [3]. Les sous-unités du ribosome bactérien sont nommées selon leur coefficient de sédimentation, en Svedberg (S) : 38S pour la grande sous-unité et 16S pour la petite [3]. Chez l'humain, les deux sous-unités ribosomales sont différentes de celles retrouvées chez les procaryotes, que ce soit par leur coefficient de sédimentation, mais également par la séquence même des gènes codant pour les ARNr présents dans l'assemblage des ribosomes [3]. Les différences évolutives entre les eucaryotes et procaryotes au niveau de cette région d'ADN permettent ainsi l'étude spécifique de l'un ou de l'autre dans un contexte où les deux seraient présents, comme c'est le cas avec le microbiome du corps humain. Une particularité du gène de l'ARN 16S (ADN 16S) est qu'il contient plusieurs régions qui sont hypervariables, si bien qu'il existe même des variations entre les espèces bactériennes [4]. Les différentes régions variables de l'ADN 16S sont représentées schématiquement dans la Figure

1, identifiée de V1 à V9, et sont accompagnées d'un exemple de taux de variabilité de ces régions pour différentes espèces de *Pseudomonas*. La présence de régions très conservées dans le domaine bactérien autour des régions hypervariable, probablement requises dans le fonctionnement des ribosomes, permet l'utilisation d'amorces qui ciblent la totalité des génomes bactériens présents dans un échantillon d'ADN [4].

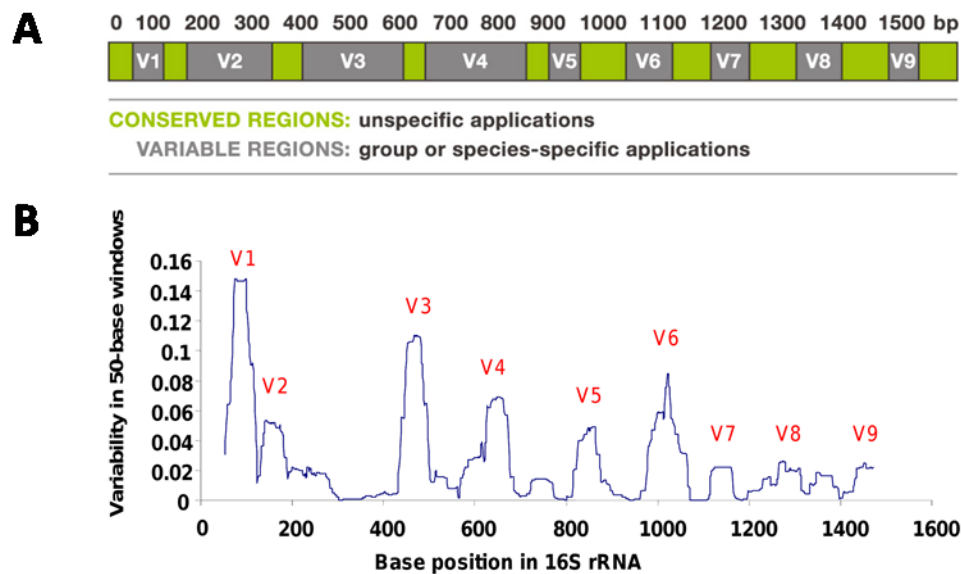


Figure 1. Représentation des régions variables de l'ADN 16S et variabilité inter-espèces.

A. Adapté de Renvoisé A. *et al*, Médecine et maladies infectieuses, 2013 [5]. B. Tiré de Bodilis J. *et al*, PLOS ONE, 2012 [6].

B) La quantification par qPCR

La technique de PCR quantitative (qPCR) permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN et de mesurer, après chaque cycle d'amplification, une indication témoignant de la quantité d'ADN présente [7]. Le principe de base est celui de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et la réaction a lieu dans un thermocycleur qui permet le changement rapide de température [8]. Brièvement, suite à l'extraction de l'ADN de l'échantillon, l'ADN génomique double-brin est ouvert pendant une phase de dénaturation à haute température. Ensuite, des sondes spécifiques aux régions entourant la séquence d'ADN cible à amplifier y sont liées pendant une phase d'hybridation à plus basse température. Finalement, une phase d'élongation permet à l'enzyme polymérase de synthétiser le brin complémentaire de la

séquence cible en utilisant des désoxyribonucléotides (dNTP), ce qui permet éventuellement de reformer une nouvelle molécule d'ADN double-brin. Cette polymérase a une activité optimale à la température utilisée dans cette étape de la réaction. Ces trois phases constituent un cycle de PCR et permettent de doubler, à chaque fois, la quantité d'ADN ciblé par les sondes. Après plusieurs cycles, la séquence cible est détectable en grande majorité.

Comparativement au PCR standard, la qPCR est utile pour calculer la quantité absolue ou relative d'une séquence cible dans les échantillons d'ADN testés [7]. Ceci se fait par la quantification de la fluorescence émise par un colorant présent dans la réaction, souvent le *SYBR Green*, un agent intercalant qui s'insère dans toutes les molécules d'ADN [9]. La fluorescence globale, mesurée directement par le thermocycleur à chaque cycle, correspond donc à la quantité d'ADN présente contenant l'agent intercalant [9]. Il est ainsi possible, afin de quantifier le nombre absolu de copies de la séquence visée dans un échantillon d'ADN, d'utiliser une courbe standard, où chaque standard contient un nombre connu de molécules de la séquence ciblée [7].

Pour ce qui est de l'analyse du microbiome par le métagénome, l'ADN 16S peut servir de séquence cible pour la qPCR, ce qui permet la mise en place d'une technique visant à quantifier le nombre de copies du gène de l'ARN 16S présent dans un échantillon d'ADN [10]. Ce nombre permet ainsi l'approximation de la quantité de bactéries présentes, si l'on considère que chaque bactérie ne contient qu'une seule copie du gène de l'ARN 16S. Toutefois, il a été montré que certaines bactéries contiennent plus d'une copie de ce gène, pouvant aller jusqu'à 15 copies selon l'espèce bactérienne [11]. Tout de même, l'utilisation de la qPCR comme méthode de quantification bactérienne pour des échantillons biologiques humains a déjà été utilisée dans un grand nombre d'études, dont plusieurs étudiant les fèces [12, 13]. Cette technique est avantageuse puisqu'elle permet de quantifier la totalité des bactéries d'un échantillon, sans avoir à connaître les conditions de culture par microbiologie spécifiques à chaque espèce bactérienne.

C) Le séquençage de nouvelle génération

Les avancées technologiques en matière de séquençage ont d'abord permis l'utilisation de l'ADN 16S pour identifier les espèces bactériennes dans les échantillons environnementaux comme le sol ou l'eau [14, 15]. Ensuite, cette technique a été transposée pour l'utilisation d'échantillons biologiques contenant un grand nombre de microorganismes, comme les fèces, puis fut tentée graduellement dans ceux contenant une quantité autrefois considérée pratiquement nulle comme le cerveau ou le cœur [16]. Une des méthodes les plus fréquemment utilisée est le séquençage par synthèse de la compagnie Illumina [17]. Globalement, le brin complémentaire de l'ADN est synthétisé en utilisant comme matrice l'autre brin, fixé à une piste de verre par des adaptateurs. Le regroupement de plusieurs copies de ce brin et la présence d'un fluorochrome spécifique complexé à chaque dNTP permet le séquençage lors de la synthèse du brin complémentaire. De cette façon, il est possible de trouver la séquence spécifique d'acides nucléiques comprise dans les régions variables ciblées par les amorces [18]. Ensuite, la comparaison de ces résultats avec une base de données informatique comprenant les séquences exactes des régions variables de toutes les bactéries connues permet l'identification taxonomique des bactéries présentes dans l'échantillon [18]. Un exemple d'application de cette technologie, qui a permis d'établir un certain consensus de la recherche sur le microbiome, est le *Human Microbiome Project*, alliant plusieurs groupes de recherche et ayant comme objectif de caractériser le microbiome normal de l'être humain [19]. La représentation temporelle du microbiote de plusieurs emplacements du corps humain dans un grand nombre d'individus permet ainsi une référence solide pour des études ultérieures [20].

D) Les risques de la contamination

Toute manipulation visant l'ADN ou l'ARN bactérien est très sensible à la contamination, en raison de la présence quasi-ubiquitaire de bactéries et de leurs acides nucléiques dans l'environnement [21, 22]. S'il advenait qu'une contamination survienne, les résultats pourraient contenir des faux positifs qui ne sont pas originellement présents dans l'échantillon biologique testé, et cet effet est accru lors de l'utilisation d'échantillons à faible biomasse bactérienne. Des études démontrent même la présence de contamination par les acides nucléiques 16S directement dans le matériel provenant de trousse commerciales

d'extraction d'ADN ou de qPCR [23, 24]. Il faut donc prendre de grandes précautions de stérilité lors de ce genre d'étude, mais également inclure des contrôles pour chaque étape du processus en cas de contamination accidentelle. Il existe toutefois des méthodes d'analyses informatiques pour tenter de corriger la contamination suite à celle-ci dans le but de minimiser son impact [25, 26].

1.1.3 Le potentiel thérapeutique de cibler le microbiome

En raison de la baisse du coût des techniques utilisées pour sa caractérisation, de plus en plus d'études s'intéressent au microbiome, ce qui se traduit en un nombre impressionnant de publications dans une multitude de domaines de recherche qui y sont associés. Entre autres, des théories sur le rôle des bactéries dans la progression et le traitement de plusieurs maladies commencent à prendre forme, notamment dans la recherche sur le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) [27] ainsi que sur les maladies inflammatoires chroniques intestinales et le cancer colorectal [28]. La capacité de cibler les bactéries par des antibiotiques ou la colonisation de l'intestin par ces micro-organismes via la prise de probiotiques en font certainement un sujet d'étude prometteur dans le domaine médical. Par contre, pour bien comprendre les différentes façons de manipuler les bactéries dans une optique thérapeutique, il faut se pencher sur l'étendue impressionnante des interactions entre l'être humain et les bactéries constituant son microbiote.

1.2 Les relations entre l'hôte et son microbiome

1.2.1 Le microbiome intestinal

Le microbiome de l'être humain est composé approximativement d'au moins 10^{14} bactéries, ce qui correspond environ à un nombre 10 fois plus grand que le nombre de cellules eucaryotes qui nous composent, et c'est dans l'intestin que se trouve la grande majorité de ces espèces bactériennes [29]. Avec les nouvelles techniques de séquençage, mais également à l'aide de modèles informatiques des systèmes biologiques complexes, il devient plus aisément possible d'étudier l'évolution du microbiote intestinal dans le temps et d'estimer les interactions inter-espèces bactériennes [30]. Il existe également des techniques, comme la microscopie à haute résolution combinée à de l'immunofluorescence (IF) et à de l'hybridation

in situ en fluorescence (FISH), qui permettent l'étude de la représentation spatiale des bactéries dans l'intestin [31]. Globalement, les populations bactériennes retrouvées en plus grande quantité dans l'intestin chez l'humain sont, au niveau taxonomique du phylum, les *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicute* et *Protobacteria* [32]. En temps normal, les bactéries qui colonisent notre système digestif de manière à y rester sont des bactéries dites commensales. Ce terme n'est pas exact puisqu'il suggère, selon sa définition, que les bactéries peuvent profiter de notre corps comme habitat, mais qu'elles ne nous sont ni bénéfiques ou néfaste. Effectivement, de nombreuses études démontrent que ces espèces bactériennes nous sont en réalité très bénéfiques et la description de ces bénéfices sera détaillée dans cet ouvrage. Bien que le terme commensal soit discutable, il sera tout de même utilisé pour décrire les bactéries résidentes de l'intestin.

Les populations de bactéries retrouvées dans le microbiote intestinal ne sont pas les mêmes entre deux individus, ou même à l'intérieur d'un même individu dans le temps [33]. Plusieurs facteurs internes et externes peuvent ainsi faire varier ce microbiote et la diète en est un exemple. En effet, il a été montré que des souris soumises à une diète animale ou élevée en gras, comparativement à une diète végétarienne ou faible en gras, présentaient des changements notables dans leur microbiote intestinal [34, 35]. Selon les auteurs, ce déséquilibre pourrait possiblement causer des effets néfastes liés aux maladies inflammatoires chroniques intestinales ou aux désordres métaboliques. Chez l'être humain, il a été trouvé qu'il existe des différences notables dans le microbiote d'individus ayant une diète de type américaine, riche en produit animaliers, contrairement à ceux ayant une diète méditerranéenne, riche en fruits et légumes [36]. Cette dernière est reconnue comme étant synonyme de santé et est associée à un microbiote enrichi en bactéries qui peuvent dégrader les fibres [36]. Aussi, l'observation du microbiote intestinal d'une communauté de chasseurs-cueilleurs en Afrique a révélé que la diversité des populations bactériennes est plus riche que celles d'Européens en milieu urbain, ce qui témoigne de l'influence possible de la diète et du style de vie particuliers et primitifs auxquels ces individus adhèrent [37].

La variation des populations bactériennes chez un même individu est également dépendante de la perméabilité intestinale, laquelle est augmentée pendant l'enfance, la grossesse et la

vieillesse [38]. Aussi, le mode de délivrance peut faire varier le type de bactéries colonisant l'intestin du nouveau-né, et il est même possible de partiellement rétablir à la normale le microbiote d'un enfant né par césarienne via un transfert du microbiote vaginal de la mère à l'enfant suivant sa naissance [39]. Plusieurs autres facteurs, étudiés chez la souris ou l'humain, peuvent faire varier la composition en population bactérienne du microbiote intestinal dont l'habitat [40, 41], les variations génétiques individuelles reliés à l'immunité [42], le cycle circadien [43] ou même les saisons [44].

1.2.2 Les lignes de défense intestinales de l'hôte

A) Les défenses de type non immunitaire

Afin d'empêcher les milliards de bactéries contenues dans le tube digestif de pénétrer dans la partie interne du corps humain, l'intestin est formé de plusieurs couches, ou tuniques, formées de cellules spécialisées spécifiques à chacune d'entre elles. Les trois tuniques les plus externes sont respectivement séreuse, musculaire, ainsi que vasculaire et nerveuse [45]. C'est toutefois la barrière intestinale directe formée par la quatrième tunique, la muqueuse, qui permet de renforcer l'imperméabilité de l'intestin aux pathogènes. En effet, elle est d'abord composée d'une simple couche de cellules épithéliales, les entérocytes, qui sont surtout liés par des jonctions serrées, bloquant ainsi le passage des bactéries [46]. Une caractéristique de ces cellules est leur auto-renouvellement constant, notamment par des mécanismes d'autophagie qui peuvent être augmentés chez la souris lors d'une infection [47]. Ceci permet, avec une prolifération sous-jacente équilibrée médiée par une couche de cellules souches, de se débarrasser des entérocytes qui seraient infectés et de garder l'intégrité de la barrière intestinale [46]. D'autre part, il y a présence d'une barrière entre le tube digestif et le réseau vasculaire, similaire à la barrière sang/cerveau, mais un peu plus perméable, et qui permet la non-dissémination des bactéries dans l'organisme par les voies sanguines [48].

Plusieurs autres composants cellulaires font partie de la barrière intestinale qu'incarne la tunique muqueuse. D'abord, les *goblet cells* (cellules caliciformes) sont à l'origine de la production d'un composant important du mucus, la glycoprotéine mucine 2, qui permet la formation d'une couche visqueuse recouvrant les entérocytes [49]. Celle-ci a un rôle

primordial dans la défense contre les bactéries, puisqu'elle empêche la colonisation intestinale de certaines bactéries en les capturant dans le mucus, puis en les repoussant grâce au péristaltisme intestinal [50]. Un nouveau genre de cellule caliciforme de type sentinelle a été trouvé chez la souris et permettrait la stimulation de la production de mucus par les cellules caliciformes avoisinantes suite à la détection de bactéries infiltrantes [51]. Ceci serait possible par un mécanisme lié aux voies de signalisation des récepteurs de type Toll (TLR). Pour continuer, la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth, dont le lysozyme et les α -défensines, représente un mécanisme de défense supplémentaire contre les bactéries [52]. D'autre part, certains entérocytes spécialisés, les cellules *Microfold* (cellules M), peuvent faire le lien avec les bactéries et les cellules immunitaires afin d'activer ces dernières [53]. Elles y arrivent par leur forte activité de transcytose, qui permet l'acheminement direct d'antigènes ou de bactéries aux lymphocytes et cellules phagocytaires se trouvant dans la zone juste en dessous des cellules M [53]. La distribution des différents types de cellules impliquées dans la barrière intestinale est représentée à la Figure 2, et celle-ci permet d'apprécier la grande diversité cellulaire requise pour maintenir son intégrité.

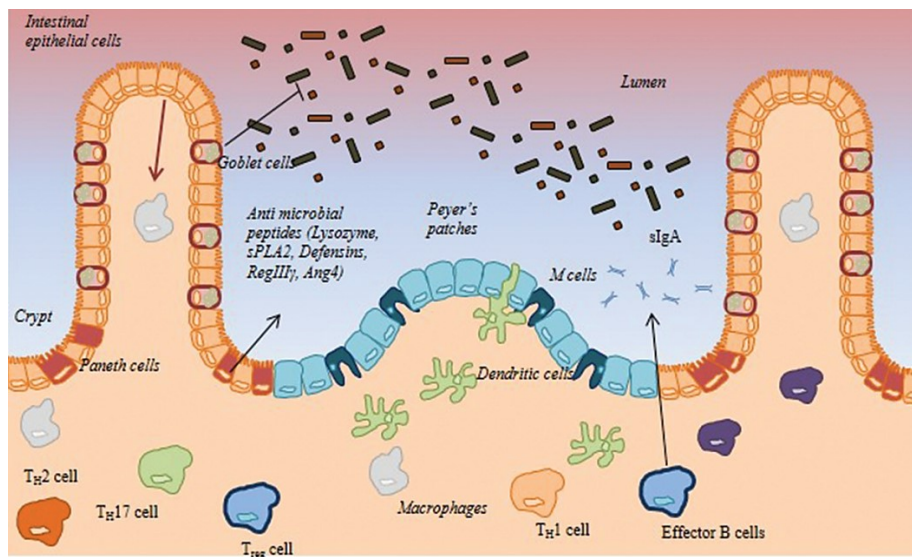


Figure 2. Représentation schématique de la barrière intestinale et de ses principaux effecteurs cellulaires.

Tirée de Chassaing, B. et al, *Biomedical Journal*, 2014 [54].

B) Les défenses de type immunitaire

Les cellules immunitaires de l'intestin sont regroupées dans des plaques lymphoïdes connues sous le nom de *Peyer's patches* (plaques de Peyer) [55]. Tel que montré en partie par la Figure 2, de nombreuses cellules immunitaires sont nécessaires, dont les cellules lymphoïdes innées (ILC), lymphocytes T effecteurs et régulateurs (Treg), lymphocytes B, macrophages et cellules dendritiques. Celles-ci sont requises pour la reconnaissance immunitaire, ou immunité innée, ainsi que pour la réponse immunitaire adaptative spécialisée qui peut s'en suivre envers le microbiote intestinal [56]. Dans une étude chez la souris, la production d'interleukines (IL) et d'interféron (IFN) par certaines cellules immunitaires en réponse à certains stimuli microbiens, dans ce cas l'IL-22 et l'IFN- γ , est observée suite à l'activation de la réponse immunitaire innée [57]. La production de l'IL-22 par les ILC de type 3 permet d'ailleurs de réguler l'expansion des bactéries commensales et, selon cette même étude elle serait dépendante de l'IL-2 et de l'IL-23, respectivement produites par les lymphocytes T et les cellules myéloïdes. Les mécanismes antibactériens découlant de la présence d'IL-22 sont l'augmentation de la production de peptides antimicrobiens et de mucines par les cellules épithéliales, ainsi que le renforcement des jonctions serrées formant la barrière physique [58]. Pour ce qui est de l'IFN- γ , cette molécule peut augmenter la présentation antigénique de classe I et II par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), ce qui permet de faire le lien entre la réponse innée de reconnaissance bactérienne et la réponse adaptative lymphocytaire subséquente [59]. Les stimuli microbiens menant à la réponse immunitaire innée peuvent être, comme discuté précédemment, transmis directement aux cellules immunitaire par les cellules M, qui se retrouvent d'ailleurs presque exclusivement au niveau des plaques de Peyer [60].

Les molécules bactériennes impliquées dans la reconnaissance directe des bactéries par le système immunitaire sont nommées motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Ceux-ci peuvent être des lipopolysaccharides (LPS) provenant de la membrane externe bactérienne, de la flagelline issue des flagelles des bactéries, des motifs d'ARN spécifiques aux bactéries comme le cytidine-phosphate-guanosine (CpG) ou encore des lipopeptides tel le Pam₃CSK₄ [61]. Les TLR permettent la reconnaissance de ces PAMP et la production de

facteurs pro-inflammatoires et d'IFN de type I nécessaires pour l'établissement de la réponse immunitaire adaptative, et ce, classiquement par la voie de signalisation MyD88. [61]. Les TLR sont exprimés par une vaste variété de cellules immunitaires humaines, dont les monocytes, les lymphocytes T et les lymphocytes B [62]. L'augmentation de la présentation antigénique par les CPA permet l'activation et la prolifération de lymphocytes T spécifiques à l'épitope présenté, soit un antigène bactérien [63]. Les lymphocytes T CD8⁺ activés peuvent ainsi participer à la lyse cytotoxique de leur cible si celle-ci parvient à franchir la barrière intestinale. Dans ce cas-ci, la cible constituerait en des bactéries pathogéniques préalablement reconnues par les cellules de l'immunité innée.

Outre la réponse contre une bactérie pathogène spécifique par les lymphocytes T suite à leur activation, un aspect important de la réponse adaptative est la production d'anticorps de type immunoglobuline (Ig) A par les plasmocytes. Les lymphocytes B peuvent produire ces molécules suite à leur activation par d'autres cellules immunitaires dont les lymphocytes T auxiliaires folliculaires pré-activés par les TLR [64]. Ceci permet leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgA [64]. Leur différenciation en plasmocytes et leur capacité à sécréter de l'IgA sont notamment médiées par l'IL-21[65, 66]. Suite à leur sécrétion, les IgA se retrouvent dans la couche de mucus, après une transcytose à travers l'épithélium intestinal facilitée par le récepteur polymérique d'immunoglobuline (pIgR) [67]. Les IgA permettent alors d'empêcher la liaison aux entérocytes de certains pathogènes spécifiques et de limiter la mobilité des bactéries en se liant à celles-ci de façon non spécifique [67].

Une autre molécule importante dans la régulation du microbiote est l'IL-17 produite par les lymphocytes T auxiliaires de type 17 (Th17). Il a été montré, chez la souris, que l'interaction physique des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) sur l'épithélium intestinal peut induire directement la différenciation des lymphocytes T en Th17 [68]. Cette augmentation de la présence de Th17 est retrouvée dans les zones où les SBF sont présentes en plus grande quantité [69]. Une étude chez la souris déficiente en récepteur de l'IL-17 montre que cette interleukine est entre autres nécessaire pour l'expression du peptide antimicrobien α -défensine, ainsi que du pIgR, nécessaire à la transcytose de l'IgA vers le mucus suite à sa sécrétion par les plasmocytes [70].

La suppression des Tregs induite par les cellules épithéliales apoptotiques est aussi un moyen de promouvoir les défenses lymphocytaires en raison de la baisse de l'inhibition de l'inflammation médiée par ces cellules régulatrices [71]. De nombreuses autres cellules et molécules sont impliquées dans le renfort de la barrière intestinale, mais ce portrait de quelques mécanismes immunitaires permet l'appréciation de la variété des processus nécessaires à la régulation du microbiote, témoignant ainsi de son importance dans le maintien de l'homéostasie.

1.2.3 Les bienfaits du microbiome pour l'hôte

Bien que le système immunitaire paraisse en perpétuel combat avec les micro-organismes présents dans le tube digestif, il est devenu important au cours de l'évolution de conserver certaines bactéries commensales non pathogéniques afin de bénéficier d'avantages indispensables qu'elles peuvent nous procurer. Un exemple très simple est la production directe de vitamines par les bactéries. En effet, certaines espèces bactériennes peuvent être à la source de notre apport en biotine, folate, acide pantothénique, pyridoxine, riboflavine ou thiamine [72]. L'aide dans l'absorption de plusieurs molécules indigestibles, comme certains amidons et fibres, issues de la fermentation par des enzymes bactériennes non présentes chez l'humain, est également un bénéfice engendré par la relation de mutualisme entre l'humain et les bactéries intestinales [73]. Des molécules issues de ces fermentations, les acides gras à chaîne courte (SCFA), incluant le butyrate, l'acétate et le propionate, sont des molécules qui peuvent avoir une importante influence pour l'humain, notamment dans le métabolisme du glucose, des lipides et du cholestérol [74].

Les bactéries commensales jouent également un rôle prépondérant dans le maintien de la barrière intestinale, et ce, par plusieurs mécanismes. Ces mécanismes comprennent la compétition nutritionnelle directe avec les bactéries pathogéniques, la production de bactériocines et même la stimulation des défenses du corps humain contre certaines espèces bactériennes nuisibles [75, 76]. Les bactéries résidentes peuvent également faire compétition aux pathogènes par leur attachement aux sites restreints possible d'adhérence des entérocytes [77]. Plusieurs espèces commensales ont d'ailleurs une grande adhésion aux entérocytes, ce

qui augmente leur rétention dans l'intestin leur donnant ainsi un avantage compétitif [78]. L'étude de souris sans microbiote, ou *germ-free* (GF), montre que ces dernières sont beaucoup plus susceptibles aux infections par des bactéries nuisibles comparativement aux souris possédant des bactéries commensales, ce qui confirme bien le caractère protecteur direct des micro-organismes résidents de l'intestin [79].

Un autre aspect essentiel qu'offre la présence bactérienne commensale est son influence sur le développement du système immunitaire. En effet, comme décrit précédemment avec l'induction de Th17 par certaines bactéries, l'induction de plasmocytes sécrétant l'IgA, ainsi que les stimulations et activations immunitaires induites par le microbiote, celui-ci peut avoir un important rôle dans l'établissement de changements dans les populations cellulaires immunitaires [80]. Son impact sur l'immunité est d'autant plus nécessaire pour l'établissement d'un système immunitaire compétent et complet. Effectivement, en plus d'être plus susceptibles aux infections et d'avoir des déficiences immunitaires intestinales, les ganglions mésentériques des souris GF ont des centres germinatifs plus petits et possèdent moins de plasmocytes et de Treg [81]. Il a d'ailleurs été montré que la génération de Treg hors du thymus peut être augmentée par la présence de butyrate, un des SCFA issus de la fermentation par le microbiote intestinal [82]. Le système immunitaire est tolérant aux bactéries dans les premières années de vie et des changements importants de microbiote dans cette période pourraient influencer le développement d'une immunité compétente [83]. De nouvelles observations montrent même la nécessité du microbiote intestinal dans l'établissement d'une réponse immunitaire efficace induite par certains traitements de maladies complexes comme le cancer, mais ceci sera discuté plus en détail ultérieurement.

1.2.4 Le microbiome ailleurs dans le système

Bien que la majorité des bactéries se retrouvent dans le tube digestif, il ne faut toutefois pas croire que les autres bactéries en contact avec le corps humain n'ont aucune fonction ou qu'elles ne nécessitent pas de mécanismes de défense spécialisés. Une grande population microbienne se retrouve constamment sur la peau et sa composition en espèces bactériennes varie grandement selon leur localisation, mais certaines bactéries sont toutefois souvent retrouvées en grande proportion comme *Staphylococcus* et *Propionibacterium* [84]. Par

ailleurs, les poumons constituent également un riche microbiote, étant en contact direct avec l'air extérieur, et, selon une analyse par qPCR de l'ADN 16S de frottis cellulaires du lobe supérieur gauche chez des personnes saines, il peut y avoir 2 000 copies du génome bactérien par cm^2 à cet endroit [85]. Un autre microbiote, souvent étudié pour son association possible avec la prédisposition de maladies transmises sexuellement, est le microbiote de la muqueuse vaginale [86].

Faisant opposition à ce qui était classiquement pensé, un concept nouveau semble se définir dans la littérature suite à l'avènement des études sur le microbiome humain : il n'y aurait aucun emplacement ou presque qui serait réellement stérile, et ce, même chez un individu en bonne santé. En effet, des études métagénomiques chez l'humain montrent que l'on peut retrouver des bactéries, ou du moins leurs acides nucléiques de type 16S, dans le sang [87], dans les voies urinaires et l'urine [88], et même dans certains tissus comme le tissu mammaire [89]. Par exemple, il était déjà connu que des bactéries pouvaient infecter les humains par voie sanguine, mais la nouveauté se situe dans l'amplitude du nombre de bactéries estimé dans le sang d'un donneur sain qui pourrait correspondre, selon l'étude précédemment citée, à environ 4×10^7 copies d'ADN 16S par ml de sang [87]. Ainsi, ces études remettent en question la croyance qui suggère que l'intérieur du corps humain serait complètement stérile en absence de conditions médicales particulières.

Puisque la présente étude se penche sur la caractérisation d'échantillons humains provenant du sein, il est primordial de vérifier si d'autres groupes ont réussi à décrire les espèces bactériennes classiquement retrouvées dans ce tissu. Il n'y a toutefois que très peu de littérature scientifique associée au microbiote du tissu mammaire normal, si bien que l'étude canadienne et irlandaise d'Urbaniak *et al* est possiblement la seule en son genre à ce jour [89]. Dans cet article, les échantillons proviennent de mastectomies et de réductions mammaires de patients du Canada ou de l'Irlande. Quelle que soit la provenance de la cohorte d'origine, il est montré, dans les deux cas, que les quatre phylums bactériens les plus représentés sont respectivement les *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes*. Ceci pourrait indiquer que le microbiote du sein est unique et pourrait rester semblable même avec la variation microbienne engendrée par la localisation différente des cohortes de patients. Il est

également intéressant de noter que des espèces classiquement retrouvées ailleurs, entre autres dans le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires, ont été identifiées dans les tissus mammaires de cette étude. La provenance des bactéries retrouvées dans les tissus mammaires pourrait donc correspondre à ces sites, mais il ne faut pas exclure la possibilité que les bactéries puissent passer directement de la peau au tissu par les canaux galactophores, puisque la présence de bactéries a été dénotée dans le liquide aspiré provenant des mamelons ainsi que dans le lait maternel chez l'humain [90-92]. Ce genre d'études permet l'identification d'espèces bactériennes chez un humain en santé, mais il faut se rappeler que celles-ci peuvent également être perturbées et éventuellement mener à des conditions pathologiques dans certains cas.

1.3 La dysbiose et la translocation bactérienne

1.3.1 La dysbiose et ses causes

La dysbiose est un changement du microbiote, quantitatif ou qualitatif, pouvant mener à une condition pathologique qui est souvent liée à l'inflammation [93]. Ceci peut généralement se traduire par un changement dans la proportion normale d'espèces bactériennes spécifiques ou par une variation de la diversité microbienne retrouvée dans un microbiote donné. Un exemple extrême de dysbiose est l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il a été montré chez l'humain que ce virus causait une perte de la résistance à la colonisation, caractérisée par la déplétion de certaines bactéries commensales et une présence plus importante de pathogènes opportunistes potentiels [94]. Ainsi, par l'altération de la balance entre l'immunité et le microbiote, la forte atteinte des lymphocytes T CD4⁺ causée par ce virus [95] permet d'induire un changement dans la protection offerte par les bactéries commensales, pouvant mener à une augmentation du risque d'infection par des pathogènes. Un moyen différent d'induire une dysbiose est par la chirurgie directe de l'intestin, tel que montré dans une étude chez la souris, où une résection intestinale cause des changements permanents dans la communauté bactérienne de l'iléon [96]. Les infections virales telles le virus de l'influenza peuvent également moduler les populations bactériennes intestinales chez la souris [97].

Des agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de plusieurs maladies peuvent également causer la dysbiose du microbiote intestinal. L'exemple par excellence correspond aux antibiotiques, utilisés spécifiquement pour contrer les infections bactériennes. Bien que leur utilisation soit bénéfique pour régler l'infection initiale, les antibiotiques peuvent changer les populations bactériennes de l'intestin de manière très marquée et même causer des changements qui subsistent suite à l'arrêt de leur utilisation [98]. Dans cette optique, on semble même observer, dans la société, une tendance vers la diminution de la diversité bactérienne intestinale à chaque génération, et cette diminution aurait commencée et progresserait avec la modernisation des techniques sanitaires et la surutilisation d'antibiotiques [99]. D'autre part, la chimiothérapie chez le rat peut induire une inflammation de la muqueuse intestinale caractérisée par une diminution de la diversité du microbiote [100]. Chez l'humain, il a été montré que la chimiothérapie utilisée en prévention de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques induit une dysbiose marquée ainsi qu'un déséquilibre des principales fonctions moléculaires associées au microbiote [101]. Outre les variations subites causées par des maladies ou des traitements, les variations du microbiote causées par tous les autres facteurs de l'environnement comme la diète, le mode de vie et l'habitat d'un être humain, discutés précédemment, pourrait éventuellement favoriser l'établissement d'une dysbiose et mener à certaines pathologies. L'ensemble de ces facteurs d'influence témoigne de l'importance de la caractérisation des espèces bactériennes et de leur diversité.

1.3.2 La translocation bactérienne

Une des conséquences pouvant accompagner la dysbiose intestinale est le passage de bactéries du tube gastro-intestinal vers des sites extra-intestinaux, aussi connu sous le terme de translocation bactérienne [102]. Par exemple, des pathogènes opportunistes comme *Salmonella Typhimurium* peuvent cibler les cellules M, chez la souris, et les utiliser comme porte d'entrée vers la circulation systémique suite à l'échappement des autres mécanismes immunitaires [103-105]. En effet, la destruction des cellules M qui s'en suit pourrait être responsable d'une brèche dans l'intestin, ce qui permettrait une voie d'entrée pour les autres micro-organismes vers les tuniques intestinales plus profondes et éventuellement la circulation systémique [106]. D'autre part, des pathogènes peuvent utiliser le plasminogène de la réparation tissulaire pour induire la dégradation de la matrice extracellulaire afin de traverser

la barrière intestinale, et ce, par plusieurs mécanismes dont l'expression d'enzymes bactériennes activatrices du plasminogène [107-109]. Un autre exemple de mécanisme potentiel d'augmentation de la translocation bactérienne est la variation de la perméabilité épithéliale par certaines maladies. Plusieurs conditions pathologiques liées à la dysbiose de l'intestin comme le cancer colorectal, le diabète, l'obésité et les maladies inflammatoires intestinales mènent, en effet, à une barrière intestinale dysfonctionnelle ou à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium [110]. De plus, l'augmentation de la translocation bactérienne par la dysbiose induite par un changement de diète, chez la souris, a comme conséquence d'augmenter le taux de LPS plasmatique et la quantité d'endotoxines dans le sang, ce qui stimule le système immunitaire par les TLR et mène à un état d'inflammation intestinale [111]. Ainsi, la translocation bactérienne à partir du tube digestif peut être néfaste.

La translocation bactérienne n'a toutefois pas seulement lieu que dans l'intestin. Il y a maintenant des preuves que les bactéries sur la surface de la peau parviennent à pénétrer la peau jusqu'au derme chez l'homme [112]. Cette découverte pourrait indiquer que des interactions entre les bactéries et les cellules eucaryotes de l'humain sont présentes à l'échelle systémique. La forte présence bactérienne dans le sang d'individus sains, telle que décrite précédemment, est également un indice que les mécanismes de défense contre le microbiote du corps humain ne parviennent pas toujours à retenir l'ensemble des bactéries à l'extérieur de l'organisme. Cette présence bactérienne systémique a peut-être une influence positive dans certains processus biologiques, mais cela reste à être étudié. D'autre part, la caractérisation de ces espèces bactériennes dans le plasma, par les nouvelles technologies de séquençage, permet la preuve diagnostique de la présence d'un sepsis lors d'une présence élevée de pathogènes [113]. Cette application du séquençage démontre que l'étude du microbiote à des endroits non classiques peut avoir une importance diagnostique.

1.3.3 Les pathologies associées à la dysbiose et la translocation bactérienne

Évidemment, des maladies infectieuses causées par des pathogènes opportunistes peuvent survenir lors de la dysbiose, comme l'infection pernicieuse impliquant *Clostridium difficile*, qui profite du déséquilibre des populations bactériennes souvent induit par la prise d'antibiotiques [114]. Également, suite à un événement chirurgical ou une brûlure importante,

la présence directe dans le système circulatoire de certains pathogènes, parfois d'origine intestinale, peut mener au choc septique, une complication médicale urgente pouvant mener à la défaillance de plusieurs organes [115, 116]. Des bactéries normalement inoffensives se retrouvant aux mauvais endroits peuvent aussi devenir pathogéniques, notamment lorsque des espèces souvent retrouvées sur la peau, comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*, sont déplacées dans un emplacement où la réponse immunitaire spécifique n'est pas adaptée [117]. Ce concept pourrait aussi être appliqué avec le microbiote du poumon et mener à des infections meurtrières dans un contexte de fibrose kystique [118].

Une composante importante de la dysbiose intestinale et de la translocation bactérienne est l'inflammation chronique instaurée par l'action du système immunitaire réagissant à ces changements microbiens. Plusieurs conditions inflammatoires comme l'obésité, l'asthme, les allergies, les maladies intestinales chroniques, le diabète, ainsi que plusieurs maladies auto-immunes semblent maintenant être influencées par ce genre de dérèglement du microbiote intestinal [119, 120]. Il est même proposé que l'augmentation de la représentation d'un certain phylum bactérien, les *Proteobacteria*, pourrait être une indication commune de dysbiose pour plusieurs de ces conditions [121]. Pour ce qui est des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse, la sur-stimulation constante médiée par des récepteurs de PAMP, comme les TLR, pourrait mener à un état d'inflammation chronique, notamment caractérisé par des réponses immunitaires pathogéniques médiées par les lymphocytes T [122]. D'autre part, dans la maladie du greffon contre l'hôte, il a été montré, chez la souris, que la reconnaissance par les neutrophiles de bactéries intestinales ayant effectué une translocation joue un rôle important dans l'activation des lymphocytes T effecteurs menant à cette condition [123]. Bien entendu, il y a encore plusieurs maladies dans lesquelles le rôle du déséquilibre du microbiote intestinal dans l'inflammation est encore mal compris, comme la cirrhose du foie ou encore le trouble du spectre de l'autisme [124, 125]. De nombreuses études tentent également de démystifier le rôle de la dysbiose et de la translocation bactérienne dans le cancer, mais, avant de les définir, il est important de revenir sur les fondements cellulaires de cette maladie complexe.

1.4 Les mécanismes cellulaires impliqués dans le cancer

1.4.1 L'ontogénie du cancer

Selon les données fournies par le gouvernement du Canada en 2016, un Canadien a approximativement 1 chance sur 4 de mourir d'un cancer au cours de sa vie et environ 80 000 décès liés à cette affection étaient estimés durant la dernière année [126]. Pour bien comprendre cette maladie universelle et ses particularités qui rendent son traitement ardu, il est essentiel de comprendre son origine cellulaire. Le cancer est, d'abord et avant tout, un dérèglement qui mène à une prolifération non contrôlée d'une masse de cellules tumorales, et sa progression peut varier selon une multitude de facteurs [127]. Classiquement, il est établi que la tumeur provient originellement d'une seule cellule dysfonctionnelle et celle-ci acquiert des dérèglements suite à son évolution clonale [128]. Les principaux concepts qui tentent d'expliquer comment une cellule normale peut devenir une cellule cancéreuse sont les suivants : le maintien de signaux prolifératifs, la résistance à la mort cellulaire, l'échappement aux suppresseurs de croissance, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion et des métastases, l'établissement d'une immortalité répliative, la présence d'instabilité génomique et de mutations, le dérèglement des voies cellulaires liées à l'énergie, l'échappement à la destruction par le système immunitaire ainsi que la présence d'inflammation [129]. Les prochains paragraphes décriront quelques mécanismes utilisés par les cellules tumorales pour parvenir à ces états pro-cancéreux.

Tout d'abord, une façon de maintenir une présence accrue de signaux prolifératifs serait de signaler aux cellules environnantes d'enclencher le relâchement de ces molécules. Il a d'ailleurs été montré, pour le carcinome infiltrant du sein, que les fibroblastes associés au tissu tumoral sécrètent la chimiokine CXCL12, qui, suite à sa liaison aux récepteurs CXCR4 des cellules tumorales, peut augmenter leur croissance et l'angiogenèse [130]. D'autre part, pour promouvoir l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour s'assurer de l'afflux constant de nutriments, certaines tumeurs peuvent produire le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [131]. En effet, dans un modèle murin de lymphome par transplantation de moelle osseuse, suite au traitement par anticorps bloquant

des récepteurs du VEGF, la croissance tumorale est arrêtée, notamment en raison de la perte du recrutement des précurseurs de l'endothélium [132]. La tumeur peut aussi devenir insensible aux signaux d'arrêt de prolifération comme c'est le cas avec le C/EBP α , qui n'exerce plus son effet suppresseur de croissance sur les hépatocytes tumoraux en raison de leur activation de la voie de signalisation PI3K/Akt, tel que montré par la culture de lignées cellulaires et de tumeurs de cancer du foie humain [133]. L'activation anormale de cette voie de signalisation par les cellules cancéreuses peut également mener à un dérèglement du métabolisme énergétique cellulaire, notamment par l'augmentation de l'activité de la protéine mTOR qui joue un rôle important dans la biosynthèse des lipides et des protéines [134].

Avec les mécanismes décrits ci-haut, mais également par une multitude d'autres, les cellules tumorales peuvent bénéficier d'un apport énergétique constant, ce qui rend leur croissance presque ininterrompue et leur confère une immortalité répliative. Toutefois, les cellules des tumeurs doivent tout de même être résistantes à l'apoptose, mort cellulaire normale, dans le but de subsister longtemps. En effet, pour contrer l'apoptose, les tumeurs peuvent débalancer l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques, comme Bcl-2 ou p53, diminuer l'activité des caspases, protéines impliquées dans le processus de mort cellulaire, ou encore bloquer la signalisation issue des récepteurs de mort cellulaire [135]. Par exemple, il a été montré, dans une étude d'expression génique de choriocarcinomes humains, qu'une diminution de l'expression des gènes de la caspase 8 et 10 était retrouvée, ce qui pourrait signifier une baisse de l'activité apoptotique [136]. Aussi, l'expression de l'enzyme télomérase dans certains cancers, permettrait l'évitement de la limite de Hayflick, un compte à rebours moléculaire du nombre maximal de divisions qu'une cellule peut effectuer [137, 138]. Finalement, c'est l'instabilité génomique et la présence de mutations qui permet aux cellules d'acquérir la plupart de ces différentes fonctions. En effet, des mutations de type gain de fonction acquises dans un gène, comme avec *ras*, peuvent être directement bénéfiques pour la tumeur et ces gènes sont nommés oncogènes [139]. Contrairement aux oncogènes, les gènes dits suppresseurs de tumeur doivent être mutés dans les deux allèles pour mener à une perte de fonction, comme c'est le cas pour le gène *PTEN* dans le glioblastome [140]. Un autre type de mutation fréquent dans le cancer est la mutation de gènes réparateurs de l'ADN, puisque sans

la réparation adéquate des mutations, leur accumulation pourrait augmenter le risque d'autres mutations bénéfiques à la tumeur [141].

1.4.2 L'évolution du cancer

Bien que les facteurs décrits plus haut permettent la croissance excessive et la survie de la tumeur, celle-ci doit pouvoir échapper aux mécanismes de défenses immunitaires afin de progresser et d'atteindre un stade agressif. Ce stade est celui qui permet à la tumeur d'envahir le tissu normal et de se disséminer dans le corps par des métastases. Les différentes étapes pour y parvenir sont l'invasion des tissus locaux, l'entrée dans les vaisseaux sanguins, la survie dans la circulation, l'arrêt à un site d'intérêt et la sortie des vaisseaux sanguins, ainsi que la formation de métastases au site distant [142]. Pour pouvoir envahir le tissu environnant et parvenir à ces sites distants par la circulation systémique, les cellules cancéreuses épithéliales peuvent passer par une étape de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), qui leur permet d'acquérir des propriétés invasives [143]. Un exemple de ce genre de transformation cellulaire est la perte des propriétés épithéliales, comme celle induite par le facteur de transcription et répresseur Snail qui inhibe l'expression de l'E-cadhérine dans certaines lignées tumorales épithéliales [144]. Bien que très peu des cellules tumorales qui atteignent la circulation sanguine parviennent à devenir des métastases, la plupart des décès liés au cancer sont le résultat de la croissance de celles-ci et de la perte de la réponse aux thérapies utilisées, peut-être en raison du microenvironnement différent dans lequel elles se trouvent [145, 146].

1.4.3 Le rôle du système immunitaire dans le cancer

Pour se rendre jusqu'au stade métastatique, l'échappement à la destruction par le système immunitaire est essentiel. Pour la tumeur, survivre au processus d'immuno-surveillance fait en sorte que seules les cellules insensibles à la destruction par les cellules immunitaires peuvent subsister, ce qui fait appel au concept d'immuno-édition [147]. Selon celui-ci, suite à l'apparition d'une tumeur, il existe une réponse immunitaire précoce visant à détruire ces cellules dérégées. La preuve de cette protection initiale réside dans le fait qu'il y a une susceptibilité plus élevée de certaines tumeurs dans les souris qui ont une absence complète de certaines cellules immunitaires, soit les lymphocytes T, lymphocytes B, ou

cellules de type *natural killer* (NK), ou encore de certaines molécules essentielles à cette réponse immune, comme la perforine, l'IFN- γ et l'IL-12 [148]. L'organisation physique de la réponse immunitaire face au cancer peut se caractériser par la formation de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) à proximité de la tumeur et celles-ci pourraient avoir une valeur pronostique en association avec le score d'infiltration immunitaire dans la tumeur [149]. La présence de ces TLS permettrait de monter une réponse immunitaire très spécialisée et dépendante du microenvironnement tumoral en raison de sa localisation dans le milieu inflammatoire [149].

Par la suite, les cellules ayant résisté à cette ligne de défense, peuvent entrer dans une phase d'équilibre avec le système immunitaire, où seules les cellules tumorales très peu immunogéniques sont sélectionnées, puisqu'elle ne sont pas éliminées [147]. En effet, si le système immunitaire ne peut plus détecter les cellules atteintes, il ne peut plus répondre efficacement et devient inutile dans le contrôle de cette maladie. Les cellules tumorales peuvent utiliser différents mécanismes pour réduire l'efficacité de la réponse immunitaire en établissant un microenvironnement de type suppresseur. Un exemple serait la manipulation des mécanismes d'autorégulation de l'immunité par la tumeur, qui mènerait soit à l'augmentation de cellules inhibitrices comme les Treg ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), ou encore à l'induction de l'expression lymphocytaire de molécules inhibitrices tel l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et les points de contrôle immunologiques suppresseurs comme CTLA4 ou PD-1 [150, 151]. Finalement, toujours selon cette théorie d'immuno-édition, la tumeur parviendrait à prendre le contrôle de la situation et à entrer dans une phase d'échappement qui peut se caractériser par une forte croissance tumorale et par la manifestation clinique du cancer [147].

D'autre part, une avenue thérapeutique de la recherche sur le cancer est d'utiliser le système immunitaire pour combattre les tumeurs, soit par le principe d'immunothérapie. Plusieurs moyens, dont l'injection de cytokines ou de vaccins pour tenter d'induire une réponse immunitaire contre la tumeur, sont maintenant étudiés, mais deux récents types de thérapies, soit le transfert adoptif de lymphocytes T et l'utilisation de bloqueurs de points de contrôle immunitaires, sont intéressants en raison de leur action directe sur la réponse lymphocytaire

[152]. Le transfert adoptif de lymphocytes T consiste en la sélection des lymphocytes T réactifs à la tumeur ainsi qu'à leur amplification *in vitro*, pour ensuite les réinjecter au patient dans le but d'observer une réponse thérapeutique contre la tumeur [153]. Pour ce qui est du ciblage des points de contrôle immunitaires par des anticorps bloquants, il permet la diminution de l'immunosuppression des lymphocytes T, souvent induite par le microenvironnement tumoral, et peut redonner l'avantage aux cellules immunitaires dans le combat contre les cellules tumorales [154]. Bien que les immunothérapies et les autres traitements actuels détiennent un grand potentiel thérapeutique théorique, leur efficacité peut dépendre du type de cancer en raison des particularités reliées à sa localisation et à son origine. C'est pourquoi il est important de connaître les caractéristiques du cancer du sein, sujet d'intérêt de cette étude.

1.5 Le cancer du sein et ses particularités

1.5.1 Les caractéristiques spécifiques au cancer du sein

Le cancer du sein est le type de cancer qui touche le plus les femmes et, bien que le taux de survie après 5 ans soit de 87%, près de 5 000 Canadiennes en sont décédées en 2016 [126]. Pour ce qui est de la susceptibilité au cancer du sein, la mutation du gène BRCA1 ou BRCA2 augmente notablement le risque d'incidence de cette maladie dans les familles atteintes [155]. Des changements à long terme dans les facteurs hormonaux ainsi que le diabète pourraient également augmenter ce risque [126]. La plupart des cancers du sein ont comme origine des cellules glandulaires, ce qui fait alors de la tumeur un adénocarcinome de type carcinome canalaire si elle est présente dans les canaux galactophores, ou de type carcinome lobulaire si elle est présente dans les lobules contenant les cellules productrices de lait maternel [156]. Pour ajouter à cette simple classification selon le tissu d'origine, il est à noter que le carcinome lobulaire est muté pour la cadhérine E[157].

De nombreux paramètres cliniques et pathologiques sont considérés pour déterminer la sévérité de l'atteinte, et ceux-ci peuvent inclure : la taille de la tumeur, la présence de métastases, l'atteinte ganglionnaire, la différenciation et prolifération cellulaire, l'infiltration immunitaire, la localisation tumorale, la mort cellulaire, ainsi que plusieurs autres traits

histologiques et morphologiques. Le stade TNM est une façon de classer les tumeurs selon certains critères. Ceux-ci incluent la taille de la tumeur, l'atteinte des ganglions ainsi que la présence de métastases, ce qui permet au médecin et au patient d'avoir une idée globale de l'état d'avancement du cancer [158]. La tumeur peut également être classée selon son grade, c'est-à-dire en fonction de son potentiel de différenciation et de prolifération, témoignant de son agressivité [159]. En plus de ces classifications, il est possible de distinguer différents sous-types de cancer du sein de manière à mieux orienter le traitement de cette maladie [160].

1.5.2 La classification des sous-types de cancers du sein

Le cancer du sein est très hétérogène au niveau pathologique et dans sa réponse thérapeutique, mais il est possible, suite à un marquage par immunohistochimie, de le classer selon l'expression de certains récepteurs hormonaux ou de facteurs de croissance, comme le récepteur des estrogènes (ER), le récepteur de la progestérone (PR), ainsi que le récepteur 2 du facteur de croissance épithélial humain (HER2) [161]. Cette classification de base peut également dépendre du grade et de l'expression des gènes associés à la prolifération et aux récepteurs hormonaux. Globalement, les tumeurs exprimant au moins un des récepteurs hormonaux (ER ou PR) sont dites de type Luminal et représentent environ le deux tiers des cancers du sein [162, 163]. L'index de prolifération, vérifié par la présence de la molécule Ki-67, ainsi que la présence de HER2 permettent entre autres d'identifier les tumeurs de type Luminal plus agressives, soit respectivement de type Luminal B ou Luminal HER2⁺ [162, 164, 165]. Il est à noter que l'utilisation de Ki-67 pour classer les tumeurs Luminal B reste une approximation. Pour ce qui est des cancers de type non Luminal, ceux qui sur-expriment la molécule HER2 sont classés en tant que HER2⁺, tandis que ceux qui ne l'expriment pas sont dits Triple négatifs [161]. Globalement entre 15 et 20% des cancers du sein sur-expriment la molécule HER2 [166]. La classification des tumeurs selon ces sous-types permet de distinguer la sévérité de chaque sous-type puisque la survie des patients à court et long terme peut y être associée en absence de traitement [167]. Les cancers de type HER2⁺ ou Triple négatifs sont ceux qui sont associés à la moins bonne survie [168]. Il existe aussi une classification des tumeurs de cancer du sein en sous-types selon leur expression génique, mais cette technique demande l'utilisation de certaines techniques plus avancées comme la puce à ADN [169, 170]. En effet, la méthode repose sur l'étude de l'expression de 427 différents gènes qui reflètent les

caractéristiques de la tumeur, ce qui permet la classification en 6 catégories très précises [169, 170]. Ce type de classification a pu être raffiné et le test PAM50 repose maintenant sur seulement 50 gènes [167]. Cette nouvelle classification semble prometteuse pour l'identification du traitement le plus approprié à la tumeur, mais cela devra devenir le standard dans les hôpitaux pour que les patients puissent en bénéficier efficacement.

1.5.3 Les traitements du cancer du sein

Suite à la détection du cancer du sein, le traitement indispensable consiste en une opération chirurgicale ayant pour but de retirer la tumeur et, dans certains cas, les ganglions lymphatiques ainsi que des muscles pectoraux [171]. Il en résulte ainsi une mastectomie partielle ou complète, parfois suivie d'une reconstruction mammaire immédiate [172]. La thérapie adjuvante qui s'en suit peut être de type radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, traitement ciblé, ou une combinaison de ces traitements. Plusieurs patients reçoivent ces traitements avant la chirurgie, alors nommée thérapie de type néo-adjuvante. Toutefois, même si la réponse au néo-adjuvant est bonne, il a été montré que le risque de récurrence reste quand même plus élevé si la chirurgie n'est pas effectuée, ce pourquoi la chirurgie reste indispensable [173]. Les traitements néo-adjuvants doivent également être poursuivis après la chirurgie.

Tout d'abord, la radiothérapie est recommandée dans plusieurs cas pour diminuer le risque de récurrence locale [174]. Toutefois, ce traitement ne doit toutefois pas être donné sans raison, puisqu'il peut, même s'il s'agit d'un faible risque, causer des cancers secondaires en raison de l'exposition à la radiation et du dommage à l'ADN qu'elle peut causer [175, 176]. La radiothérapie est utilisée en raison de son action sur les cellules cancéreuses, et plus spécifiquement les cellules qui se divisent activement. En effet, les dommages induits à l'ADN, par la radiation ionisante, bloquent la prolifération et mènent à la mort cellulaire [177]. Il est évident que lors du traitement, on tente de minimiser l'atteinte de la radiation aux tissus normaux, mais il est possible que ceux-ci soit tout de même atteints, directement ou non [177]. La chimiothérapie, quant à elle, correspond à l'utilisation de molécules cytotoxiques ciblant les cellules en division. Plusieurs types de molécules peuvent être utilisées pour traiter le cancer du sein, ayant comme cible des protéines ou acides nucléiques essentiels aux

différentes phases du cycle cellulaire, ce qui permet son blocage suite à leur action inhibitrice [178, 179]. La chimiothérapie adjuvante est utilisée depuis un grand nombre d'années et permet d'augmenter la survie des patients suite au retrait de la tumeur [180]. D'autre part, il est également possible, pour les tumeurs de type Luminal, d'utiliser l'hormonothérapie dans le but de cibler directement les récepteurs hormonaux. Des exemples sont le tamoxifène qui cible ER ou encore l'inhibition de l'aromatase, nécessaire à la production cellulaire de l'estrogène [181]. La présence ou surexpression de la molécule HER2 peut mener au traitement ciblé contre cette molécule, par l'utilisation d'un anticorps bloquant comme le trastuzumab et/ou le pertuzumab, thérapie presque toujours utilisée en combinaison avec la chimiothérapie [182, 183]. Ainsi, selon le sous-type intrinsèque de la tumeur, qui témoigne lui-même de l'expression de molécules pouvant être ciblées, le patient sera dirigé vers un ou plusieurs types de thérapies adjuvantes, tel que résumé dans le tableau I. La difficulté de traitement du cancer Triple négatif, ou de type Basal, pourrait être expliquée par l'absence de traitement ciblé comme celui contre HER2 ou l'hormonothérapie.

Tableau I. Les options de thérapies adjuvantes du cancer du sein selon le sous-type.

Breast cancer subtype/classification			Adjuvant systemic therapy		
Phenotypic subtype		Intrinsic subtype	Endocrine therapy	Anti-HER2 therapy	Chemotherapy
Hormone receptors	HER2 overexpression				
+	-	Luminal A or B	Yes	No	Yes (if high risk)
+	+	Luminal B or HER2 enriched	Yes	Yes	Yes
-	-	Basal	No	No	Yes
-	+	HER2 enriched	No	Yes	Yes

Tiré de Baskar R. *et al*, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2014 [177].

Une nouvelle avenue de traitement pour le cancer du sein est l'immunothérapie et plusieurs essais cliniques sont présentement en cours dans le but de vérifier son efficacité, incluant notamment des vaccins à ADN, viraux, cellulaires, peptidiques ou protéiques, mais également des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires comme CTLA4 ou PD-1 [184].

1.6 La relation du microbiome avec le cancer

1.6.1 Le rôle du microbiome dans l'établissement du cancer

Un effort scientifique considérable semble être dédié à la caractérisation du microbiote intestinal dans les cas de cancer colorectal, probablement en raison de la proximité de ces tumeurs avec les bactéries du tube digestif. Pour ce type de cancer, plusieurs bactéries potentiellement impliquées dans la carcinogénèse ont été identifiées, souvent en raison de leur surabondance dans le microbiote intestinal, dont *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus Faecalis* et la famille *Prevotellaceae* [185] [186]. Le mode d'action de ces espèces bactériennes peut être soit direct, dû à un métabolite ou toxine spécifique produit par l'espèce bactérienne, ou encore indirect, par l'influence de la présence de la bactérie sur la réponse immunitaire [185, 186]. Par exemple, *Fusobacterium nucleatum* est enrichi dans l'intestin en présence d'adénomes humains [187]. Dans un modèle murin, cette bactérie accélère la carcinogénèse en se liant à l'E-cadhérine par son adhésine FadA, ce qui permet l'activation de la voie de signalisation β -caténine, qui a une forte influence dans la réponse inflammatoire anti-cancéreuse [188]. Un déséquilibre du microbiote intestinal pourrait donc favoriser l'oncogénèse et le développement tumoral par l'augmentation de la présence de certaines espèces bactériennes opportunistes.

De nombreux mécanismes sont à l'étude dans la détermination du rôle des bactéries dans l'établissement du cancer, notamment par le rôle possible de l'inflammation chronique pouvant être causée par une dysbiose bactérienne et une translocation microbienne [189]. Plusieurs mécanismes sont proposés tel l'augmentation de l'activation générale de la voie des TLR ou encore l'infection par un pathogène spécifique [190]. Un des exemple les plus connus de relation de cause à effet du cancer par une bactérie est le cas du cancer de l'estomac et d'*Helicobacter pylori*, dans lequel l'éradication de cette bactérie par des antibiotiques permet la diminution de nouveaux cas de carcinomes [191]. L'infection dans le passé par *H. pylori* est d'ailleurs un facteur de risque dans l'apparition de ce cancer [192]. Aussi, l'augmentation de l'inflammation et de l'activation immunitaire est peut-être liée au rôle du microbiote dans l'établissement de plusieurs types de cancer. En effet, des variations génétiques humaines dans

les récepteurs immunitaires liés au contrôle bactérien, telles celles pouvant affecter le TLR5, peuvent influencer la réponse tumorale [193, 194]. Dans ce même ordre d'idée, il a été montré, dans un modèle murin de néoplasme pancréatique endogène, que la carcinogénèse pouvait être augmentée par la stimulation du TLR4 par le LPS, notamment en raison du rôle du TLR4 dans l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques [195]. Il s'agit d'un exemple qui renforce l'hypothèse selon laquelle une modification de la flore intestinale peut également mener à des cancers non intestinaux, tel que vérifiée dans plusieurs modèles murins, notamment pour le cancer de la peau, du sein, du poumon, du foie et ovarien. [196, 197]. Ainsi, une dysbiose ou translocation bactérienne qui influence la stimulation par les TLR, et par le fait même l'inflammation, pourrait mener à l'augmentation du risque de certains cancers.

1.6.2 Les animaux *germ-free* (GF) et l'impact de la prise d'antibiotiques dans le cancer

Les animaux élevés dans des conditions aseptiques sans bactéries et ceux soumis à une prise d'agents bactériolytiques sont des modèles très utilisés pour étudier l'impact du microbiote intestinal dans le cancer. Plusieurs modèles murins GF sont caractérisés par une incidence moins élevée de tumeurs induites et spontanées [190, 198]. Toutefois, la présence de bactéries commensales pourrait aussi être importante dans la réponse anti-tumorale. Un exemple est la perte de la protection offerte par le microbiote intestinal chez la souris GF. Dans un modèle de cancer colorectal induit par une colite causée un agent perturbant la barrière intestinale, la perte de protection par le microbiote se traduit par l'augmentation du nombre et de la taille des tumeurs [199]. L'influence de l'absence totale de microbiote dans l'établissement du cancer reste donc controversée dans la littérature scientifique et pourrait être dépendante du modèle utilisé. D'autre part, la prise récurrente de certains antibiotiques a été associée à une augmentation du risque de cancers chez l'homme. Par exemple, la prise de pénicilline est associée au cancer colorectal, œsophagien, gastrique, pancréatique et pulmonaire et prostatique [200, 201]. Il y a également des observations montrant l'impact des antibiotiques sur l'incidence du cancer de sein [202]. Chez la souris, il a été montré, dans un modèle de carcinome mammaire spontané, que la fréquence des tumeurs était plus élevée chez les animaux qui recevaient des antibiotiques comparativement à ceux qui n'étaient pas exposés

à ces agents [203]. Pour ce qui est de l'humain, une étude a montré qu'une utilisation plus élevée était associée à un plus haut risque de cancer du sein, et ce, pour plusieurs classes d'antibiotiques [202]. La dysbiose bactérienne induite par la prise d'antibiotique renforce l'hypothèse selon laquelle le microbiote intestinal est un important facteur dans l'établissement d'un système immunitaire apte à réagir contre une tumeur.

1.6.3 L'étude du microbiome tumoral dans le cancer

Bien qu'il soit maintenant assez évident que les bactéries intestinales peuvent jouer un rôle dans l'établissement du cancer et de la réponse anti-tumorale, qu'en est-il des bactéries qui se rendent dans les tumeurs? Le fait que des bactéries puissent se retrouver directement dans les tumeurs est un concept très récent et il existe des technologies pour tenter de détecter des pathogènes dans des échantillons d'ADN de tumeurs, qu'ils soient viraux, bactériens ou d'un autre type [204]. Toutefois, l'étude du microbiote tumoral en tant qu'entité propre à la tumeur est à ses débuts et a, pour l'instant, principalement été étudié dans le cancer colorectal, probablement encore une fois en raison de la proximité entre ces tumeurs et les bactéries. Le fait que des différences peuvent être observées dans le microbiote de la muqueuse intestinale entre des patients atteints du cancer colorectal et des individus sains a probablement aussi participé à encourager la recherche sur les bactéries tumorales [205]. Ainsi, quelques études ont montré que le microbiote tumoral de patients atteints du cancer colorectal était différent de ce que l'on retrouve dans la muqueuse intestinale adjacente à la tumeur ou saine [206-208]. Elles ont aussi montré qu'il pouvait varier en fonction de la localisation dans l'intestin ou de la provenance de la cohorte et que certaines espèces bactériennes pouvaient être sur- ou sous-représentées. Il a été proposé que certaines bactéries tumorales, dites conductrices, pourraient directement induire la carcinogénèse, ce qui permettrait à d'autres bactéries, dites passagères, de profiter de l'environnement tumoral [209]. Ces bactéries passagères pourraient exercer un rôle dans le maintien ou l'altération de la tumeur. Ainsi, la présence de certaines bactéries dans la tumeur pourrait nuire à la réponse immunitaire anti-tumorale. Par exemple, il a été montré que la bactérie *Fusobacterium nucleatum* était présente en plus grande quantité directement dans les adénomes menant au cancer colorectal de patients, ainsi que dans la muqueuse intestinale d'autres patients ayant ce type de cancer [187, 205]. Le mode d'action intratumoral de cette bactérie constitue en la production de la leptine Fap2 qui, suite à sa

liaison avec le point de contrôle immunitaire TIGIT, bloque la réponse cytotoxique des cellules NK et lymphocytes T envers la tumeur [210, 211]. Voilà donc un exemple démontrant que les bactéries peuvent moduler la réponse immunitaire lorsqu'elles se retrouvent dans la tumeur.

Dans le cas des cancers non liés au tube gastro-intestinal, la présence de bactéries dans les tumeurs solides est encore très controversée. Toutefois, selon des données non publiées de nos collaborateurs, du laboratoire américain de Dr. Jennifer Wargo au MD Anderson Cancer Center à Houston au Texas, il y aurait une présence bactérienne dans les tumeurs dans plusieurs types de cancers, tel celui du pancréas, du poumon ou du sein. En effet, plusieurs genres bactériens ont pu être identifiés par séquençage de l'ADN 16S tumoral et ils ont pu mettre au point une technique de quantification bactérienne par qPCR dans 150 ng d'ADN tumoral génomique.

D'autre part, trois études ont plus spécifiquement tenté de caractériser le microbiote de tumeurs ou de tissus du sein provenant de patients atteints du cancer du sein [212-214]. Une première étude a examiné les différences de microbiote entre les tissus normaux adjacents aux tumeurs et les tumeurs elles-mêmes, ainsi que des tissus sains [212]. Les chercheurs ont trouvé qu'il y avait une quantité moins élevée d'ADN bactérien dans les tumeurs, et qu'il semblait y avoir une diminution plus le grade de la tumeur était avancé. La réponse antibactérienne basée sur l'évaluation de l'expression génétique était également moins élevée dans la tumeur que dans les tissus normaux. De plus, la présence de la bactérie *Methylobacterium radiotolerans* se trouvait être plus importante dans les tissus tumoraux. La deuxième étude portait plus spécifiquement sur la comparaison entre le microbiote des tumeurs bénignes et malignes du cancer du sein [213]. Un enrichissement en *Fusobacterium*, *Atopobium*, *Gluconacetobacter*, *Hydrogenophaga* et *Lactobacillus* a été trouvé dans les tumeurs malignes. Cette étude a également permis de prouver que le microbiote des tumeurs était distinct de celui du microbiote du tissu de peau du sein, en surface de cette peau ou de la bouche. La dernière étude se concentrait plutôt sur les différences entre des échantillons de tissu de sein de patients atteints de cancer du sein ou d'individus en santé [214]. Dans cette cohorte, les tissus provenant de patients cancéreux étaient enrichis en *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* et

Staphylococcus. Selon ces chercheurs, les bactéries retrouvées dans la tumeur ou à proximité de celle-ci seraient semblables. Les différences entre les espèces bactériennes trouvées dans les trois études pourraient venir du fait que les types de tissus comparés n'étaient pas les mêmes. Ainsi, la caractérisation du microbiote des tumeurs de cancer du sein est toujours à ses débuts et il n'est pas encore clair quelles espèces bactériennes y sont normalement présentes en plus grande quantité. Pour mieux comprendre comment moduler le microbiote tumoral, suite à son observation et sa caractérisation, il est primordial de vérifier l'influence du microbiome sur les thérapies utilisées dans le traitement du cancer.

1.7 Les thérapies du cancer et le microbiome

1.7.1 Le rôle du microbiome dans les traitements contre le cancer

En plus d'avoir un impact dans l'établissement ou la progression tumorale, le microbiote intestinal est également impliqué dans la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par certains traitements du cancer. Il a d'ailleurs été montré, dans un modèle de tumeurs sous-cutanées murin, que l'absence de microbiote intestinal dans les souris GF, ou encore la prise orale d'un cocktail de plusieurs antibiotiques, est synonyme d'une moins bonne réponse immunitaire suite à l'immunothérapie par le CpG couplée à un anticorps bloquant du récepteur de l'IL-10 [215]. Cet effet était notamment associé à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules myéloïdes intratumorales. Cette étude a également démontré que la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), nécessaires à l'action cytotoxique de la chimiothérapie à l'oxaliplatine, est dépendante d'un microbiote intestinal non perturbé par les antibiotiques. Dans une deuxième étude, la réponse thérapeutique à la chimiothérapie avec la cyclophosphamide chez la souris était dépendante du microbiote intestinal et les tumeurs de souris GF ou traitées avec des antibiotiques contre les bactéries de type Gram positif étaient résistantes à ce traitement [216]. Dans ce cas-ci, la diminution de la stimulation des Th17 par les bactéries ayant effectué une translocation bactérienne à travers la membrane digestive suite à la prise de chimiothérapie était la cause de la perte de la réponse immunitaire nécessaire à l'action de la cyclophosphamide. Deux récentes études d'importance, menées par les groupes de Zitvogel L. et Gajewski T. F. et parues dans la revue *Science*, ont montré que certaines bactéries intestinales étaient

nécessaires à la réponse thérapeutique optimale dans l'immunothérapie par blocage des points de contrôle immunitaires CTLA4 et PD-L1 [217, 218]. Il est ainsi maintenant défini que le microbiote intestinal peut optimiser et même être nécessaire dans certaines thérapies du cancer. D'autre part, les bactéries à l'intérieur des tumeurs pourraient également avoir un impact sur les thérapies du cancer, mais ceci reste encore à être étudié dans le futur. Toutefois, des bactéries ont déjà été utilisées comme moyen thérapeutique direct ou en combinaison à un autre traitement, et ce, dans plusieurs modèles animaux de néoplasie.

1.7.2 La thérapie bactérienne contre le cancer

L'idée que les bactéries pourraient être utilisées dans le traitement du cancer n'est pas récente. En effet, en 1891, William Coley administrait des bactéries vivantes de type *Streptococcus* à des patients atteints de sarcome des os longs dans le but d'obtenir une diminution de la taille des tumeurs [219]. Ensuite, en raison de l'infection parfois mortelle qui s'en suivait, il administra plutôt un mélange nommé toxine de Coley, constitué de *Streptococcus pyogenes* et *Serratia marcescens*, cette fois-ci tuées par la chaleur, et ce traitement parvint à guérir près de la moitié des patients à qui il fut administré lors de sa carrière [219, 220]. Le travail de Coley est considéré comme l'une des premières formes d'immunothérapie en raison de la stimulation immunitaire causée par son traitement, d'où son titre populaire de père de l'immunothérapie [219]. D'autre part, l'utilisation de bactéries comme adjuvant à la vaccination est également activement sous étude puisqu'elle permet de stimuler plus efficacement le système immunitaire contre des pathogènes, et ce même genre de concept pourrait être appliqué à la stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale suite à un traitement [221]. En effet, une forme de traitement pro-immunitaire du cancer avec les bactéries, cette fois-ci toujours utilisée à ce jour pour le cancer de la vessie, est celui impliquant le *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), une forme atténuée de la bactérie *Mycobacterium Bovis* [222]. Bien que le mécanisme exact de son action sur le système immunitaire soit toujours discuté, l'analyse de plusieurs études étudiant son efficacité permet d'affirmer que cette forme de thérapie est fonctionnelle pour ce type de cancer [222, 223].

Une autre approche, toujours en développement, est l'utilisation de bactéries ayant le potentiel de se répliquer spécifiquement à l'intérieur des tumeurs dans l'espoir que ceci mène à la

diminution de la croissance tumorale. En effet, l'utilisation de bactéries anaérobiques qui cibleraient la zone hypoxique des tumeurs, tel *Bifidobacterium longum*, permet le ciblage de la tumeur par les bactéries puisque, 168 heures après injection intraveineuse (*i.v.*), la tumeur est le seul emplacement testé où la bactérie est retrouvée [224]. De plus, une étude montréalaise a montré qu'il est possible d'utiliser cette caractéristique ainsi que la propriété magnétotactique de *Magnetococcus marinus* pour livrer un médicament en zone tumorale *in vivo* [225]. Les spores de *Clostridium novyi* atténués, bactéries à anaérobie obligatoire, sont présentement en essai clinique de phase I comme traitement de tumeurs solides réfractaires aux traitements, en raison de leur effet anti-tumoral observé chez la souris, le lapin, le chien et même chez un patient [226].

Une autre bactérie d'intérêt dans le traitement du cancer est *Salmonella Thyphimurium*, en raison de ses capacités d'invasion et de survie à l'intérieur des cellules, ainsi que du fait qu'elle soit à anaérobie facultative [227]. D'ailleurs, son atténuation permet de réduire la taille tumorale dans des modèles murins et une souche atténuée, nommée VNP20009, fut utilisée dans une étude clinique de traitement du mélanome [227, 228]. Toutefois, dans cette étude clinique, bien que l'injection *i.v.* des bactéries n'aie induit que très peu d'effets secondaires, la colonisation des tumeurs humaines n'était pas au point et le traitement était inefficace [228]. Toutefois, d'autres modifications de *Salmonella Thyphimurium* ont été tentées pour augmenter son efficacité dans les modèles murins, dont l'induction de la production de flagelline ou d'IFN- γ pour mieux stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale [229, 230]. Une autre modification, effectuée dans le laboratoire du Dr. Robert Hoffman semble aussi prometteuse pour le traitement du cancer. Celle-ci, nommée *Salmonella Thyphimurium* A1-R, fut sélectionnée en raison de sa faible toxicité dans des souris immuno-déficientes et en raison de sa forte virulence sur des cellules cancéreuses [231]. Selon ces chercheurs, cette souche permet de cibler les tumeurs plus spécifiquement en raison de mutations qui empêchent la survie des bactéries en raison d'un manque de nutriments. En effet, ces nutriments seraient retrouvés en plus grande abondance dans le microenvironnement tumoral. Le groupe a ainsi montré que l'injection de bactéries *i.v.* ou intratumorale (*i.t.*) de cette bactérie parvient à améliorer la survie et à diminuer la croissance tumorale, avec et/ou sans traitement, dans une grande variété de modèles murins, de lignées tumorales humaines et de xénogreffes dérivées

de tissus cancéreux de patients, dont le cancer du sein et du colon [232, 233]. De plus, la combinaison de cette souche bactérienne avec l'immunothérapie par PD-L1 ou par le transfert adoptif de lymphocytes T peut mener à un plus haut taux de rejet tumoral chez la souris [234, 235]. Outre l'injection directe de bactéries visant les tumeurs pour améliorer la réponse anti-tumorale, il existe d'autres moyens d'utiliser le microbiome de façon thérapeutique dans plusieurs maladies.

1.7.3 La modulation du microbiome pour traiter le cancer

Le microbiote intestinal est une cible thérapeutique de choix, notamment en raison de la facilité des agents thérapeutiques à l'atteindre via une administration par voie orale, et plusieurs moyens sont employés pour tenter de le modifier ou de l'exploiter. D'abord, il est possible de le modifier drastiquement en administrant des agents cytotoxiques comme les antibiotiques, tel que discuté précédemment, mais ceci peut mener à des complications, notamment à l'infection par des pathogènes opportunistes. Une approche plus ciblée permettrait de diminuer ces effets secondaires néfastes, par exemple, en utilisant des antibiotiques à spectre plus étroit ou des anticorps neutralisant spécifiquement les bactéries d'intérêt [236, 237]. D'autre part, il est aussi possible de modifier le microbiome intestinal par l'ingestion de bactéries ou de leurs métabolites. En effet, l'utilisation de probiotiques, c'est-à-dire de bactéries vivantes, est possible dans un objectif de promotion de la présence de bactéries commensales non pathogéniques, et est étudiée pour une multitude de conditions associées à une dysbiose bactérienne, dont la gastroentérite et le syndrome du côlon irrité [238, 239]. L'utilisation de prébiotiques, les métabolites bactériens, permet également de modifier le microbiote intestinal chez la souris et l'humain [240, 241]. Une autre façon prometteuse de modifier les espèces bactériennes intestinales correspond au transfert fécal d'un individu sain vers un individu malade. Effectivement, cette technique a été utilisée dans le traitement de l'infection à *Clostridium difficile* et pourrait l'être éventuellement dans d'autres conditions médicales comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [242, 243].

Ainsi, il est intéressant de croire que changer le microbiote intestinal selon l'une ou l'autre de ces méthodes pourrait optimiser le rôle du microbiote intestinal pour la stimulation du système

immunitaire dans le cancer. D'ailleurs, un groupe a également montré que des souris ayant le même bagage génétique, mais provenant de deux fournisseurs différents, avaient une réponse anti-tumorale basale différente et que celle-ci pouvait être rétablie par le transfert fécal ou la cohabitation des souris dans une même cage [217]. D'autre part, la modulation du microbiote intestinal pourrait également mener à une meilleure efficacité des traitements en immunothérapie, en raison de l'étroite relation entre le microbiome et le système immunitaire [244]. Bien qu'il soit faisable de modifier le microbiote intestinal, il est intéressant de croire qu'il serait possible, dans un futur rapproché, de modifier directement le microbiome tumoral, soit en privilégiant la présence de bactéries associées à une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale, ou en éliminant les bactéries néfastes. Toutefois, avant d'arriver à utiliser le potentiel du microbiote tumoral, il demeure important de savoir caractériser cette présence de bactéries dans les tumeurs solides éloignées du tube gastro-intestinal puisqu'il s'agit d'un sujet encore controversé.

Chapitre 2. Hypothèse et objectifs

2.1 Hypothèse du projet

Bien que la croyance populaire suggère qu'une grande partie des tissus est stérile et d'autant plus qu'un nombre très restreint d'études ont tenté de la caractériser, la présence bactérienne à l'intérieur des tumeurs est possible. D'ailleurs elle est détectée dans les tumeurs du cancer colorectal, mais aussi dans des tumeurs éloignées du tube digestif, comme dans le cas du cancer du sein, tel que montré par quelques études ainsi que par les données non publiées de nos collaborateurs. De plus, il est clair que la réponse immunitaire anti-tumorale basale ou médiée par un traitement peut être influencée favorablement ou non par le microbiome. En effet, les bactéries influencent positivement et négativement l'immunité par de multiples récepteurs présents dans plusieurs types cellulaires.

Ainsi, ces démonstrations nous amènent à émettre l'hypothèse qu'il existe bel et bien un microbiote tumoral dans le cancer du sein et que la présence de ces bactéries peut jouer un rôle dans la progression de cette maladie chez l'homme en présence ou non de traitements. Nous suggérons que les bactéries à l'intérieur des tumeurs peuvent exercer une influence importante sur le système immunitaire et mener à l'amélioration ou à l'altération de la réponse anti-tumorale, tout dépendant de la charge et des espèces bactériennes présentes.

2.2 Objectifs du projet

Le premier objectif est de quantifier la charge d'ADN bactérien à partir d'échantillons d'ADN génomique, tout en s'assurant que notre méthode soit fiable et précise. Suite à la mise en place de cette technique, le deuxième objectif est d'évaluer la présence d'ADN bactérien dans l'ADN de tumeurs de cancer du sein. Dans le cas où cette présence bactérienne serait confirmée, l'identification des types de bactéries présents sera également explorée. Le troisième objectif est de vérifier l'influence des bactéries tumorales sur la réponse immunitaire anti-tumorale en associant nos résultats avec les données cliniques des patients de l'étude, de même qu'avec l'importance de l'infiltration immunitaire.

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1 Provenance des échantillons et considérations éthiques

Les échantillons tumoraux proviennent de la banque de tissus du cancer du sein du Réseau de recherche sur le cancer du Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S) et de la Fondation du cancer du sein du Québec (FCSQ), gérée par le laboratoire du Dr. Réjean Lapointe au Centre de recherche du CHUM (CRCHUM). Les tumeurs sont issues de patients atteints du cancer du sein qui ont été opérés à l'Hôpital Notre-Dame ou à l'Hôtel-Dieu du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Suite au retrait de la tumeur par le chirurgien, celle-ci est envoyée vers le département de pathologie, puis les marges sont colorées avec de l'encre pour usage interne. Une tranche de la tumeur est donnée pour la recherche et placée dans un tube stérile. Suite à leur transport sur glace, les tumeurs sont découpées en plusieurs morceaux et sont placées dans une solution permettant leur conservation à long terme, le *RNAlater*[®] (Sigma-Aldrich Co. LLC). Ces échantillons sont ensuite congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. L'utilisation de ces échantillons de cette banque à des fins de recherche est approuvée par le comité d'éthique de la recherche du CHUM par le numéro de projet suivant 2005-1893, BD 04.002 – BSP.

3.2 Culture et manipulation des bactéries

Toutes les manipulations qui incluent des bactéries se font en suivant les méthodes microbiologiques classiques (matériel stérile, travail sous la flamme, *etc.*). Des *Escherichia coli*, spécifiquement les One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific Inc.), sont utilisées comme souche bactérienne de référence pour toutes les expériences impliquant des bactéries. Celles-ci sont préalablement congelées à -80°C dans une solution de glycérol 50% et d'eau de grade moléculaire (WISSENT, Inc.), puis sont inoculées dans 5 ml de milieu LB pré-stérilisé à l'autoclave (composition : eau double-distillée, bio-tryptone à 10 mg / ml, extrait de levure à 5 mg / ml et sel à 10 mg / ml) et incubées à 37°C avec agitation pendant une nuit avant d'être utilisées dans les expériences. Le jour de l'expérience, ces bactéries sont diluées à 1:200 dans un plus grand volume de milieu LB, puis

incubées à 37°C avec agitation jusqu'à l'atteinte de la croissance bactérienne cible. La vérification de la croissance bactérienne se fait par la mesure de la densité optique (D.O.) à 600 nm à partir de 1 ml de suspension bactérienne, vérifiée par spectrophotométrie par l'appareil Ultraspec 2100 Pro UV/Visible (GE Healthcare).

Pour le compte des unités formant colonie (UFC), des dilutions de suspensions bactériennes d'*E. coli* sont effectuées dans du milieu LB, à différentes densités optiques, puis sont étalées sur des géloses comprenant du LB-agar pré-stérilisé à l'autoclave (composition : milieu LB et agar à 15 mg / ml). L'étalement des bactéries se fait à l'aide d'un râteau en métal, stérilisé à l'éthanol et à la flamme, ou par les billes ColiRollers™ Plating Beads (EMD Millipore Corporation), pré-stérilisées à l'autoclave suite à leur désinfection dans l'éthanol. Suite à l'incubation à 37°C des géloses contenant les bactéries pendant la nuit, les UFC sont comptées, puis le nombre correspondant à 1 ml de suspension bactérienne non diluée est calculé. Lorsque des bactéries sont requises pour une extraction d'ADN, des échantillons de 7 ou 10 ml sont prélevés des suspensions bactériennes, à différentes densités optiques, et centrifugés à 3800 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré partiellement et le culot est transféré dans un tube de 1,5 ml. Une deuxième centrifugation à 8000 rpm est effectuée, et, suite au retrait total du surnageant, le culot de bactéries est directement congelé à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN ultérieure.

3.3 Extraction de l'ADN de suspensions bactériennes ou d'échantillons de tumeurs

Toutes les manipulations impliquant l'ADN sont effectuées avec des embouts de pipette avec filtre dans le but de prévenir la contamination des échantillons avec de l'ADN bactérien par l'air. L'extraction d'ADN des culots bactériens ou des morceaux de tumeurs est effectuée avec la trousse UltraClean Tissue and Cell DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Inc.). Des modifications au protocole de base ont été apportées et sont basées sur des données non publiées de nos collaborateurs du MD Anderson Cancer Center. En bref, suite à l'ajout de la solution de protéinase K et de la solution de lyse TD1 aux échantillons dans les tubes d'agitation par billes, les échantillons sont agités sur un adaptateur de vortex

pour tube de 2 ml pour le Vortex-Genie® 2 (MO BIO Laboratories, Inc.) pendant 10 minutes à vitesse maximale. Cette étape est suivie d'une incubation à 60°C pendant 30 minutes, pour ensuite continuer avec une deuxième période d'agitation sur vortex pendant 5 minutes. Par la suite, l'ADN est transféré dans la colonne d'extraction et le reste de la manipulation correspond aux indications du fabricant. Aussi, dans le but d'obtenir le maximum d'ADN, l'étape d'élution est effectuée dans trois tubes de 1,5 ml de type BIOPUR (Eppendorf AG.), en série, dans respectivement 100, 50 et 50 µl d'eau de grade moléculaire. Les échantillons d'ADN sont congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les tumeurs décongelées sont pesées, préalablement à l'extraction d'ADN, puis coupées avec un scalpel stérile jetable en morceaux plus petits selon le poids et ceux-ci sont repesés. Les morceaux non utilisés sont recongelés dans le tube de départ contenant du RNAlater®. Par souci de prévention de contamination des échantillons, toutes les solutions utilisées pendant l'extraction sont préparées à l'avance dans un poste de travail pour acides nucléiques de type Clone Zone® avec filtre HEPA, préalablement stérilisé aux rayons ultra-violet (UV) pendant 20 minutes. De plus, les tubes utilisés lors de l'extraction sont préparés et stérilisés de la même façon et les manipulations se font stérilement sous une enceinte de sécurité biologique de classe II. Toutefois, lorsque la manipulation implique des bactéries, les manipulations s'effectuent non stérilement en raison du risque de contamination bactérienne des postes de travail communs. Ainsi, lorsque mentionné, 100 µl de LB seul ou contenant un nombre estimé de bactéries est ajouté aux échantillons juste avant l'étape d'agitation par billes. La quantité d'ADN est mesurée par spectrophotométrie avec l'appareil NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). La pureté et la présence de contaminants dans l'échantillon d'ADN est établie par cette mesure aux ratios de longueurs d'ondes de 260/280 et 260/230.

3.4 Quantification de l'ADN bactérien par qPCR

Chaque point de la courbe standard comprend une quantité prédéterminée d'ADN bactérien préalablement extrait lors des manipulations avec *E. coli*. L'ADN bactérien est dilué dans l'eau de grade moléculaire. Chaque puits de la courbe standard d'ADN bactérien et du contrôle d'ADN humain comprend 150 ng d'ADN humain mâle (Promega Corporation). L'ADN des échantillons est testé par qPCR en utilisant 150 ng dans chaque puits. Le contrôle

négatif est de l'eau de grade moléculaire sans ajout d'ADN. Tous les puits sont au moins effectués en triplicatas. La qPCR est effectuée avec le mélange pour qPCR KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix 2X (KAPA Biosystems), en utilisant un mélange d'amorces ciblant la région V6 de l'ADN 16S des bactéries. Les amorces décrites au Tableau SI, en Annexe, sont basées sur une pré-sélection effectuée par nos collaborateurs au MD Anderson Cancer Center. La réaction est effectuée dans 20 µl au total, incluant 10 µl de mélange pour qPCR, 0,2 µl de chacune des amorces pré-diluées à 10 µM, ainsi que 9 µl d'ADN à tester. La préparation des réactifs nécessaires au PCR se fait dans un poste de travail de type Clone Zone ® avec filtre HEPA, pré-stérilisé aux UV. L'ADN est ensuite ajouté sur un poste de travail dédié pour cette manipulation. Les qPCR sont effectuées sur un thermocycleur de type Step One Plus TM Real Time PCR System (Applied Biosystems). Suite à une dénaturation et une activation initiale de l'enzyme de 3 minutes à 95°C, 40 cycles de 3 secondes à 95°C (dénaturation) et de 20 secondes à 60°C (élongation) sont effectués. Ensuite, la température de fusion des produits est déterminée par une analyse de courbe de fusion préprogrammée. La quantité d'ADN bactérien présent dans chaque échantillon selon le cycle du seuil (Ct) obtenu est établie par la relation logarithmique obtenue par la courbe standard d'ADN bactérien dans chaque expérience. Avec cette quantité d'ADN calculée, il est possible d'utiliser l'équivalence bactérienne basée sur la bactérie *E. coli*, pour établir le nombre d'équivalents bactériens de chaque puits de qPCR.

3.5 Statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées avec le programme R (R Foundation) et le logiciel Graphpad Prism 6® (GraphPad Software, Inc.). Les équivalents bactériens étant obtenus et présenté sous forme logarithmique, ceux-ci ont été transformés en valeurs logarithmiques avant d'être analysés statistiquement. Le test t de Student est utilisé lors de l'analyse des différences entre deux groupes. L'analyse statistique des corrélations est faite par la régression linéaire avec le coefficient de Pearson. Pour les analyses de survie, le test *log-rank*, connu sous le nom de Mantel-Cox, est utilisé. Finalement, l'analyse statistique des tableaux est effectuée par un test t de Student pour les variables continues et par un test χ^2 pour les variables catégoriques. Les valeurs p plus petites que 0,05 sont considérées significatives. Les symboles *, ** et *** représentent respectivement une valeur p <0,05, <0,01 et <0,001.

Chapitre 4. Résultats

4.1 Établissement de l'équivalence bactérienne nécessaire à la quantification des bactéries dans un échantillon d'ADN

Dans le but d'établir une équivalence bactérienne de référence pour la quantification des bactéries par qPCR dans les échantillons d'ADN génomique, la première étape était la vérification expérimentale du nombre de bactéries retrouvées dans une quantité d'ADN bactérien donnée. Pour ce faire, des bactéries *E. coli* ont été mises en culture et des dilutions ont été comptées à partir des suspensions à plusieurs densités optiques (D.O.) (Figure 3A). La forte relation linéaire ($R^2 = 0,85$) trouvée entre la D.O. et le nombre d'unités formant colonie (UFC) par ml permet l'utilisation de la formule pour faire l'approximation du nombre de bactéries présentes dans une suspension bactérienne à D.O. connue.

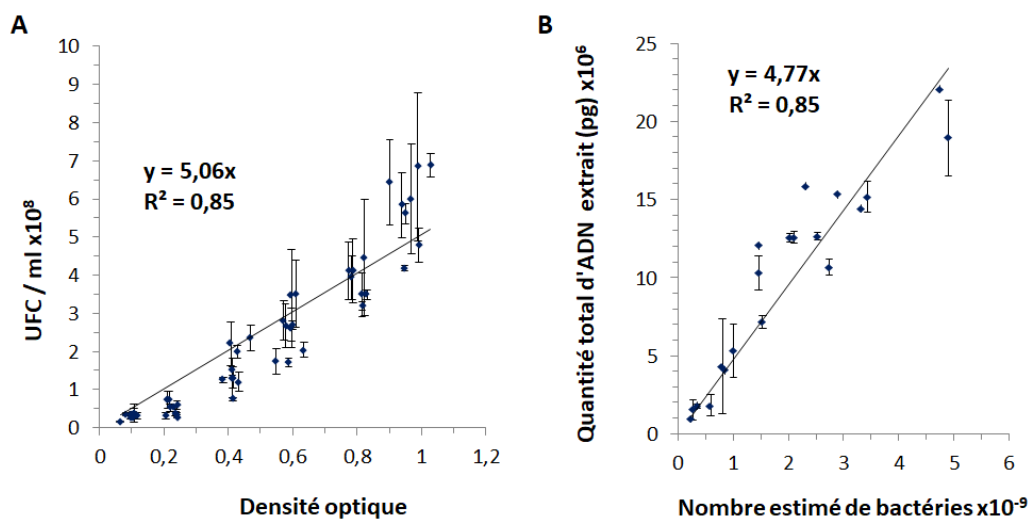


Figure 3. La quantité d'ADN totale extraite d'une suspension de *E. coli* est proportionnelle au nombre de bactéries présentes.

A. Des suspensions bactériennes de *E. coli* cultivées dans du milieu LB sont réalisées et des prélèvements sont effectués à différentes densités optiques (D.O.). Des dilutions de ces prélèvements effectuées en triplicata sont étalées sur des géloses LB. Les unités formant colonie (UFC) sont comptées, puis le nombre correspondant à 1 ml de suspension bactérienne est calculé. La moyenne et l'erreur standard obtenue à partir des trois dilutions utilisées pour chaque D.O. sont représentées. **B.** Suite à la congélation de culots bactériens provenant des suspensions bactériennes à différentes D.O., l'ADN est extrait et quantifié. Le nombre estimé de bactéries dans les échantillons est basé sur la régression linéaire entre le nombre d'UFC / ml et la D.O. Chaque point représente un ou deux tubes d'extraction provenant de la même suspension bactérienne (moyenne et erreur standard).

Par la suite, pour déterminer le nombre approximatif de bactéries contenues dans un échantillon d'ADN bactérien, des extractions d'ADN ont été réalisées en utilisant des échantillons de suspensions bactériennes dont le nombre de bactéries était déterminé (Figure 3B) à l'aide de la D.O. La quantité totale d'ADN extraite des échantillons bactériens est proportionnelle à la quantité approximative de bactéries et elle suit une relation linéaire ($R^2 = 0,85$). Cette linéarité permet d'estimer mathématiquement la quantité d'ADN d'*E. coli* que représente une seule de ces bactéries. En inversant les axes du graphique et en suivant cette même relation, il est possible d'obtenir le nombre d'*E. coli* associé à une quantité définie de son ADN. Dans ce cas-ci, 1 pg d'ADN issu de cette bactérie correspond à approximativement 200 bactéries *E. coli*. C'est avec cette équivalence bactérienne, basée sur *E. coli*, que les quantités d'ADN bactérien seront transposées en nombre de bactéries (équivalents bactériens) dans les prochaines figures. Ainsi, c'est ce nombre approximatif d'*E. coli* par pg d'ADN qui détermine les équivalents bactériens de la courbe standard utilisée pour la méthode de quantification bactérienne par qPCR (Tableau SII).

4.2 La méthode de détection des bactéries par qPCR est fonctionnelle, précise et reproductible

Pour s'assurer de la fiabilité de la détection de l'ADN 16S bactérien par qPCR, une courbe standard comprenant dans chaque puits 150 ng d'ADN humain et une quantité déterminée d'ADN bactérien a été testée plusieurs fois. Un exemple représentatif illustrant la relation entre le seuil de cycle de la qPCR et la quantité d'ADN bactérien dans les puits de la courbe standard est présenté à la Figure 4. Le cycle du seuil représente le cycle d'amplification à partir duquel l'ADN ciblé est distinguable par le thermocycleur. Cette relation est dans ce cas presque parfaitement logarithmique ($R^2 = 0,998$) et permet ainsi la quantification fiable des équivalents bactériens. De plus, les sept points de la courbe standard sont au-dessus de la limite de détection représentée par l'ADN humain seul (témoin). Le seuil de cycle exact variant entre les plaques de qPCR (non montré), il a été nécessaire de placer la courbe standard dans chacune des plaques contenant des échantillons à tester. Ceci pourrait être dû à un manque de calibration de l'appareil ou une opacité qui varie entre les plaques de PCR et modifiant la détection de lumière par l'appareil.

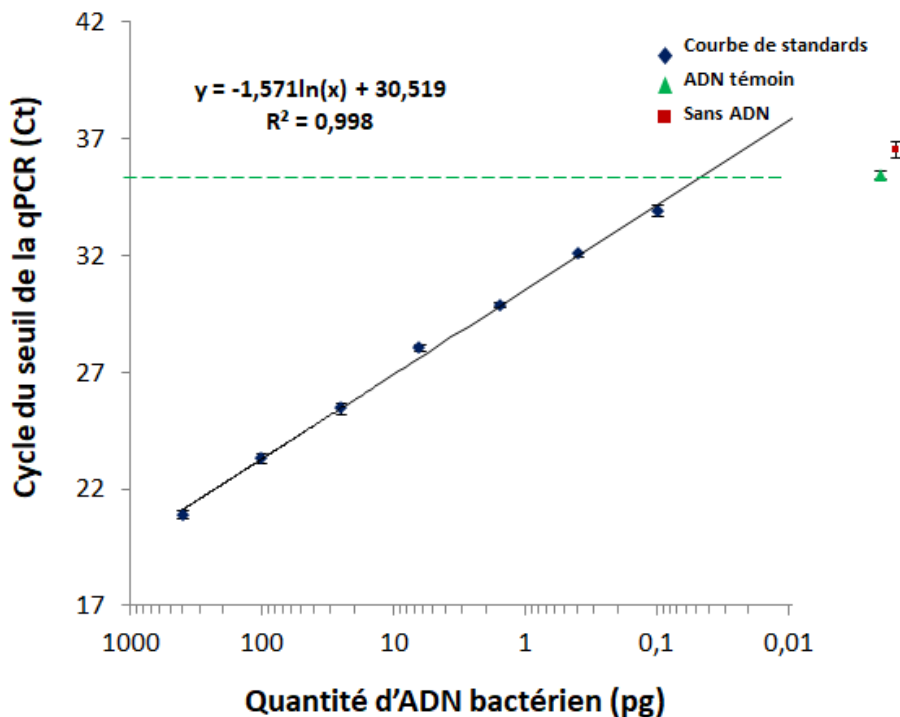


Figure 4. La relation entre le cycle du seuil par qPCR et la quantité d'ADN bactérien de la courbe standard est logarithmique.

La qPCR est effectuée en utilisant des amorces ciblant l'ADN 16S. Les standards d'ADN bactérien et le témoin comprennent 150 ng d'ADN humain. Les standards d'ADN bactériens comprennent également la quantité d'ADN d'*E. coli* indiquée dans le Tableau SII. Les moyennes et erreurs standards des triplicatas d'une qPCR représentative sont présentées.

Par la suite, il était primordial de tester si la méthode de détection d'équivalents bactériens était fonctionnelle en la testant avec de l'ADN provenant d'une tumeur, et ce, avec ou sans ajout d'ADN bactérien (Figure 5). Une tumeur d'un patient atteint du cancer du sein a ainsi été soumise à une extraction d'ADN et au test de détection par qPCR. Lors de ce dernier, des dilutions prédéterminées d'ADN bactérien furent ajoutées à 150 ng d'ADN de la tumeur. De l'échantillon le plus concentré en ADN bactérien (TB1) jusqu'à celui correspondant approximativement au seuil de détection (TB9), le nombre d'équivalents bactériens ajouté par puits et celui qui est détecté sont très similaires. Les échantillons contenant des dilutions d'ADN bactériens équivalentes à moins que la limite de détection (TB10 à TB13) sont aussi très rapprochés de la limite de détection et de l'ADN de la tumeur seul. La différence globale

entre la quantité ajoutée et détectée n'est pas significative. Ceci démontre que la technique de détection de l'ADN bactérien est sensible et permet de détecter jusqu'à une dizaine d'équivalents bactériens dans un contexte d'ADN tumoral.

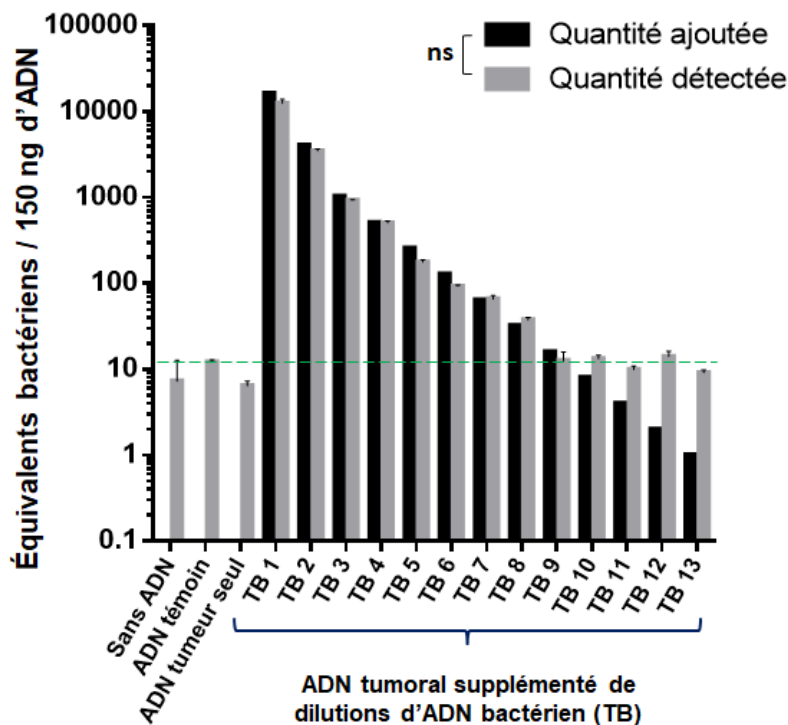


Figure 5. La détection d'ADN bactérien dans l'ADN tumoral par qPCR est sensible jusqu'à la limite de détection.

L'ADN extrait d'un fragment de tumeur (ADN de tumeur seul, 150 ng) est combiné à différentes quantités d'ADN d'*E. coli* (TB1 à TB13) et testé par qPCR avec les amorces pour l'ADN 16S. La quantité d'ADN bactérien ajouté à TB1 correspond à 16 384 équivalents bactériens et TB13 contient celle correspondant à 1. Des dilutions 1:4 ont été effectuées de TB1 à TB3, puis des dilutions 1:2 ont suivi de TB3 à TB13. Le nombre d'équivalents bactériens est calculé par la relation logarithmique de la courbe standard de l'expérience (Tableau SII). Les moyennes et erreurs standards des puits de qPCR en triplicatas sont montrées. L'analyse statistique n'inclut pas les trois contrôles.

Pour continuer, il était nécessaire de valider si la méthode de détection par qPCR nous permettait de faire la différence entre l'ADN provenant d'une tumeur avec ou sans présence bactérienne artificielle. Pour ce faire, l'extraction de l'ADN de plusieurs fragments de deux tumeurs (#1, #2) a été effectuée et, dans certains cas, un nombre précis de bactéries y a été ajouté. L'ADN provenant de cette extraction a ensuite été testé par qPCR (Figure 6A). Les deux tumeurs utilisées se trouvent sous la limite de détection et ceci est aussi vrai lors de

l'ajout de milieu LB sans bactéries avant l'extraction. En présence de bactéries (B1, B2), les échantillons d'ADN sont grandement détectables en ADN bactérien (plus de 30 équivalents bactériens par 150 ng d'ADN). Ainsi, il est possible de détecter la présence d'ADN bactérien dans l'ADN tumoral suite à l'ajout de bactéries lorsque l'ADN de tumeur seul se trouve sous la limite de détection en équivalents bactériens. Aussi, l'approximation du nombre d'équivalents bactériens par fragment (Figure 6B) n'est pas significativement différente de la quantité de bactéries ajoutée aux fragments. En effet, la quantification totale des bactéries ajoutées au fragment avant l'extraction est donc possible.

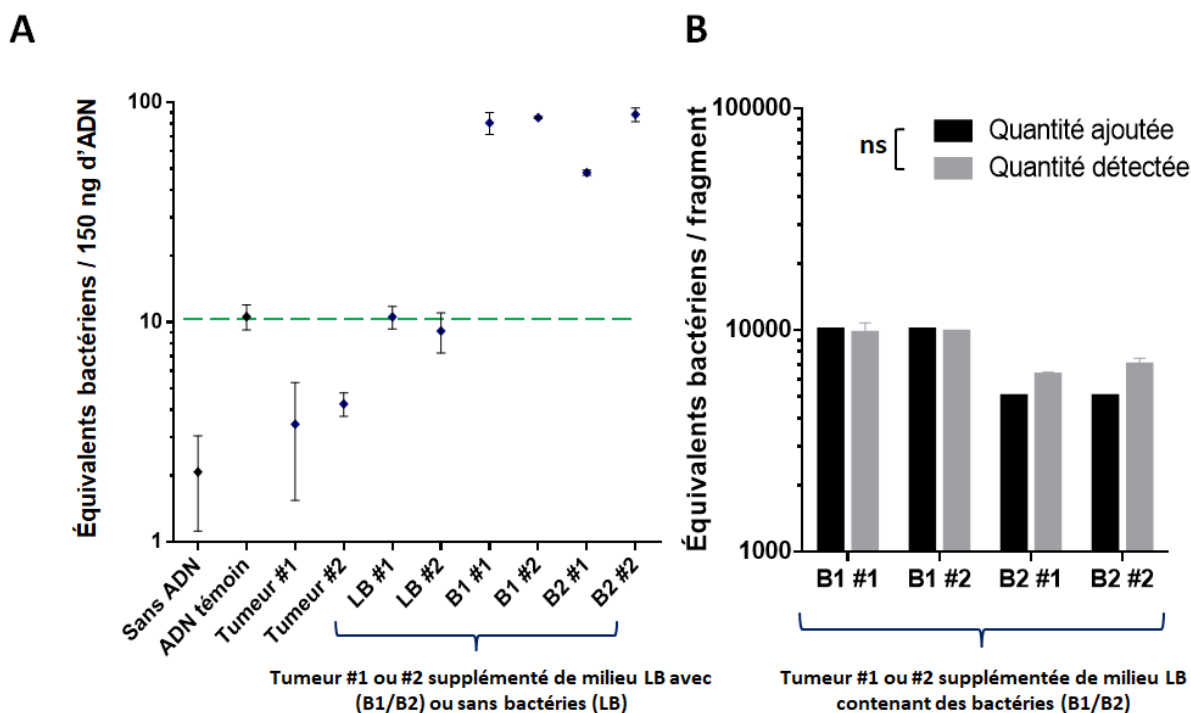


Figure 6. La technique de détection d'ADN bactérien par qPCR permet de détecter et de quantifier l'ajout de bactéries à des fragments tumoraux.

L'ADN est extrait de fragments de deux tumeurs (#1, #2). Avant l'extraction, 100 µl de milieu LB contenant des bactéries (B1, B2) ou non (LB) est ajouté au fragment. Les dilutions pour arriver au nombre d'équivalents bactériens ajoutés (10 000 pour B1 et 5 000 pour B2) sont basées sur la D.O. de la suspension bactérienne d'*E. coli* en culture utilisée (Figure 3A). **A.** 150 ng d'ADN extrait est testé par qPCR avec les amorces pour l'ADN 16S en triplicata et le nombre d'équivalents bactériens est calculé par la relation logarithmique de la courbe standard de l'expérience (Tableau SII). **B.** Le nombre d'équivalents bactériens / 150 ng est transposé en équivalents bactériens / fragment en utilisant la quantité totale d'ADN extrait du fragment. Le nombre obtenu pour la même tumeur en présence de LB sans bactéries est soustrait du résultat lors de l'ajout de bactéries (retrait du bruit de fond). Les moyennes et erreurs standards sont représentées.

Une vérification supplémentaire de la technique de détection d'ADN bactérien par qPCR était la reproductibilité de la méthode entre deux plaques pour les mêmes échantillons. Pour ce faire des extraits d'ADN d'échantillons de tumeurs (150 ng par échantillon) ont été testés en triplicata sur deux plaques de qPCR. Par la suite, le calcul des équivalents bactériens à l'aide des courbes de standards de chaque expérience a été effectué (Figure 7). Le profil des deux plaques est tout à fait similaire, car la moyenne des triplicatas de l'ADN de chaque tumeur est pratiquement la même, ce qui montre que la méthode de détection d'équivalents bactériens dans l'ADN tumoral est reproductible. De plus, les erreurs standards sont relativement faibles, ce qui laisse croire que la méthode est robuste.

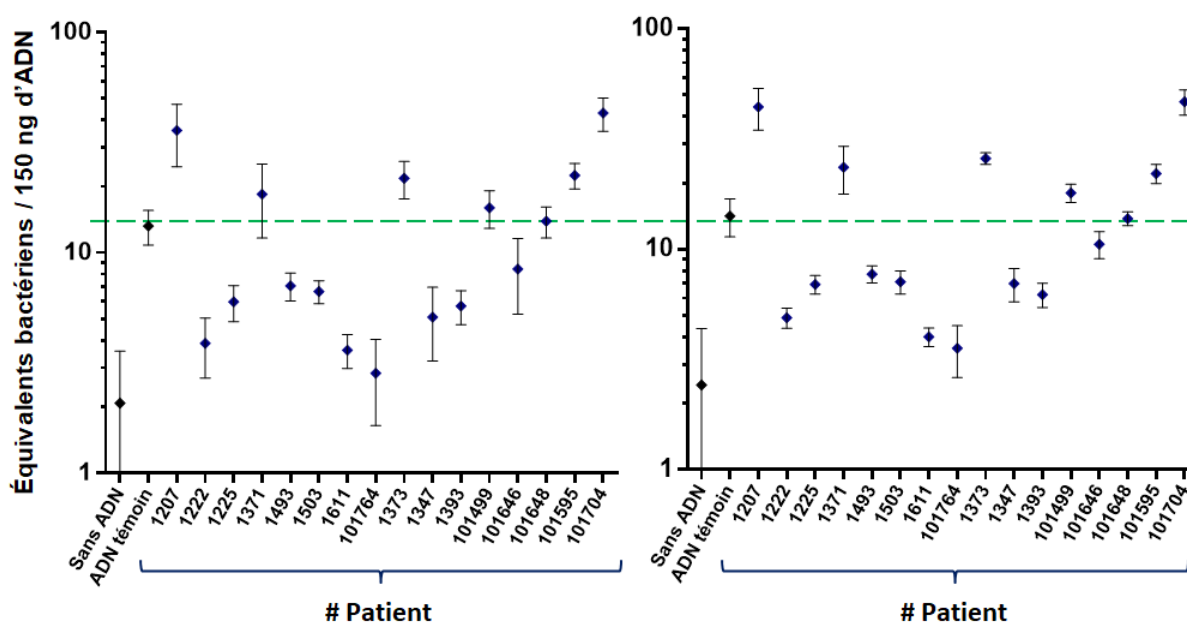


Figure 7. La technique de détection de l'ADN bactérien par qPCR est reproductible.

L'ADN extrait de tumeurs de cancer du sein (150 ng) est testé par qPCR avec les sondes pour l'ADN 16S bactérien. Deux expériences de qPCR testant les mêmes échantillons d'ADN sont représentées côte-à-côte. Le nombre d'équivalents bactériens est calculé par la relation logarithmique de la courbe standard de chaque expérience (Tableau SII). Les moyennes et erreurs standards des triplicatas sont représentées.

4.3 Les patients peuvent être classés selon la moyenne en équivalents bactériens des échantillons d'ADN issus de fragments de leur tumeur

Puisque la méthode de détection des équivalents bactériens dans l'ADN tumoral par qPCR était fiable, la prochaine étape fut de tester l'ADN de plusieurs fragments de tumeurs de patients atteints du cancer du sein. Ceci a été réalisé dans l'objectif d'associer la quantification de la présence bactérienne tumorale aux données cliniques des patients de la cohorte étudiée. Les données cliniques des 86 patients sont rassemblées dans le Tableau SIII. La majorité des patients sont des femmes (un seul homme), ont subi une mastectomie partielle et étaient atteints d'une tumeur de type carcinome canalaire infiltrant. La moyenne d'années de suivi est d'environ 5 ans et de 20 à 25% des patients ont développé des métastases et/ou sont décédés. Au moins 10 patients sont classés dans chaque sous-type de cancer du sein, sauf pour HER2⁺ qui en contient 6. Les critères de classification exacts des sous-types sont montrés dans le Tableau SIV. Selon ces données cliniques, la cohorte contient un bon nombre de patients qui sont répartis dans plusieurs sous-catégories cliniques, ce qui pourrait augmenter la possibilité de trouver une différence significative en associant ces groupes avec la quantification des bactéries tumorales.

Pour ce qui est du test des échantillons d'ADN issus de ces patients, un à trois fragments par tumeur ont été utilisés. Les patients ont ensuite été ordonnés selon la moyenne d'équivalents bactériens des fragments d'une même tumeur (Figure 8). Les patients ont subséquemment été classés dans la catégorie «Détectable» si cette moyenne était supérieure ou égale au seuil de détection de la technique de qPCR, représenté par l'ADN témoin de provenance commerciale. Le seuil de détection correspond à la moyenne du nombre d'équivalents bactériens par 150 ng d'ADN obtenu pour l'ADN témoin contenu dans toutes les expériences de qPCR. Par coïncidence, les deux catégories comprennent le même nombre de patients. Quelques tumeurs ont des fragments dans les deux catégories, mais seule la moyenne importe dans cette classification. Ceci pourrait témoigner de l'hétérogénéité à l'intérieur de la tumeur en matière de présence bactérienne. D'autre part, plusieurs tumeurs ont la totalité de leurs fragments dans

l'une ou l'autre des catégories. Cette classification représente une manière de prendre en compte tous les fragments et l'hétérogénéité possible, ce qui permet une vue d'ensemble de la tumeur.

Pour vérifier l'influence du poids et de la quantité d'ADN extrait des fragments de tumeur sur la classification, des analyses supplémentaires ont été réalisées (Figure S1). Le poids des fragments utilisés n'est pas significativement différent entre les deux groupes, mais la quantité d'ADN extrait du fragment l'est, ce qui pourrait indiquer qu'elle influence la classification. Cette influence sur la classification se traduirait par une capacité réduite de détection de l'ADN bactérien au qPCR lorsque l'ADN tumoral extrait doit être dilué dans un trop grand volume d'eau. D'autre part, pour le groupe de fragments classés comme «Détectable», il n'y a pas de relation linéaire significative entre ces trois paramètres : la quantité d'ADN extrait, le poids du fragment ou le nombre d'équivalents bactériens par 150 ng d'ADN mesuré par la technique de qPCR. Ainsi, ces analyses indiquent que la quantité d'ADN extrait ou le poids n'influence pas de manière proportionnelle les résultats de la méthode de quantification, mais qu'une trop grande quantité d'ADN pourrait biaiser la classification vers la catégorie «Indétectable».

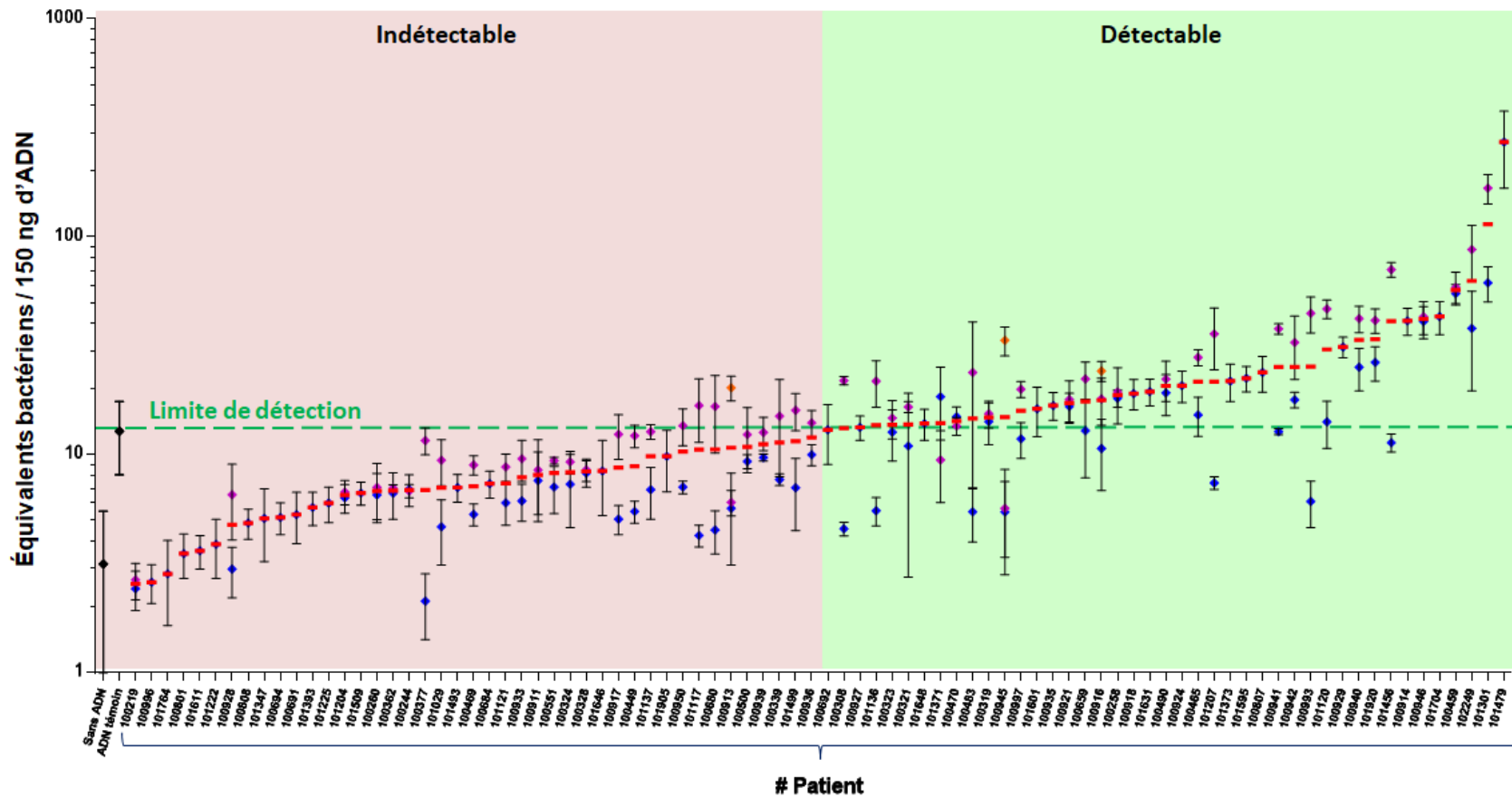


Figure 8. Classification des patients selon le nombre d'équivalents bactériens détectés dans les fragments tumoraux.

L'ADN d'échantillons de fragments de tumeurs de cancer du sein (150 ng) est testé par qPCR avec les amorces pour l'ADN 16S bactérien. L'équivalence bactérienne est établie par la relation logarithmique obtenue par la courbe standard d'ADN bactérien de chaque expérience. Chaque point correspond à la moyenne et l'écart type des triplicatas issus d'un fragment testé à une ou deux reprises. L'ordre des patients suit la moyenne (en rouge) d'un à trois fragments testés issus d'une même tumeur. Les fragments 1, 2 et 3 sont respectivement de couleur bleu, mauve ou orange. La limite de détection de la technique de qPCR permet la séparation entre détectable et indétectable, en se fiant à la moyenne des fragments d'une même tumeur.

4.4 L'ADN extrait du tissu normal adjacent à la tumeur est plus concentré en équivalents bactériens que la tumeur

Nous avons évalué l'ADN de tissu adjacent à la tumeur avec notre technique afin de déterminer la présence d'équivalents bactériens. En raison de la difficulté d'extraction d'ADN (Figure S2), probablement dû à la présence de lipides dans ces tissus, seulement six de ces tissus normaux ont été testés. En effet, il a fallu prendre des fragments plus volumineux pour parvenir à une quantité d'ADN relativement faible. Toutefois, nous avons pu obtenir assez d'ADN pour tester ces échantillons avec notre technique de qPCR utilisant les amorces pour l'ADN 16S (Figure 9). Ceci fait en sorte qu'il y a très peu de tissus normaux adjacents dans notre analyse comparativement au nombre de tumeurs. Malgré cela, il y a une différence significative en comparant la totalité des fragments de tumeurs avec les tissus normaux adjacents aux tumeurs (Figure 9A). De plus, une augmentation significative est retrouvée dans les tissus normaux comparativement aux tumeurs provenant des mêmes patients (Figure 9B). Également, les patients 808, 913, 928 et 996 ont leur tumeur sous le seuil de détection, représenté par l'ADN témoin, alors que leur tissu normal est au-dessus du seuil. Ceci suggère que la présence bactérienne serait plus élevée dans le tissu avoisinant la tumeur que dans celle-ci.

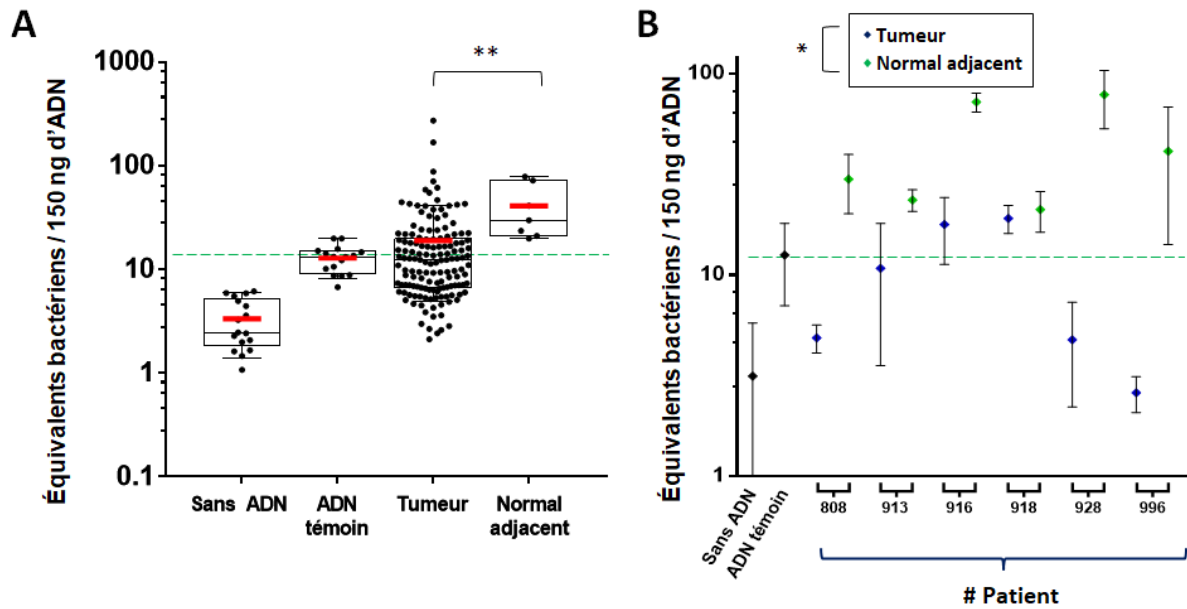


Figure 9. Le nombre d'équivalents bactériens détecté est plus élevé dans le tissu normal adjacent que dans la tumeur d'un même patient.

L'ADN d'échantillons de fragments de tumeurs ou de tissus normaux adjacents à la tumeur de cancer du sein (150 ng) est testé par qPCR avec les amorces pour l'ADN 16S. L'équivalence bactérienne est établie par la relation logarithmique obtenue par la courbe standard d'ADN bactérien de chaque expérience. **A.** Représentation de la moyenne des triplicatas de chaque fragment testé peu importe leur tumeur d'origine. La moyenne de tous les fragments (rouge) est représentée et le diagramme de dispersion du 10^e au 90^e percentile y est juxtaposé. Pour les contrôles d'ADN témoin et sans ADN, chaque point représente la moyenne d'une plaque de qPCR où des fragments de tumeurs ont été testés. **B.** Représentation de la moyenne et de l'erreur standard des triplicatas des fragments de tumeurs (bleu) et de tissus normaux (vert) adjacents regroupés par patient.

4.5 La classification selon la détection d'équivalents bactériens par qPCR permet de différencier les patients selon certains paramètres cliniques

Tableau II. Caractéristiques cliniques des patients de l'étude selon la détection d'équivalents bactériens dans les tumeurs.

Caractéristiques	Indétectable, n (%)	Détectable, n (%)	Valeur p	Total, n (%)
n	42 (100)	42 (100)		84 (100)
Âge au diagnostic , moyenne (Années) ± SD	63 ± 15	58 ± 12	ns	61 ± 14
Antécédents familiaux de cancer			ns	
Oui	16 (38)	17 (40)		33 (39)
Non	22 (52)	24 (57)		46 (55)
Manquant	4 (10)	1 (2)		5 (6)
Comorbidités (cancer)			0,002883	
Sein	9 (21)	3 (7)		12 (14)
Sein et autre	2 (5)	0 (0)		2 (2)
Autre	0 (0)	9 (21)		9 (11)
Taille moyenne de la tumeur (mm) ± SD	30 ± 21	26 ± 16	ns	28 ± 19
Sous-type de cancer du sein			ns	
Luminal A	11 (26)	17 (40)		28 (33)
Luminal B	7 (17)	8 (19)		15 (18)
Luminal HER2 ⁺	7 (17)	4 (10)		11 (13)
HER2 ⁺	4 (10)	2 (5)		6 (7)
Triple négatif	13 (31)	11 (26)		24 (29)
Stade TNM pathologique simplifié			ns	
0-I	9 (21)	10 (24)		19 (23)
II	20 (48)	20 (48)		40 (48)
III-IV	11 (26)	11 (26)		22 (26)
Manquant	2 (5)	1 (2)		3 (4)
Grade de Nottingham			0,01077	
I	5 (12)	0 (0)		5 (6)
II	9 (21)	19 (45)		28 (33)
III	28 (67)	23 (55)		51 (61)
Traitements reçus				
Chimiothérapie néo-adjuvante	3 (7)	3 (7)	ns	6 (7)
Chimiothérapie adjuvante	20 (48)	28 (67)	ns	48 (57)
Hormonothérapie néo-adjuvante	6 (14)	0 (0)	0,01102	6 (7)
Hormonothérapie adjuvante	19 (45)	30 (71)	0,01491	49 (58)
Radiothérapie néo-adjuvante	2 (5)	0 (0)	ns	2 (2)
Radiothérapie adjuvante	26 (62)	32 (76)	ns	58 (69)
Métastases	16 (38)	3 (7)	0,0006979	19 (23)
Années de suivi , moyenne (Années) ± SD	4,8 ± 3,0	5,0 ± 2,3	ns	4,9 ± 2,7
Survie , moyenne (mois) ± SD	63 ± 35	65 ± 27	ns	63 ± 31
Décès	12 (29)	4 (10)	0,02622	16 (19)

Classement détectable/indétectable selon la Figure 8.

Pour associer la quantification bactérienne dans l'ADN tumoral aux données cliniques, les patients ont été classifiés en deux groupes de la même façon qu'à la Figure 8: indétectable ou détectable (Tableau II). D'ailleurs, pour les figures de survie suivantes et ce tableau, deux patients ont été retirés en raison d'une classification erronée en tant que cancer du sein ainsi qu'en raison d'un décès dû à une autre maladie que le cancer du sein ou métastatique. Les patients dont la cause exacte du décès n'était pas indiquée ont été conservés. De nombreux paramètres cliniques ne comportent pas de différence significative entre les deux groupes, tel l'âge, les antécédents familiaux de cancer, la taille de la tumeur, le stade ou le sous-type du cancer. Toutefois, des différences significatives dans le type de comorbidités associées au cancer, le grade et l'hormonothérapie néo-adjuvante ou adjuvante sont observées. De plus, dans le groupe «Indétectable», davantage de patients ont développé des métastases et un nombre plus élevé de décès est retrouvé. Ainsi, il est possible d'observer des différences dans les données cliniques des patients selon notre système de classification.

Le nombre plus élevé de décès dans le groupe «Indétectable» nous a encouragés à vérifier les courbes de survie des deux groupes (Figure 10). L'analyse statistique Mantel-Cox démontre une différence significative entre les deux groupes avec un ratio de risque de 2,86 [Intervalle de confiance à 95% :1,07-7,65]. Ceci suggère que la classification basée sur la détection d'équivalents bactériens par qPCR pourrait être utilisée pour différencier les patients à plus haut risque de décès puisque les patients du groupe «Indétectable» ont une survie globale plus faible, et ce, indépendamment des autres paramètres cliniques.

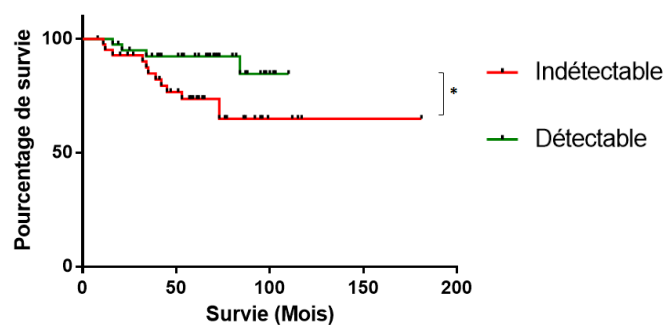


Figure 10. Les patients ayant une tumeur classée comme «détectable» en équivalents bactériens ont une meilleure survie.

La courbe de survie des patients est représentée en suivant le classement détectable/indétectable en équivalents bactériens de leur tumeur selon la Figure 8.

4.6 Le système de classification par équivalents bactériens peut accentuer certains paramètres associés à la survie

L'association entre la survie des patients et notre système de classification nous a poussés à sous-stratifier les patients sur la base de certains paramètres classiquement associés à la survie. La survie selon la classification par équivalents bactériens a ainsi été analysée en stratifiant les patients selon le stade TNM et le grade de Nottingham (Figure 11), ainsi que selon le sous-type de cancer du sein de leur tumeur (Figure 12).

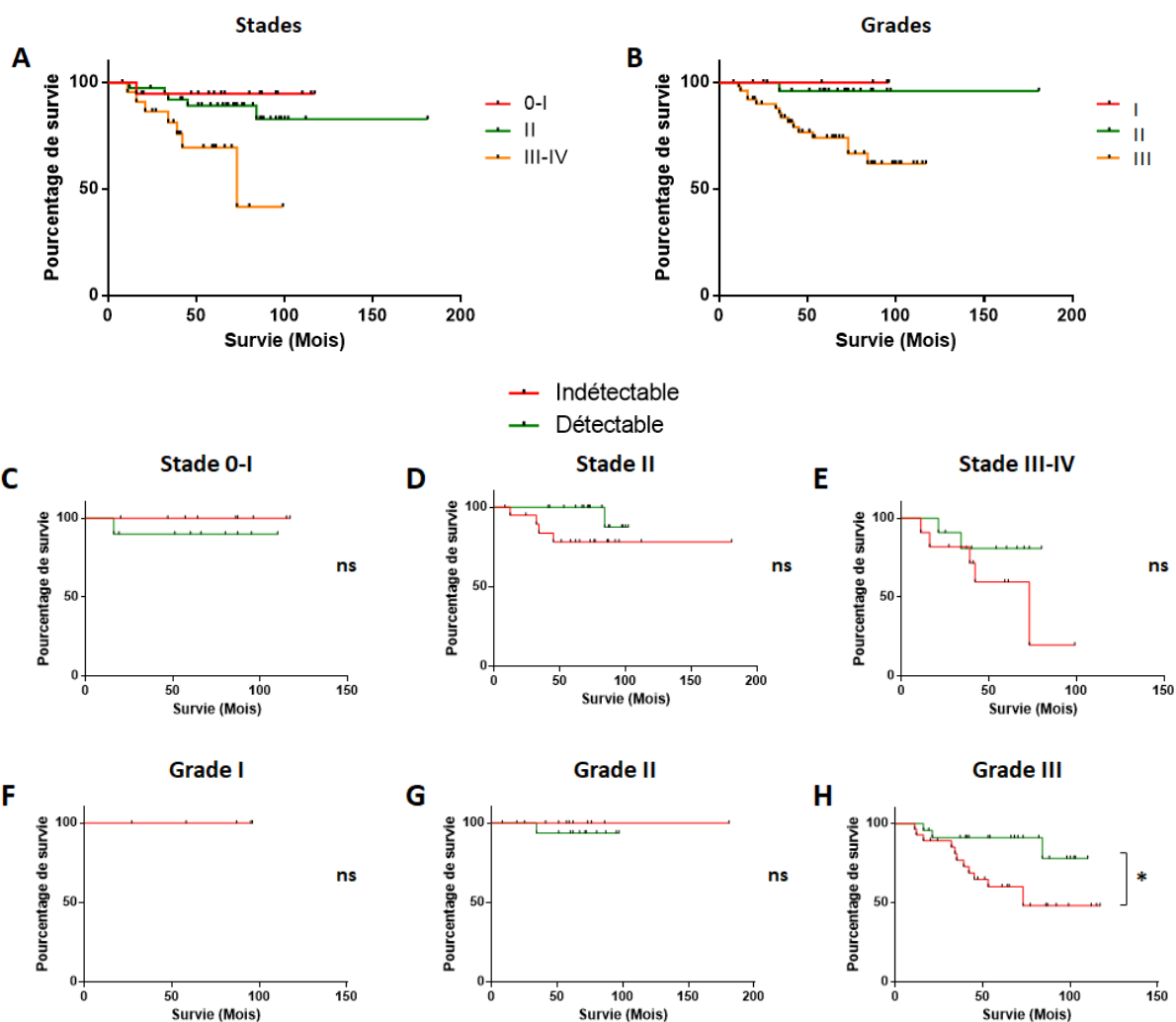


Figure 11. La différence pronostique en lien avec les équivalents bactériens dans la tumeur semble être reliée à un stade ou un grade avancé.

La courbe de survie des patients est représentée selon le stade regroupé (A) ou le grade de Nottingham (B) de la tumeur. La courbe de survie pour chaque stade est montrée selon la classification détectable/indétectable (C, D, E). La courbe de survie pour chaque grade est montrée selon la classification détectable/indétectable (F, G, H).

La survie des patients selon le grade et le stade de la tumeur est moins grande lorsque ces paramètres sont plus élevés (Figure 11A et B). En catégorisant chaque stade et grade selon notre système de classification, on retrouve une différence significative pour le grade III seulement. Dans ce cas, le groupe «Indétectable» a une moins bonne survie. Bien que les stades II et III-IV n'atteignent pas la significativité, la séparation entre les deux groupes est bien visible, suggérant un nombre plus élevé de décès dans le groupe «Indétectable». Ceci laisse croire que plus le stade ou le grade est avancé, plus la différence du pronostic basée sur la classification des équivalents bactériens est marquée.

D'autre part, des différences notables sont retrouvées entre de la survie des patients selon le sous-type de cancer du sein (Figure 12 A). Dans cette cohorte, les tumeurs Luminal HER2⁺ sont associées à une moins bonne survie. En catégorisant chaque sous-type selon la détection d'équivalents bactériens, bien que Luminal B et HER2⁺ semblent être différents, seul le sous-type Luminal HER2⁺ a une différence significative entre les deux groupes. Étonnement, presque tous les patients de ce groupe qui étaient classés «Indétectable» sont décédés, alors que tous ceux qui étaient catégorisés «Détectable» ont survécu. Ceci suggère que pour ce sous-type de cancer du sein, la détection ou non d'équivalents bactériens dans l'ADN de la tumeur par notre technique de qPCR pourrait être une indication très puissante de la survie du patient.

Il est important de mentionner que la taille des échantillons des groupes avec ou sans présence bactérienne, présentée au Tableau II, peut être limitante pour les résultats d'analyse de survie obtenus avec la sous-stratification des sous-types, des stades ou des grades.

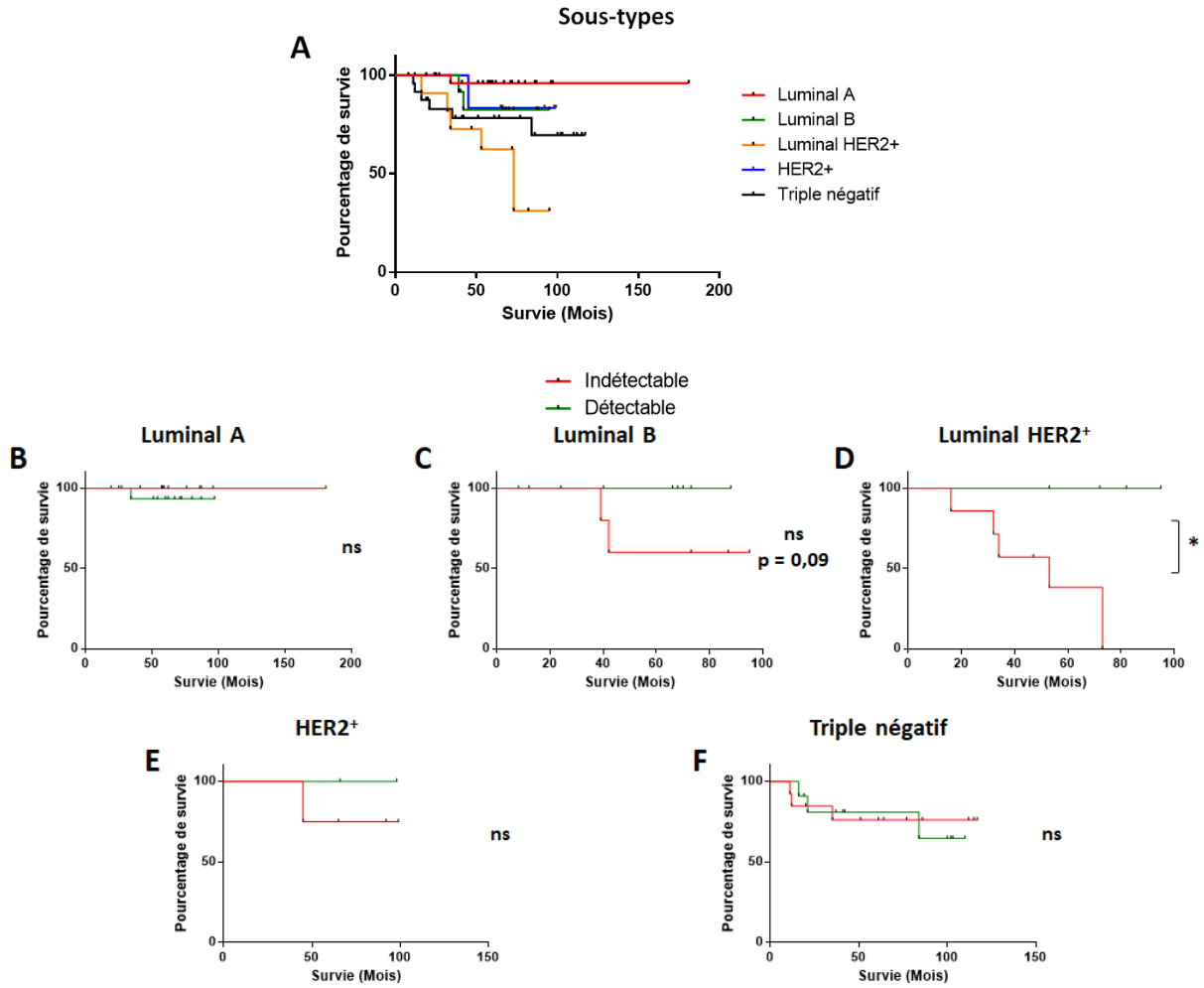


Figure 12. La différence pronostique liée aux équivalents bactériens dans la tumeur est accentuée dans le sous-type Luminal HER2⁺.

La courbe de survie des patients est représentée selon le sous-type de cancer du sein (A) de la tumeur. La courbe de survie pour chaque sous-type est montrée selon la classification détectable/indétectable (B, C, D, E, F).

Chapitre 5. Discussion

La récente découverte de bactéries dans les tumeurs et la multitude de processus biologiques qui sont influencés par ces micro-organismes nous ont poussés à vérifier leur présence et à évaluer leur fonction dans la progression du cancer du sein. Ainsi, les objectifs de ce projet étaient d'optimiser une méthode de quantification bactérienne dans les tumeurs, d'utiliser cette méthode avec des tumeurs d'une cohorte de patients atteints du cancer du sein, et de vérifier si nos résultats pouvaient avoir une signification clinique. En premier lieu, en utilisant une technique développée par nos collaborateurs, nous avons établi une équivalence bactérienne à partir de la bactérie *E. coli*. Ensuite, nous avons vérifié que la technique de qPCR était fonctionnelle dans les tumeurs, sensible et reproductible. Ceci nous a permis de tester un grand nombre d'échantillons d'ADN tumoral. Nous avons choisi de classer les patients selon la détection ou non d'équivalents bactériens. La même méthode appliquée aux fragments de tissus adjacents aux tumeurs a montré que ceux-ci pourraient contenir un plus grand nombre de bactéries. D'autre part, plusieurs paramètres cliniques sont significativement différents selon la présence d'équivalents bactériens, dont le développement de métastases et la mortalité qui sont accrus en absence de détection d'équivalents bactériens. L'analyse des courbes de survie de quelques paramètres cliniques selon la détection bactérienne a permis de cibler certains types de tumeurs associés à une meilleure survie en présence de bactéries. La reproduction de ces résultats avec une plus grosse cohorte permettrait d'ajouter de la robustesse aux analyses de survie après sous-stratification selon le type de tumeur. Tout de même, l'ensemble de nos résultats nous a permis de valider notre hypothèse selon laquelle la présence de bactéries dans les tumeurs est réelle et peut jouer un rôle dans la progression de cette maladie chez l'homme, et ce, en présence ou non de traitements.

5.1 Établissement de la référence pour la méthode de quantification des bactéries dans un échantillon d'ADN

Le premier objectif était donc d'établir une méthode de quantification des bactéries dans l'ADN. La méthode choisie a premièrement été développée par nos collaborateurs dans le laboratoire du Dr. Jennifer Wargo. Cette technique de qPCR utilise des amorces ciblant la

région V6 de l'ADN 16S pour quantifier l'ADN bactérien présent et estimer à partir de celui-ci le nombre de bactéries. Plusieurs régions hypervariables de l'ADN 16S (Figure 1) sont utilisées pour les techniques avancées d'analyse du microbiome, mais elles ne sont pas toutes équivalentes pour l'identification précise d'espèces bactériennes. En effet, certaines régions sont plus hétérogènes et ont un meilleur pouvoir discriminatoire pour déceler un plus grand nombre d'espèces bactériennes [245, 246]. Basé en partie sur un article d'identification des espèces bactérienne en eaux profondes, notre choix d'amorces permet de viser une très grande proportion des espèces bactériennes connues [247]. En effet, en plus de lier les régions hypervariables, nous ciblons les quelques mutations des régions conservées de l'ADN 16S, ce qui augmente notre couverture totale des espèces bactériennes. Ces régions conservées se retrouvent de part et d'autre des régions hypervariables et, lorsque muté, restreignent l'utilisation d'une seule paire d'amorces. Puisque le projet se concentre sur la quantification des espèces bactériennes connues ou non, il était nécessaire de pouvoir ratisser le plus large éventail de séquences possibles en ciblant ainsi plusieurs mutations des régions conservées. Cette approche n'est pas absolument nécessaire pour l'identification par séquençage, puisque les espèces doivent être connues en ayant déjà été séquencées auparavant. D'autres recommandent plutôt de combiner des amorces de plusieurs régions pour augmenter la précision de l'identification, mais cela n'est pas utile pour notre technique de quantification, puisque nous risquerions d'amplifier l'ADN 16S en double [248]. Tester des régions différentes en parallèle aurait toutefois pu permettre la validation de la reproductibilité de la méthode. D'autre part, la région V6 serait la région la plus petite et la plus hétérogène, ce qui est un bon choix pour l'étude par qPCR, technique plus favorable à l'amplification de fragments plus courts [246, 249]. Ainsi, nous avons choisi de rester avec la combinaison d'amorces ciblant la région V6 de nos collaborateurs plutôt que d'utiliser une seule paire d'amorce ciblant une région différente de l'ADN 16S.

La technique consiste d'abord en l'établissement d'une équivalence bactérienne ayant pour but d'estimer le nombre de bactéries dans une quantité donnée d'ADN bactérien, et ce, en se basant sur des bactéries de référence. Pour notre part, nous avons choisi d'utiliser la bactérie *E. coli* en raison de sa disponibilité dans le laboratoire et de sa facilité de manipulation. Toutefois, le fait de choisir une seule bactérie comme référence peut être discutable, puisque le

nombre de copies du gène de l'ARN 16S peut varier en fonction de l'espèce bactérienne et entre les individus [11]. Des études ont pourtant déjà utilisé la bactérie *E. coli* comme méthode de quantification des espèces bactériennes globales par qPCR [25, 250]. Certains utilisent plutôt une courbe standard de dilutions de plasmides contenant le gène de l'ARN 16S [12, 251]. Toutefois, nous croyons que l'utilisation directe de l'ADN, provenant une culture bactérienne d'*E. coli* comparativement à des plasmides exprimant l'ADN 16S, permet se baser directement sur une véritable culture bactérienne comprenant des variations interindividuelles. De cette façon, il est aussi plus facile de garder le contrôle sur le véritable nombre de bactéries présentes, puisque celles-ci sont dénombrables suite à leur étalement sur des géloses avant l'extraction d'ADN. La qPCR quantifie directement l'ADN bactérien, ce qui est difficilement interprétable. Ainsi, il est pertinent de faire une approximation du nombre de bactéries pour avoir une idée représentative de l'infiltration bactérienne, et ce, même si notre estimation est basée sur une seule espèce bactérienne et qu'elle est possiblement quelque peu surévaluée. Évidemment, ce qui compte est de toujours utiliser la même unité de référence.

Tout d'abord, nous avons obtenu une relation linéaire à partir de laquelle il est possible de calculer une estimation de la quantité de bactéries dans une suspension bactérienne à partir de la D.O. (Figure 3A). La linéarité de la relation était attendue puisque la turbidité d'une suspension bactérienne avec *E. coli* augmente avec la croissance bactérienne lorsque la culture est dans sa phase de croissance [252]. Avec cette information, il a été aisé de pouvoir prendre une quantité déterminée de bactéries et d'en extraire l'ADN.

L'extraction d'ADN a été effectuée avec un protocole optimisé par nos collaborateurs, choisi pour sa capacité de briser la paroi bactérienne qui rend les bactéries à gram positif plus ardues à lyser. Une multitude de méthodes existe pour tenter d'extraire l'ADN de ces bactéries plus résistantes, dont l'utilisation de lyse chimique, d'agents antimicrobiens, d'agitation par billes, de sonication, de chauffage, ou encore par la combinaison de certaines de ces techniques [253, 254]. Par contre, plusieurs études comparant ces protocoles d'extraction d'ADN bactérien, que ce soit pour des échantillons environnementaux ou humains, s'entendent pour inclure une étape d'agitation par billes qui a pour but de briser physiquement les bactéries [253, 255, 256]. Ainsi, nous croyons que nous pouvons recueillir presque la totalité de l'ADN bactérien en

utilisant le protocole de nos collaborateurs qui inclut l'agitation par billes en plus d'une lyse chimique.

Il était impératif d'établir la relation montrant que plus le nombre de bactéries utilisé était élevé, plus il y avait d'ADN extrait (Figure 3B). Ceci est évidemment attendu, car chaque organisme contient de l'ADN et chacun devrait en contenir la même quantité puisque nous avons utilisé des cultures contenant une seule espèce bactérienne. Ensuite, pour estimer le nombre de bactéries contenu dans une quantité d'ADN bactérien donnée, nous avons établi l'équivalence bactérienne de 201 ± 9 *E. coli* par pg d'ADN. Si l'on se base sur la taille du génome bactérien de la souche de bactérie utilisée et sur le poids moyen des paires de bases nucléiques d'ADN, il est possible d'estimer le nombre théorique de bactéries dans 1 pg. Celui-ci correspond à 197 *E. coli* (calculs non montrés). La proximité de cette valeur théorique avec la nôtre permet de nous assurer que l'équivalence bactérienne est comprise dans les marges attendues et dans le bon ordre de grandeur. Pour ce qui est de nos collaborateurs du MD Anderson, ceux-ci ont obtenu une valeur différente d'équivalence bactérienne, mais cela peut être expliqué par un choix différent des espèces bactériennes de référence. En effet, la taille du génome de ces espèces est ce qui détermine en grande partie la quantité d'ADN bactérien contenu dans ces bactéries. Nous sommes ainsi confiants d'utiliser ce résultat pour quantifier les bactéries dans les échantillons d'ADN en se basant sur *E. coli*, d'autant plus que notre courbe standard de qPCR est préparée avec l'ADN de cette bactérie.

5.2 La méthode de quantification bactérienne dans l'ADN tumoral par qPCR est robuste

La technique de quantification est dépendante d'une courbe standard comme référence, ce pourquoi il était important de bien l'optimiser. Effectivement, puisque nous quantifions une très faible quantité d'ADN bactérien dans une grande quantité d'ADN génomique, il était nécessaire que ces standards contiennent 150 ng d'ADN humain commercial en plus de la quantité variable d'ADN bactérien. En effet, lors de nos essais préliminaires (non montrés), nous avons constaté qu'en absence de l'ADN humain dans les standards, la quantification de l'ADN bactérien était très différente. En effet, la présence d'ADN humain retardait le cycle de

qPCR où l'ADN bactérien était détecté. C'est pourquoi nous avons choisi d'inclure l'ADN humain dans tous les standards pour toutes les expériences.

Le choix de la limite de détection est critique pour notre méthode de classification. Nous avons choisi l'ADN humain comme ADN témoin. Nous avons fait ce choix puisque cet ADN témoin était toujours faible en équivalents bactériens et moins élevé que le standard #7. Un meilleur choix aurait été de tenter de faire un standard supplémentaire contenant une quantité d'ADN bactérien encore plus faible. Toutefois, la trop grande variation expérimentale (non montrée), obtenue en raison de l'ampleur des dilutions en série nécessaires pour arriver à cette concentration extrêmement faible d'ADN bactérien, nous a empêchés d'y parvenir. Bien que l'ADN humain commercial ait un niveau basal en ADN bactérien, possiblement lié à une faible contamination, sa quantification en équivalents bactériens était constante entre les expériences et plus faible que le standard #7, ce qui nous a poussés à l'utiliser comme limite de détection.

Nous avons montré que la courbe standard était fiable en raison de la relation logarithmique entre la quantité d'ADN bactérien des standards et le cycle du seuil de la qPCR (Figure 4). En effet, plus il y a de copies de l'ADN d'intérêt au départ, plus il est détecté tôt dans les cycles. Cette relation permet l'estimation du nombre de bactéries contenues dans un échantillon selon l'équivalence bactérienne. Ce genre de quantification basée sur l'ADN bactérien a déjà été utilisé dans plusieurs articles scientifiques, notamment dans l'étude du microbiote retrouvé dans les fèces [12] et le sang périphérique [87], ce qui témoigne de son potentiel de découvertes en recherche.

Pour valider la technique, nous avons montré que la quantification après l'ajout de quantités connues d'ADN bactérien à de l'ADN tumoral est précise (Figure 5). Nous notons toutefois une perte de précision dans les derniers échantillons contenant une très faible quantité d'ADN bactérien, correspondant à moins de 0,05 pg par puits. Par contre les quantités ajoutées de ces échantillons sont plus faibles que la quantité retrouvée dans l'ADN seul. Ainsi, puisque l'ADN seul est présent dans tous ces échantillons, la valeur théorique ajoutée est logiquement non atteignable. D'autre part, une étude est parvenue à une limite de détection de 10 copies par

réaction de qPCR, mais leur courbe standard est basée sur des plasmides exprimant l'ADN 16S et non sur l'ADN bactérien total [257]. Notre seuil de détection correspond à moins de 15 bactéries / 150 ng d'ADN tumoral, ce qui est très sensible considérant que certaines espèces bactériennes peuvent contenir plus d'une copie de l'ADN 16S [11]. Cette expérience a ainsi confirmé que l'ADN bactérien ajouté peut être détecté avec précision dans l'ADN d'une tumeur, ce qui nous laisse croire que, s'il y a présence de bactéries dans la tumeur, nous pourrions les détecter et les quantifier efficacement par notre technique.

Nous avons ensuite montré que l'ajout de bactéries à des tumeurs avant l'extraction d'ADN est détectable et quantifiable par notre technique de qPCR (Figure 6). Le nombre d'équivalents bactériens semble étonnement un peu plus élevé suite à l'ajout de LB sans bactéries. Ce phénomène est peut-être dû d'une faible contamination du milieu de culture bactérien par de l'ADN bactérien présent dans les réactifs qui le compose. D'autre part, le fait que l'ADN seul des deux tumeurs se retrouve sous le seuil de détection permet d'apprécier la distinction lorsqu'il y a ajout d'*E. coli*. Refaire cette expérience avec plus d'une souche bactérienne aurait ajouté plus de puissance à la démonstration de cette technique. En effet, pour valider leurs protocoles, le consortium du *Human Microbiome Project* a utilisé un ensemble de 21 espèces bactériennes [19]. Utiliser un tel mélange d'espèces bactériennes aurait pu démontrer que la technique est fonctionnelle avec un microbiote artificiel complexe, mais aurait compliqué grandement les manipulations. Notre quantification bactérienne étant basé sur *E. coli*, nous avons décidé d'utiliser seulement cette bactérie pour les tests d'optimisation. Aussi, notre test a tout de même été réalisé avec deux quantités de bactéries, tout en utilisant des fragments de deux tumeurs distinctes, ce qui montre que l'expérience est fonctionnelle dans plusieurs conditions. Ainsi, même s'il est possible d'améliorer ces manipulations, nous sommes confiants que la présence bactérienne dans une tumeur est détectable et quantifiable par notre méthode de détection des équivalents bactériens par qPCR.

Puisque l'équation de la relation logarithmique de la courbe standard varie entre les plaques de qPCR (non montré), nous avons utilisé cette courbe dans chaque expérience. Nous avons donc voulu montrer que la quantification en équivalents bactériens qui y est associée ne varie pas entre les expériences (Figure 7). En effet, puisqu'elles sont consistantes, équivalentes et

réfèrent à une courbe standard répétée à chaque expérience, nous pouvons utiliser les quantifications issues de plusieurs expériences et les analyser conjointement. D'autre part, les faibles erreurs standards des triplicatas techniques indiquent que l'ADN bactérien serait réparti de manière égale dans l'ADN tumoral extrait. L'ADN bactérien aurait pu ne pas être distribué également dans l'échantillon en raison de sa très faible présence comparativement à l'ADN tumoral, mais cela ne semble pas être le cas. Ainsi, même si nous utilisons seulement 150 ng d'ADN tumoral à la fois par notre méthode de quantification, nous obtenons une représentation satisfaisante et reproductible de la concentration bactérienne dans un échantillon.

5.3 Analyse des paramètres cliniques des patients de la cohorte ainsi que de la classification des tumeurs

5.3.1 La sélection des patients et la distribution de leurs données cliniques permettent une analyse approfondie

Le deuxième objectif était d'évaluer la présence de bactéries dans les tumeurs de patients atteints de cancer du sein. Les patients ont été sélectionnés dans la banque de tissus de cancer du sein, gérée par notre laboratoire, afin d'assurer une bonne représentation de chaque sous-type, soit minimalement 10 patients pour chacun d'entre eux. L'incapacité à atteindre ce nombre pour le sous-type HER2⁺ s'explique simplement par le très faible nombre de ces patients dans la banque. En effet, la totalité des échantillons HER2⁺ de la banque ont été utilisés pour cette étude. Même si ce sous-type est sous-représenté dans notre étude, cette sélection nous a tout de même permis d'étudier en détail l'analyse de survie associée à nos résultats.

La classification des sous-types utilisée dans l'étude (Tableau SIV) est basée sur l'expression de récepteurs spécifiques [258]. Puisque peu d'échantillons de la banque de tissus sont marquées pour le Ki-67, nous avons décidé d'inclure également le grade comme critère de séparation entre Luminal A et Luminal B, et ce, en raison du plus haut grade normalement associé au sous-type Luminal B selon la pathologie. Cette classification n'est pas la plus

optimale puisqu'avec des données de séquençage il est maintenant possible de raffiner la classification selon l'expression de plusieurs gènes [258]. Toutefois, l'absence de ce genre de données dans les dossiers cliniques des patients nous restreint à utiliser cette classification plus ancienne.

Le fait que la grande majorité des patients soit des femmes et que leur tumeur soit un carcinome canalaire infiltrant correspond à ce qui est normalement retrouvé dans la population canadienne [126, 156]. Ainsi, notre sélection permet l'étude intégrale des différents types de tumeurs de cancer du sein pour le sexe et la morphologie tumorale les plus fréquents.

Aussi, bien que plusieurs données cliniques de la cohorte (Tableau SIII) semblent être bien réparties, plusieurs informations étaient absentes. En effet, il aurait été intéressant de pouvoir vérifier plus en profondeur l'impact de grossesses ou de la ménopause avec la présence bactérienne dans les tumeurs, mais la plupart de ces données n'ont pas été inscrites dans le dossier clinique. Bien que la moyenne de suivi des patients avoisine les 5 années, plusieurs patients sont perdus au suivi (non montré). Ceci pourrait être relié au fait que les dossiers ne sont pas toujours mis à jour lorsque les patients retournent dans leurs hôpitaux en région après avoir subi une opération dans la métropole. Outre ces éléments manquants, l'hétérogénéité de plusieurs paramètres pour les patients de notre cohorte nous indique que l'association de ces données cliniques avec notre quantification bactérienne dans les tumeurs a le potentiel d'être étudiée en profondeur.

5.3.2 La détection bactérienne dans l'ADN des tumeurs permet la classification des patients atteints du cancer du sein

Nous avons ensuite montré la présence d'une certaine variabilité dans la quantité d'équivalents bactériens présents dans 150 ng d'ADN selon le fragment de tumeur (Figure 8). Ce n'est toutefois pas la totalité des tumeurs qui a été testée en double ou en triple, ce qui fait que la moyenne tumorale en équivalents bactériens n'est pas toujours basée sur le même nombre de fragments. Ceci induit potentiellement un biais puisque les résultats obtenus à partir des fragments d'une même tumeur sont parfois distants. La raison pour laquelle le nombre de fragments testés diffère s'explique par notre souci de minimiser la dégradation de

l'ADN bactérien dans les fragments suite à un trop grand nombre de décongelations. En effet, l'ADN génomique est sensible à la dégradation par l'augmentation du nombre de cycle congélation/décongélation [259]. Puisque nous nous attendions à très peu d'ADN bactérien dans nos échantillons d'ADN tumoral, nous souhaitions minimiser les décongelations. Ainsi, pour la première partie de la cohorte, seul un fragment par tumeur a été utilisé, puisqu'elle constituait en un test d'extraction d'ADN. Ensuite, pour la deuxième partie de la cohorte, deux fragments par tumeur ont été utilisés. Il en fut ainsi puisque nous voulions prendre en compte l'hétérogénéité, parfois observée, dans la détection d'équivalents bactériens entre les fragments d'une même tumeur. Cette hétérogénéité pourrait être due à la quantité variable de stroma entre les fragments tumoraux. Aussi, si la quantité d'ADN extrait n'était pas suffisante pour notre test, les fragments de tumeurs ont été décongelés une deuxième fois. En bref, nous avons tenté minimiser les décongelations des fragments de tumeurs avant leur extraction d'ADN pour préserver la qualité de l'ADN bactérien.

Pour la Figure 8, le choix de placer notre limite de détection au niveau des équivalents bactériens de l'ADN humain témoin est ce qui nous apparaissait le plus logique puisqu'il s'agissait du contrôle de notre méthode de qPCR. Voici ce qui caractérise notre méthode de classification selon les équivalents bactériens : nous considérons que les moyennes tumorales se trouvant sous notre limite de détection sont indétectables en bactéries, et ce, même si un des fragments de la tumeur se situe au-dessus de cette limite. Nous avons procédé de cette façon puisque nous avons une grande proportion des fragments qui avoisinait notre limite de détection. L'approche habituelle pour diviser des résultats de ce genre en deux groupes est plutôt de choisir la médiane [260]. Par contre, puisque les résultats expérimentaux varient généralement d'une étude à l'autre, le choix de la médiane restreint les comparaisons avec les études subséquentes éventuelles [260]. En choisissant la limite de détection de la technique de quantification comme délimitant, nous permettons une meilleure capacité de comparaison inter-études puisque chaque future étude pourra utiliser cette façon de classer ses tumeurs selon sa propre limite de détection. Ainsi, notre choix de méthode de classification permet une vue d'ensemble de la tumeur lorsque plusieurs fragments sont testés (hétérogénéité) et tient compte du nombre d'équivalents bactériens trouvés pour chaque fragment (amplitude). Aussi,

le seuil de classification est dicté par la limite de détection de notre méthode de quantification, ce qui rend la technique de classification applicable pour les études subséquentes.

Un des risques associés à l'étude du microbiome est la contamination des échantillons par les bactéries ou leur ADN avant les manipulations et pendant celles-ci. Bien que la contamination bactérienne soit un enjeu d'importance dans les hôpitaux en raison des infections nosocomiales, les chirurgies n'ont pas été effectuées dans un emplacement aussi stériles que les salles blanches utilisées dans le domaine pharmaceutique [261]. Il se pourrait donc que les tumeurs mises en banque aient pu être contaminées durant la chirurgie et par les pathologistes. Une autre étude du microbiome des tumeurs du sein utilise un contrôle environnemental, soit un tube de tampon phosphate salin, ouvert pendant la chirurgie, duquel l'ADN est extrait dans le but de vérifier la présence de contamination par l'air ambiant lors du retrait de la tumeur [89]. Ceci était impossible pour notre part puisque nous utilisons des échantillons déjà entreposés depuis plusieurs années. Toutefois, la contamination, si présente, devrait être assez semblable entre nos échantillons de tumeurs puisque celles-ci sont toutes traitées de la même façon. De plus, lors de la mise en banque, les tumeurs sont transportées dans un contenant stérile avant d'être immédiatement placées dans la solution de conservation puis congelées, ce qui limite leur contamination. Suite à la décongélation toutes les manipulations impliquant les tumeurs sont réalisées dans des conditions contrôlées et stériles. À plusieurs reprises, nous avons également effectué la méthode d'extraction en utilisant de l'eau stérile afin de vérifier la présence de contamination par qPCR, ce qui est conseillé pour l'étude du microbiote lorsqu'on s'attend à une très faible quantité de bactéries dans les échantillons testés [23]. Ces mesures permettent ainsi de limiter et contrôler une possible contamination bactérienne. Le fait que plusieurs fragments de tumeurs se retrouvent sous la limite de détection de notre technique nous laisse croire qu'une contamination des échantillons ne serait pas la cause des différences observées pour la quantité d'ADN bactérien détectée et que, s'il y en a une, elle serait minime.

Malgré ces sources potentielles de biais, nous avons montré que plusieurs tumeurs de ces patients atteints du cancer du sein contiennent des fragments dont l'ADN tumoral est positif en ADN bactérien (Figure 8). Nous avons remarqué que la quantification absolue par qPCR des bactéries dans les tumeurs de ce type de cancer n'a été faite qu'une seule autre fois par une

équipe de recherche californienne [212]. Leur utilisation de la quantification a pu être liée au grade des patients et au tissu normal adjacent, mais ils n'ont pas tenté d'associer leurs résultats avec la survie des patients comme nous l'avons fait. Ils ont tout de même pu détecter des bactéries dans un peu plus des trois quarts de leurs échantillons. Pour notre part, nous détectons des bactéries dans près de la moitié des tumeurs des patients de notre cohorte. Notre cohorte est toutefois deux fois plus grande et nous avons souvent testé plus d'un fragment par tumeur. D'autres équipes ont plutôt opté pour le séquençage et la quantification relative des espèces bactériennes retrouvées dans l'ADN tumoral, que ce soit pour le cancer du sein ou le cancer colorectal [206-208, 213, 214]. Plusieurs différences entre les espèces bactériennes spécifiques ont été trouvées, mais ils ne se sont pas concentrés sur l'abondance globale de bactéries infiltrant les tumeurs comme nous l'avons fait. Toutefois, ces études ont montré qu'il était possible d'identifier les bactéries trouvées dans l'ADN tumoral et que les communautés bactériennes retrouvées peuvent être spécifiques aux tumeurs. Nos résultats et ces études prouvent que les bactéries, minimalement leur ADN, sont présentes dans les extraits tumoraux, montrant que le microbiote tumoral est un concept d'intérêt.

Puisque la technique de quantification par qPCR repose sur l'analyse des équivalents bactériens dans seulement 150 ng d'ADN, nous voulions nous assurer que la quantité d'ADN extrait n'exerçait pas d'influence sur nos résultats. Toutefois, nous avons trouvé qu'il y avait généralement plus d'ADN suite à l'extraction dans les tumeurs classées «Indétectable» (Figure S1). Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'une plus grande dilution d'ADN soit nécessaire pour tester 150 ng de l'ADN en question. Ainsi, il est possible que la présence d'une trop grande quantité d'ADN suite à l'extraction biaise notre technique de classification. Une manière de contrer cette influence potentielle aurait été le test d'un plus grand nombre de fragments par tumeur ainsi que le test de morceaux de tumeurs plus petits, contenant moins d'ADN. Cette grande présence d'ADN dans certains fragments pourrait être due à un nombre de cellules variable dans divers emplacement de la tumeur. Pour en vérifier l'impact, il serait intéressant d'associer une visualisation des tumeurs par immunohistochimie à la détection de l'infiltration bactérienne. Toutefois, la quantité d'ADN extraite n'est pas proportionnellement liée au nombre d'équivalents bactériens retrouvés dans les fragments du groupe «Déteçtable». Nous croyons donc qu'il pourrait y avoir un certain biais vers la catégorie «Indétectable»

lorsque la quantité d'ADN extraite est trop grande, mais que la quantification exacte des tumeurs du groupe «Délectable» n'est pas affectée.

D'autre part, nous voulions évaluer si la taille de la tumeur biaisait nos résultats. Nous avons montré que poids du morceau n'influence pas notre quantification puisque le poids moyen ne variait pas entre le groupe «Délectable» et «Indélectable» (Figure S1). Étonnamment, la quantité d'ADN extrait n'était pas proportionnelle au poids de la tumeur. Ceci pourrait être expliqué par la présence variable d'amas lipidiques dans les fragments et par le fait que ceux-ci contiendraient moins d'ADN pour la même quantité de tissu, les cellules adipeuses pouvant être volumineuses [262]. Nous ne pouvons donc pas utiliser le poids pour normaliser nos résultats dans notre étude.

5.4 Les bactéries seraient présentes en nombre plus élevé dans le tissu normal adjacent à la tumeur que dans celle-ci

Les morceaux de tissus adjacents à la tumeur contenaient une plus faible quantité d'ADN que les fragments de tumeurs (Figure S2). Nous croyons que leur plus grand contenu lipidique explique cette différence, tel qu'observé lors des manipulations. Nous avons ainsi utilisé des morceaux plus volumineux que la majorité des fragments de tumeurs afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante. Ainsi, un nombre limité de ces morceaux a été testé, ce qui fait en sorte que ne pouvons pas associer chacune des tumeurs à son tissu normal adjacent.

Tout de même, nous avons montré qu'il y avait plus d'équivalents bactériens dans le tissu normal que dans les tumeurs (Figure 9A). L'étude ayant auparavant tenté de quantifier les bactéries tumorales dans le cancer du sein a montré que le tissu normal adjacent à la tumeur était plus concentré en bactéries que le tissu tumoral [212]. Nos résultats semblent donc concorder avec les leurs. Toutefois, en raison du faible nombre de fragments testés, nous avons voulu vérifier notre observation différemment. Pour ce faire, nous avons comparé chaque tissu normal adjacent aux tumeurs avec les tumeurs issues des mêmes patients (Figure 9B). Nous observons, dans la grande majorité des tissus normaux, un plus grand nombre d'équivalents bactériens en comparaison avec les tissus cancéreux, ce qui concorde encore une

fois avec les conclusions de l'étude précédente. Ce phénomène pourrait être un exemple de dysbiose du microbiote du sein causé par le tissu tumoral. En effet, un nombre réduit de bactéries dans la tumeur pourrait être la conséquence de mécanismes oncogéniques moins favorables à l'infiltration et à la prolifération bactérienne. Il est connu que certaines souches de bactéries peuvent cibler et proliférer spécifiquement dans les tumeurs chez la souris [224, 226, 231]. Toutefois, il serait possible que le tissu normal du sein ne soit pas constitué de ces souches bactériennes capables de survivre dans le microenvironnement tumoral, ce qui expliquerait pourquoi les bactéries sont en nombre moins élevé dans la tumeur. L'identification des espèces bactériennes par séquençage génomique permettrait d'évaluer cette hypothèse. Un autre aspect qui pourrait être important dans la réduction de la charge et des espèces bactériennes est la prise d'antibiotiques par les patients. En effet, il a été montré que certains antibiotiques pourraient être liés à l'apparition de plusieurs types de cancers [202]. Nous pourrions spéculer que la diminution de la représentation bactérienne, en raison de l'action cytotoxique des antibiotiques, pourrait favoriser l'apparition de tumeurs, dans lesquels on retrouverait moins de bactéries que dans le tissu normal adjacent. Ainsi, nos résultats concordent avec l'étude précédemment publiée selon laquelle le tissu normal du sein contiendrait une présence bactérienne plus élevée que dans les tumeurs, mais les mécanismes qui y sont liés sont encore inconnus.

5.5 Certains paramètres cliniques des patients, incluant la survie, pourraient être associés à la détection bactérienne tumorale

Le dernier objectif du projet était l'association de la détection bactérienne avec les données cliniques des patients. Pour ce faire, certains patients ont été retirés des analyses. Puisque l'étude porte spécifiquement sur le cancer du sein, le patient dont la tumeur était un sarcome n'a pas été conservé. Son inclusion au départ est due à une erreur dans la sélection des patients de la banque de tissus. Le retrait des analyses de survie a également été appliqué pour les patients dont les dossiers cliniques mentionnaient un décès lié à une condition autre que le cancer du sein ou métastatique. La décision de conserver les patients dont la cause du décès n'était pas indiquée peut être discutable, mais ils ont été conservés puisqu'ils constituent une grande proportion des patients décédés. Il est également probable que la plupart de ces

patients soient décédés de cette maladie. Notre choix de seulement retirer ces quelques patients permet donc une analyse de survie plus robuste et spécifique au cancer du sein.

Nous avons montré que les comorbidités, le grade, le traitement par l'hormonothérapie, l'apparition de métastases et le nombre de décès étaient différents selon notre classification des tumeurs par équivalents bactériens (Tableau II). Nous voulions ainsi déterminer si la présence de bactéries dans les tumeurs pouvait avoir un impact sur certains paramètres cliniques ou si elle en était plutôt une conséquence. Les mécanismes basés sur nos observations, prochainement discutés, restent toutefois des suppositions.

Pour débiter, nous observons que, bien que le nombre total de patients dans les deux catégories soit approximativement le même, toutes les comorbidités du groupe «Indétectables» sont liées au cancer du sein. Ainsi, les patients de ce groupe atteints d'une comorbidité liée au cancer ont tous développé un premier cancer du sein avant d'être atteint une seconde fois de ce type de cancer. Selon la Société Canadienne du Cancer, la récurrence du cancer du sein est plus fréquente pour les tumeurs de grade III, de sous-type Triple négatif ou HER2⁺, de taille élevée ou étant très répandues dans le corps [263]. Nous n'avons toutefois pas observé de différences pour ces paramètres entre les groupes «Déteçtables» et «Indéteçtable». Cette absence de différence pourrait témoigner que la présence bactérienne est un nouvel indicateur du risque de récurrence du cancer du sein. Nous pourrions spéculer que la présence de bactéries tumorales induit une présence immunitaire accrue dans la région du sein, ce qui pourrait prévenir l'apparition d'un deuxième cancer. Puisque les monocytes, les lymphocytes T et les lymphocytes B expriment des récepteurs de type TLR, ces cellules pourraient être activées par les PAMP des bactéries tumorales et contribuer à renforcer la mémoire immunitaire dans le sein, ce qui mènerait à une meilleure réponse anti-tumorale subséquente [62]. Ainsi, l'absence de bactéries dans la tumeur pourrait avoir un impact sur le risque de développement d'une tumeur primaire additionnelle pour ce type de cancer.

Pour ce qui est de la différence observée dans les grades selon notre classification, celle-ci semble être caractérisée par une détection bactérienne plus élevée dans les tumeurs de grade II. Puisque la différenciation et la prolifération cellulaire varient entre les grades de

Nottingham [159], nous pourrions spéculer que les bactéries ont une préférence pour les cellules tumorales correspondant aux critères d'inclusion du grade II. Le microenvironnement tumoral spécifique à ces cellules pourrait offrir d'éventuels avantages pour l'infiltration et la prolifération des bactéries. La présence de régions nécrotiques dans la tumeur pourrait expliquer en partie cette théorie. En effet, dans le cas du carcinome canalaire *in situ*, le nombre et la taille des zones de nécrose augmentent avec le grade [264]. De plus, certains types de bactéries anaérobiques, comme *Salmonella* et *Clostridium*, peuvent coloniser les zones nécrotiques faibles en oxygène des tumeurs, d'où le développement actuel de thérapies du cancer relié à ces bactéries [265]. Ainsi, une tumeur de grade II présenterait des régions nécrotiques, mais pas en trop grande quantité, ce qui permettrait la prolifération de bactéries anaérobiques et aérobiques. Il se pourrait donc que les bactéries bénéficient de la présence et de l'absence d'oxygène, tous deux possibles, dans les tumeurs de ce type. D'autre part, l'étude de Xuan *et al* qui s'est penchée sur la quantification absolue des bactéries tumorales du cancer du sein a montré qu'il y avait une tendance indiquant que plus le grade de la tumeur était important, moins il y avait de bactéries [212]. À première vue, ce n'est pas ce que nous retrouvons puisque la totalité des patients de grade I sont contenus dans le groupe «Indétectable». Nous avons donc utilisé une autre approche pour vérifier s'il y avait une diminution dans le nombre de bactéries avec l'augmentation du grade. Nous avons comparé le nombre moyen d'équivalents bactériens pour chaque grade, et ce, seulement pour les patients dans lesquels nous détectons des bactéries (non montré). Nous n'avons toutefois pas trouvé de différence significative entre les grades II et III de ces patients. La divergence de nos résultats avec ceux de l'autre étude aurait pu être expliquée par les différences entre nos cohortes, puisque la leur contenait seulement des patients atteints de cancer du sein ER⁺. Par contre, même suite à la sélection des patients ER⁺ de notre cohorte, nous n'observons pas la tendance retrouvée par l'autre groupe de recherche (non montré). Ainsi, nos résultats ne peuvent pas confirmer les conclusions avancées par l'étude de Xuan *et al* pour ce qui est du grade. Par ailleurs, nous supposons qu'un microenvironnement tumoral avantageux pour les bactéries, retrouvé lorsque la tumeur est de grade II, pourrait expliquer la plus forte représentation de ce grade dans le groupe «Détectable».

Nous retrouvons également une différence significative entre les deux groupes pour l'hormonothérapie adjuvante. Les traitements adjuvants sont administrés suite au retrait de la tumeur et sont basés en grande partie sur une prise de décision ayant comme critères le sous-type de la tumeur et la capacité des patients à recevoir les traitements, évaluée selon des échelles objectives comme l'échelle de performance ECOG [160, 266]. Ainsi, puisqu'on ne retrouve pas de différences entre les groupes au niveau des sous-types de cancer, on s'attendrait à ce qu'il n'y ait pas de différences non plus pour ce critère. La différence que nous retrouvons pour l'hormonothérapie adjuvante au Tableau II pourrait donc être due à ces types de décisions médicales ou à la décision du patient, éléments qui n'ont aucun lien avec les bactéries tumorales. En effet, certains des patients de la cohorte ont tout simplement refusés les traitements proposés. Ainsi, la différence observée pour ce traitement adjuvant ne peut pas, selon nous, être associée à nos résultats de quantification bactérienne.

En plus des différences observées entre les groupes de notre classification, l'absence de différence pour certains paramètres permet d'émettre quelques hypothèses. La taille de la tumeur n'aurait pas d'importance dans la détection ou non de bactéries, ce qui pourrait indiquer que le nombre total de cellules tumorales et la présence d'amas lipidiques volumineux n'influencent pas la présence de bactéries. La détection d'ADN bactérien ne dépendrait également pas du sous-type de cancer du sein, ce qui sous-entend que la technique peut fonctionner aussi bien quelle que soit l'expression des récepteurs ER, PR ou HER2. Ainsi, bien que l'expression de ces molécules soit un facteur déterminant dans le choix du traitement pour le patient [160], le sous-type de cancer du sein n'influencerait pas la présence de bactéries et celle-ci ne serait pas la source des différences de survie classiquement retrouvées entre les sous-types. Le fait que l'âge des patients et leurs antécédents familiaux de cancer ne diffèrent pas pourrait être considéré comme une indication de l'homogénéité des deux groupes, témoignant que notre méthode de détection et de classification est fonctionnelle pour n'importe quel patient.

Une autre observation notable dégagée de la comparaison est que le groupe « Indélectable » est lié au développement de métastases et à une moindre survie des patients. Nous pourrions ainsi spéculer que l'absence de bactéries tumorales mène à un plus grand risque de

développement de métastases. Le mécanisme exact derrière ce phénomène reste évidemment à être démystifié. Toutefois, les interactions des bactéries avec le système immunitaire pourraient être en cause, et ce, en raison de l'influence quasi-ubiquitaire de celui-ci sur cette maladie. En effet, les bactéries sont une source de stimulation immunitaire importante, notamment par les TLR [61]. De nombreux produits bactériens sont d'ailleurs utilisés comme adjuvants dans le but d'améliorer la réponse immunitaire spécifique à des vaccins [221]. Nous spéculons que ce concept pourrait également être appliqué à l'inflammation intratumorale et à une réponse immunitaire anti-tumorale amplifiée. Un exemple de cette théorie est représenté par ce qui suit. Les bactéries à l'intérieur des tumeurs pourraient être reconnues par les cellules de l'immunité innée et mener à l'activation des macrophages via leur TLR, ce qui permettrait la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire. Ceci favoriserait le recrutement immunitaire dans la tumeur et nous croyons qu'une certaine proportion des cellules recrutées pourrait reconnaître la tumeur de façon intrinsèque. La reconnaissance des cellules tumorales par des CPA pourrait ensuite mener à l'augmentation de la présentation antigénique, donc à l'activation des lymphocytes B et T anti-tumoraux. Cette activation immunitaire serait caractérisée par l'augmentation de la présence de lymphocytes T cytotoxiques dans la tumeur et par une production de cellules mémoires immunes. Cette inflammation et activation immunitaire, qui serait proportionnelle au nombre de bactéries intratumorales, permettrait l'amélioration de la réponse spécifique à la tumeur par l'établissement d'une mémoire immunitaire contre le cancer à long terme qui serait utile en présence de métastases. Pour vérifier cette théorie, il faudrait quantifier l'infiltration immunitaire dans les tumeurs de notre cohorte. Ainsi, il se pourrait qu'une moins bonne activation des cellules de l'immunité, en absence de bactéries tumorales détectables, mène à une progression plus avancée de cette maladie et à un plus grand risque de métastases.

D'autre part, en raison du pronostic défavorable associé aux métastases dans l'évolution du cancer [145], il est logique que l'on constate également une proportion plus élevée de patients décédés dans ce même groupe, dans lequel nous ne détectons pas de bactéries. Nous spéculons que suite au retrait de la tumeur, l'inflammation globale, préalablement induite par les bactéries tumorales, pourrait permettre une meilleure réponse immune face au cancer et diminuerait le risque de décès. De plus, certaines bactéries pourraient intrinsèquement

posséder la capacité d'infecter et de lyser les cellules tumorales, tel que montré par les exemples de thérapies bactériennes anti-tumorales en développement [226, 231]. Cette destruction bactérienne des cellules tumorales pourrait constituer une piste de réponse quant à l'amélioration de la survie pour les patients avec des bactéries tumorales détectables. Aussi, la production bactérienne de composés inhibant la prolifération des tumeurs pourrait être en cause. Un exemple de ce genre de molécule est le butyrate, un SCFA qui peut s'accumuler dans le noyau des cellules tumorales et stimuler l'acétylation des histones et autres protéines, ce qui permet l'induction de l'apoptose et une baisse de la prolifération [267]. Ainsi, l'absence de bactéries tumorales, ou leur diminution, pourrait témoigner d'une augmentation du risque de développement d'une maladie plus avancée dans le cas du cancer du sein. Cette augmentation de la progression tumorale serait liée à la réduction de la stimulation immunitaire, médiée par les bactéries, qui limiterait la réponse immunitaire anti-tumorale globale.

Suite à cette étude de corrélation avec les paramètres cliniques, nous avons produit la courbe de survie des patients selon notre classification basée sur la détection bactérienne tumorale (Figure 10). Étrangement, bien que les patients du groupe chez lequel nous détectons des bactéries tumorales ne survivent pas plus longtemps en moyenne, le groupe «Détectable» présente un nombre moins élevé de décès. L'analyse de la courbe ne tient compte que de ces deux paramètres, soit la survie dans le temps et les décès. Ainsi, puisque l'analyse de survie montre une différence significative entre les deux groupes et que la longévité des patients n'est pas affectée, nous croyons que la présence de bactéries dans les tumeurs exerce une puissante influence sur la survie globale des patients atteints du cancer du sein. Il se pourrait que l'absence de différence dans le temps de survie soit expliqué par la perte de suivi des patients. Il est aussi intéressant de constater que notre étude de survie globale ne prend pas en compte les traitements reçus des patients. Puisque nous observons une différence dans la survie sans la comparaison des traitements, cela pourrait indiquer que la détection de bactérie tumorale en elle-même est un nouveau critère associé à la survie, et ce, indépendamment des cibles actuelles des thérapies du cancer du sein. Selon notre recherche dans la littérature, il s'agit de la première étude liant la détection bactérienne dans les tumeurs solides à un bénéfice au niveau du pronostic. Ainsi, le microbiote tumoral pourrait être lié à un phénomène

important dans le développement de la maladie. Nous pensons que son influence est immunitaire, tel que discuté précédemment.

Une autre piste intéressante est la suivante : nos résultats indiquent que les patients ayant été soumis à une hormonothérapie néo-adjuvante sont tous dans le groupe «Indétectable». Les traitements néo-adjuvants sont administrés avant le retrait de la tumeur, ce qui laisse croire que l'hormonothérapie néo-adjuvante pourrait avoir un impact direct sur le microbiote tumoral et réduire la présence bactérienne. À la lumière des résultats de l'analyse de survie, il est possible de concevoir que la diminution des bactéries, induite par ce traitement, pourrait mener à une moins bonne survie des patients recevant de l'hormonothérapie néo-adjuvante. Nous spéculons que l'établissement d'un microbiote tumoral compétent, avant le retrait de la tumeur, pourrait être important dans la mise en place de ce phénomène. Une dysbiose serait donc observée dans la tumeur suite au blocage d'ER. Par comparaison, suite à la ménopause, caractérisée par la diminution de la production des estrogènes, le microbiote du vagin peut parfois être débalancé et être associé à l'atrophie vaginale [268]. En effet, les femmes en préménopause ont un microbiote enrichi en *Lactobacillus*, bactéries productrices d'acide lactique, ce qui favorise le maintien de l'acidité vaginale optimale. Dans le cas de l'atrophie vaginale, le microbiote peut être partiellement rétabli avec une thérapie à l'estrogène [269]. L'augmentation de la présence de glycogène dans les cellules épithéliales vaginales, médiée en partie par les estrogènes, permettrait une meilleure colonisation du vagin par les *Lactobacillus* [268]. Pour ce qui est du cancer du sein, c'est peut-être cette diminution de l'action de l'estrogène qui, suite au traitement néo-adjuvant, réduit le nombre de bactéries tumorales. Bien que cette théorie soit particulièrement intéressante, la prise d'antibiotiques par les patients avant le retrait de la tumeur, si elle est combinée à l'hormonothérapie néo-adjuvante, pourrait également influencer la différence que nous retrouvons. Les antibiotiques sont, par définition, des agents qui pourraient réduire le nombre de bactéries retrouvées. Nous n'avons toutefois pas étudié ces données en raison de leur difficulté d'accès dans le dossier clinique des patients. Une analyse poussée devra être réalisée afin de vérifier l'influence réelle des antibiotiques sur ce phénomène. Malgré cela, nos résultats pourraient suggérer que le microbiote tumoral est débalancé par l'hormonothérapie néo-adjuvante, ce qui influencerait négativement le taux de survie des patients. Pour prouver cette hypothèse, il faudrait comparer

les biopsies avant et après traitement en plus des tumeurs retirées. L'hormonothérapie est toutefois reconnue pour son impact positif sur la survie des patients et il faudrait comparer la différence de survie avant de conclure sur l'influence négative d'une dysbiose qui serait induite par ce traitement.

5.6 La détection bactérienne dans les tumeurs améliore la prédiction de survie de certains paramètres diagnostiques

Afin de vérifier l'influence de la présence bactérienne dans les tumeurs sur la survie selon le stade et le grade de la tumeur, il était primordial de vérifier si ces paramètres, en eux-mêmes, influençaient la survie des patients (Figure 11A-B). Le stade témoigne de la progression de la maladie alors que le grade représente la différenciation et la prolifération cellulaire de la tumeur [156, 158]. Il n'est donc pas surprenant de constater qu'il y a plus de décès si l'un ou l'autre de ces paramètres augmente. Ainsi, tel qu'attendu, plus le stade ou le grade était élevé, moins la survie était bonne.

Sachant ceci, nous avons vérifié la variation de la survie pour chaque classe de ces deux paramètres selon notre classification par équivalents bactériens (Figure 11 C-H). Pour ce qui est du stade TNM pathologique, la séparation entre les courbes de survie était bien visible pour le stade II et III. Le fait que ces stades ne soient pas significativement différents pourrait être expliqué par l'influence, précédemment montrée, du temps de survie qui n'est pas différent entre les deux groupes pour la survie globale des patients. Cependant, en faisant abstraction de cela, la différence dans le nombre de décès entre les deux courbes suggérerait que plus le stade est élevé, plus la survie serait influencée par la présence bactérienne dans les tumeurs. D'autre part, l'atteinte d'une différence significative pour le grade III nous indique que c'est lorsque le grade est très élevé qu'il y a surtout présence d'un bénéfice au niveau du pronostic pour les patients chez lesquels nous détectons des bactéries. Nos observations pourraient donc indiquer que lorsqu'une tumeur est détectée et enlevée tôt dans la maladie, alors qu'elle est moins répandue et que les cellules sont plus différenciées, la présence ou non de bactéries dans la tumeur ne représente pas un marqueur indicatif de la survie des patients à long terme. La différence moins marquée dans la survie pourrait donc être liée au fait que plus la tumeur est

de stade et de grade avancés lorsqu'elle est détectée, moins le taux de survie des patients est grand [270]. Ainsi, nous croyons que ce sont les patients avec une tumeur de stade et de grade élevés qui bénéficieraient de l'avantage sur la survie lié à l'infiltration tumorale de bactéries.

Nous avons ensuite observé que, dans notre cohorte, ce sont les tumeurs Luminal HER2⁺ qui correspondent à une moins bonne survie (Figure 12A). Classiquement, les patients ayant une tumeur de type Triple négatif et HER2⁺ ont une moins bonne survie [168]. Cette différence pourrait être simplement due aux pertes de suivi de plusieurs patients. Outre ceci, nous notons également une bonne différenciation des courbes de survie associées à chaque sous-type et celle-ci est représentative de ce qui est retrouvé habituellement, sauf pour HER2⁺ [168]. En effet, la mortalité des patients HER2⁺ est plus faible dans notre cohorte, mais ceci pourrait être dû au faible nombre de patients de ce sous-type inclus dans l'étude. Malgré ces petites différences et les pertes dans le suivi, nous considérons que la survie des patients est assez représentative de la population générale pour être analysée plus en profondeur.

Nous avons ensuite voulu vérifier si la détection d'équivalents bactériens pouvait apporter une distinction supplémentaire (Figure 12B-F). Bien que non significative, la différence entre les courbes de survie pour Luminal B et HER2⁺ est notable. Ceci pourrait être dû à l'absence d'amélioration dans le temps survécu entre les deux groupes de façon globale, tel que vu précédemment. Aussi, le très faible nombre de patients HER2⁺ limite la possibilité d'en tirer des conclusions solides. Pour ce qui est des tumeurs Luminal B, le grade élevé pourrait causer la tendance observée, puisque celui-ci entre directement dans la classification utilisée pour attribuer les tumeurs à ce sous-type. Par ailleurs, la plus forte différence dans la survie selon la présence bactérienne est retrouvée dans le sous-type Luminal HER2⁺. Le fait que la quasi-totalité des patients du groupe «Indétectables» soit décédés (6 patients sur 7) tandis qu'aucun du groupe «Délectable» (4 patients) ne le soit ajoute un poids supplémentaire à cette observation. Puisque les tumeurs du sous-type Luminal HER2⁺ sont positives pour ER, PR et HER2, il serait possible que la présence de ces trois récepteurs, lors de l'absence de bactéries tumorales, mène à une moins bonne survie, et ce, indépendamment des traitements. D'ailleurs, la survie des sous-types Luminal A et Triple négatifs, n'étant clairement pas dépendante de la détection bactérienne, nous laisse croire que l'expression spécifique de HER2 est peut-être

importante dans ce phénomène. Les bactéries pourraient donc avoir un rôle déterminant dans le traitement anti-HER2, ce qui expliquerait pourquoi leur absence dans la tumeur mène à une survie altérée. Une étude chez la souris a d'ailleurs montré que ce type de traitement est dépendant de l'activation des TLR et peut l'induire, via la voie de signalisation MyD88 [271]. Selon les auteurs, ceci mène à la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ qui sont indispensables pour la réponse anti-tumorale dans leur modèle murin. D'autre part, la différence observée pourrait impliquer un plus haut risque de formation de métastases par une réponse immunitaire globale altérée. Tel que mentionné précédemment, cette réponse immunitaire déficiente pourrait être liée à la diminution de la stimulation immunitaire influencée par le nombre moindre de bactéries tumorales. En bref, nous croyons que la détection des équivalents bactériens permet d'ajouter une précision supplémentaire quant au risque de décès des patients atteints de cancer du sein de type Luminal HER2⁺.

Chapitre 6. Conclusions

6.1 Réalisations

Nos résultats permettent de consolider notre hypothèse selon laquelle les bactéries peuvent être présentes dans la tumeur et le tissu normal du sein. En effet, la technique de quantification des équivalents bactériens dans l'ADN génomique est optimisée et fiable. Nous avons ainsi pu l'utiliser pour tester les échantillons d'une grande cohorte de patients atteints de cancer du sein, ce qui constituait nos premiers objectifs. Les différences trouvées entre le tissu normal adjacent aux tumeurs et les tumeurs suggèrent fortement l'existence d'un microbiote du sein qui pourrait être altéré en présence d'un cancer. D'autre part, nous avons pu associer nos résultats avec les données cliniques des patients : les patients ayant une tumeur se classant sous le seuil de détection ont une moins bonne survie que ceux dont l'ADN bactérien est détectable. Cette présence de bactéries à l'intérieur des tumeurs pourrait prédire une meilleure réponse anti-tumorale résiduelle suite au retrait chirurgical de la tumeur. De plus, le fait que la quasi-totalité des patients avec une tumeur Luminal HER2⁺ dans le groupe sans détection bactérienne soient décédés pourrait indiquer que le microbiote tumoral est une cible thérapeutique intéressante pour ce sous-type de cancer en particulier.

Ainsi, nous avons pu compléter plusieurs des objectifs du projet. Nous devons, dans un avenir rapproché, identifier les bactéries présentes dans nos échantillons tumoraux. En effet, ceci nécessitera l'utilisation du séquençage de nouvelle génération. Nous avons déjà pu tester certains de nos échantillons, mais ces résultats préliminaires ne permettent pas de tirer des conclusions pour l'instant (non montrés). D'autre part, nous devons également compléter cette étude en définissant l'infiltration immunitaire intratumorale en lien avec la détection bactérienne. Pour ce faire, nous pourrions utiliser une technique d'immunofluorescence de type multiplex sur les tumeurs des patients de notre cohorte afin de quantifier l'infiltration tumorale des cellules immunitaires.

6.2 Perspectives

La technique de qPCR de quantification bactérienne par l'ADN 16S, validée par nos résultats, permet de représenter l'infiltration bactérienne en associant la quantité d'ADN bactérien trouvé avec un nombre théorique d'*E. coli*. Toutefois, l'établissement de l'équivalence bactérienne pourrait être fait avec n'importe quelle combinaison de bactéries. Aussi, la méthode utilise l'ADN génomique extrait d'échantillons humains, quelle que soit sa provenance. Ainsi, il pourrait être intéressant de quantifier le nombre de bactéries dans plusieurs autres échantillons tels que le sang périphérique ou les ganglions lymphatiques, afin d'apporter une représentation systémique de la présence bactérienne dans le cancer. Bien entendu, l'extraction d'ADN devrait être optimisée selon le type tissu utilisé pour que la quantification soit fonctionnelle. La méthode en elle-même pourrait également être utilisée, suite à de petits ajustements, pour l'étude du microbiome de n'importe quelle maladie, ce qui en fait un outil potentiellement très intéressant.

Puisque le cancer du sein est l'un des cancers causant le plus grand nombre de décès au Canada [126], une meilleure compréhension des risques de mortalité qui y sont associés est primordiale pour le développement des traitements. Notre étude est la première à montrer un lien entre la présence de bactéries dans les tumeurs et la survie des patients atteints de cancer du sein. Il est clair que des études subséquentes devront être réalisées pour mieux comprendre et valider les mécanismes immunitaires qui expliquent nos résultats, soit que l'absence ou la diminution de bactéries dans la tumeur peuvent influencer négativement la survie des patients atteints du cancer du sein. L'association de l'infiltration immunitaire tumorale avec les résultats obtenus dans cette étude pourrait nous donner une bonne indication sur les cellules immunitaires associées au microbiote tumoral et sur la piste à suivre pour étudier l'influence de l'immunité. L'identification des espèces bactériennes retrouvées dans les fragments de tumeurs par séquençage pourrait également mener à des cibles thérapeutiques plus spécifiques. Aussi, reproduire les résultats avec de plus grandes cohortes permettrait d'augmenter la puissance statistique des analyses de survies. Ainsi, ces recherches ultérieures permettront de découvrir la meilleure façon d'utiliser le microbiote tumoral, que l'on retrouve bel et bien dans le cancer du sein, dans le but d'améliorer la réponse aux traitements actuels de cette maladie.

Bibliographie

- [1] PubMed, «Microbiome», *National Center for Biotechnology and Information*, 2017. [En ligne]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=microbiome>. [Accès en 2017].
- [2] Bromberg JS, Fricke WF, Brinkman CC, Simon T et Mongodin EF. «Microbiota-implications for immunity and transplantation». *Nat Rev Nephrol*. 2015; vol. 11, n° 6: pp. 342-53.
- [3] Lafontaine DLJ et Tollervey D. «The function and synthesis of ribosomes». *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; vol. 2, n° 7: pp. 514-20.
- [4] Yang B, Wang Y et Qian P-Y. «Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis». *BMC Bioinformatics*. 2016; vol. 17, n° 1: pp. 135.
- [5] Renvoisé A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V et Aubry A. «Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology?». *Medecine et maladies infectieuses*. 2013; vol. 43, n° 8: pp. 322-30.
- [6] Bodilis J, Nsigue-Meilo S, Besaury L et Quillet L. «Variable Copy Number, Intra-Genomic Heterogeneities and Lateral Transfers of the 16S rRNA Gene in *Pseudomonas*». *PLOS ONE*. 2012; vol. 7, n° 4: pp. e35647.
- [7] Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW et Kubista M. «How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments». *Biomolecular Detection and Quantification*. 2015; vol. 3, pp. 9-16.
- [8] Garibyan L et Avashia N. «Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)». *The Journal of investigative dermatology*. 2013; vol. 133, n° 3: pp. e6-e.
- [9] Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, *et al.* «Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions». *BMC Biotechnology*. 2003; vol. 3, pp. 18.

- [10] Gao W, Zhang W et Meldrum DR. «RT-qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells». *J Microbiol Methods*. 2011; vol. 85, n° 3: pp. 221-7.
- [11] Větrovský T et Baldrian P. «The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses». *PLOS ONE*. 2013; vol. 8, n° 2: pp. e57923.
- [12] Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J et Schreiber S. «Quantification of Intestinal Bacterial Populations by Real-Time PCR with a Universal Primer Set and Minor Groove Binder Probes: a Global Approach to the Enteric Flora». *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; vol. 42, n° 6: pp. 2566-72.
- [13] Ellis CL, Ma ZM, Mann SK, Li CS, Wu J, Knight TH, *et al.* «Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation». *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011; vol. 57, n° 5: pp. 363-70.
- [14] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, *et al.* «Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"». *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; vol. 103, n° 32: pp. 12115-20.
- [15] Gołębiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A et Wróbel B. «16S rDNA Pyrosequencing Analysis of Bacterial Community in Heavy Metals Polluted Soils». *Microbial Ecology*. 2014; vol. 67, n° 3: pp. 635-47.
- [16] Lluch J, Servant F, Paisse S, Valle C, Valiere S, Kuchly C, *et al.* «The Characterization of Novel Tissue Microbiota Using an Optimized 16S Metagenomic Sequencing Pipeline». *PLoS One*. 2015; vol. 10, n° 11: pp. e0142334.
- [17] Illumina, «An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology», *Illumina Inc.*, 2016. [En ligne]. Disponible: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf. [Accès en 2017].
- [18] Cox MJ, Cookson WO et Moffatt MF. «Sequencing the human microbiome in health and disease». *Hum Mol Genet*. 2013; vol. 22, n° R1: pp. R88-94.
- [19] «A framework for human microbiome research». *Nature*. 2012; vol. 486, n° 7402: pp. 215-21.

- [20] «Structure, function and diversity of the healthy human microbiome». *Nature*. 2012; vol. 486, n° 7402: pp. 207-14.
- [21] Ng LS, Teh WT, Ng SK, Eng LC et Tan TY. «Bacterial contamination of hands and the environment in a microbiology laboratory». *The Journal of hospital infection*. 2011; vol. 78, n° 3: pp. 231-3.
- [22] Witt N, Rodger G, Vandesompele J, Benes V, Zumla A, Rook GA, *et al.* «An Assessment of Air As a Source of DNA Contamination Encountered When Performing PCR». *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*. 2009; vol. 20, n° 5: pp. 236-40.
- [23] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, *et al.* «Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses». *BMC Biol*. 2014; vol. 12, pp. 87.
- [24] Tanner MA, Goebel BM, Dojka MA et Pace NR. «Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants». *Appl Environ Microbiol*. 1998; vol. 64, n° 8: pp. 3110-3.
- [25] Lazarevic V, Gaia N, Girard M et Schrenzel J. «Decontamination of 16S rRNA gene amplicon sequence datasets based on bacterial load assessment by qPCR». *BMC Microbiol*. 2016; vol. 16, pp. 73.
- [26] Tennessen K, Andersen E, Clingenpeel S, Rinke C, Lundberg DS, Han J, *et al.* «ProDeGe: a computational protocol for fully automated decontamination of genomes». *The ISME Journal*. 2016; vol. 10, n° 1: pp. 269-72.
- [27] Lozupone CA, Rhodes ME, Neff CP, Fontenot AP, Campbell TB et Palmer BE. «HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences, and effects of antiretroviral therapy». *Gut Microbes*. 2014; vol. 5, n° 4: pp. 562-70.
- [28] Francescone R, Hou V et Grivennikov SI. «Microbiome, inflammation, and cancer». *Cancer J*. 2014; vol. 20, n° 3: pp. 181-9.
- [29] Berg RD. «The indigenous gastrointestinal microflora». *Trends in microbiology*. 1996; vol. 4, n° 11: pp. 430-5.
- [30] Manor O, Levy R et Borenstein E. «Mapping the inner workings of the microbiome: genomic- and metagenomic-based study of metabolism and metabolic interactions in the human microbiome». *Cell metabolism*. 2014; vol. 20, n° 5: pp. 742-52.

- [31] Earle KA, Billings G, Sigal M, Lichtman JS, Hansson GC, Elias JE, *et al.* «Quantitative Imaging of Gut Microbiota Spatial Organization». *Cell Host Microbe*. 2015; vol. 18, n° 4: pp. 478-88.
- [32] Lawley TD et Walker AW. «Intestinal colonization resistance». *Immunology*. 2013; vol. 138, n° 1: pp. 1-11.
- [33] Flores GE, Caporaso JG, Henley JB, Rideout JR, Domogala D, Chase J, *et al.* «Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome». *Genome biology*. 2014; vol. 15, n° 12: pp. 531.
- [34] David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, *et al.* «Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome». *Nature*. 2014; vol. 505, n° 7484: pp. 559-63.
- [35] Daniel H, Gholami AM, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, *et al.* «High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice». *The ISME Journal*. 2014; vol. 8, n° 2: pp. 295-308.
- [36] De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Storia A, Laghi L, *et al.* «High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome». *Gut*. 2016; vol. 65, n° 11: pp. 1812-21.
- [37] Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, *et al.* «Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers». *Nature communications*. 2014; vol. 5, pp. 3654.
- [38] Kerr CA, Grice DM, Tran CD, Bauer DC, Li D, Hendry P, *et al.* «Early life events influence whole-of-life metabolic health via gut microflora and gut permeability». *Critical reviews in microbiology*. 2015; vol. 41, n° 3: pp. 326-40.
- [39] Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, *et al.* «Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer». *Nat Med*. 2016; vol. 22, n° 3: pp. 250-3.
- [40] Thoene-Reineke C, Fischer A, Friese C, Briesemeister D, Gobel UB, Kammertoens T, *et al.* «Composition of intestinal microbiota in immune-deficient mice kept in three different housing conditions». *PLoS One*. 2014; vol. 9, n° 11: pp. e113406.

- [41] Pehrsson EC, Tsukayama P, Patel S, Mejia-Bautista M, Sosa-Soto G, Navarrete KM, *et al.* «Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats». *Nature*. 2016; vol. 533, n° 7602: pp. 212-6.
- [42] Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, *et al.* «Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites». *Genome biology*. 2015; vol. 16, pp. 191.
- [43] Paulose JK, Wright JM, Patel AG et Cassone VM. «Human Gut Bacteria Are Sensitive to Melatonin and Express Endogenous Circadian Rhythmicity». *PLoS One*. 2016; vol. 11, n° 1: pp. e0146643.
- [44] Maurice CF, Knowles SC, Ladau J, Pollard KS, Fenton A, Pedersen AB, *et al.* «Marked seasonal variation in the wild mouse gut microbiota». *ISME J*. 2015; vol. 9, n° 11: pp. 2423-34.
- [45] Van De Graaff KM. *Human Anatomy*: McGraw-Hill Higher Education; 2001. 320 p.
- [46] Zhang K, Hornef MW et Dupont A. «The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity». *Cell Microbiol*. 2015; vol. 17, n° 11: pp. 1561-9.
- [47] Chang S-Y, Lee S-N, Yang J-Y, Kim DW, Yoon J-H, Ko H-J, *et al.* «Autophagy Controls an Intrinsic Host Defense to Bacteria by Promoting Epithelial Cell Survival: A Murine Model». *PLOS ONE*. 2013; vol. 8, n° 11: pp. e81095.
- [48] Spadoni I, Zagato E, Bertocchi A, Paolinelli R, Hot E, Di Sabatino A, *et al.* «A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria». *Science*. 2015; vol. 350, n° 6262: pp. 830-4.
- [49] Kim YS et Ho SB. «Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress». *Current gastroenterology reports*. 2010; vol. 12, n° 5: pp. 319-30.
- [50] Dharmani P, Srivastava V, Kisson-Singh V et Chadee K. «Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens». *Journal of innate immunity*. 2009; vol. 1, n° 2: pp. 123-35.
- [51] Birchenough GM, Nystrom EE, Johansson ME et Hansson GC. «A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion». *Science*. 2016; vol. 352, n° 6293: pp. 1535-42.

- [52] Bevins CL et Salzman NH. «Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis». *Nat Rev Micro*. 2011; vol. 9, n° 5: pp. 356-68.
- [53] Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR et Mahajan A. «Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium». *Mucosal immunology*. 2013; vol. 6, n° 4: pp. 666-77.
- [54] Chassaing B, Kumar M, Baker MT, Singh V et Vijay-Kumar M. «Mammalian gut immunity». *Biomedical journal*. 2014; vol. 37, n° 5: pp. 246-58.
- [55] Jung C, Hugot J-P et Barreau F. «Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine». *International Journal of Inflammation*. 2010; vol. 2010, pp. 823710.
- [56] Lei YM, Nair L et Alegre ML. «The interplay between the intestinal microbiota and the immune system». *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015; vol. 39, n° 1: pp. 9-19.
- [57] Hashiguchi M, Kashiwakura Y, Kojima H, Kobayashi A, Kanno Y et Kobata T. «Peyer's patch innate lymphoid cells regulate commensal bacteria expansion». *Immunology letters*. 2015; vol. 165, n° 1: pp. 1-9.
- [58] Schreiber F, Arasteh JM et Lawley TD. «Pathogen Resistance Mediated by IL-22 Signaling at the Epithelial-Microbiota Interface». *Journal of molecular biology*. 2015; vol. 427, n° 23: pp. 3676-82.
- [59] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T et Hume DA. «Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions». *Journal of leukocyte biology*. 2004; vol. 75, n° 2: pp. 163-89.
- [60] Mowat AM et Agace WW. «Regional specialization within the intestinal immune system». *Nat Rev Immunol*. 2014; vol. 14, n° 10: pp. 667-85.
- [61] Kawai T et Akira S. «The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors». *Nat Immunol*. 2010; vol. 11, n° 5: pp. 373-84.
- [62] Zarembek KA et Godowski PJ. «Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines». *The Journal of Immunology*. 2002; vol. 168, n° 2: pp. 554.
- [63] Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, *et al.* «Signals required for programming effector and memory development by CD8⁺ T cells». *Immunol Rev*. 2006; vol. 211, pp. 81-92.

- [64] Kubinak JL, Petersen C, Stephens WZ, Soto R, Bake E, O'Connell RM, *et al.* «MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health». *Cell Host Microbe*. 2015; vol. 17, n° 2: pp. 153-63.
- [65] Cao AT, Yao S, Gong B, Nurieva RI, Elson CO et Cong Y. «Interleukin (IL)-21 promotes intestinal IgA response to microbiota». *Mucosal Immunol*. 2015; vol. 8, n° 5: pp. 1072-82.
- [66] Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, *et al.* «A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production». *Science*. 2002; vol. 298, n° 5598: pp. 1630-4.
- [67] Gutzeit C, Magri G et Cerutti A. «Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction». *Immunol Rev*. 2014; vol. 260, n° 1: pp. 76-85.
- [68] Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, *et al.* «Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells». *Cell*. 2015; vol. 163, n° 2: pp. 367-80.
- [69] Farkas AM, Panea C, Goto Y, Nakato G, Galan-Diez M, Narushima S, *et al.* «Induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine». *Journal of immunological methods*. 2015; vol. 421, pp. 104-111.
- [70] Kumar P, Monin L, Castillo P, Elsegeiny W, Horne W, Eddens T, *et al.* «Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation». *Immunity*. 2016; vol. 44, n° 3: pp. 659-71.
- [71] Nakahashi-Oda C, Udayanga KG, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, *et al.* «Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces». *Nat Immunol*. 2016; vol. 17, n° 4: pp. 441-50.
- [72] Said HM. «Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease». *The Biochemical journal*. 2011; vol. 437, n° 3: pp. 357-72.
- [73] Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A et Jenkins DJ. «Colonic health: fermentation and short chain fatty acids». *Journal of clinical gastroenterology*. 2006; vol. 40, n° 3: pp. 235-43.
- [74] den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J et Bakker BM. «The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism». *Journal of Lipid Research*. 2013; vol. 54, n° 9: pp. 2325-40.

- [75] Yoon MY, Lee K et Yoon SS. «Protective role of gut commensal microbes against intestinal infections». *J Microbiol.* 2014; vol. 52, n° 12: pp. 983-9.
- [76] Guarner F et Malagelada J-R. «Gut flora in health and disease». *The Lancet.* 2003; vol. 361, n° 9356: pp. 512-9.
- [77] Bernet MF, Brassart D, Neeser JR et Servin AL. «Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria». *Gut.* 1994; vol. 35, n° 4: pp. 483-9.
- [78] de Wouters T, Jans C, Niederberger T, Fischer P et Ruhs PA. «Adhesion Potential of Intestinal Microbes Predicted by Physico-Chemical Characterization Methods». *PLoS One.* 2015; vol. 10, n° 8: pp. e0136437.
- [79] Costa MC, Santos JR, Ribeiro MJ, Freitas GJ, Bastos RW, Ferreira GF, *et al.* «The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*». *International journal of medical microbiology : IJMM.* 2016; vol. 306, n° 4: pp. 187-95.
- [80] Salzman NH. «The role of the microbiome in immune cell development». *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014; vol. 113, n° 6: pp. 593-8.
- [81] Round JL et Mazmanian SK. «The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease». *Nature reviews Immunology.* 2009; vol. 9, n° 5: pp. 313-23.
- [82] Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, *et al.* «Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation». *Nature.* 2013; vol. 504, n° 7480: pp. 451-5.
- [83] Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL et Blumberg RS. «How colonization by microbiota in early life shapes the immune system». *Science.* 2016; vol. 352, n° 6285: pp. 539-44.
- [84] Grice EA et Segre JA. «The skin microbiome». *Nat Rev Microbiol.* 2011; vol. 9, n° 4: pp. 244-53.
- [85] Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, *et al.* «Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways». *PLOS ONE.* 2010; vol. 5, n° 1: pp. e8578.
- [86] Martin DH. «The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease». *The American journal of the medical sciences.* 2012; vol. 343, n° 1: pp. 2-9.

- [87] Paisse S, Valle C, Servant F, Courtney M, Burcelin R, Amar J, *et al.* «Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing». *Transfusion*. 2016; vol. 56, n° 5: pp. 1138-47.
- [88] Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G et Burton JP. «The microbiome of the urinary tract--a role beyond infection». *Nat Rev Urol*. 2015; vol. 12, n° 2: pp. 81-90.
- [89] Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M, Macklaim JM, Gloor GB, Baban CK, *et al.* «Microbiota of human breast tissue». *Appl Environ Microbiol*. 2014; vol. 80, n° 10: pp. 3007-14.
- [90] Sauter ER, Ross E, Daly M, Klein-Szanto A, Engstrom PF, Sorling A, *et al.* «Nipple aspirate fluid: a promising non-invasive method to identify cellular markers of breast cancer risk». *British journal of cancer*. 1997; vol. 76, n° 4: pp. 494-501.
- [91] Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC et Martinez-Costa C. «Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota». *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2014; vol. 34, n° 8: pp. 599-605.
- [92] Martin R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jimenez E, Fernandez L, Smidt H, *et al.* «Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women». *Research in microbiology*. 2007; vol. 158, n° 1: pp. 31-7.
- [93] MeSH Database, «Dysbiosis», *National Center for Biotechnology and Information*, 2017. [En ligne]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=dysbiosis>. [Accès en 2017].
- [94] Yang L, Poles MA, Fisch GS, Ma Y, Nossa C, Phelan JA, *et al.* «HIV-induced immunosuppression is associated with colonization of the proximal gut by environmental bacteria». *Aids*. 2016; vol. 30, n° 1: pp. 19-29.
- [95] Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, *et al.* «Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection». *Science*. 1998; vol. 280, n° 5362: pp. 427-31.
- [96] Sommovilla J, Zhou Y, Sun RC, Choi PM, Diaz-Miron J, Shaikh N, *et al.* «Small bowel resection induces long-term changes in the enteric microbiota of mice». *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2015; vol. 19, n° 1: pp. 56-64.

- [97] Yu B, Dai CQ, Chen J, Deng L, Wu XL, Wu S, *et al.* «Dysbiosis of gut microbiota induced the disorder of helper T cells in influenza virus-infected mice». *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015; vol. 11, n° 5: pp. 1140-6.
- [98] Dethlefsen L et Relman DA. «Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation». *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; vol. 108 Suppl 1, pp. 4554-61.
- [99] Blaser MJ. «Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome». *Science*. 2016; vol. 352, n° 6285: pp. 544-5.
- [100] Fijlstra M, Ferdous M, Koning AM, Rings EH, Harmsen HJ et Tissing WJ. «Substantial decreases in the number and diversity of microbiota during chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model». *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 2015; vol. 23, n° 6: pp. 1513-22.
- [101] Montassier E, Gastinne T, Vangay P, Al-Ghalith GA, Bruley des Varannes S, Massart S, *et al.* «Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome». *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015; vol. 42, n° 5: pp. 515-28.
- [102] MeSH Database, «Bacterial Translocation», *National Center for Biotechnology and Information*, 2017. [En ligne]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68018988>. [Accès en 2017].
- [103] Clark MA, Jepson MA, Simmons NL et Hirst BH. «Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells». *Research in microbiology*. 1994; vol. 145, n° 7: pp. 543-52.
- [104] Muller AJ, Kaiser P, Dittmar KE, Weber TC, Haueter S, Endt K, *et al.* «*Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes». *Cell Host Microbe*. 2012; vol. 11, n° 1: pp. 19-32.
- [105] Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Müller AJ, Heikenwalder M, *et al.* «The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-2 and SPI-1 Type III Secretion Systems Allow *Salmonella* Serovar *typhimurium* to Trigger Colitis via MyD88-Dependent and MyD88-Independent Mechanisms». *The Journal of Immunology*. 2005; vol. 174, n° 3: pp. 1675.

- [106] Ribet D et Cossart P. «How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues». *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2015; vol. 17, n° 3: pp. 173-83.
- [107] Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Yamaguchi M et Kawabata S. «Group A Streptococcus exploits human plasminogen for bacterial translocation across epithelial barrier via tricellular tight junctions». *Scientific reports*. 2016; vol. 7, pp. 20069.
- [108] Peetermans M, Vanassche T, Liesenborghs L, Lijnen RH et Verhamme P. «Bacterial pathogens activate plasminogen to breach tissue barriers and escape from innate immunity». *Critical reviews in microbiology*. 2016; vol. 42, n° 6: pp. 866-82.
- [109] Bergmann S et Hammerschmidt S. «Fibrinolysis and host response in bacterial infections». *Thrombosis and Haemostasis*. 2007; vol. 98, n° 3: pp. 512-20.
- [110] Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, *et al.* «Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy». *BMC gastroenterology*. 2014; vol. 14, pp. 189.
- [111] Kim K-A, Gu W, Lee I-A, Joh E-H et Kim D-H. «High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway». *PLOS ONE*. 2012; vol. 7, n° 10: pp. e47713.
- [112] Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB, Nagarajan H, Zengler K et Gallo RL. «The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin». *Nature communications*. 2013; vol. 4, pp. 1431.
- [113] Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, Decker SO, Weigand MA, Hofer S, *et al.* «Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients». *Genome medicine*. 2016; vol. 8, n° 1: pp. 73.
- [114] Leber A, Viladomiu M, Hontecillas R, Abedi V, Philipson C, Hoops S, *et al.* «Systems Modeling of Interactions between Mucosal Immunity and the Gut Microbiome during Clostridium difficile Infection». *PLoS One*. 2015; vol. 10, n° 7: pp. e0134849.
- [115] MacFie J, O'Boyle C, Mitchell C, Buckley P, Johnstone D et Sudworth P. «Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity». *Gut*. 1999; vol. 45, n° 2: pp. 223-8.

- [116] Earley ZM, Akhtar S, Green SJ, Naqib A, Khan O, Cannon AR, *et al.* «Burn Injury Alters the Intestinal Microbiome and Increases Gut Permeability and Bacterial Translocation». *PLoS One*. 2015; vol. 10, n° 7: pp. e0129996.
- [117] Lood R, Waldetoft KW et Nordenfelt P. «Localization-triggered bacterial pathogenesis». *Future microbiology*. 2015; vol. 10, n° 10: pp. 1659-68.
- [118] Rogers GB, Hart CA, Mason JR, Hughes M, Walshaw MJ et Bruce KD. «Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling». *J Clin Microbiol*. 2003; vol. 41, n° 8: pp. 3548-58.
- [119] West CE, Renz H, Jenmalm MC, Kozyrskyj AL, Allen KJ, Vuillermin P, *et al.* «The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies». *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015; vol. 135, n° 1: pp. 3-13; quiz 4.
- [120] McLean MH, Dieguez D, Jr., Miller LM et Young HA. «Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases?». *Gut*. 2015; vol. 64, n° 2: pp. 332-41.
- [121] Shin NR, Whon TW et Bae JW. «Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota». *Trends in biotechnology*. 2015; vol. 33, n° 9: pp. 496-503.
- [122] Sartor RB. «Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases». *Gastroenterology*. 2008; vol. 134, n° 2: pp. 577-94.
- [123] Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, *et al.* «Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage». *Nat Med*. 2014; vol. 20, n° 6: pp. 648-54.
- [124] Rosenfeld CS. «Microbiome Disturbances and Autism Spectrum Disorders». *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2015; vol. 43, n° 10: pp. 1557-71.
- [125] Giannelli V, Di Gregorio V, Iebba V, Giusto M, Schippa S, Merli M, *et al.* «Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis». *World J Gastroenterol*. 2014; vol. 20, n° 45: pp. 16795-810.
- [126] Société Canadienne du Cancer, Statistique Canada, Agence de la santé publique du Canada, Registres provinciaux et territoriaux du cancer, «Statistiques canadiennes sur

- le cancer», *Gouvernement du Canada*, 2016. [En ligne]. Disponible: <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2016-FR.pdf?la=fr-CA>. [Accès en 2017].
- [127] Foulds L. «The experimental study of tumor progression: a review». *Cancer Res.* 1954; vol. 14, n° 5: pp. 327-39.
- [128] Greaves M et Maley CC. «Clonal evolution in cancer». *Nature.* 2012; vol. 481, n° 7381: pp. 306-13.
- [129] Hanahan D et Weinberg Robert A. «Hallmarks of Cancer: The Next Generation». *Cell.* vol. 144, n° 5: pp. 646-74.
- [130] Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, *et al.* «Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion». *Cell.* 2005; vol. 121, n° 3: pp. 335-48.
- [131] Weis SM et Cheresch DA. «Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets». *Nat Med.* 2011; vol. 17, n° 11: pp. 1359-70.
- [132] Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, *et al.* «Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth». *Nat Med.* 2001; vol. 7, n° 11: pp. 1194-201.
- [133] Wang G-L, Iakova P, Wilde M, Awad S et Timchenko NA. «Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP α growth inhibitory activity». *Genes & Development.* 2004; vol. 18, n° 8: pp. 912-25.
- [134] Cairns RA, Harris IS et Mak TW. «Regulation of cancer cell metabolism». *Nat Rev Cancer.* 2011; vol. 11, n° 2: pp. 85-95.
- [135] Wong RS. «Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2011; vol. 30, n° 1: pp. 87.
- [136] Fong PY, Xue WC, Ngan HYS, Chiu PM, Chan KYK, Tsao SW, *et al.* «Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: a cDNA array differential expression study». *Journal of Clinical Pathology.* 2006; vol. 59, n° 2: pp. 179-83.

- [137] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Peter LCH, *et al.* «Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer». *Science*. 1994; vol. 266, n° 5193: pp. 2011-5.
- [138] Shay JW et Wright WE. «Role of telomeres and telomerase in cancer». *Seminars in Cancer Biology*. 2011; vol. 21, n° 6: pp. 349-53.
- [139] Fernández-Medarde A et Santos E. «Ras in Cancer and Developmental Diseases». *Genes & Cancer*. 2011; vol. 2, n° 3: pp. 344-58.
- [140] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, *et al.* «PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer». *Science*. 1997; vol. 275, n° 5308: pp. 1943.
- [141] Chae YK, Anker JF, Carneiro BA, Chandra S, Kaplan J, Kalyan A, *et al.* «Genomic landscape of DNA repair genes in cancer». *Oncotarget*. 2016; vol. 7, n° 17: pp. 23312-21.
- [142] Valastyan S et Weinberg Robert A. «Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms». *Cell*. 2011; vol. 147, n° 2: pp. 275-92.
- [143] Kalluri R et Weinberg RA. «The basics of epithelial-mesenchymal transition». *The Journal of Clinical Investigation*. 2009; vol. 119, n° 6: pp. 1420-8.
- [144] Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, *et al.* «The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells». *Nature cell biology*. 2000; vol. 2, n° 2: pp. 84-9.
- [145] Langley RR et Fidler IJ. «The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs». *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011; vol. 128, n° 11: pp. 2527-35.
- [146] Joyce JA et Pollard JW. «Microenvironmental regulation of metastasis». *Nat Rev Cancer*. 2009; vol. 9, n° 4: pp. 239-52.
- [147] Dunn GP, Old LJ et Schreiber RD. «The three Es of cancer immunoediting». *Annual review of immunology*. 2004; vol. 22, pp. 329-60.
- [148] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ et Schreiber RD. «Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape». *Nat Immunol*. 2002; vol. 3, n° 11: pp. 991-8.

- [149] Dieu-Nosjean M-C, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C et Fridman WH. «Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond». *Trends in Immunology*. 2014; vol. 35, n° 11: pp. 571-80.
- [150] Munn DH et Bronte V. «Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment». *Current opinion in immunology*. 2016; vol. 39, pp. 1-6.
- [151] Zou W et Chen L. «Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment». *Nat Rev Immunol*. 2008; vol. 8, n° 6: pp. 467-77.
- [152] Mellman I, Coukos G et Dranoff G. «Cancer immunotherapy comes of age». *Nature*. 2011; vol. 480, n° 7378: pp. 480-9.
- [153] Restifo NP, Dudley ME et Rosenberg SA. «Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response». *Nat Rev Immunol*. 2012; vol. 12, n° 4: pp. 269-81.
- [154] Pardoll DM. «The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy». *Nat Rev Cancer*. 2012; vol. 12, n° 4: pp. 252-64.
- [155] Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, *et al.* «Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families». *The American Journal of Human Genetics*. 1998; vol. 62, n° 3: pp. 676-89.
- [156] Société Canadienne du Cancer, «Tumeurs cancéreuses du sein», 2017. [En ligne]. Disponible: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/cancerous-tumours/?region=qc>. [Accès en 2017].
- [157] Moll R, Mitze M, Frixen UH et Birchmeier W. «Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas». *The American Journal of Pathology*. 1993; vol. 143, n° 6: pp. 1731-42.
- [158] Société Canadienne du Cancer, «Stadification du cancer du sein», 2017. [En ligne]. Disponible: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/cancerous-tumours/?region=qc>. [Accès en 2017].
- [159] National Institutes of Health, «Tumor Grade», *National Cancer Institute*, 2017. [En ligne]. Disponible: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet>. [Accès en 2017].
- [160] Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, *et al.* «Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women

- With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline». *Journal of Clinical Oncology*. 2016; vol. 34, n° 10: pp. 1134-50.
- [161] Rivenbark AG, O'Connor SM et Coleman WB. «Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer». *The American Journal of Pathology*. vol. 183, n° 4: pp. 1113-24.
- [162] Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, *et al.* «Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends». *American Journal of Cancer Research*. 2015; vol. 5, n° 10: pp. 2929-43.
- [163] American Cancer Society, Inc., «Hormone Therapy for Breast Cancer», 2017. [En ligne]. Disponible: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html>. [Accès en 2017].
- [164] Rossi L, Laas E, Mallon P, Vincent-Salomon A, Guinebretiere JM, Lerebours F, *et al.* «Prognostic impact of discrepant Ki67 and mitotic index on hormone receptor-positive, HER2-negative breast carcinoma». *British journal of cancer*. 2015; vol. 113, n° 7: pp. 996-1002.
- [165] Dai X, Xiang L, Li T et Bai Z. «Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes». *J Cancer*. 2016; vol. 7, n° 10: pp. 1281-94.
- [166] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, *et al.* «Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update». *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013; vol. 31, n° 31: pp. 3997-4013.
- [167] Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, *et al.* «Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes». *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; vol. 27, n° 8: pp. 1160-7.
- [168] Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT et Mukesh BN. «Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival». *Clinical Medicine & Research*. 2009; vol. 7, n° 1-2: pp. 4-13.

- [169] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* «Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; vol. 98, n° 19: pp. 10869-74.
- [170] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al.* «Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; vol. 100, n° 14: pp. 8418-23.
- [171] Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, *et al.* «Twenty-Year Follow-up of a Randomized Study Comparing Breast-Conserving Surgery with Radical Mastectomy for Early Breast Cancer». *New England Journal of Medicine.* 2002; vol. 347, n° 16: pp. 1227-32.
- [172] Platt J, Baxter N et Zhong T. «Breast reconstruction after mastectomy for breast cancer». *CMAJ : Canadian Medical Association Journal.* 2011; vol. 183, n° 18: pp. 2109-16.
- [173] Mauri D, Pavlidis N et Ioannidis JPA. «Neoadjuvant Versus Adjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer: A Meta-Analysis». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2005; vol. 97, n° 3: pp. 188-94.
- [174] Recht A, Edge SB, Solin LJ, Robinson DS, Estabrook A, Fine RE, *et al.* «Postmastectomy Radiotherapy: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology*». *Journal of Clinical Oncology.* 2001; vol. 19, n° 5: pp. 1539-69.
- [175] Roychoudhuri R, Evans H, Robinson D et Møller H. «Radiation-induced malignancies following radiotherapy for breast cancer». *British journal of cancer.* 2004; vol. 91, n° 5: pp. 868-72.
- [176] Ronckers CM, Erdmann CA et Land CE. «Radiation and breast cancer: a review of current evidence». *Breast Cancer Research.* 2004; vol. 7, n° 1: pp. 21.
- [177] Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R et Yeoh K-W. «Biological response of cancer cells to radiation treatment». *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2014; vol. 1, pp. 24.
- [178] American Cancer Society, Inc., «How Chemotherapy Drugs Work», 2017. [En ligne]. Disponible: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>. [Accès en 2017].

- [179] Hassan MS, Ansari J, Spooner D et Hussain SA. «Chemotherapy for breast cancer (Review)». *Oncol Rep.* 2010; vol. 24, n° 5: pp. 1121-31.
- [180] Bonadonna G et Valagussa P. «Dose-Response Effect of Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer». *New England Journal of Medicine.* 1981; vol. 304, n° 1: pp. 10-5.
- [181] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, *et al.* «American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version)». *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2010; vol. 134, n° 7: pp. e48-72.
- [182] Ross JS et Fletcher JA. «The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy». *STEM CELLS.* 1998; vol. 16, n° 6: pp. 413-28.
- [183] Swain SM, Kim SB, Cortes J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, *et al.* «Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study». *The Lancet Oncology.* 2013; vol. 14, n° 6: pp. 461-71.
- [184] Ernst B et Anderson KS. «Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer». *Current Oncology Reports.* 2015; vol. 17, n° 2: pp. 5.
- [185] Gagliani N, Hu B, Huber S, Elinav E et Flavell RA. «The fire within: microbes inflame tumors». *Cell.* 2014; vol. 157, n° 4: pp. 776-83.
- [186] Dzutsev A, Goldszmid RS, Viaud S, Zitvogel L et Trinchieri G. «The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy». *Eur J Immunol.* 2015; vol. 45, n° 1: pp. 17-31.
- [187] Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, *et al.* «Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment». *Cell Host Microbe.* 2013; vol. 14, n° 2: pp. 207-15.
- [188] Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G et Han YW. «Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin». *Cell Host Microbe.* 2013; vol. 14, n° 2: pp. 195-206.
- [189] Garrett WS. «Cancer and the microbiota». *Science.* 2015; vol. 348, n° 6230: pp. 80-6.

- [190] Schwabe RF et Jobin C. «The microbiome and cancer». *Nat Rev Cancer*. 2013; vol. 13, n° 11: pp. 800-12.
- [191] Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, *et al.* «Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial». *The Lancet*. vol. 372, n° 9636: pp. 392-7.
- [192] Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, *et al.* «Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation». *BMJ : British Medical Journal*. 1991; vol. 302, n° 6788: pp. 1302-5.
- [193] Rutkowski MR et Conejo-Garcia JR. «Size does not matter: commensal microorganisms forge tumor-promoting inflammation and anti-tumor immunity». *Oncoscience*. 2015; vol. 2, n° 3: pp. 239-46.
- [194] Rutkowski MR, Stephen TL, Svoronos N, Allegrezza MJ, Tesone AJ, Perales-Puchalt A, *et al.* «Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation». *Cancer cell*. 2015; vol. 27, n° 1: pp. 27-40.
- [195] Ochi A, Nguyen AH, Bedrosian AS, Mushlin HM, Zerbakhsh S, Barilla R, *et al.* «MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells». *J Exp Med*. 2012; vol. 209, n° 9: pp. 1671-87.
- [196] Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B et Kroemer G. «Microbiome and Anticancer Immunosurveillance». *Cell*. 2016; vol. 165, n° 2: pp. 276-87.
- [197] Pevsner-Fischer M, Tuganbaev T, Meijer M, Zhang SH, Zeng ZR, Chen MH, *et al.* «Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers». *World J Clin Oncol*. 2016; vol. 7, n° 2: pp. 200-13.
- [198] Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuckova L, *et al.* «The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases». *Cell Mol Immunol*. 2011; vol. 8, n° 2: pp. 110-20.

- [199] Zhan Y, Chen P-J, Sadler WD, Wang F, Poe S, Núñez G, *et al.* «Gut microbiota protects against gastrointestinal tumorigenesis caused by epithelial injury». *Cancer research*. 2013; vol. 73, n° 24: pp. 7199-210.
- [200] Boursi B, Haynes K, Mamtani R et Yang YX. «Impact of antibiotic exposure on the risk of colorectal cancer». *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 2015; vol. 24, n° 5: pp. 534-42.
- [201] Boursi B, Mamtani R, Haynes K et Yang YX. «Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation - Another step in understanding the role of the human microbiota?». *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2015; vol. 51, n° 17: pp. 2655-64.
- [202] Velicer CM, Heckbert SR, Lampe JW, Potter JD, Robertson CA et Taplin SH. «Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer». *JAMA*. 2004; vol. 291, n° 7: pp. 827-35.
- [203] Rossini A, Rumio C, Sfondrini L, Tagliabue E, Morelli D, Miceli R, *et al.* «Influence of antibiotic treatment on breast carcinoma development in proto-neu transgenic mice». *Cancer Res*. 2006; vol. 66, n° 12: pp. 6219-24.
- [204] Baldwin DA, Feldman M, Alwine JC et Robertson ES. «Metagenomic Assay for Identification of Microbial Pathogens in Tumor Tissues». *mBio*. 2014; vol. 5, n° 5: pp. e01714-14.
- [205] Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, *et al.* «Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers». *Journal of gastroenterology*. 2015; vol. 50, n° 2: pp. 167-79.
- [206] Allali I, Delgado S, Marron PI, Astudillo A, Yeh JJ, Ghazal H, *et al.* «Gut Microbiome Compositional and Functional Differences between Tumor and Non-tumor Adjacent Tissues from Cohorts from the US and Spain». *Gut Microbes*. 2015; vol. 6, n° 3: pp. 161-72.
- [207] Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q et Qin H. «Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer». *Front Microbiol*. 2015; vol. 6, pp. 20.

- [208] Flemer B, Lynch DB, Brown JM, Jeffery IB, Ryan FJ, Claesson MJ, *et al.* «Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer». *Gut*. 2016; vol. 66, n° 4: pp. 633-43.
- [209] Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR et Dutilh BE. «A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects». *Nat Rev Microbiol*. 2012; vol. 10, n° 8: pp. 575-82.
- [210] Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, *et al.* «Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack». *Immunity*. 2015; vol. 42, n° 2: pp. 344-55.
- [211] Gur C, Mandelboim O et Bachrach G. «"Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot": Gentlemen, it is the microbes who have the last word (Louis Pasteur)-protect tumors from killing by immune cells». *Oncoimmunology*. 2015; vol. 4, n° 9: pp. e1038690.
- [212] Xuan C, Shamonki JM, Chung A, Dinome ML, Chung M, Sieling PA, *et al.* «Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer». *PLoS One*. 2014; vol. 9, n° 1: pp. e83744.
- [213] Hieken TJ, Chen J, Hoskin TL, Walther-Antonio M, Johnson S, Ramaker S, *et al.* «The Microbiome of Aseptically Collected Human Breast Tissue in Benign and Malignant Disease». *Scientific reports*. 2016; vol. 6, pp. 30751.
- [214] Urbaniak C, Gloor GB, Brackstone M, Scott L, Tangney M et Reid G. «The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer». *Applied and Environmental Microbiology*. 2016; vol. 82, n° 16: pp. 5039-48.
- [215] Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, *et al.* «Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment». *Science*. 2013; vol. 342, n° 6161: pp. 967-70.
- [216] Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillere R, Hannani D, *et al.* «The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide». *Science*. 2013; vol. 342, n° 6161: pp. 971-6.
- [217] Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, *et al.* «Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy». *Science*. 2015; vol. 350, n° 6264: pp. 1084-9.

- [218] Vetizou M, Pitt JM, Daillere R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, *et al.* «Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota». *Science*. 2015; vol. 350, n° 6264: pp. 1079-84.
- [219] McCarthy EF. «The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas». *The Iowa Orthopaedic Journal*. 2006; vol. 26, pp. 154-8.
- [220] Nauts HC, Swift WE et Coley BL. «The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research». *Cancer Res*. 1946; vol. 6, pp. 205-16.
- [221] Licciardi PV et Tang ML. «Vaccine adjuvant properties of probiotic bacteria». *Discovery medicine*. 2011; vol. 12, n° 67: pp. 525-33.
- [222] Boehm BE, Cornell JE, Wang H, Mukherjee N, Oppenheimer JS et Svatek RS. «Efficacy of Bacillus Calmette-guerin Strains for the Treatment of non-muscle Invasive Bladder Cancer: a Systematic Review and Network Meta-analysis». *J Urol*. 2017; vol. 198, n° 3: pp. 503-10.
- [223] Redelman-Sidi G, Glickman MS et Bochner BH. «The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer[mdash]a current perspective». *Nat Rev Urol*. 2014; vol. 11, n° 3: pp. 153-62.
- [224] Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y et Taniguchi S. «Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors». *Cancer Gene Ther*. 2000; vol. 7, n° 2: pp. 269-74.
- [225] Felfoul O, Mohammadi M, Taherkhani S, de Lanauze D, Zhong Xu Y, Loghin D, *et al.* «Magneto-aerotactic bacteria deliver drug-containing nanoliposomes to tumour hypoxic regions». *Nat Nano*. 2016; vol. 11, n° 11: pp. 941-7.
- [226] Roberts NJ, Zhang L, Janku F, Collins A, Bai R-Y, Staedtke V, *et al.* «Intratumoral injection of Clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses». *Science Translational Medicine*. 2014; vol. 6, n° 249: pp. 249ra111-249ra111.
- [227] Pawelek JM, Low KB et Bermudes D. «Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector». *Cancer Res*. 1997; vol. 57, n° 20: pp. 4537-44.
- [228] Toso JF, Gill VJ, Hwu P, Marincola FM, Restifo NP, Schwartzentruber DJ, *et al.* «Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium

- to patients with metastatic melanoma». *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002; vol. 20, n° 1: pp. 142-52.
- [229] Yoon W, Park YC, Kim J, Chae YS, Byeon JH, Min SH, *et al.* «Application of genetically engineered Salmonella typhimurium for interferon-gamma-induced therapy against melanoma». *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2017; vol. 70, pp. 48-61.
- [230] Zheng JH, Nguyen VH, Jiang S-N, Park S-H, Tan W, Hong SH, *et al.* «Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered Salmonella typhimurium secreting heterologous flagellin». *Science Translational Medicine*. 2017; vol. 9, n° 376: pp.
- [231] Zhao M, Yang M, Li XM, Jiang P, Baranov E, Li S, *et al.* «Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing Salmonella typhimurium». *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; vol. 102, n° 3: pp. 755-60.
- [232] Kawaguchi K, Murakami T, Suetsugu A, Kiyuna T, Igarashi K, Hiroshima Y, *et al.* «High-efficacy targeting of colon-cancer liver metastasis with Salmonella typhimurium A1-R via intra-portal-vein injection in orthotopic nude-mouse models». *Oncotarget*. 2017; vol. 8, n° 12: pp. 19065-73.
- [233] Zhang Y, Tome Y, Suetsugu A, Zhang L, Zhang N, Hoffman RM, *et al.* «Determination of the optimal route of administration of Salmonella typhimurium A1-R to target breast cancer in nude mice». *Anticancer research*. 2012; vol. 32, n° 7: pp. 2501-8.
- [234] Binder DC, Arina A, Wen F, Tu T, Zhao M, Hoffman RM, *et al.* «Tumor relapse prevented by combining adoptive T cell therapy with Salmonella typhimurium». *Oncoimmunology*. 2016; vol. 5, n° 6: pp. e1130207.
- [235] Binder DC, Engels B, Arina A, Yu P, Slauch JM, Fu YX, *et al.* «Antigen-specific bacterial vaccine combined with anti-PD-L1 rescues dysfunctional endogenous T cells to reject long-established cancer». *Cancer Immunol Res*. 2013; vol. 1, n° 2: pp. 123-33.
- [236] Langdon A, Crook N et Dantas G. «The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation». *Genome medicine*. 2016; vol. 8, pp. 39.
- [237] DiGiandomenico A et Sellman BR. «Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation?». *Current opinion in microbiology*. 2015; vol. 27, pp. 78-85.

- [238] Butel MJ. «Probiotics, gut microbiota and health». *Medecine et maladies infectieuses*. 2014; vol. 44, n° 1: pp. 1-8.
- [239] Preidis GA et Versalovic J. «Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era». *Gastroenterology*. 2009; vol. 136, n° 6: pp. 2015-31.
- [240] Musilova S, Rada V, Marounek M, Nevoral J, Duskova D, Bunesova V, *et al.* «Prebiotic effects of a novel combination of galactooligosaccharides and maltodextrins». *Journal of medicinal food*. 2015; vol. 18, n° 6: pp. 685-9.
- [241] Sawin EA, De Wolfe TJ, Aktas B, Stroup BM, Murali SG, Steele JL, *et al.* «Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice». *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2015; vol. 309, n° 7: pp. G590-601.
- [242] Hourigan SK, Chen LA, Grigoryan Z, Laroche G, Weidner M, Sears CL, *et al.* «Microbiome changes associated with sustained eradication of *Clostridium difficile* after single faecal microbiota transplantation in children with and without inflammatory bowel disease». *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015; vol. 42, n° 6: pp. 741-52.
- [243] Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, *et al.* «Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook». *Gastroenterology*. 2015; vol. 149, n° 1: pp. 223-37.
- [244] Nelson MH, Diven MA, Huff LW et Paulos CM. «Harnessing the Microbiome to Enhance Cancer Immunotherapy». *J Immunol Res*. 2015; vol. 2015, pp. 368736.
- [245] Baker GC, Smith JJ et Cowan DA. «Review and re-analysis of domain-specific 16S primers». *J Microbiol Methods*. 2003; vol. 55, n° 3: pp. 541-55.
- [246] Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N et Alland D. «A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria». *Journal of microbiological methods*. 2007; vol. 69, n° 2: pp. 330-9.
- [247] Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, *et al.* «Microbial population structures in the deep marine biosphere». *Science*. 2007; vol. 318, n° 5847: pp. 97-100.

- [248] Yang B, Wang Y et Qian P-Y. «Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis». *BMC Bioinformatics*. 2016; vol. 17, pp. 135.
- [249] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* «The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments». *Clinical chemistry*. 2009; vol. 55, n° 4: pp. 611-22.
- [250] Castillo M, Martin-Orue SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martin M et Gasa J. «Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR». *Veterinary microbiology*. 2006; vol. 114, n° 1-2: pp. 165-70.
- [251] Rubin BE, Sanders JG, Hampton-Marcell J, Owens SM, Gilbert JA et Moreau CS. «DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure». *Microbiologyopen*. 2014; vol. 3, n° 6: pp. 910-21.
- [252] Sezonov G, Joseleau-Petit D et D'Ari R. «Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth». *Journal of bacteriology*. 2007; vol. 189, n° 23: pp. 8746-9.
- [253] Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z et Forney LJ. «Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome». *PLoS One*. 2012; vol. 7, n° 3: pp. e33865.
- [254] Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ et Morata P. «Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis». *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. 2008; vol. 15, n° 2: pp. 293-6.
- [255] de Boer R, Peters R, Gierveld S, Schuurman T, Kooistra-Smid M et Savelkoul P. «Improved detection of microbial DNA after bead-beating before DNA isolation». *J Microbiol Methods*. 2010; vol. 80, n° 2: pp. 209-11.
- [256] Yeates C, Gillings MR, Davison AD, Altavilla N et Veal DA. «Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification». *Biological Procedures Online*. 1998; vol. 1, n° 1: pp. 40-7.
- [257] Kramski M, Gaeguta AJ, Lichtfuss GF, Rajasuriar R, Crowe SM, French MA, *et al.* «Novel sensitive real-time PCR for quantification of bacterial 16S rRNA genes in

- plasma of HIV-infected patients as a marker for microbial translocation». *J Clin Microbiol.* 2011; vol. 49, n° 10: pp. 3691-3.
- [258] Rakha EA et Green AR. «Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know». *Pathology.* vol. 49, n° 2: pp. 111-9.
- [259] Shao W, Khin S et Kopp WC. «Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis». *Biopreservation and biobanking.* 2012; vol. 10, n° 1: pp. 4-11.
- [260] Altman DG et Royston P. «The cost of dichotomising continuous variables». *BMJ : British Medical Journal.* 2006; vol. 332, n° 7549: pp. 1080.
- [261] Favero MS, Puleo JR, Marshall JH et Oxborrow GS. «Comparison of Microbial Contamination Levels Among Hospital Operating Rooms and Industrial Clean Rooms». *Applied Microbiology.* 1968; vol. 16, n° 3: pp. 480-6.
- [262] Rutkowski JM, Stern JH et Scherer PE. «The cell biology of fat expansion». *The Journal of cell biology.* 2015; vol. 208, n° 5: pp. 501.
- [263] Société Canadienne du Cancer, «Risque de récurrence après la chirurgie et traitements supplémentaires», 2017. [En ligne]. Disponible: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/treatment/risk-of-breast-cancer-recurrence-and-adjuvant-therapy/>. [Accès en 2017].
- [264] Société Canadienne du Cancer, «Classification histologique du cancer du sein», 2017. [En ligne]. Disponible: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/grading/>. [Accès en 2017].
- [265] Pawelek JM, Low KB et Bermudes D. «Bacteria as tumour-targeting vectors». *The Lancet Oncology.* 2003; vol. 4, n° 9: pp. 548-56.
- [266] Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, *et al.* «Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group». *American journal of clinical oncology.* 1982; vol. 5, n° 6: pp. 649-55.
- [267] Donohoe DR, Holley D, Collins LB, Montgomery SA, Whitmore AC, Hillhouse A, *et al.* «A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner». *Cancer Discov.* 2014; vol. 4, n° 12: pp. 1387-97.

- [268] Mitchell CM et Reed SD. «The Vagina Dialogues». *Menopause (New York, NY)*. 2014; vol. 21, n° 5: pp. 437-8.
- [269] Heinemann C et Reid G. «Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy». *Canadian journal of microbiology*. 2005; vol. 51, n° 9: pp. 777-81.
- [270] Société Canadienne du Cancer, «Pronostic et survie pour le cancer du sein», 2017. [En ligne]. Disponible: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/prognosis-and-survival/>. [Accès en 2017].
- [271] Stagg J, Loi S, Divisekera U, Ngiew SF, Duret H, Yagita H, *et al.* «Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; vol. 108, n° 17: pp. 7142-7.

Annexes

Tableau SI. Description des amorces de qPCR.

Nom des amorces ^a	Séquence des amorces
986F	5'- CNA CGC GAA GAA CCT TAN C -3'
Bac967d	5'- ATA CGC GAR GAA CCT TAC C -3'
Bac967Fe	5'- CTA ACC GAN GAA CCT YAC C -3'
Bac967b et Bac967c dégénéré	5'- CAA CGC GMA RAA CCT TAC C -3'
1046R	5'- CGA CRR CCA TGC ANC ACC T -3'

^a Basé sur probeBase (<http://probebase.csb.univie.ac.at>)

Tableau SII. Équivalence bactérienne des standards utilisés dans la courbe standard pour la qPCR.

Courbe standard	Quantité d'ADN bactérien (pg)	Équivalents bactériens
Standard #1	400,00	80400
Standard #2	100,00	20100
Standard #3	25,00	5025
Standard #4	6,25	1256
Standard #5	1,56	314
Standard #6	0,39	79
Standard #7	0,10	20

Les équivalents bactériens sont calculés en fonction de la relation entre l'ADN extrait et le nombre estimé de bactéries pour *E. coli* (**Figure 3B**).

Tableau SIII. Caractéristiques cliniques des patients de l'étude.

Caractéristiques	n (%)
Nombre de patients	86 (100)
Sexe, Femme	85 (99)
Âge médian au diagnostic (Années) [Étendue]	56 [30-91]
Ménopause	
Non ménopausée	4 (5)
Ménopausée par chirurgie	4 (5)
Pré-ménopausée	4 (5)
Post-ménopausée	17 (20)
Manquant	57 (66)
Historique de grossesse	
Oui	9 (10)
Non	2 (2)
Manquant	75 (87)
Antécédents familiaux de cancer	
Oui	33 (38)
Non	48 (56)
Manquant	5 (6)
Comorbidités (cancer)*	
Sein	12 (14)
Sein et autre	2 (2)
Autre	10 (12)
Type de mastectomie	
Partielle	56 (65)
Radicale	1 (1)
Radicale modifiée	20 (23)
Simple/totale	6 (7)
Manquant	3 (3)
Latéralité	
Droite	49 (57)
Gauche	36 (42)
Organe non pair	1 (1)
Taille moyenne de la tumeur (mm) ± SD	29 ± 21
Morphologie	
Carcinome lobulaire	8 (9)
Adénocarcinome canalaire infiltrant	62 (72)
Carcinome canalaire et lobulaire infiltrant	3 (3)
Carcinome canalaire infiltrant et autre	7 (8)
Adénocarcinome apocrine	2 (2)
Carcinome métaplasique	1 (1)
Liposarcome	1 (1)
Sarcome	1 (1)
Adénocarcinome mucipare	1 (1)

Sous-type de cancer du sein	
Luminal A	28 (33)
Luminal B	15 (17)
Luminal HER2 ⁺	11 (13)
HER2 ⁺	6 (7)
Triple négatif	25 (29)
Sarcome de haut grade (non sein)	1 (1)
Stade TNM pathologique simplifié	
0-I	20 (23)
II	41 (48)
III-IV	22 (26)
Manquant	3 (3)
Grade de Nottingham	
I	5 (6)
II	29 (34)
III	51 (59)
Manquant	1 (1)
Traitements reçus	
Chimiothérapie néo-adjuvante	6 (7)
Chimiothérapie adjuvante	48 (56)
Hormonothérapie néo-adjuvante	6 (7)
Hormonothérapie adjuvante	49 (57)
Radiothérapie néo-adjuvante	2 (2)
Radiothérapie adjuvante	59 (69)
Métastases	20 (23)
Années de suivi, moyenne (Années) ± SD	4,8 ± 2,7
Décès	18 (21)
Cause du décès	
Cancer du sein ^T	2 (2)
Cancer métastatique ^T	8 (9)
Non indiqué	6 (7)
Autre	2 (2)

*Patients qui présentent un cancer supplémentaire en plus du cancer du sein étudié. Les données manquantes n'étant pas différenciable des patients sans comorbidité, seuls les patients avec comorbidité sont présentés. ^TLa distinction entre le cancer du sein ou métastatique n'est pas inscrite dans les données cliniques. Les métastases du cancer métastatique ne sont pas identifiées comme provenant nécessairement du cancer du sein.

Tableau SIV. Définition des sous-types de cancer du sein.

Sous type de cancer du sein	Récepteurs des œstrogènes (ER)	Récepteur de la progestérone (PR)	HER2/neu	Ki-67 > 15% ou grade III
Luminal A	+	+/-	-	-
Luminal B	+	+/-	-	+
Luminal HER2 ⁺	+	+/-	+	+/-
HER2 ⁺	-	-	+	+/-
Triple négatif	-	-	-	+/-

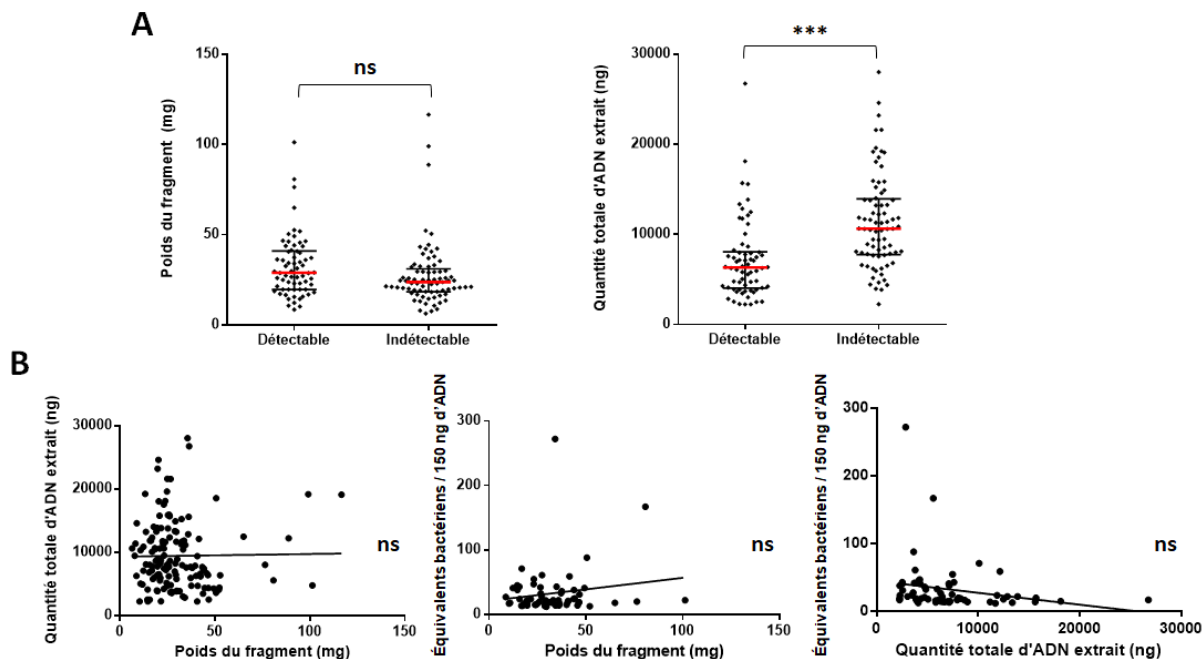


Figure S1. La quantité extraite d'ADN d'un fragment est plus élevée lorsque des équivalents bactériens ne sont pas détectables, mais il n'y a pas de relation entre la quantité extraite et le nombre d'équivalents bactériens.

A. Le poids (gauche) des fragments de tumeurs et la quantité totale d'ADN extrait (droite) de ceux-ci sont montrés pour le groupe détectable et indétectable. Chaque fragment a été classé indétectable ou détectable en utilisant comme séparateur la limite de détection de la technique de qPCR de toutes les expériences combinées représentée par l'ADN témoin. Les moyennes et erreurs standards sont représentées. **B.** Corrélations des fragments pour : la quantité d'ADN extrait des fragments et leur poids (gauche). Corrélation des fragments classés comme détectables pour : le poids et les équivalents bactériens / 150 ng d'ADN (centre), ainsi que les équivalents bactériens / 150 ng d'ADN et l'ADN total extrait (droite).

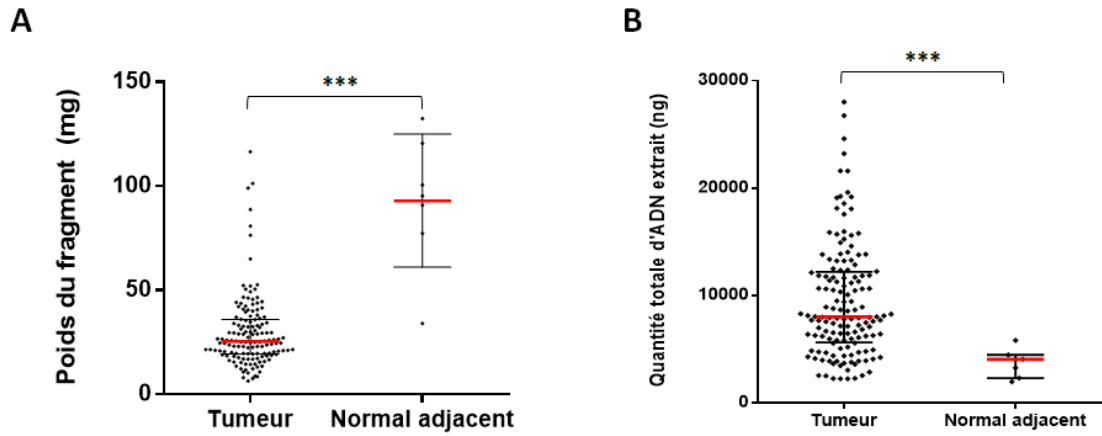


Figure S2. L'ADN du tissu normal adjacent à la tumeur est plus difficile à extraire.

A. Poids des fragments de tumeurs ou de tissus normaux adjacents utilisés pour l'extraction d'ADN. La moyenne et l'erreur standard de tous les fragments sont représentées. **B.** Quantité totale de l'ADN extrait des fragments de tumeur ou de tissus normaux adjacents aux tumeurs. Les moyennes et erreurs standards sont représentées.