THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences Biologiques pour la Santé

École doctorale CBS2 n°168

Unité de recherche IRCM U1194 INSERM

Rôle du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la biologie des cellules souches intestinales normales et cancéreuses et leurs propriétés de chimiorésistance

Présentée par Antoine GLEIZES

Le 13 décembre 2021

Sous la direction de Marion LAPIERRE

Devant le jury composé de

Julie PANNEQUIN, DR, IGF UMR 5203 CNRS	Présidente
Nathalie VERGNOLLE, DRE, IRSD U1220 INSERM	Rapportrice
Abdel-Majid KHATIB, DR, LAMC U1029 INSERM	Rapporteur
Jean-Noël FREUND, DR, IRFAC U113 INSERM	Examinateur
Maguy DEL RIO, CR, IRCM U1194 INSERM	Examinatrice
Marion LAPIERRE, CR, IRCM U1194 INSERM	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Rôle du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la biologie des cellules souches intestinales normales et cancéreuses et leurs propriétés de chimiorésistance

Le taux d'incidence et de mortalité des cancers colorectaux (CCR) font de cette maladie un problème de santé publique majeur à travers le monde. La compréhension des mécanismes d'initiation des processus oncogéniques ainsi que la séquence d'évènements qui soutient le développement tumoral a permis d'identifier des instabilités génomiques associées à la progression des cancers ainsi que de nombreuses mutations activatrices d'oncogènes ou inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs, améliorant ainsi le diagnostic et la prise en charge clinique des patients. Ces évènements favorisent le phénotype cancéreux des cellules intestinales et notamment l'apparition d'une population cellulaire bien particulière, les cellules souches cancéreuses (CSC). Les CSC sont notamment décrites par leurs capacités à soutenir la croissance tumorale et à régénérer la tumeur. De plus, ces cellules présentent une exacerbation des mécanismes de tolérance aux thérapies ainsi que des propriétés favorisant l'échappement à ces traitements. Dans ce contexte, notre équipe a pu mettre un évidence le rôle protecteur du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la tumorigenèse intestinale. Le but de mon doctorat a consisté à caractériser les fonctions de cette protéine dans la physiologie intestinale afin de comprendre par quels mécanismes elle influence la biologie des cellules épithéliales intestinales et les mécanismes associés à l'oncogenèse intestinale. En premier lieu, j'ai finalisé l'identification de la régulation négative de la différenciation des cellules de Paneth, population clé dans la régulation de la physiologie intestinale, par RIP140 au travers du contrôle négatif du facteur de transcription SOX9. Par ailleurs, j'ai pu observer que la perte d'expression de RIP140 dans les cellules épithéliales intestinales est associée à une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs ainsi qu'à une perte d'efficacité du traitement au FOLFIRI dans nos modèles pré-cliniques murins. Enfin, mes résultats montrent un rôle inhibiteur de RIP140 sur la biologie des CS et CSC. En effet, RIP140 inhibe la prolifération en culture 2D ainsi que la croissance de sphéroïdes en culture 3D de lignées cellulaires de CCR pour lesquelles l'expression de RIP140 est modulée. De même, RIP140 diminue la croissance des colosphères après ensemencement en cellule unique (propriété propre des CSC), associée à l'inhibition de l'expression de certains marqueurs souches. Mon projet de recherche permettra à terme d'améliorer l'approche thérapeutique des patients atteints de CCR notamment à travers l'utilisation de RIP140 comme marqueur prédictif de la réponse aux chimiothérapies.

Mots clés : Cancer coloréctal, cellules souches, RIP140, chimiorésistance

Role of the transcriptional co-regulator RIP140 in the biology of normal and tumoral intestinal stem cells and their chemoresistance properties

The incidence and mortality rate of colorectal cancers (CRC) remain a major health issue worldwide. The understanding of the mechanisms underlying the initiation of oncogenic processes as well as the sequence of event sustaining tumoral development notably highlighted by genomic instabilities associated to tumor progression and identification of mutations activating oncogenes or inactivating tumor suppressor genes allowed the improvement of diagnostic and patient care in clinic. These events favour a cancerous phenotype in intestinal cells and notably promote the appearance of a particular population, the cancer stem cells (CSC), described for their ability to sustain tumor growth and regeneration after treatment for instance. Among other features, CSC possess exacerbated tolerance mechanisms to therapeutic compounds and present phenotypic properties allowing treatment escape. In this context, our team shown a protective effect of the transcriptional co-regulator RI1P40 on intestinal tumorigenesis. My research project during my PhD relied on the characterization of its involment in the intestinal stemness and in intestinal oncogenic. First, I finalized the identification of the negative regulation on Paneth cell differentiation by RIP140, a cellular population considered as the keystone of the epithelial physiology, through the repression of the transcription factor SOX9. In addition, in our pre-clinic transgenic mice model, the loss of expression of *Rip140* in the intestinal epithelium was associated with an increase in tumor number and size as well as an impairment of the efficiency of FOLFIRI treatment. Finally, my results showed a repressive effect of RIP140 on the biology of SC and CSC. This transcriptional co-regulator inhibits the proliferation of colorectal cancer cells in 2D and the growth of spheroids in a 3D culture model. Similarly, the ectopic expression of RIP140 represses the growth of colospheres after single-cell seeding (property of CSC), associated with the inhibition of the expression of some SC markers. My research project will ultimately improve the therapeutic approach for CRC patients, in particular through the use of RIP140 as a predictive marker of the response to chemotherapy.

Key words : Colorectal cancer, stem cells, RIP140, chemoresistance

REMERCIEMENTS

Je tiens ici à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné, soutenu au cours de ces 3 ans et qui m'ont permis d'avancer rendant possible la réalisation de ma thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail, à savoir les **Dr. Julie Pannequin**, **Dr. Nathalie Vergnolle**, **Dr. Abdel-Majid Khatib**, **Dr. Jean-Noël Freund** et **Dr. Maguy Del Rio**, merci infiniment !

Ensuite, je souhaiterai remercier le **Dr. Marion Lapierre** qui en tant que directrice de thèse m'a apporté tout son savoir et son soutien au cours de ces 3 années. Marion, j'ai beaucoup appris à tes côtés, merci pour l'investissement dont tu as fait preuve, merci pour tout !

Un grand merci également à **Vincent Cavaillès** qui en tant que chef d'équipe m'a permis de réaliser ce projet au sein de l'équipe SNeC. Merci Vincent pour le temps que tu m'as consacré et le savoir que tu m'as transmis. Bien entendu je tiens également à remercier chaleureusement tous les membres de l'équipe, **Cathy**, **Stéphan**, **Audrey**, **Marilyn** et **Priyanka** pour nos échanges diverses et variés que ce soit vis-à-vis du travail ou pour rigoler un bon coup ! Merci également aux personnes que j'ai pu rencontrer dans cette équipe, **Nour**, **Habib** et **Carole**, mais également tous les jeunes stagiaires qu'ils aient survécus ou non à l'attaque de la Pétri-Garou, merci à vous tous !

Un spécial big bisou à la plus belle, la plus forte, **Sandrine Bonnet**. Sandrine tu es devenue au cours de ces trois années passées ensemble une réelle amie. Ta sincérité et ta gentillesse sont un phare pour nous tous, merci du fond du cœur !

Après la plus belle, les plus beaux et les plus forts, **Valentin** et **Yannick**, vous m'êtes devenus des amis très chères et j'espère que nos routes se croiseront encore. Merci à vous pour tous ces moments magiques surtout en culture, on y aura laissé un bout de notre âme dans ces murs, mais aussi pour toutes ces discussions et le soutien dont vous avez fait preuve.

Merci à tous les copains que j'ai pu rencontrer à l'IRCM ! Que ce soit dans le travail ou en dehors j'ai vécu des moments géniaux pendant ces trois années. Merci pour votre soutien, votre aide dans mon travail et pour toutes ces personnalités si belles qui ont fait de cette thèse une expérience inoubliable, on en a bien bavé mais on a aura aussi bien rigolé. Merci à vous, bon courage pour la suite, j'espère que nos routes se croiseront à l'avenir !

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler tout au long de ma thèse et qui ont participées à l'avancée de mon travail. Merci d'avoir partagé votre savoir, merci pour vos conseils, votre expertise, merci pour tout !

Ensuite, un grand merci à toutes les personnes et amis que j'ai rencontrés jusqu'ici. La route a été longue et je pense à tous ces amis, collègues, enseignants, encadrants qui ont su me faire aimer la recherche, me guider dans mon travail mais surtout me soutenir. Merci à tous les copains que j'ai pu rencontrer à l'IUT, la fac et maintenant à l'IRCM j'ai passé une quantité de moments incroyables que je n'oublierai jamais durant toutes ces années d'études supérieures. Merci à vous !

Des remerciements profonds s'adressent à tous mes amis avec qui j'ai grandi et avec qui je ne cesserai de me dire que la vie est belle lorsqu'on est entouré par des personnes aussi magnifiques. Des bisous tout spéciaux à mes amis de Montferrier, vous êtes pour moi une seconde famille, pour beaucoup on s'est connu dès notre plus jeune âge et pourvu que ça dure ainsi. Vous avez été d'un soutien sans faille peu importe la forme qu'il ait pu prendre et j'ai autant appris et grandis à vos côtés que toutes ces années passées à étudier.

Enfin, des remerciements infinis et une gratitude inconditionnelle à ma famille, **ma mère**, **mon père** et **ma sœur**. Vous m'avez élevé, éduqué et j'ai reçu par votre amour toutes les armes qui m'ont permis de faire mon chemin jusqu'à aujourd'hui. Je ne vous remercierai jamais assez pour toutes ces choses si évidentes pourtant si précieuses que vous m'avez inculqué tout au long de ma vie. Merci du fond du cœur !

PREAMBULE

Le cancer colorectal est l'un des cancers le plus représenté au monde. L'incidence de cette maladie a connu une forte augmentation avec le développement de la société. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent l'apparition et le développement des cancers est un aspect primordial dans l'amélioration des traitements actuels et de la prise en charge des patients. Cependant, les cancers sont des maladies difficiles à traiter par leur nature complexe mutli-factorielle et beaucoup d'échecs thérapeutiques pourront être évités par l'approfondissement de nos connaissances aussi bien cliniques que fondamentales.

L'équipe Signalisation Nucléaire et Cancer, hébergée au sein de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM U1109 INSERM) et dirigée par le docteur Vincent Cavaillès, s'intéresse aux différents rôles du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la physiopathologie notamment des cancers colorectaux et mammaires. L'objectif de mes travaux de thèse consiste à étudier le rôle de RIP140 dans la physiologie intestinale mais surtout dans la physiologie des tumeurs colorectales au travers de l'étude des populations de cellules souches cancéreuses. Ensuite, j'ai également étudié le rôle de RIP140 dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques dont les mécanismes sont responsables d'échecs thérapeutiques.

Afin d'assurer une bonne compréhension de mes travaux de thèse, vous trouverez une introduction détaillant la physiologie intestinale au travers de ses aspects cellulaires et moléculaires. Ensuite, sont présentés les caractéristiques des cancers colorectaux et notamment les processus qui mènent à l'apparition et au développement de cette maladie. Enfin, une dernière partie présentant les différentes facettes du co-régulateur transcriptionnel RIP140 ainsi que son implication dans différents types de cancers et notamment les cancers colorectaux. A la suite de cette introduction sont présentés mes résultats de thèse dont la première partie présente un effet répresseur de RIP140 sur la différenciation des cellules de Paneth au travers de la répression du facteur de transcription SOX9. Le rôle de la régulation RIP140/SOX9 a également été évalué dans la biologie cellules cancéreuses colorectales mais aussi pour sa valeur clinique. Ces données sont présentées sous format d'article publié dans le journal scientifique *Cancers* au cours de cette année 2021. Ensuite dans une deuxième partie, j'expose mes résultats présentant le rôle protecteur de RIP140 dans le développement tumoral au travers de la répression des cellules souches cancéreuses. Nous verrons également le rôle bénéfique de RIP140 dans la réponse tumorale à la chimiothérapie au FOLFIRI. Pour terminer, l'ensemble de ces résultats seront discutés dans une dernière partie avec une mise en perspective.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des tableaux et illustrations

INTRODUCTION....1

1 La physiologie intestinale....1

1.1 Structure et fonction de l'intestin....1

1.1.1 Anatomie de l'appareil digestif....1

1.1.2 Structure de l'intestin grêle et du côlon....2

1.1.3 La muqueuse épithéliale de l'intestin grêle et du côlon....4

1.2 Structure, dynamisme et fonctions de l'épithélium intestinal....6

1.2.1 L'axe crypto-villositaire : architecture et dynamisme....6

1.2.2 Lignages cellulaires intestinaux....7

1.2.3 Le compartiment souche....9

1.3 Bases moléculaires de l'homéostasie intestinale....15

1.3.1 Les grandes voies de signalisation de l'axe crypto-villositaire....16

1.3.2 Régulation de l'identité et du comportement des cellules souches....24

2 Les cancers colorectaux....28

2.1 Généralités....28

2.1.1 Epidémiologie et facteurs de risques....28

2.1.2 Dépistage et diagnostic....32

2.2 Bases moléculaires et cellulaires dans cancers colorectaux....33

2.2.1 Classification histologique et moléculaire des cancers colorectaux....34

2.2.2 Les instabilités génomiques de la séquence adénome-carcinome....39

2.2.3 Gènes et voies de signalisation impliqués dans les cancers colorectaux 42

2.2.4 Hétérogénéité tumorale et cellules souches cancéreuses....48

2.3 Stratégies thérapeutiques....52

2.3.1 Chirurgie....53

2.3.2 Chimio-/radio-thérapies....54

2.3.3 Thérapies ciblées....56

2.4 Récidive tumorale et chimiorésistance....58

2.4.1 Chimiorésistance et mécanismes moléculaires....61

2.4.2 Cellules souches cancéreuses et chimiorésistance....65

3 Le co-régulateur transcriptionnel RIP140 67
3.1 Généralités 67
3.1.1 Structure et fonctions 67
3.1.2 Régulation de l'expression de RIP140 69
3.1.3 Modifications post-traductionnelles et régulation de l'activité 71
3.2 Rôles physiologiques de RIP140 72
3.2.1 Métabolisme 73
3.2.2 Inflammation 76
3.2.3 Ovulation 76
3.2.4 Développement de la glande mammaire 77
3.2.5 Homéostasie épithéliale 78
3.3 Tumorigenèse 80
3.3.1 Cancers hormono-dépendants 80
3.3.2 Cancers digestifs 83
OBJECTIFS 88
ARTICLE & RESULTATS 89
1 RIP140 réprime le lignage Paneth *via* la régulation de SOX9 89
1.1 Article 90
2 RIP140 réprime le potentiel souche des cellules cancéreuses intestinales et favorise l'efficacité chimiothérapeutique 112
2.1 Introduction 112
2.2 Matériel et méthodes 113
2.3 Résultats 119
2.3.1 Rôle de Rip140 dans la physiologie épithéliale intestinale 119
2.3.2 Effet de RIP140 dans la tumorigenèse intestinale 126
2.3.3 RIP140 influence la réponse tumorale au FOLFIRI 135
DISCUSSION & PERSPECTIVES 150
1 RIP140 réprime l'axe de signalisation WNT/SOX9 151
2 RIP140, un gardien de l'homéostasie épithéliale 152
2.1 RIP140 réprime le dynamisme de l'épithélium intestinal 152
2.2 RIP140, prédictif de l'inflammation et la régénération épithéliale 153

3 RIP140, un gène protecteur dans la tumorigenèse intestinale 155
3.1 RIP140 réprime le potentiel souche des cellules cancéreuses 155
3.2 RIP140 réprime la tumorigenèse intestinale 156
3.3 RIP140 est un marqueur de bon pronostic 157
4 Un effet adverse de RIP140 sur la sensibilité tumorale aux thérapies 158
4.1 RIP140 induit la chimiorésistance des cellules cancéreuses *in vitro* 159
4.2 RIP140 favorise la réponse tumorale au FOLFIRI *in vivo* 160
4.3 RIP140 : valeur prédictive ? 162
CONCLUSION 164
BIBLIOGRAPHIE 166

ABREVATIONS

15-PGDH – 15-prostaglandin dehydrogenase

5-FU – 5-fluorouracil

ABC – ATP-binding cassette

ACF – Aberrant crypt foci

ACTA2 – Actin alpha 2, smooth muscle, aorta

AF1 – Activation function 1

AHR – Aryl-hydrocarbon receptor

AKT – Akt serine-threonine protein kinase

ALDH1 – Aldehyde dehydrogenase 1

APC – Adenomatosis polyposis coli

AREG – Amphiréguline

ARNm – Acide ribonucléique messager

ASCL2 – Achaete-scute family bHLH transcription factor 2

ATM –Ataxia-telangiectasia mutated serine/threonine kinase

ATOH1 – Atonal bHLH transcription factor 1

BAT – Brown adipose tissue

BCL2 – BCL2 apoptosis regulator

BER – Base-excision repair

BMI1 – BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger

BMP – Bone morphogenetic protein

BP – Processus biologiques

BRAF – B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

BTC – Betacelluline

βTRCP – β-transducin repeat containing protein

CAR – Constitutive androstane receptor

CBC – Crypt-Based Columnar cells

CBP – CREB-binding protein

CCR – Cancer colorectaux

CCDN1 – Cylin D1

CDK – Cyclin-dependent kinase

CDKN1B – Cyclin dependent kinase inhibitor 1B

CDKN2A – Cyclin dependent kinase inhibitor 2A

C-FOS – Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit

CHRDL1 – Chordin-like 1

CIDEA – Cell-death-inducing DEF45-like effector A

CIT – Cellule initiatrice de tumeur

C-JUN – Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit

CK1 – Casein kinase 1

CMS – Consensus molecular subtype

CO-SMAD – Common-partner SMAD

CP – Cellules de Paneth

CPT1β – Carinitine palmitoyltransferase 1b

CRCSC – Colorectal cancer subtyping consortium

CS – Cellules souches

CSC – Cellules souches cancéreuses

CSI – Cellules souches intestinales

CSPG4 – Chondroitin sulfate proteoglycan 4

CT – Chimiothérapie

CTC – Computed tomographic colonoscopy

CTNNB1 – Catenin (cadherin associated protein), beta 1

CYP2B10 – Cytochrome p450 2b10

DBD – DNA-binding domain

DCLK1 – Doublecortin-like kinase 1

DDR – DNA damage response

DEAB – N,N-diethylaminobenzaldehyde

DES – Desmine

DFS – Disaese-free survival

DHFU – Dihydrofluorouracil

DHH – Desert hedgehog

DKK – Dickkopf

DLL1 – Delta like canonical Notch ligand 1

DMSO – Diméthylsulfoxyde

DOS – Delta and OSM-11-like proteins

DPD – Dihydropyrimidine dehydrogenase

DSB – Double-strand breaks

DSL – Delta/Serrate/LAG-2

DSS – Dextran sulfate sodium

E2 – Oestradiol

E2F – Adenoviral early region 2 binding factor

EGF – Epidermial growth factor

ELK1 – ETS transcription factor ELK1

EpCAM – Epithelial cell adhesion molecule

EMT – Epithelial-mesenchymal transition

EPHB2 – EPH receptor B2

ER – Estrogen receptor

EREG – Epiréguline

ERK – Extracellular signal-regulated kinase 1

ERR – Estrogen receptor-related receptor

FACS – Fluorescence-activating cell sorting

FdUMP – Fluorodeoxyuridine monophosphate

FGFR – Fibroblast growth factor receptor

FOXA1 – Forkhead box A1

FOXL1 – Forkhead box L1

FOXO1 – Forkhead box O transcription factor

FT – Facteur de transcription

FZ – Frizzled

GALT – Gut-associated lymphoid tissue

GAP – GTPase-activating proteins

GATA3 – GATA binding protein 3

GDP – Guanosine diphosphate

GFI1 – Growth factor independent 1 transcriptional repressor

GLI – GLI family zinc finger protein

GO – Gene ontology

GREM – Gremlin

GSH - Gluthatione

GSK-3β – Glycogen synthase kinase 3 beta

GTP – Guanosine triphosphate

HDAC – Histone deacetylase

HES1 – Hes family bHLH transcription factor 1

HH – Hedgehog

HHIP – Hedgehog interacting-protein

HOPX – HOP homeobox

HE – Hématoxyline-Eosine

HR – Homologous recombination

HRE – Hormone responsive element

IBD – Inflammatory bowel disease

IHC - Immunohistochimie

IHH – Indian hedgehog

IL – Interleukine

JAG1 – Jagged1

KLF4 – Kruppel like factor 4

KO – Knock-out

KRAS – KRAS proto-oncogene, GTPases

LAST1/2 – Large tumor suppressor 1 and 2

LBD – Ligand-binding domain

LCOR – Ligand-dependent corepressor

LGR5 – Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5

LMA – Leucémie myéloïde aiguë

LRC – Label-retaining cells

LRIG1 – Leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1

LRP5/6 – LDL receptor-related proteins 5 and 6

LXR – Liver X receptor

MAML1 – Mastermind-like transcriptional coactivator 1

MDR – Multidrug resistance

MET – Mesenchymal-epithelial transition

MF – Fonction moléculaire

MFE – Myofibroblastes sub-épithéliaux

MICI – Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MLH1 – MutL homolog1

MOB1 – Mob kinase activator 1

MST1/2 – STE20-like protein kinase 1 and 2

MYC – MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor

mTOR – Mechanistic target of rapamycin kinase

MYH11 – Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle

NER – Nucleotide-excision repair

NEUROG3 – Neurogenin 3

NF-κB – Nuclear factor κB

NHEJ – Non-homologous end-joining

NICD – Notch intracellular domain

NLS – Nuclear localization sequence

NOG – Noggin

NRG1 – Neuregulin 1

NRIP1 – Nuclear receptor-interacting protein of 140 kDa

OLMF4 – Olfactomedin 4

OS- Overall survival

P160 – MYB binding protein 1a

P300 – E1A binding protein p300

P53 – Tumor protein 53

PCNA – Proliferating cell nuclear antigen

PCR – Réaction de polymérisation en chaîne

PDGFR – Platelet derived growth factor receptor

PDK1 – 3-phosphoinositide-dependent kinase 1

PGC – PPARG coactivator

PGE2 – Prostaglandine E2

PI3K – Phosphoinositide-3-kinase

PIP_2 – Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate

PIP_3 – Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate

PKA – Protein kinase A

PPAR – Peroxisome proliferator activated receptor

POU2F3 – POU class 2 homeobox 3

PR – Progesterone receptors

PRC1 – Polycomb repressive complex 1

PRMT1 – Protein arginine methyltransferase 1

PROM-1 – Prominin-1

PTC – Patched

PTEN – Phosphatase and tensin homolog

PXR – Pregnane X receptor

qPCR – PCR quantitative

R-SMAD – Receptor-regulated SMAD

RAM – RBPjκ association module

RAR – Retinoid acid receptor

RARE – Retinoid acid response element

RAS – Rat sarcoma factors

RB – Retinoblastoma transcriptional corepressor

RBPj – Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region

RCH – Rectocolite hémorragique

RCPG – Récepteur transmembranaire couplé aux potéines G

RCT – Radiochimiothérapie

RIP140 – Receptor-interacting protein of 140 kDa

RIPKO – Modèle murin présentant un KO pour le gène *RIP140*

RIPTg – Modèle murin présentant une sur-expression du gène *RIP140*

RN – Récepteur nucléaire

RNF43 – Ring finger protein 43

ROS – Reactive oxygen species

RT-PCR – PCR à transcription inverse

RTK – Récepteur tyrosine kinase

RXR – Retinoid X receptor

SAV1 – Salvador homologue 1

SCID – Severe combined immunodeficient

SCNA – Somatic copy number alterations

SHH – Sonic hedgehog

SLC22 – Solute carrier family 22

SMO – Smoothened

SMOC2 – SPARC related modular calcium binding 2

SN-38 – 7-éthyle-10-hydroxycamptothécine

SNAIL – Snail family transcriptional repressor

SOX9 – SRY-box transcription factor 9

SP – Side population

SPDEF – SAM pointed domain containing ETS transcription factor

SSD – Single-strand breaks

STD – Short tandem repeats

SUMO1 – Small ubiquitin-like modifier 1

TAZ – Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif

TCF – T-cell factor

TEAD – TEA domain

TEF – Transcription enhancer factor

TERT – Telomerase reverse transcriptase

TGF-β – Transforming growth factor-β

TNF-α – Tumor necrosis factor α

TNFRSF19 – TNF receptor superfamily member 19

TP53 – Tumor protein p53

TPM – Transcript per kilobase million

TR – Thyroid hormone receptor

TS – Thymidylate synthase

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling

TWIST – Twist family bHLH transcription factor

UA – Unité arbitraire

UCP1 – Uncoupling protein 1

VIM – Vimentine

WAT – White adipose tissue

WNT – Wingless-related MMTV integration site

YAP – Yes-associated protein

ZEB – Zinc finger E-box binding homeobox

LISTE DES TABLEAUX ET ILLUSTRATIONS

- **Tableaux**

Tableau 1 et 2 – Classification TNM non exhaustive des adénocarcinomes colorectaux et combinaisons des stades d'avancée de la tumeur 36
Tableau 3 – Liste des amorces 118

- **Illustrations**

Figure 1 – Schéma représentatif du système digestif humain 1
Figure 2 – Schéma représentatif des couches de la paroi intestinale 3
Figure 3 – Schéma représentatif de la paroi de l'intestin grêle et du côlon 5
Figure 4 – Représentation schématique de l'épithélium intestinal et colique 7
Figure 5 – Schéma représentatif des lignages cellulaires épithéliaux 8
Figure 6 – Les CBC LGR5+ et traçage cellulaire dans l'épithélium intestinal murin 10
Figure 7 – Cellules de réserves, différenciation et régénération épithéliale 12
Figure 8 – Cellules souches intestinales et plasticité épithéliale 14
Figure 9 – Les grandes voies de signalisation de l'axe-crypto-villositaire 15
Figure 10 – Schéma représentatif de la voie de signalisation WNT 16
Figure 11 – Schéma représentatif de la voie de signalisation NOCTH 18
Figure 12 – Schéma représentatif de la voie de signalisation HIPPO 20
Figure 13 – Schéma représentatif de la voie de signalisation BMP 21
Figure 14 – Schéma représentatif de la voie de signalisation HEDGEHOG 23
Figure 15 – Composantes stromales et profil d'expression 25
Figure 16 – Schéma représentatif de la niche moléculaire Paneth 27
Figure 17 – Taux d'incidence des CCR à travers le monde 29
Figure 18 – Facteurs de risque des cancers colorectaux 30
Figure 19 – Images représentatives de l'état de différenciation des adénocarcinomes colorectaux 34
Figure 20 – Schéma représentatif de l'invasion et de la dissémination des adénocarcinomes colorectaux en fonction du stade tumoral 35
Figure 21 – Classification moléculaire des cancer colorectaux 37
Figure 22 –Séquence adénome-carcinome et instabilités génomiques 39

Figure 23 – Gènes et voies de signalisation de la séquence adénome-carcinome.....43
Figure 24 – Théorie de l'évolution clonale des tumeurs et modèle Big Bang 49
Figure 25 – Développement tumoral et cellules souches cancéreuses.....50
Figure 26 – Caractéristiques tumorales et ciblage thérapeutique 57
Figure 27 – Schéma représentatif des mécanismes de chimiorésistance cellulaire.....59
Figure 28 – Hétérogénéité tumorale et résistance clonale 63
Figure 29 – Mécanismes de chimiorésistance des CSC.....64
Figure 30 – Schéma représentatif des domaines et motifs de RIP140.....68
Figure 31 – Schéma représentatif de l'interactome de RIP140.....69
Figure 32 – Expression relative de *RIP140* dans les tissus humains 70
Figure 33 – Schéma représentatif des modifications post-traductionnelles du co-régulateur transcriptionnel RIP140 71
Figure 34 – Processus physiologiques et gènes cibles régulés par RIP140.....73
Figure 35 – Rip140 réprime la dynamique épithéliale intestinale.....79
Figure 36 – Schéma représentatif de la régulation d'APC et de l'activité de la voie WNT/β-caténine par RIP140.....80
Figure 37 – RIP140, un marqueur clinique potentiel protecteur dans les CCR 86
Figure 38 – Résumé graphique 90
Figure 39 – Schéma représentatif de l'expression de *Rip140* le long de l'axe crypto-villositaire ...119
Figure 40 – Expression de *Rip140* dans les populations cellulaires intestinales.....120
Figure 41 – Rip140 réprime l'expression de marqueurs de cellules souches.....122
Figure 42 – Suivi du développement des organoïdes RipKO^{int} 123
Figure 43 – Augmentation de la prolifération des organoïdes intestinaux 125
Figure 44 – Un modèle pré-clinique murin pour la chimiothérapie FOLFIRI 126
Figure 45 – Rip140 réprime la tumorigenèse intestinale 127
Figure 46 – *RIP140* est moins exprimé dans les populations souches cancéreuses colorectales ...129
Figure 47 – RIP140 réprime la croissance des CSC en culture 3D.....130
Figure 48 – RIP140 réprime la dynamique des colosphères.....131
Figure 49 – RIP140 réprime la population ALDH+ en culture 3D.....133
Figure 50 – RIP140 réprime l'expression du pro-oncogène *BMI1* au niveau transcriptionnel.....134
Figure 51 – RIP140 réprime la croissance des cellules cancéreuses en culture 3D.....136
Figure 52 – RIP140 semble induire la chimiorésistance des cellules cancéreuses 137
Figure 53 – Validation du traitement FOLFIRI dans le modèle ApcKO^{int}.....138

Figure 54 – Enrichissement fonctionnel et estimation de l'infiltration immunitaire associée à la réponse au traitement FOLFIRI 140
Figure 55 – Analyse transcriptomique associée à la réponse au FOLFIRI dans l'épithélium intestinal murin 142
Figure 56 – Impact de la délétion de *Rip140* sur l'efficacité thérapeutique du FOLFIRI 144
Figure 57 – Analyse transcriptomique associée à la réponse au FOLFIRI dépendante à Rip140 146
Figure 58 – Etude transcriptomique du rôle de Rip140 dans la régulation de la chimiorésistance des cellules cancéreuses en réponse au FOLFIRI 147
Figure 59 - Etude transcriptomique du rôle de Rip140 dans la régulation de la réponse immunitaire au traitement FOLFIRI 149
Figure 60 – Schéma représentatif du réseau transcriptionnel associé à l'axe de signalisation WNT/SOX9 et RIP140 151
Figure 61 – Schéma représentatif du rôle répresseur de Rip140 sur la dynamique épithéliale et de ses potentiels modes d'actions 153
Figure 62 – Schéma représentatif du rôle de RIP140 dans le développement tumoral et la réponse à la chimiothérapie 165

INTRODUCTION

1 La physiologie intestinale

1.1 Structure et fonction de l'intestin

1.1.1 Anatomie de l'appareil digestif

L'appareil digestif dans son ensemble a pour fonction d'ingérer liquides et aliments pour en extraire les éléments essentiels aux fonctions de notre organisme aussi bien dans son développement que pour en assurer son fonctionnement au quotidien.

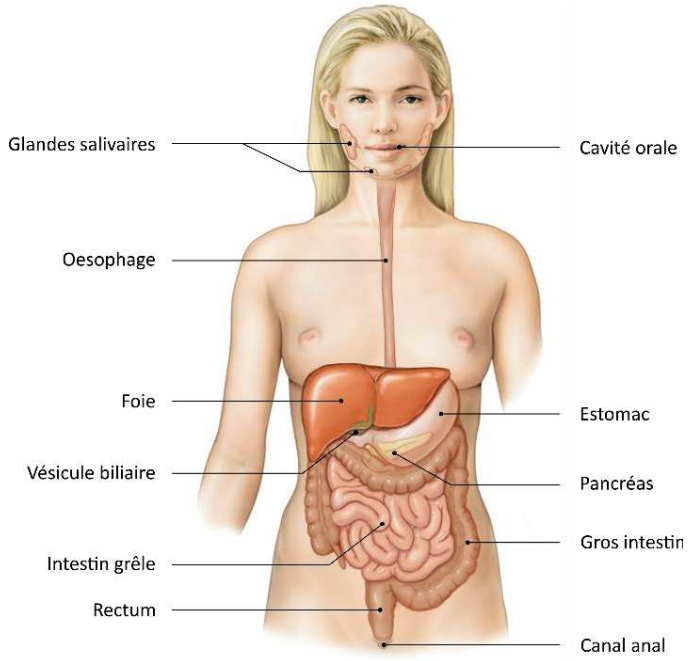


Figure 1 – Schéma représentatif du système digestif humain. (Adapté de Silverthorn *et al.*, 2019).

En tant que système biologique, l'appareil digestif est composé d'un ensemble d'organes et de tissus dont les principaux composent le tube digestif en lui-même depuis la bouche en passant par l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin et enfin l'anus. D'autres organes dits annexes, les glandes salivaires, le foie, le pancréas et la vésicule biliaire apportent un soutien essentiel aux fonctions de digestion et de régulation du système digestif (Figure 1). Après mastication, les aliments sont envoyés à l'estomac dans lequel le bol alimentaire, mélangé à l'acide gastrique et à un cocktail

d'enzymes digestives, est brisé pour être envoyé dans l'intestin grêle ou petit intestin sous forme de chyme. L'intestin grêle est composé de trois parties, le duodénum lié à l'estomac, le jéjunum et l'iléon qui relie le gros intestin, pour un total d'environ 7m de long et une surface d'absorption de 250 à 400 m^2. La majeure partie du processus de digestion est effectuée le long du petit intestin qui absorbe eau, électrolytes, solubles mais également protéines, acides gras et sucres une fois catabolisés, ainsi que d'autres composants relargués par le chyme (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017; Campbell et al., 2019).

Contraint par les mouvements péristaltiques des muscles qui entourent le tube digestif, le chyme quitte ce qui est appelé la partie haute de l'appareil digestif pour entrer dans la partie basse, le gros intestin. D'une longueur approximative de 1,5 m, il est composé de 5 parties. Lié à l'iléum, le cæcum qui porte l'appendice s'ouvre sur le côlon, lui-même divisé en plusieurs zones. Le côlon ascendant, faisant le lien avec le cæcum, remonte le long du côté droit de l'abdomen pour faire un angle de 90° à l'horizontal, l'angle hépatique, marquant le début du côlon transverse qui prendra également un angle à 90°, l'angle splénique, pour descendre le long du côté gauche de l'abdomen formant le côlon descendant. La majorité de l'eau et des électrolytes des restes du chyme sont absorbés le long du côlon. Les aliments non absorbés sont solidifiés et compactés sous forme de fèces avant d'être stockés dans le rectum et excrétés par le canal anal (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017; Kahai et al., 2021).

1.1.2 Structure de l'intestin grêle et du côlon

Le tube digestif est le premier organe formé au cours du développement. Pendant la quatrième semaine de gestation, l'endoderme se replie suivant l'axe antéro-postérieur pour former une structure tubulaire, l'intestin primitif. Au cours de l'embryogenèse, cette structure se différencie et se complexifie pour former le système digestif qui terminera son développement peu après la naissance. De la bouche au canal anal, cette structure tubulaire prend des aspects très variés, complexes et spécialisés pour remplir les fonctions essentielles au processus de digestion. L'intestin grêle et le côlon ont la particularité d'avoir une paroi repliée sur elle-même pour augmenter la surface d'échange avec la lumière. Ils partagent une structure globale très proche présentant 4 couches distinctes (Figure 2) (Noah et al., 2011; Silverthorn et al., 2019).

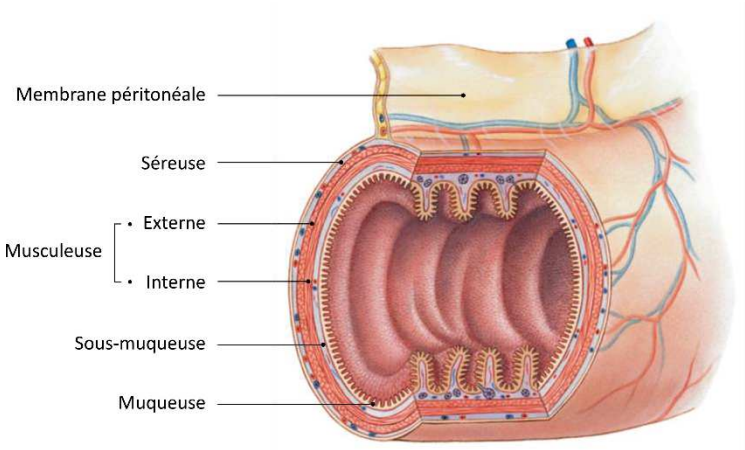


Figure 2 – Schéma représentatif des couches de la paroi intestinale. (Adapté de Silverthorn *et al.*, 2019).

En premier lieu se trouve la muqueuse intestinale, constituée de 3 sous-couches :

- l'épithélium intestinal, une couche de cellules monostratifiée qui façonne la lumière intestinale, en contact direct avec le bol alimentaire et dont les cellules remplissent les fonctions primordiales de la digestion, de la régulation du microbiote et de l'homéostasie épithéliale,

- la *lamina propria*, un tissu conjonctif riche en cellules fibroblastiques et immunitaires, qui soutient les cellules épithéliales et supporte les terminaisons du système nerveux, sanguin et lymphatique de l'épithélium intestinal,

- la *muscularis mucosae*, une fine couche de muscles lisses dont la contraction régule localement la surface d'échange de l'épithélium.

La deuxième couche de la paroi intestinale correspond à la sous-muqueuse. Elle est composée d'un tissu conjonctif supportant un réseau plus large de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle est également le siège du plexus sous-mucosal, un des 2 systèmes principaux du réseau nerveux entérique qui innerve les cellules épithéliales ainsi que la *muscularis mucosae*.

La musculeuse externe qui forme la troisième couche de la paroi intestinale, est composée de 2 sous-couches de muscles lisses, l'une interne circulaire et l'autre externe longitudinale. Leur contraction respective diminue localement le diamètre et la longueur de l'intestin. Entre ces deux couches musculaires se situe le deuxième principal système nerveux entérique, le plexus mésentérique, qui contrôle leurs mouvements.

Enfin, la séreuse est un tissu conjonctif membranaire qui forme la dernière couche de la paroi intestinale. Elle est un prolongement de la membrane péritonéale englobant toutes les viscères abdominales et forme une gaine autour de l'intestin pour maintenir sa cohésion.

1.1.3 La muqueuse épithéliale de l'intestin grêle et du côlon

La muqueuse est l'un des tissus du système digestif qui présente le plus de variations d'une zone à l'autre. Bien que certaines de ses fonctions soient conservées, sa physiologie présente des changements importants le long de la paroi de l'intestin grêle et du côlon.

1.1.3.a Structure

Les intestins sont la plus grande surface d'échange avec le milieu extérieur de notre organisme. La muqueuse intestinale est repliée sur elle-même afin d'augmenter cette surface, optimisant ainsi l'absorption des produits de la digestion qui se fait essentiellement dans le petit intestin. Ces repliements, appelés *plicae*, apparaissent le long du duodénum pour disparaître dans la partie basse de l'iléon. Une particularité anatomique de la muqueuse intestinale est l'architecture cellulaire de son épithélium. A un niveau encore inférieur aux *plicae*, la couche cellulaire qui tapisse la paroi intestinale est elle aussi repliée sous forme d'invaginations, appelées cryptes de Lieberkühn, d'après Johann Nathanael Lieberkühn qui en fit la démonstration en 1745 (Lieberkühn, 1745), et de protrusions appelées villus (villi au pluriel) (Figure 3). Cette structure crypto-villositaire se retrouve tout le long de l'intestin grêle avec une plus forte concentration et une plus grande hauteur des villi dans le duodénum qui rétrécissent progressivement pour s'effacer à la fin de l'iléon. La contraction de la *muscularis mucoase* soutient notamment le mouvement de va-et-vient de ces villi favorisant ainsi les échanges au niveau cellulaire. Cette structure très particulière mise en place au cours du développement intestinal permet d'une part d'augmenter la surface d'échange entre les cellules absorptives de l'intestin et le chyme alimentaire et d'une autre de protéger le compartiment cellulaire souche en fond de crypte, clé de voute de la physiologie épithéliale (Barker, 2014; Silverthorn et al., 2019).

La fonction de digestion et d'absorption des nutriments n'étant pas conservée dans le gros intestin, les *plicae* sont absents de ce tissu. De même, les villi dont la fonction principale est d'augmenter la surface d'absorption sont absents de la muqueuse du gros intestin. Cependant, les cryptes coliques sont plus longues que dans le petit intestin (Figure 3) (Barker, 2014; Silverthorn et al., 2019).

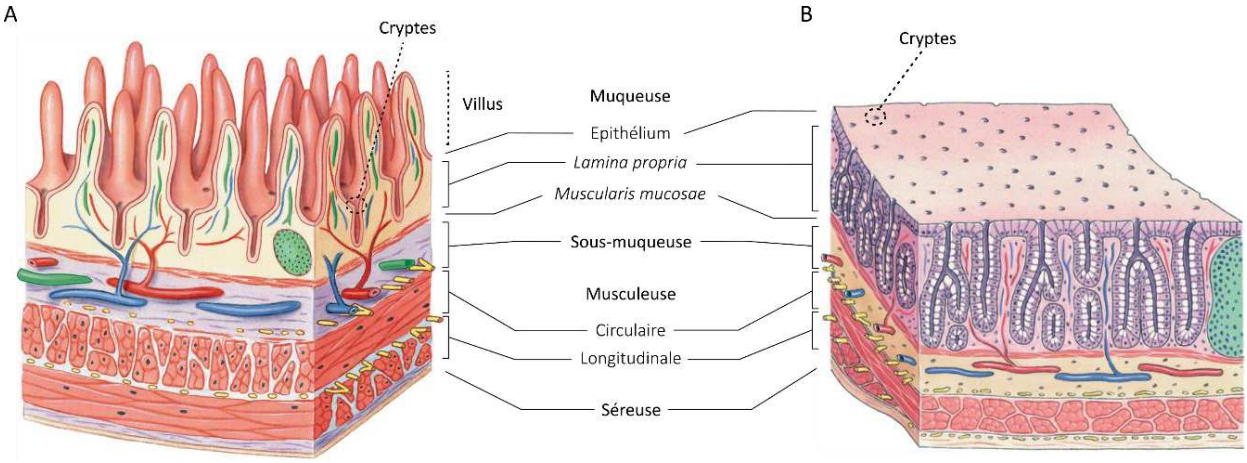


Figure 3 – Schéma représentatif de la paroi de l'intestin grêle (A) et du côlon (B). (Adapté de Silverthorn *et al.*, 2019).

1.1.3.b Fonctions

L'épithélium intestinal a pour rôle de réguler les échanges entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Les fonctions d'absorption et de sécrétion entre la lumière du tube digestif et la paroi intestinale dépendent directement de l'épithélium intestinal qui par sa nature de barrière biologique régule ces aspects. Les jonctions cellulaires serrées préviennent tout échange non contrôlé de part et d'autre de la barrière épithéliale. Les jonctions cellules-cellules le long de la paroi du petit intestin sont plus perméables que dans le côlon et facilitent notamment le transport passif de l'eau et de certains solutés. Cependant, l'essentiel de l'absorption des produits de la digestion se fait de manière contrôlée par des canaux transporteurs ou par endocytose au travers des cellules qui constituent l'épithélium. Le panel de molécules absorbées par la muqueuse varie selon le tissu. Dans le petit intestin, sont principalement absorbés les acides aminés, peptides, sucres, acides gras, glycérides, cholestérol, bases azotés, ions, minéraux, vitamines et eau. Alors que le long du côlon, la muqueuse absorbe essentiellement les ions, les vitamines, les minéraux et l'eau (Silverthorn et al., 2019).

Dans un aspect similaire, les fonctions de sécrétion de la muqueuse sont également différentes entre le petit et le gros intestin. La muqueuse intestinale absorbe principalement des molécules sous leur forme simple et raffinée. Par compression mécanique mais surtout digestion enzymatique et chimique, les macromolécules du chyme sont catabolisées en molécules plus simples. Le cocktail chimique et enzymatique est produit en partie par les organes annexes au système digestif, le foie et le pancréas sécrétant respectivement la bile et les fluides pancréatiques, ainsi que par les cellules épithéliales intestinales. La fonction de production d'enzymes digestives n'est globalement pas retrouvée dans le côlon. Cependant, il a été montré que les bactéries du gros intestin sont capables de cataboliser certaines molécules dont le produit bénéficie à notre organisme. Néanmoins, la

fonction de sécrétion de l'intestin ne s'arrête pas là. Afin de faciliter le passage des aliments mais également pour se protéger, la muqueuse intestinale sécrète beaucoup de mucus qui va lubrifier le chyme et créer une couche protectrice prévenant le contact trop important avec des micro-organismes potentiellement pathogènes. Cette fonction, bien que présente dans le petit intestin, est beaucoup plus importante dans le côlon où le chyme est plus compact. Les cellules épithéliales produisent des hormones qui en fonction de la nature du chyme et de la phase digestive vont réguler la production d'acide, d'enzymes, les mouvements musculaires et le métabolisme (Silverthorn et al., 2019).

Enfin, une des grandes fonctions de la muqueuse intestinale est la surveillance immunitaire. Du fait de sa constante exposition au milieu extérieur, l'intestin représente un des plus grands organes immunitaires du corps. La *lamina propria* est notamment très riche en cellules immunitaires éparpillées tout au long de l'intestin et du côlon. Les plaques de Peyer sont des agrégats folliculaires lymphoïdes principalement situés dans l'iléon mais il existe des structures similaires réparties le long de l'intestin et du côlon. Au travers de cellules spécialisées de l'épithélium, l'ensemble de ce tissu immunitaire appelé GALT (Gut-associated lymphoid tissue) surveille la composition et l'état de la lumière intestinale permettant une activation rapide de l'inflammation et une réponse efficace du système immunitaire en cas de besoin (Pearson et al., 2012).

1.2 Structure, dynamisme et fonctions de l'épithélium intestinale

1.2.1 L'axe crypto-villositaire : architecture et dynamisme

L'architecture si particulière de l'épithélium intestinal répond aux contraintes imposées par la confrontation constante de ce tissu avec le milieu extérieur et aux différents composants délétères pour son intégrité. L'axe crypto-villositaire présente 2 structures distinctes, le villus et la crypte intestinale (figure 4).

Chaque villus est entouré par plusieurs cryptes intestinales et offre une grande surface de contact avec la lumière du tube digestif permettant de remplir ses fonctions d'absorption et de sécrétion décrites dans la section précédente (*cf.* section 1.1.3.b). Malgré l'absence de villi dans l'épithélium du côlon, la structure et la dynamique générale de l'épithélium sont conservées. La crypte intestinale est délimitée en 2 zones, le compartiment souche et au-dessus, le compartiment d'amplification transitoire. Le compartiment souche contient les cellules souches intestinales (CSI) localisées en fond de cryptes ainsi protégées des dommages pouvant être causés par le passage du chyme. En constante prolifération, elles produisent des cellules progénitrices qui par pression mécanique remontent du fond de la crypte vers le sommet du villus. D'abord dans un état

indifférencié, ces cellules se multiplient le long du compartiment d'amplification transitoire et engagent leur différenciation. Une fois arrivées à la base du villus, les cellules épithéliales ont atteint leur état final de différenciation et ont acquis des fonctions hautement spécialisées, nécessaires au fonctionnement de l'intestin. Elles continuent ensuite leur périple le long du villus pour finir par mourir par *anoikis*, une forme de mort cellulaire programmée, et être expulsées avec le reste du bol alimentaire. De cette manière, l'épithélium intestinal se renouvelle tous les 5 à 7 jours. Son dynamisme et son renouvellement constant lui permettent de remplir ses fonctions essentielles tout en préservant son intégrité face à un environnement hostile (Barker, 2014).

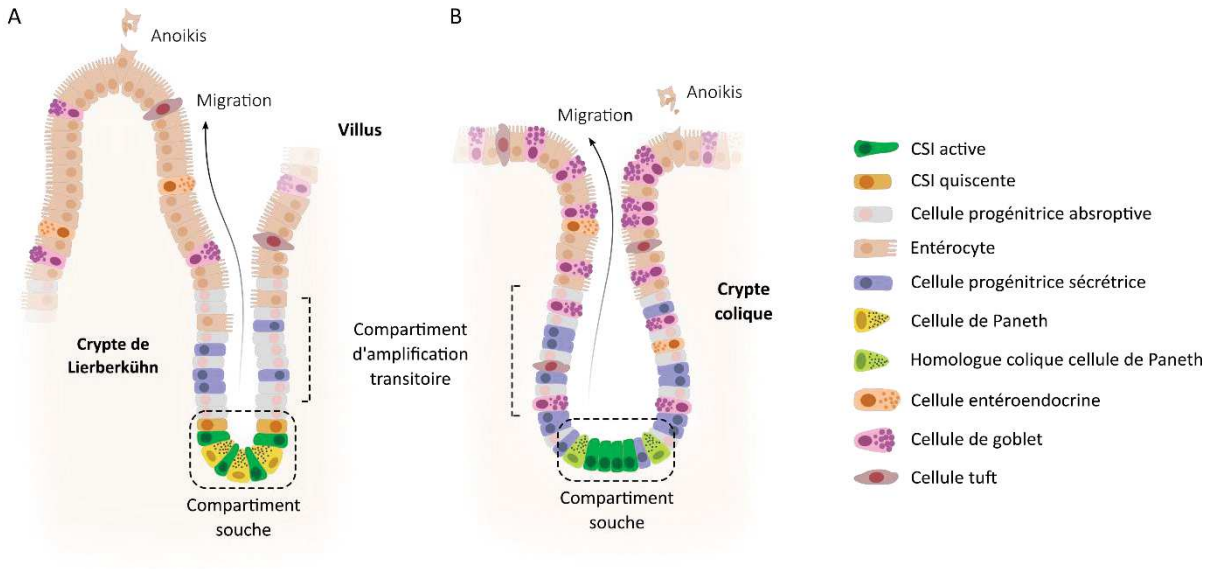


Figure 4 – Représentation schématique de l'épithélium intestinal (A) et colique (B). (Inspiré de Barker, 2014).

1.2.2 Lignages cellulaires intestinaux

L'épithélium intestinal présente un large panel de populations cellulaires ayant chacune leurs fonctions et leurs rôles dans la physiologie de ce tissu. Les CSI sont à l'origine de 5 types cellulaires épithéliaux répartis en 2 classes (Figure 5).

Les entérocytes, issues des cellules progénitrices absorptives, sont les cellules majoritaires du petit et gros intestin, elles remplissent les fonctions d'absorption des nutriments et de sécrétion d'enzymes digestives (Noah et al., 2011).

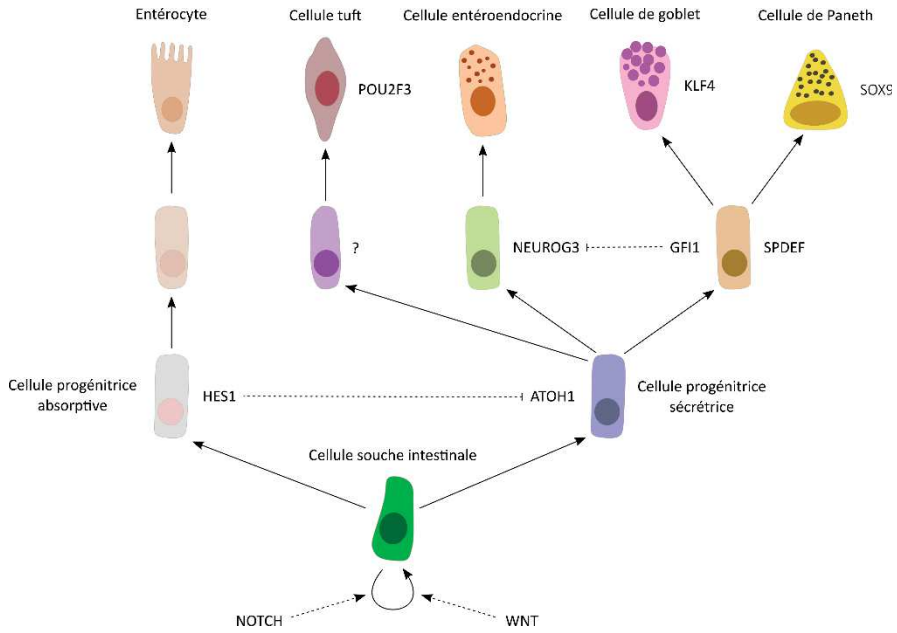


Figure 5 – Schéma représentatif des lignages cellulaires épithéliaux. (Adapté de Noah, Donahue and Shroyer, 2011).

Les cellules progénitrices sécrétrices engagent leur différenciation pour générer l'ensemble des populations à fonction de sécrétion. Les cellules entéroendocrines, dont la fonction principale est la production hormonale régulant l'appétit, l'absorption des nutriments et le métabolisme (Gribble & Reimann, 2019), se spécifient par l'induction de l'expression de *NEUROG3* (*Neurogenin)* (Noah et al., 2011). Elles représentent environ 1% de la population cellulaire et sont éparpillées tout au long de l'intestin grêle et du côlon. Ensuite les cellules de Goblet, qui représentent 15% de la population cellulaire de l'intestin grêle et jusqu'à 50% du gros intestin, produisent et sécrètent le mucus qui lubrifie le passage du chyme et protège l'épithélium du contact avec le milieu extérieur (Birchenough et al., 2015). Ces cellules expriment fortement *KLF4* (Kruppel like factor 4) sous le contrôle de l'activité des voies de signalisation NOTCH et WNT (Noah et al., 2011).

Etudiées plus récemment, les cellules tuft sont le troisième type de cellules épithéliales intestinales. Bien que très rares, ces cellules jouent un rôle important dans la chimiosensibilité épithéliale et l'initiation de la réponse immunitaire de type Th2 (Gerbe et al., 2016, 2012). Il a été démontré que le facteur POU2f3 (POU class 2 homeobox 3) est nécessaire à leur différenciation.

Enfin, les cellules de Paneth (CP), du nom de Josef Paneth qui en fit la démonstration en 1888, représente le quatrième type de cellules sécrétrices. Ce type cellulaire n'existe pas dans le côlon bien que par homologie de fonction un phénotype cellulaire sécrétoire similaire y ait été identifié (Rothenberg et al., 2012; Sasaki et al., 2016). La spécialisation de ces cellules est essentiellement médiée par l'activation de la voie WNT et l'expression de *SOX9* (*SRY-box transcription factor 9)* (Bastide

et al., 2007; van Es, Jay, et al., 2005). Considérées comme les chefs d'orchestre de la physiologie épithéliale, les CP ont la particularité de migrer vers le fond des cryptes intestinales et y résident intercalées entre les CSI. Dès lors, elles participent largement à la régulation de l'homéostasie épithéliale en contrôlant notamment les interactions hôte-microbiotes grâce à la production et la sécrétion de peptides anti-microbiens (Bevins & Salzman, 2011). Elles sont impliquées dans l'inflammation intestinale et les MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), telle que la maladie de Crohn, suite à un stress induit au niveau de leur réticulum endoplasmique (Adolph et al., 2013). Enfin, les CP sont connues pour leur rôle crucial de soutien au compartiment souche en créant un environnement moléculaire, appelé niche, essentiel au maintien de l'identité et de la biologie des CSI (Sato et al., 2011). Elles sont notamment capable d'adapter la vitesse de renouvellement de l'épithélium intestinal en influant la prolifération et la différenciation des CSI en réponse à une restriction calorique (Yilmaz et al., 2012).

1.2.3 Le compartiment souche

Le compartiment souche est la clé de voûte de l'homéostasie intestinale grâce au renouvellement continuel de l'ensemble des lignages cellulaires de l'épithélium. Les CSI adultes prennent leur origine au stade embryonnaire de l'épithélium. Plusieurs études chez la souris ont montré qu'en premier lieu se formaient les villosités intestinales séparées par des régions inter-villositaires contenant des cellules souches (CS) embryonnaires. Cependant, il est nécessaire à l'organisme de mettre en place le plus efficacement possible les structures cryptiques afin de protéger l'ensemble des CS. De manière intéressante, plusieurs types cellulaires embryonnaires peuvent être à l'origine des CS adultes, reflétant la très forte plasticité épithéliale (Guiu et al., 2019; Ponder et al., 1985). La maturation des cryptes s'initie par les mouvements mécaniques de l'épithélium fœtal, notamment la fission des villi et l'invagination de la zone inter-villositaire, créant un environnement adéquat à la prolifération d'abord symétrique des CS embryonnaires créant rapidement un ensemble de CS qui entament ensuite une division asymétrique permettant la génération des cellules progénitrices. La crypte commence alors à se former, entame sa maturation et la niche souche, ou zone dite permissive maintenue par un environnement cellulaire et moléculaire complexe, se met en place où les CSI entrent dans le stade adulte de leur développement (Itzkovitz et al., 2012).

L'idée d'un compartiment souche, contenant des cellules indifférenciées générant des cellules filles qui en quittant la zone permissive engagent leur différenciation produisant ainsi l'ensemble des lignages cellulaires épithéliaux, s'est développé au cours des années 1970-80 d'après les travaux de

Leblond, Cheng et Bjerknes (Bjerknes & Cheng, 1981; Cheng, 1974a, 1974b; Cheng & Leblond, 1974a, 1974b, 1974c). Deux populations de CSI ont été mises en évidence : les CS actives et les CS de réserves.

1.2.3.a Les cellules souches actives

Les CSI actives, appelées en anglais « crypt-based columnar cells » (CBC) d'après leur localisation et leur morphologie, ont été identifiées notamment par leur expression spécifique du récepteur transmembranaire *Lgr5* (L*eucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*) dans le petit intestin et le côlon murin (Figure 6).

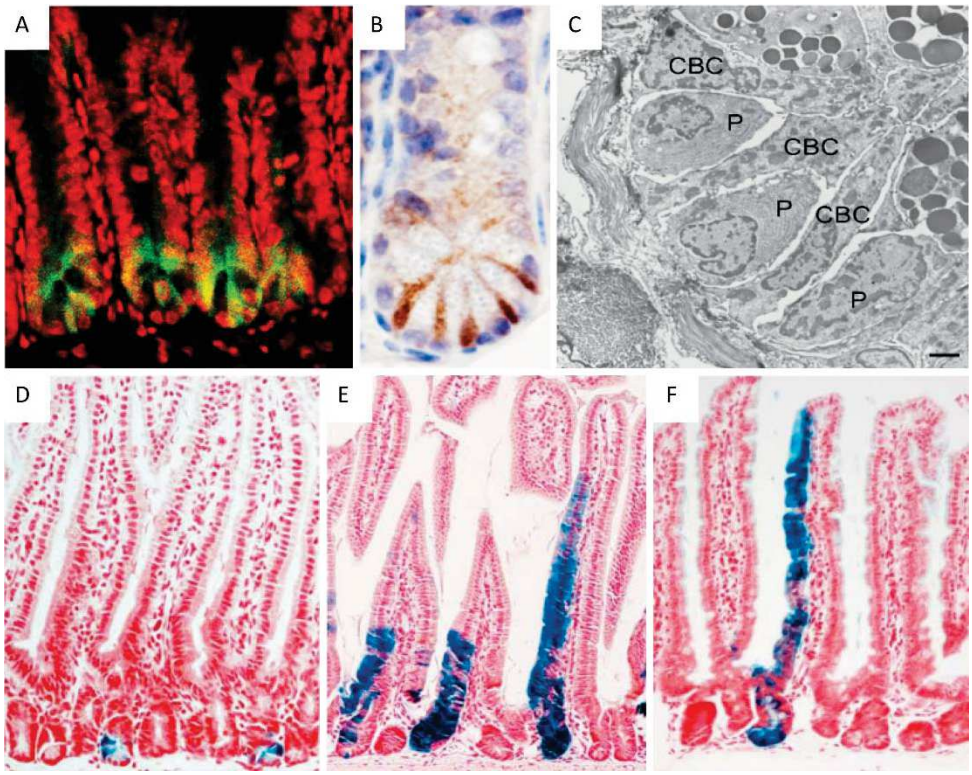


Figure 6 – Les CBC LGR5+ et traçage cellulaire dans l'épithélium intestinal murin. (A) Image par microscopie confocale à fluorescence d'un épithélium intestinal d'une souris *Lgr5-EGFP* dont les CBC LGR5+ expriment la GFP (en vert) avec un contre marquage nucléaire (en rouge). (B) Image par microscopie optique à transmission en lumière blanche d'un marquage de la GFP (en marron) par immunohistochimie (IHC) sur une coupe d'intestin de souris *Lgr5-EGFP* avec un contre marquage nucléaire (en bleu). (C) Image du fond d'une crypte intestinale obtenue par cryo-éléctro microscopie où l'on peut observer l'ultrastructure des CBC intercalées entre les CP. (D-F) Images par microscopie optique en lumière blanche de coupes d'intestin grêle de souris *Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 x Rosa26-LacZ* avec une révélation de l'activité LacZ au X-Gal (en bleu) à 1 jour (D), 5 jours (E) et 60 jours (F) après induction au tamoxifène (images extraites et adaptées de Barker *et al.*, 2007).

De manière intéressante, la découverte de ce marqueur a permis d'apporter la preuve de leur capacité à s'auto-renouveler mais également à produire l'ensemble des lignages cellulaires épithéliaux

par traçage cellulaire (Barker et al., 2007). De plus, les cellules Lgr5^{+} conservent leur capacité à générer un épithélium intestinal fonctionnel et similaire à celui observé *in vivo* après isolation et culture *ex vivo* suivant la technique de culture d'organoïdes (Sato et al., 2009). De manière similaire, une population de CSI exprimant le récepteur membranaire *EPHB2* (*EPH receptor B2)* et riche en LGR5 a pu être identifiée chez l'humain, relatant de la forte similitude physiologique entre ces deux organismes. La mise en évidence de leurs propriétés souches à s'auto-renouveler et à la multipotence ont été entre autres démontrées à travers une culture *ex vivo* de cette population cellulaire (P. Jung et al., 2011).

Leur identification a permis la caractérisation transcriptomique et protéomique de leur signature cellulaire mais également d'une signature moléculaire associé au caractère souche de l'épithélium intestinal. De nombreux gènes comme *Lgr5*, *Sox9*, *Ascl2* (*Achaete-scute family bHLH transcription factor 2*), *Ephb2*, *Tnfrsf19* (*TNF receptor superfamily member 19*) et *Axin2* dont l'expression est enrichie dans les CBC sont des cibles transcriptionnelles de la voie de signalisation WNT/TCF connue pour être largement impliquée dans la régulation de l'identité et du comportement des CBC (Barker, 2014; Korinek et al., 1998; Van der Flier et al., 2007). Néanmoins l'étude de Muñoz et collègues révèle plus de 500 gènes enrichis dans la signature des CBC et certains tels que *Olfm4* (*olfactomedin 4*), *Smoc2* (*SPARC related modular calcium binding 2*) et *Rnf43* (R*ing finger protein 43*) sont également des marqueurs de cette population. Enfin de manière intéressante, l'expression de certains gènes tels que *Bmi1* (*BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger*), *Lrig1* (*Leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1*), *Tert* (*Telomerase reverse transcriptase*) et *Hopx* (*HOP homeobox*) plutôt connus dans les populations de CS dites de réserve (présentée dans la section suivante) a été observée (Barker, 2014; Muñoz et al., 2012). Ces données reflètent une nouvelle fois la grande plasticité cellulaire et la complexité moléculaire du compartiment souche intestinale.

1.2.3.b Les cellules souches de réserve : un concept

La particularité de l'épithélium intestinal ne réside pas seulement dans son architecture ou dans son renouvellement permanent mais également dans sa plasticité. La population de CSI actives, les CBC, n'est pas la seule capable de soutenir la physiologie intestinale.

Initialement, Potten et ses collègues dévoilent indirectement l'existence d'une population de cellules résistantes aux radiations capable de maintenir l'intégrité épithéliale malgré la disparition des cellules en fond de cryptes, supposées alors souches par les travaux de Cheng et Leblond (Potten, 1977). En corrélation avec cette étude, des travaux ont montré l'existence de cellules peu cycliques, en position +4 du compartiment souche, capables de retenir un marquage nucléaire, appelées en

anglais « label-retaining cells »(LRC) (Cairnie et al., 1965; J. M. Qiu et al., 1994). Ainsi émergea l'idée d'une population peu cyclique en position +4, résistante aux radiations et capable de maintenir l'intégrité des cryptes intestinales après dommages au compartiment souche, appelée CS de réserves. Cette idée fut source de controverses au sujet de la fiabilité apportée par la relation entre leur capacité à retenir un marquage nucléaire et leur résistance aux radiations et ainsi leur fonction de CS de réserve, reflétant le manque certain de marqueurs permettant de mettre fonctionnellement en évidence cette population. C'est finalement en 2013 que les travaux de Buczacki et ses collègues montrent l'existence de cellules peu cycliques, retenant un marquage nucléaire, également en position +4, à l'origine de cellules sécrétrices entéroendocrines et de CP (Figure 7). Ces mêmes cellules sont également capables de repeupler la crypte intestinale dans des conditions de dommage à l'épithélium, confortant ainsi le concept avancé par Potten et ses collègues plusieurs années auparavant (Buczacki et al., 2013).

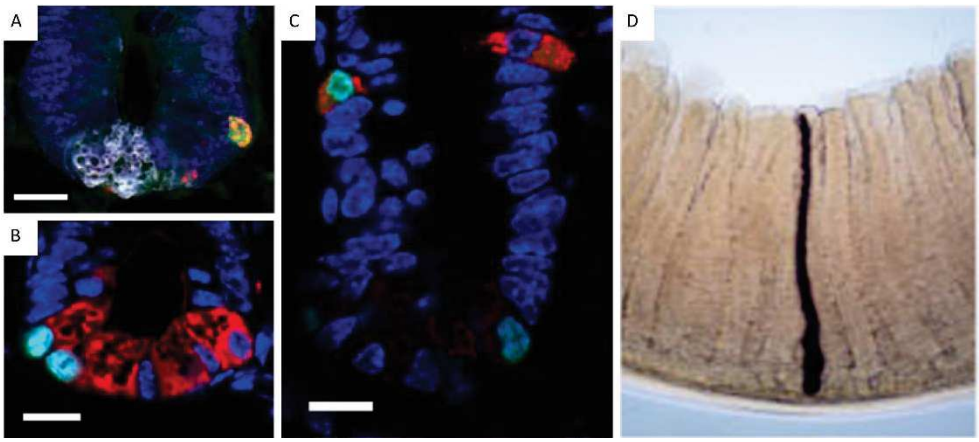


Figure 7 – Cellules de réserves, différenciation et régénération épithéliale. (A) Image obtenue par microscopie confocale d'une crypte intestinale de souris contenant une cellule non Paneth (marquage lysozyme en blanc), retenant le marquage H2B-YFP (en vert) et en cours de phase S (marquage EdU en rouge) avec un contre marquage nucléaire (en bleu). (B) De la même manière, deux cellules retenant le marquage H2B-YFP (en vert) différenciées en CP (marquage lysozyme en rouge). (C) Ensuite, deux cellules entéroendocrines (marquage chromogranine A en rouge) dont l'une est issue d'une cellule retenant le marquage H2B-YFP (en vert). (D) Enfin, image par microscopie optique à transmission en lumière blanche d'un épithélium intestinal murin avec observation d'un traçage cellulaire issu d'un clone retenant le marquage H2B révélé par le système β-Galactosidase (en bleu foncé) en condition de dommages à l'épithélium.

En 2008, les travaux de Sangiorgi et Cappechi mettent pour la première fois en évidence l'existence d'une population de CSI peu cycliques et situées en position +4 du fond de cryptes exprimant le marqueur Bmi1 (Sangiorgi & Capecchi, 2008). Leur propriété de multipotence a été mise en évidence par marquage des populations cellulaires de l'épithélium intestinal et traçage cellulaire mais également par clonage *ex vivo* après isolation (Sangiorgi & Capecchi, 2008; Yan et al., 2012).

Les travaux initiés par Potten et ses collègues, plus que d'avoir permis l'identification d'une population de cellules souches de réserve, ont mis en évidence un concept fascinant. Comme présenté par Sangiorgi et Cappechi mais également par d'autres études, il existe plusieurs populations de cellules peu cycliques, à la limite physique du compartiment souche tel qu'il est défini et pouvant présenter des propriétés de pluripotence et de renouvellement épithélial dans certaines conditions. La description de ces différentes populations et des mécanismes qui leurs sont associés est encore floue et nécessite encore beaucoup de travail. Néanmoins, aujourd'hui sont connus plusieurs marqueurs cellulaires étudiés fonctionnellement tel que *Bmi1* (Tian et al., 2011), *Lrig1* (Powell et al., 2012), *Hop*x (Takeda et al., 2011) et *Tert* (Montgomery et al., 2011), qui nous permettent d'identifier ou du moins de dessiner les contours de cette population de réserve bien qu'ils n'en soient pas spécifiques (Barker, 2014; Muñoz et al., 2012).

1.2.3.c La plasticité du compartiment souche

Au cours de la dernière décennie, beaucoup d'études ont mis en évidence l'existence de plusieurs populations souches avec l'établissement d'un dogme désignant une population active de CSI et une population de réserve. Comme présenté précédemment (*cf.* 1.2.3.b), la première catégorie de CS, correspondant aux CBC LGR5^{+}, assure la production de l'ensemble des lignages cellulaires épithéliaux en conditions physiologiques tout en maintenant son identité au cours de l'existence d'un individu. La deuxième, communément appelées les CS +4 ou CS de réserves, regroupe un ensemble de cellules ayant la capacité de repeupler le compartiment souche et l'épithélium intestinal en cas de perte de son intégrité (Figure 8).

Bien que ces travaux et l'établissement de ce dogme aient permis de mieux comprendre les mécanismes associés au fonctionnement du compartiment souche, il est important de nuancer ces principes établis en y intégrant le concept de plasticité cellulaire. En effet, l'état souche, bien que réel et largement défini, présente des frontières plus nuancées qu'il n'y parait. Un modèle plus récent suggère que le compartiment souche et notamment la niche souche permet le maintien de l'identité de ces populations présentant l'une ou l'autre des caractéristiques décrites ci-dessus mais qu'une cellule en elle-même peut selon les conditions, changer ou acquérir l'une ou l'autre de ces caractéristiques (Tian et al., 2011; Takeda et al., 2011; Barker, 2014). La compréhension des mécanismes associés à cette plasticité reste encore à approfondir. Certaines études ont néanmoins montré que cette conversion d'un état actif à un état plutôt dormant des populations de CSI peut répondre à un besoin physiologique comme l'apport en nutriment ou à un stress comme la perturbation du rythme circadien (Pagel et al., 2017; Richmond et al., 2015) (Figure 8).

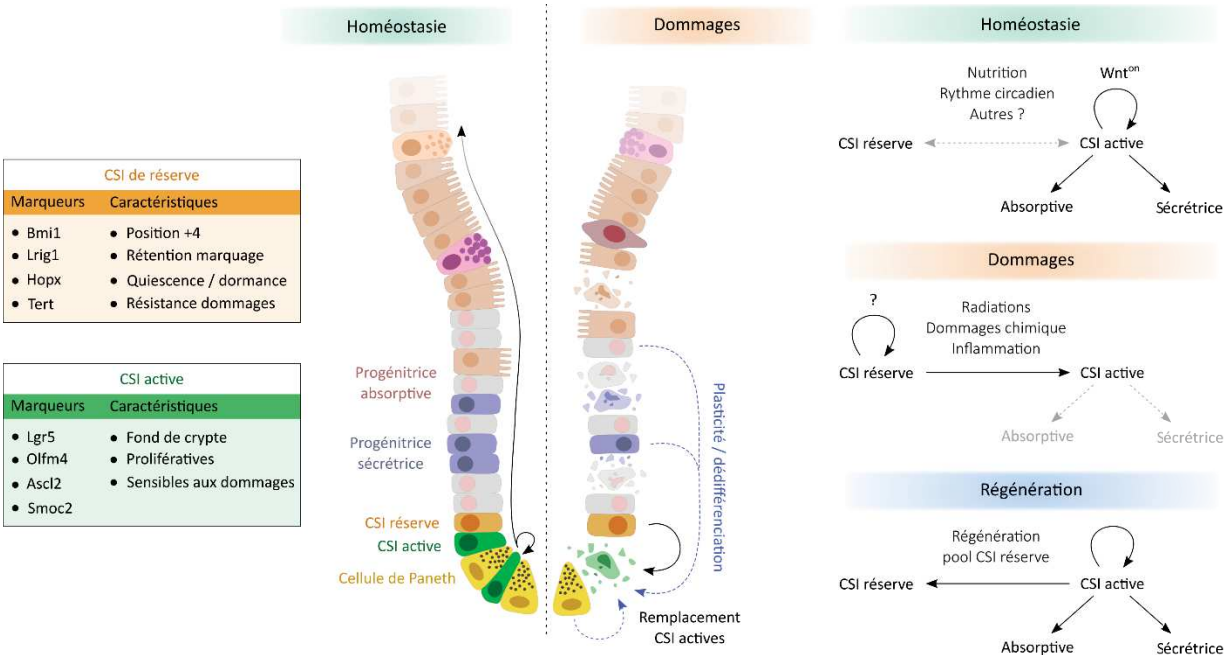


Figure 8 – Cellules souches intestinales et plasticité épithéliale. (Adapté et inspiré de Barker, 2014 et Bankaitis *et al.*, 2018).

Basé sur le postulat de Potten, il est maintenant démontré que les CSI de réserves réactivent leurs fonctions souches et changent d'état lorsque les CSI actives sont déplétées (Tian et al., 2011) ou en cas de dommage à la crypte et au compartiment souche, rétablissant ainsi l'homéostasie épithéliale et repeuplant les différents lignages cellulaires (Montgomery et al., 2011; Asfaha et al., 2015; Roche et al., 2015) (Figure 8). Cette capacité de régénération relate de la forte plasticité des cryptes intestinales. De manière intéressante, il a également été démontré que des cellules progénitrices en bas du compartiment d'amplification transitoire peuvent être à l'origine du rétablissement de l'homéostasie épithéliale en retrouvant un état souche par la modification de la niche permissive en fond de crypte à la suite d'une perte de l'intégrité de celle-ci. En effet, une étude a démontré la plasticité cellulaire de progéniteurs issus de LRC possédant des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles souches (N. Li et al., 2016). De plus, il a été démontré que les CP, issues de la différenciation terminale des progéniteurs LRC, sont capables de retourner dans le cycle cellulaire même au stade terminal de leur différenciation et de réacquérir des propriétés souches dans des conditions d'inflammation de l'intestin (Schmitt et al., 2018). De même, des propriétés souches sont retrouvées par les cellules progénitrices sécrétrices à différents stades de maturation après dommages à l'épithélium (Jadhav et al., 2017; Roche et al., 2015; van Es et al., 2012; Yan, Gevaert, Zheng, Anchang, Probert, Larkin, Davies, Cheng, Kaddis, Han, Roelf, Calderon, Cynn, Hu, Mandleywala, Wilhelmy, Grimes, Corney, Boutet, Terry, Belgrader, Ziraldo, Mikkelsen, Wang, von Furstenberg, et al., 2017). Enfin, les cellules progénitrices absorptives sont elles aussi capables de se dédifférencier pour

régénérer les CBC LGR5^{+} constituant un ensemble de cellules disponibles important étant la population cellulaire la plus représentée de l'épithélium intestinal (Tetteh et al., 2016).

Cette plasticité épithéliale à préserver et régénérer le compartiment souche est complexe et les travaux réalisés jusqu'alors ont permis d'éclaircir les mécanismes cellulaires qui l'entoure. La régulation de ces processus implique un contrôle moléculaire fin par un ensemble de signaux autonomes et non-autonomes cellulaires.

1.3 Bases moléculaires de l'homéostasie intestinale

L'équilibre de l'activité de certaines voies de signalisation et la création de zones avec un environnement moléculaire particulier sont nécessaires à l'établissement des différents compartiments épithéliaux (Figure 9). Ces ensembles de signaux permettent non seulement de maintenir le compartiment souche avec son identité et sa dynamique, notamment grâce à la niche permissive en fond de crypte, mais également de contrôler la détermination des cellules progénitrices jusqu'à leur différenciation finale ainsi que l'architecture épithéliale en elle-même.

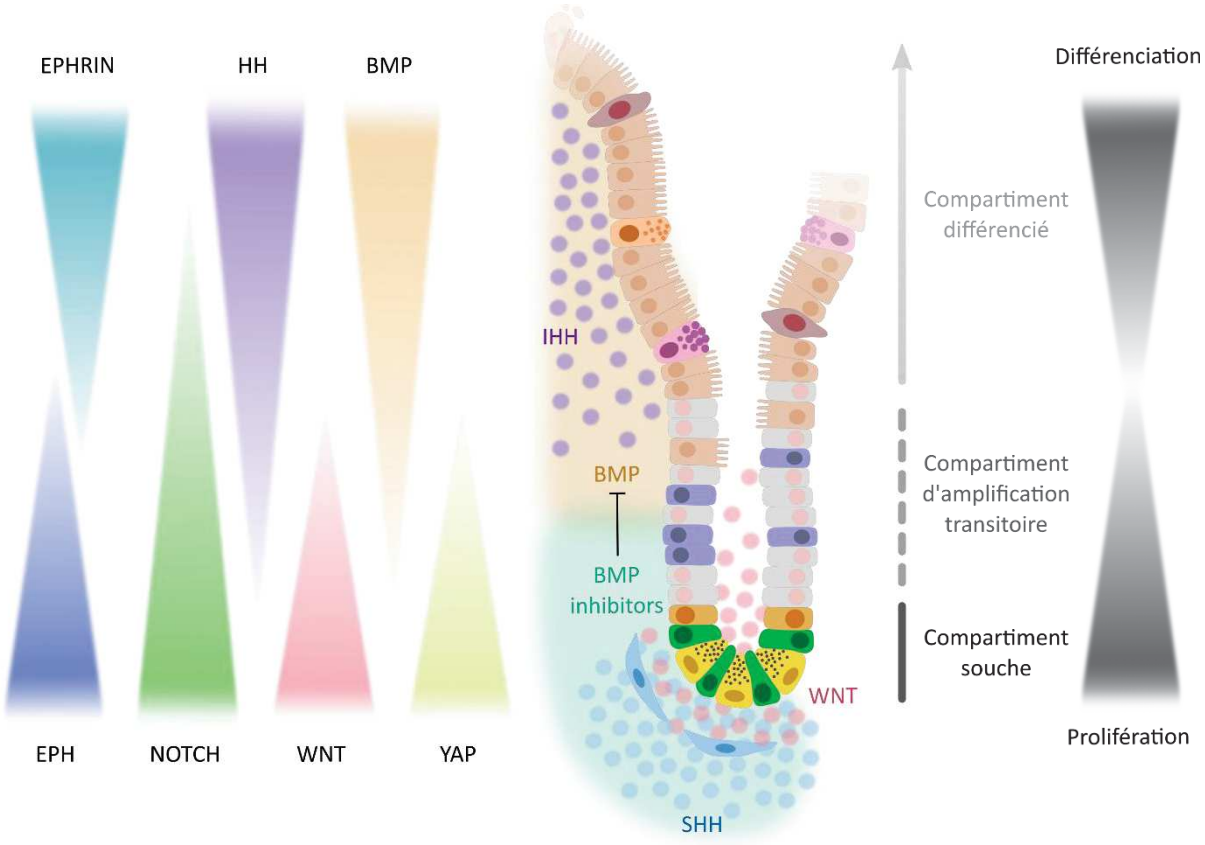


Figure 9 – Les grandes voies de signalisation de l'axe-crypto-villositaire. (Adapté de Meran, Baulies and Li, 2017).

1.3.1 Les grandes voies de signalisation de l'axe crypto-villositaire

L'homéostasie épithéliale est maintenue par un ensemble de signaux autonomes et non-autonomes cellulaires. La plupart de ces voies de signalisation moléculaire fonctionnent suivant le schéma de l'activation ou l'inhibition d'un récepteur par son ligand, induisant une réponse cellulaire au travers de l'activation ou l'inhibition de l'expression des gènes cibles de cette voie.

1.3.1.a La voie WNT

Largement conservée au cours de l'évolution, la voie de signalisation WNT/β-caténine est connue pour réguler nombre de processus développementaux et est cruciale pour le maintien des CS adultes et de l'homéostasie tissulaire (Steinhart & Angers, 2018).

La sécrétion des glycoprotéines WNT active cette voie de signalisation au travers de leur liaison aux co-récepteurs transmembranaires FZ (Frizzled), de la famille des RCPG (Récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G), et des LRP5/6 (LDL receptor-related proteins 5 and 6). Le complexe WNT-FZ-LRP5/6 ainsi formé transduit un signal intracellulaire stabilisant la β-caténine, effecteur majeur de cette voie codé par le gène *CTNNB1* (*Catenin (cadherin associated protein), beta 1*), sous forme mono-phosphorylée au travers de l'inhibition du complexe de dégradation composé de l'AXIN2, APC (Adenomatosis polyposis coli), CK1 (Casein kinase 1) et GSK-3β (Glycogen synthase kinase 3 beta). Ainsi accumulée, elle est transloquée au noyau où elle forme un complexe avec les facteurs de transcription TCF (T-cell factor) activant la transcription de ses gènes cibles (Figure 10). Inversement, la sécrétion de facteurs DKK (Dickkopf) favorise l'internalisation des récepteurs LRP5/6 se traduisant par une stabilisation du complexe de dégradation, une élimination de la β-caténine par le protéasome et un maintien de l'inhibition des gènes cibles des facteurs TCF (H. Clevers, 2006).

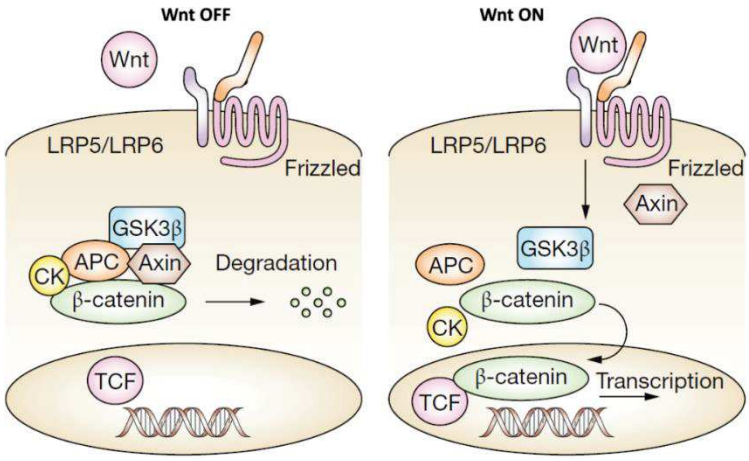


Figure 10 – Schéma représentatif de la voie de signalisation WNT. (Adapté de Corr, 2008).

L'analyse exhaustive des composantes épithéliales de la voie WNT a révélé que l'expression de la glycoprotéine WNT3 est restreinte au compartiment souche. Les facteurs WNT6 et WNT9b quant à eux sont exprimés en gradient décroissant depuis le fond des cryptes jusque le long du compartiment d'amplification transitoire, de même que l'expression de certains membres des récepteurs FZ, tels que FZ-5 et 7. De manière intéressante, l'expression du FT TCF-4, majoritaire dans l'épithélium intestinal, est constante le long de l'axe crypto-villositaire (Gregorieff et al., 2005). Ces données semblent indiquer que l'expression des gènes cibles de la voie WNT par le complexe TCF-4/β-caténine est également graduelle et inversement proportionnelle au potentiel souche depuis le fond des cryptes intestinales (Figure 9). Il a notamment était montré que la perte d'expression de *Tcf-4*, effecteur majeur de cette voie dans l'épithélium intestinal murin, se traduisait par une perte totale du compartiment souche et une altération profonde la physiologie épithéliale (Korinek et al., 1998). Inversement, l'expression ectopique de l'inhibiteur Dkk1 est associée à une diminution drastique de la prolifération cellulaire épithéliale aboutissant à une perte des cryptes mais également à une perturbation du développement des cellules sécrétrices (Pinto et al., 2003). Enfin, la voie WNT régule le système Ephrin, qui contrôle la migration cellulaire le long de l'axe crypto-villositaire par répulsion cellulaire en réponse au remodelage du cytosquelette, après activation du récepteur par son ligand. L'expression des récepteurs EPHB2 et 3 est graduelle depuis le fond des cryptes jusqu'au sommet des villosités intestinales et est positivement contrôlée par les effecteurs de la voie WNT, le complexe TCF/β-caténine. Inversement, l'expression de leurs ligands EPHRIN-B1 et 2 est décroissante depuis le sommet des villi jusqu'au fond du compartiment souche (Figure 9). Le contrôle de ce gradient est essentiel à la migration et la différenciation cellulaire ainsi qu'à leur prolifération le long de l'axe crypto-villositaire (Kullander & Klein, 2002; Batlle et al., 2002; Holmberg et al., 2006).

Ainsi, la voie de signalisation WNT est considérée comme l'une des voies majeures du maintien de l'homéostasie épithéliale, largement décrite comme étant impliquée dans la différenciation cellulaire mais surtout le maintien de l'identité des CSI actives et la régulation de leur comportement (Vanuytsel et al., 2013).

1.3.1.b La voie NOTCH

La voie de signalisation NOTCH est très conservée au cours de l'évolution et compte parmi les grandes voies moléculaires régulant beaucoup de processus développementaux. Largement impliquée dans l'homéostasie tissulaire en général, elle est connue pour participer au maintien de l'identité souche des cellules adultes (Siebel & Lendahl, 2017).

Contrairement à la voie WNT, la voie NOTCH agit par contact de cellule à cellule. Toutes les cellules expriment à leur surface des récepteurs et des ligands de cette voie. La famille des récepteurs NOTCH comprend 4 protéines transmembranaires composées d'une partie extracellulaire, essentiellement constituée d'une répétition en tandem de domaines EGF-like (Epidermial growth factor-like) régulant l'affinité pour son ligand et d'un domaine d'hétérodimérisation. La partie transmembranaire et intracellulaire, en dimère avec à la partie extra-cellulaire, est globalement constituée d'un domaine d'hétérodimérisation suivi d'un domaine transmembranaire et d'une partie intracellulaire contenant plusieurs domaines, notamment des séquences de localisation nucléaires. La partie extra-cellulaire des récepteurs NOTCH reconnait une grande famille de ligands composée essentiellement de protéines transmembranaires de type I classées principalement en 2 familles, DELTA et JAGGED, selon la composition de leur domaine extra-cellulaire (S. J. Bray, 2006; Kopan & Ilagan, 2009).

La liaison d'un ligand à son récepteur provoque le clivage du domaine extracellulaire par la métalloprotéinase ADAM créant le substrat de la γ-sécrétase, une protéase transmembranaire, qui clive en plusieurs points produisant le domaine intra-cellulaire de NOTCH. Une fois généré, ce domaine intracellulaire est transloqué au noyau où il interagit avec le FT RBPj (Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region) et des protéines co-activatrices comme MAML1 (Mastermind-like transcriptional coactivator 1) pour activer l'expression des gènes cibles de ce complexe comme *HES1* (Figure 11). En l'absence de liaison avec le ligand, le récepteur finit par être phosphorylé puis dégradé par le protéasome. Les gènes cibles de RBPj restent alors inactivés (Kopan & Ilagan, 2009).

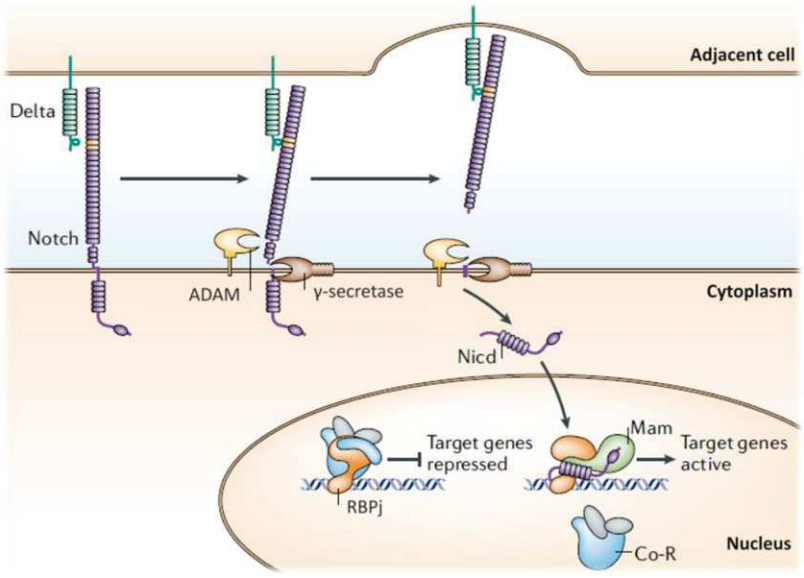


Figure 11 – Schéma représentatif de la voie de signalisation NOCTH. Notch intracellular domain (Nicd), co-répresseur (Co-R) (Adapté de Bray, 2006).

L'expression des composantes de la voie de signalisation NOTCH est principalement observée au niveau des cryptes que ce soit l'expression de certains ligands tel que *DLL1* (*Delta like canonical Notch ligand 1*), *DLL4* et *JAG1* (*Jagged 1)* ou des récepteurs *NOTCH 1* et *2*. L'activité transcriptionnelle, suivie par l'expression des gènes *HES*, semble prédominante dans la crypte pour les gènes *HES1*, *6* et *7* mais est également retrouvée jusque dans les villi pour *HES5* (Schröder & Gossler, 2002) (Figure 9). Comme présenté précédemment (*cf.* section 1.2.2), la voie NOTCH est essentielle à la différenciation cellulaire. Son activation réprime la différenciation des progéniteurs en cellules sécrétrices, notamment à travers l'expression du FT *HES1* induisant la répression d'*ATOH1*, comme observé après délétion d'un ou plusieurs composants (Pellegrinet et al., 2011; van Es, van Gijn, et al., 2005). De manière intéressante, l'inhibition de l'activité NOTCH est associée à une perte de la prolifération des cellules progénitrices (inversement pour sa sur-activation) ainsi qu'une perte d'expression de certains marqueurs souches comme *OLFM4*, *LGR5* et *ASCL2* après inactivation de *DLL1* et *DLL4* (Pellegrinet et al., 2011; Fre et al., 2005). Enfin, il a été montré que l'inactivation de la voie NOTCH résulte en une perte de l'identité des CBC à travers une réduction de la prolifération et de l'apoptose des CSI (VanDussen et al., 2012).

Ainsi, la voie de signalisation NOTCH compte parmi les grandes voies moléculaires impliquées dans le maintien de l'homéostasie intestinale en orientant le développement cellulaire intestinal et est nécessaire au maintien de l'identité des CBC.

1.3.1.c La voie HIPPO

La voie de signalisation HIPPO, étudiée que récemment en comparaison des autres voies moléculaires, est encore mal définie chez les mammifères. Elle est cependant conservée au cours de l'évolution et est connue pour être impliquée dans l'organogenèse notamment au niveau de la régulation de la taille des organes en réponse à la densité cellulaire ainsi que dans le contrôle de la différenciation et la prolifération cellulaire (Pan, 2010).

Cette voie a été principalement étudiée pour son complexe de kinases, composant essentiel de la signalisation HIPPO, en dépit des mécanismes régulant son activité. Néanmoins, en réponse à un signal, le complexe kinase formé par les protéines MST1/2 (STE20-like protein kinase 1 and 2) et SAV1 (Salvador homologue 1) phosphoryle LAST1/2 (Large tumor suppresor 1 and 2) et MOB1 (Mob kinase activator 1) créant un site de liaison pour la protéine 14-3-3 sur les protéines YAP (Yes-associated protein 1) et TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) après leur phosphorylation. Ainsi l'activation du cœur de kinases prévient la translocation de YAP/TAZ et favorise sa dégradation. Inversement, en l'absence d'activation de MST1/2, YAP/TAZ sont transloquées au noyau ou elles

interagissent avec une large palette de FT, étant dépourvues de site de liaison à l'ADN. Parmi leur interactome, les FT TEAD (TEA domain) / TEF (Transcription enhancer factor) semblent être prédominants (Pan, 2010) (Figure 12).

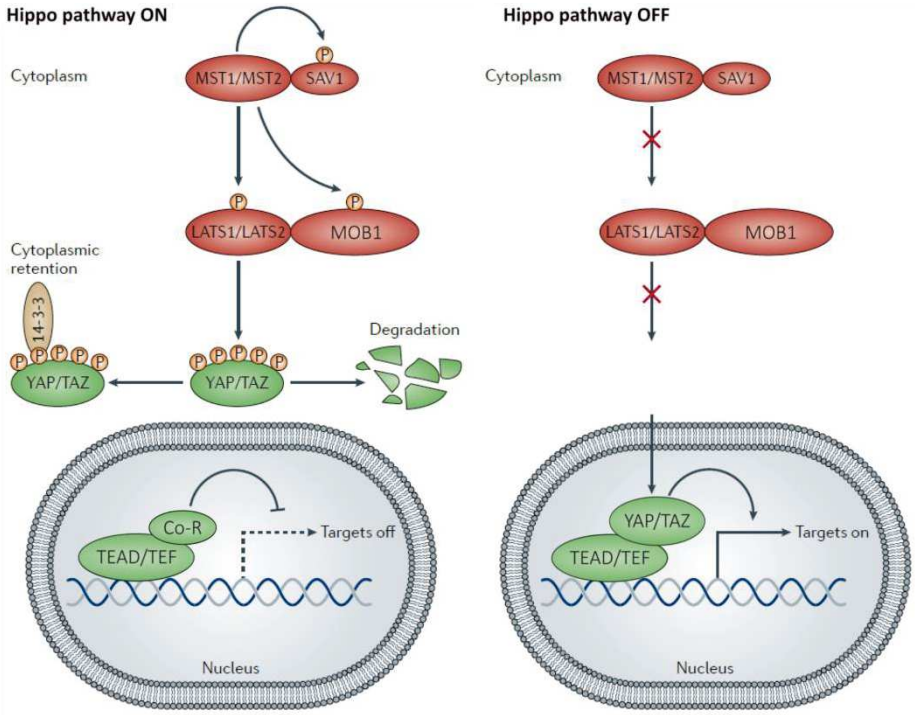


Figure 12 – Schéma représentatif de la voie de signalisation HIPPO. Co-répresseur (Co-R) (Adapté de Johnson and Halder, 2014).

Les évènements régulant l'activation du complexe kinase sont encore flous. Il semble que certaines voies moléculaires comme WNT puissent interagir avec leur activation, tout comme des RCPG ou la tension cellulaire induite par des jonctions serrées et adhérentes (Pan, 2010). Au sein de l'épithélium intestinal, YAP est stable depuis le fond des cryptes jusque le long du compartiment d'amplification transitoire et l'induction de sa stabilisation accroit la prolifération cellulaire des cryptes intestinales ainsi que l'inhibition générale de la différenciation cellulaire potentiellement à travers l'activation en synergie de la voie NOTCH et de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine (Camargo et al., 2007; D. Zhou et al., 2011) (Figure 9). De manière intéressante, l'inactivation de YAP ne semble pas induire de phénotype dans des conditions homéostatiques, cependant elle est délétère pour la régénération épithéliale induite après inflammation ou irradiation (Cai et al., 2010; Gregorieff et al., 2015).

La régulation de la voie HIPPO et le contrôle de la stabilisation des facteurs YAP/TAZ sont essentiels au maintien de l'homéostasie intestinale et plus particulièrement de la prolifération et la régénération du compartiment souche et d'amplification transitoire.

1.3.1.d La voie BMP

Les signaux BMP (Bone morphogenetic proteins), à l'instar des signaux WNT, sont des ligands solubles de la superfamille des TGF-β (Transforming growth factor-β) impliqués dans le développement des membres et dans l'homéostasie tissulaire. Une quinzaine de protéines BMP ont été identifiées, présentant une structure en dimère reliée par des ponts disulfures dont les monomères ont une séquence conservée de 7 cystéines, caractéristique de la superfamille des TGF-β. Les membres de la famille BMP se lient à 2 types de récepteurs sérine/thréonine kinase, BMPR-I et II (Bone morphogenetic protein receptor-I and II). Les récepteurs BMPR-II, constitutivement actifs, forment un hétéro-oligomère avec les récepteurs BMPR-I après liaison du ligand. Le complexe, composé du ligand et de 2 unités de chaque récepteur, active la fonction kinase des BMPR-I phosphorylant les R-SMAD (Receptor-regulated Smads), formant un complexe avec les CO-SMAD (Common-partner Smads). Ce complexe est ensuite transloqué au noyau où il interagit avec d'autres FT et/ou des co-régulateurs transcriptionnels à travers la reconnaissance d'une séquence SBE (Smad-binding element) pour réguler l'expression des gènes cibles de cette voie (Miyazono et al., 2005) (Figure 12). De manière intéressante, la transduction du signal par les récepteurs BMP n'est pas nécessairement dépendante des SMAD. Plusieurs voies de signalisation, comme les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ou des petites protéines G élargissent considérablement l'éventail des régulations associées aux signaux BMP (K. Luo, 2017) (Figure 13).

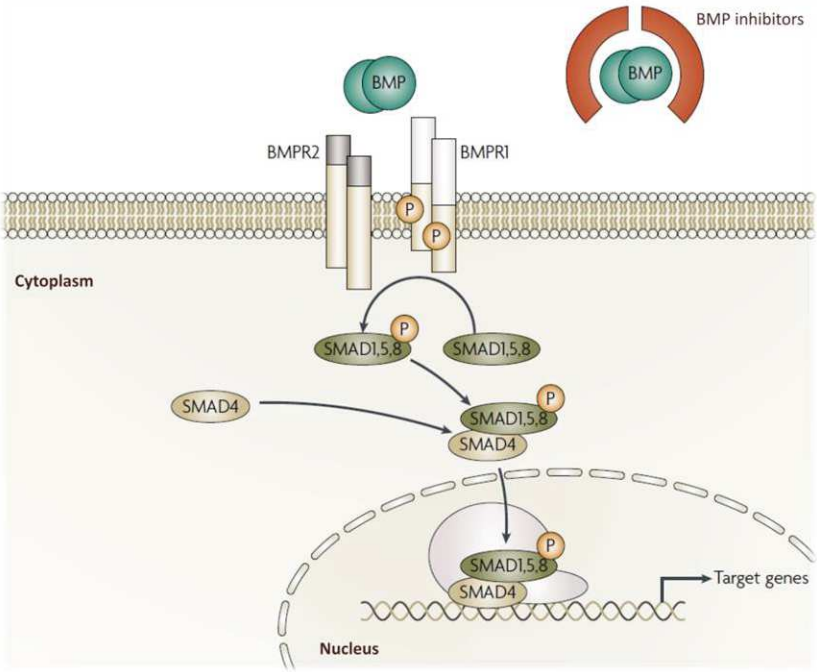


Figure 13 – Schéma représentatif de la voie de signalisation BMP. (Adapté de Hardwick *et al.*, 2008).

L'expression des facteurs BMP est plutôt stromale qu'épithéliale (Figure 9). Il a été montré que BMP4, 5 et 6 sont exprimés presque uniquement dans le stroma, tandis que les facteurs BMP1, 2 et 7 sont exprimés dans le stroma et les cellules épithéliales. Les récepteurs de ces molécules sont également exprimés dans l'épithélium et le stroma (X. Li et al., 2007). De manière intéressante, la phosphorylation et donc l'activation des SMAD, notamment SMAD1, 5 et 8, est plutôt spécifique des cellules épithéliales intestinales. Ces observations relatent de l'effet paracrine des signaux BMP, depuis le stroma vers les cellules épithéliales (Haramis et al., 2004). L'activation des SMAD par les facteurs BMP est décroissante du sommet des villi vers le début des cryptes intestinales pour s'éteindre dans le compartiment d'amplification transitoire. En effet, les cellules stromales en périphérie et au fond des cryptes sécrètent des inhibiteurs de BMP, notamment les facteurs GREM1 et 2 (Gremlin 1 and 2), CHRDL1 (Chordin-like 1), des follistatines et NOG (Noggin), qui séquestrent les protéines BMP et empêchent l'activation des SMAD (J. C. H. Hardwick et al., 2004; Kosinski et al., 2007).

Comme le suggèrent ces observations, l'inhibition des facteurs BMP ou de leur signalisation est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'à une formation aberrante de cryptes intestinales. Ainsi, la voie de signalisation BMP apparait comme cruciale dans le maintien de l'architecture épithéliale au travers du contrôle de la prolifération des cellules progénitrices et des CSI actives (Haramis et al., 2004; He et al., 2004; Qi et al., 2017). Enfin, cette voie est essentielle à la différenciation finale des cellules sécrétrices entéroendocrines (Auclair et al., 2007).

1.3.1.e La voie HEDGEHOG

La voie de signalisation HH (Hedgehog) est très largement conservée au cours de l'évolution et joue un rôle prédominant au cours du développement notamment à travers la mise en place des axes développementaux et du contrôle de l'organogenèse, comme c'est le cas dans l'intestin (Briscoe & Thérond, 2013; Ramalho-Santos et al., 2000).

Chez les mammifères, 3 protéines du nom de FHH (Desert HH), SHH (Sonic HH) et IHH (Indian HH) constituent la famille de ligands de cette voie. Brièvement, en absence de ligand HH, le récepteur transmembranaire PTC (Patched) inactive SMO (Smoothened), également un récepteur transmembranaire, se traduisant par la phosphorylation des FT GLI1, 2 et 3 (GLI family zinc finger protein 1, 2 and 3) par PKA (Protein kinase A), CKI et GSK3-β. Cette forme phosphorylée est ensuite reconnue par la protéine βTrCP (β-transducin repeat containing protein) et ubiquitinylée par le complexe ubiquitine ligase E3. Ensuite partiellement dégradée par le protéasome, leur forme tronquée exerce une activité transcriptionnelle répressive sur l'expression de leur gènes cibles (Figure

14). En cas de liaison d'un ligand HH, le récepteur PTC est internalisé et l'inhibition de SMO est levée. Les protéines GLI sont libérées sous leur forme totale et une fois transloquées dans le noyau, elles régulent positivement l'expression de leurs gènes cibles (Figure 14). Une balance entre leur forme tronquée et totale contrôle l'expression de leurs gènes cibles au reflet de l'intensité extracellulaire des gradients HH (Briscoe & Thérond, 2013).

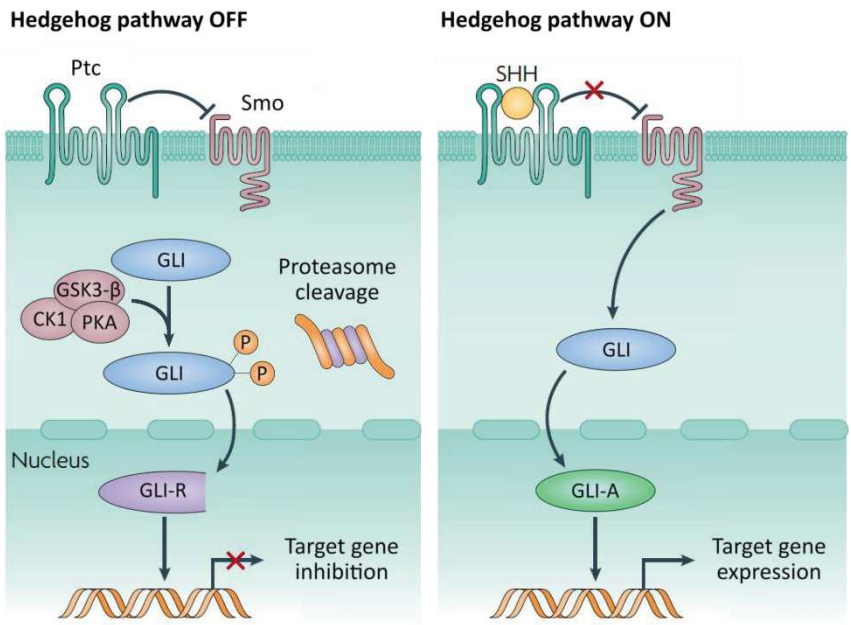


Figure 14 – Schéma représentatif de la voie de signalisation HEDGEHOG. Forme tronquée répressive des facteurs GLI (GLI-R) et forme entière active des facteurs GLI (GLI-A) (Adapté de Crompton, Outram and Hager-Theodorides, 2007)

La signalisation HH est basée sur un système paracrine avec une expression des ligands HH par les cellules épithéliales, IHH à la base des villosités et SHH au fond des cryptes intestinales (Figure 9). L'expression des récepteurs PTC est quant à elle restreinte aux cellules stromales à l'instar des facteurs de transcription GLI (Kolterud et al., 2009; van den Brink et al., 2004). La perte d'expression d'IHH ou leur inhibition par la sur-expression de HHIP (Hedgehog interacting-protein) sont associées à un défaut du développement de la *muscularis mucosae* et de la localisation des myofibroblastes sub-épithéliaux au cours du développement se traduisant par une perturbation de l'architecture épithéliale, une malformation des villi et une formation aberrante de cryptes (Kosinski et al., 2010; Madison et al., 2005; Ramalho-Santos et al., 2000). Les échanges entre les cellules stromales et notamment les myofibroblastes sub-épithéliaux sont essentiels au maintien de l'environnement moléculaire du compartiment souche. Ainsi la perturbation induite par l'inhibition d'IHH est associée à une expansion de la population des CSI et une augmentation de leur prolifération en corrélation à une intensification de l'activité WNT (van den Brink et al., 2004). De plus, il a été observé que

l'inhibition d'IHH diminue l'expression des signaux BMP et favorise l'expression de leurs inhibiteurs dans le côlon soutenant l'effet pro-prolifératif de l'inhibition d'IHH (Kosinski et al., 2010). De manière intéressante, l'inhibition de SHH diminue la prolifération des cellules progénitrices et altère la différenciation des cellules sécrétrices en particulier les cellules de Goblet et les CP (Gagné-Sansfaçon et al., 2014).

Ainsi, la voie HH compte parmi les voies majeures de soutien à l'homéostasie épithéliale avec un rôle prédominant dans le développement de la paroi intestinale, la mise en place et le maintien de l'architecture épithéliale.

1.3.2 Régulation de l'identité et du comportement des cellules souches

La niche souche épithéliale intestinale maintient un environnement dit permissif à l'état souche. Plus précisément, l'environnement cellulaire et moléculaire présent permet le maintien de cette identité au travers de signaux de contact ou sécrétés formant une zone particulière. Il est important de noter que les CSI actives au fond des cryptes se divisent de manière symétrique, à savoir qu'elles produisent deux cellules filles identiques. Ces cellules sont poussées aux extrémités du compartiment de manière mécanique et entament leur développement lorsqu'elles quittent l'espace permissif de la niche souche au début de la zone d'amplification transitoire. Ainsi, de manière stochastique, la population des CSI actives est peu à peu maintenue par un seul clone (Lopez-Garcia et al., 2010; Snippert et al., 2010). Ce mécanisme appelé dérive clonale met en avant l'aspect non-autonome cellulaire de l'identité souche et le rôle prédominant de cette zone permissive.

Il existe deux types cellulaires majeurs à l'origine de cet environnement si particulier. Les cellules stromales sub-épithéliales et les CP, intercalées entres les CSI et considérées comme les chefs d'orchestre de la physiologie épithéliale (*cf.* section 1.2.2).

1.3.2.a Le rôle du stroma

Comme présenté précédemment, la muqueuse épithéliale est constituée de plusieurs couches organisées de manière radiale (*cf.* section 1.1.3). La sous-muqueuse et une partie de la muqueuse, la *muscularis mucosae* et la *lamina propria*, forment le mésenchyme intestinal qui correspond au tissu stromal soutenant l'architecture épithéliale. Elle contient notamment un ensemble de cellules stromales dont l'identité et la fonction ont été étudiées plus récemment que celle de l'épithélium. Ces cellules jouent un rôle crucial dans la physiologie épithéliale en régulant

entre autres l'activité des grandes voies de signalisation nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale (McCarthy, Kraiczy, et al., 2020).

Cette population hétérogène est éparpillée au sein de la *lamina propria* et est présente le long de la surface basale de l'épithélium (Figure 15). Grâce à une combinaison d'analyses phénotypiques par FACS et d'études transcriptomiques, une signature moléculaire a pu être identifiée pour chacune de ces population basée sur l'expression des marqueurs *VIM* (*Vimentine)*, *FOXL1* (*Forkhead box L1*), *DES* (*Desmine*), *ACTA2* (*Actin alpha 2, smooth muscle, aorta*), *MYH11* (*Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle*), *GLI1*, *CSPG4* (*Chondroitin sulfate proteoglycan 4*) et *PDGFRA* (*Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide*), dont les combinaisons sont résumées ci-dessous (Figure 15).

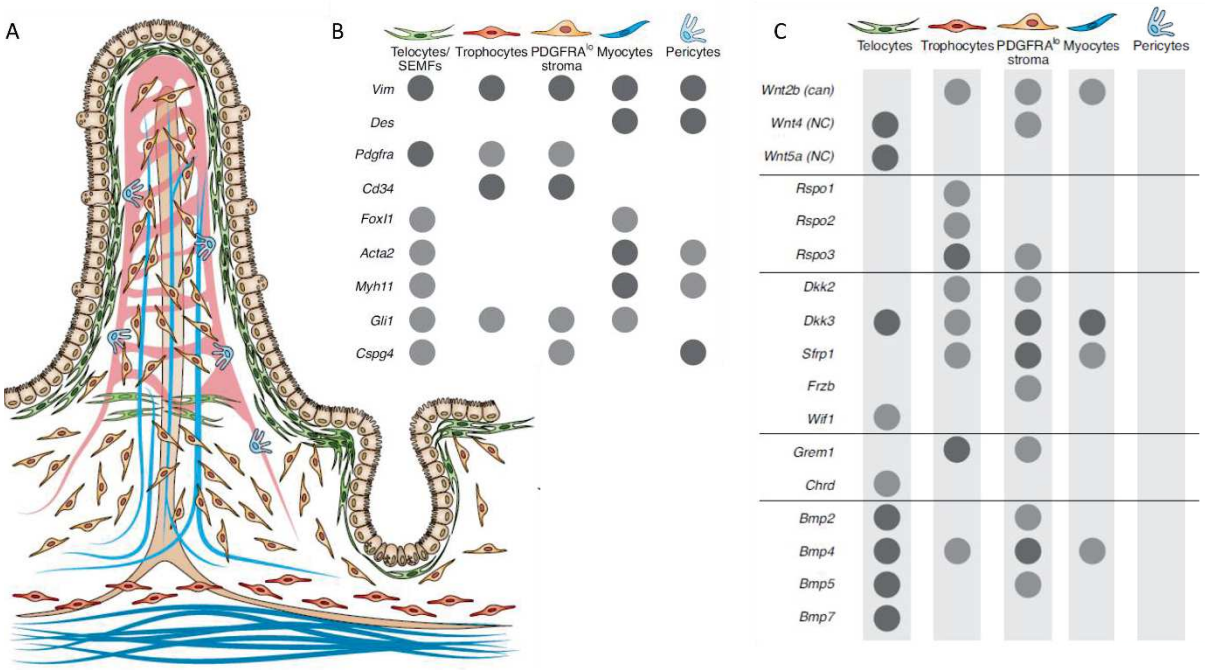


Figure 15 – Composantes stromales et profil d'expression. (A) Schéma représentatif de l'architecture et des populations cellulaires mésenchymateuses. (B) Profil d'expression des marqueurs cellulaires des populations stromales. (C) Profil d'expression des ligands de la voie WNT et BMP pour chaque population mésenchymateuse. L'intensité de gris des cercles correspond au taux d'expression de chaque marqueur ou ligand avec une forte expression en gris foncé et une expression plus faible en gris clair (Adapté de McCarthy, Kraiczy and Shivdasani, 2020).

Chacune de ces populations cellulaires produit des molécules agonistes ou antagonistes de grandes voies moléculaires tels que la voie de signalisation des BMP ou WNT, permettant le maintien des gradients d'activité essentiels de ces voies le long de l'axe crypto-villositaire (Figures 9 et 15). Le manque de spécificité des marqueurs cellulaires et la redondance des signaux sécrétés rendent difficiles les études fonctionnelles de ces cellules stromales. Néanmoins, il a été montré que les cellules PDGFRA^{+}, à savoir les Télocytes ou Myofibroblastes sub-épithéliaux (MFE), les Trophocytes et

les cellules stromales PDGFRA^{low} sont les principales populations sécrétrices impliquées dans ces processus (McCarthy, Kraiczy, et al., 2020).

De manière globale, les ligands BMP, inhibant la prolifération cellulaire et stimulant leur différenciation, sont exprimés au sommet des cryptes alors que les inhibiteurs de BMP, GREM1 et 2, sont principalement exprimés en bas des cryptes créant un gradient d'activité de cette voie maintenant la prolifération et l'identité des CSI (McCarthy, Manieri, et al., 2020). L'expression des facteurs WNT est compartimentée et dépend de la position des cellules stromales. En haut des cryptes, elles sécrètent des ligands WNT non canoniques tels que WNT4 et WNT5a ainsi que DKK3, un inhibiteur de WNT. Inversement en bas des cryptes, sont sécrétés le ligand canonique WNT2a et les R-spondines 1 à 3 (McCarthy, Manieri, et al., 2020; Shoshkes-Carmel et al., 2018). Les facteurs R-spondines potentialisent l'activation de la voie WNT *via* leur interaction avec les récepteurs LGR, inhibant le recyclage des récepteurs FZ (de Lau et al., 2014). Ils sont cruciaux dans le maintien de l'auto-renouvellement des CBC. En effet, les CS actives sont par défaut destinées à se différencier sous l'influence des facteurs WNT suivant le principe de dérive neutre présenté précédemment. Leurs capacités de prolifération/différenciation et d'auto-renouvellement sont deux caractéristiques bien distinctes et la sécrétion des facteurs R-spondines par les cellules stromales maintient les capacités d'auto-renouvellement et d'expansion des CS actives (Hao et al., 2012; Yan, Janda, et al., 2017). Dans le côlon, les cellules stromales exprimant l'effecteur GLI1 de la voie HEDGEHOG sont une source de production des ligands WNT soutenant l'activité des CSI (Degirmenci et al., 2018). De manière intéressante, il existe un dialogue entre le compartiment souche et les cellules stromales où la production de ligands HH par les cellules épithéliales active la signalisation cellulaire mésenchymateuse produisant en retour des ligands WNT *via* l'activité des FT GLI, ce qui favorise la mise en place de la niche permissive (J.-E. Kim et al., 2020).

La complexité et la redondance des marqueurs et signaux moléculaires de la niche mésenchymateuse rend son étude difficile. Il ne fait néanmoins aucun doute de l'importance de ces populations. Il a été montré que l'ablation des cellules FOXL1^{+} se traduit par une diminution de la prolifération cellulaire épithéliale associée à une diminution de l'activité WNT ainsi qu'une perte de l'identité souche (Aoki et al., 2016).

1.3.2.b Le rôle des cellules de Paneth

Les CP sont des cellules différenciées hautement spécialisées de l'épithélium intestinal. Ce type cellulaire est particulier en bien des points. C'est le seul cytotype épithélial à migrer systématiquement en bas des cryptes après différenciation pour s'intercaler entre les CSI actives.

Largement étudiées, elles ont été décrites par Clevers et Bevins comme les maestro de la physiologie épithéliale intestinale (H. C. Clevers & Bevins, 2013) (*cf.* section 1.2.2).

La localisation si particulière de ces cellules n'est pas dénuée de sens. En effet, parmi leurs multiples fonctions, elles jouent un rôle important de soutien dans la mise en place du compartiment souche et de cette zone permissive au maintien de l'identité souche et à la régulation de leur comportement. A travers la sécrétion et l'expression membranaire de ligands des grandes voies de signalisation cellulaire, les CP maintiennent un équilibre entre auto-renouvellement et prolifération/différenciation des CSI (Figure 16).

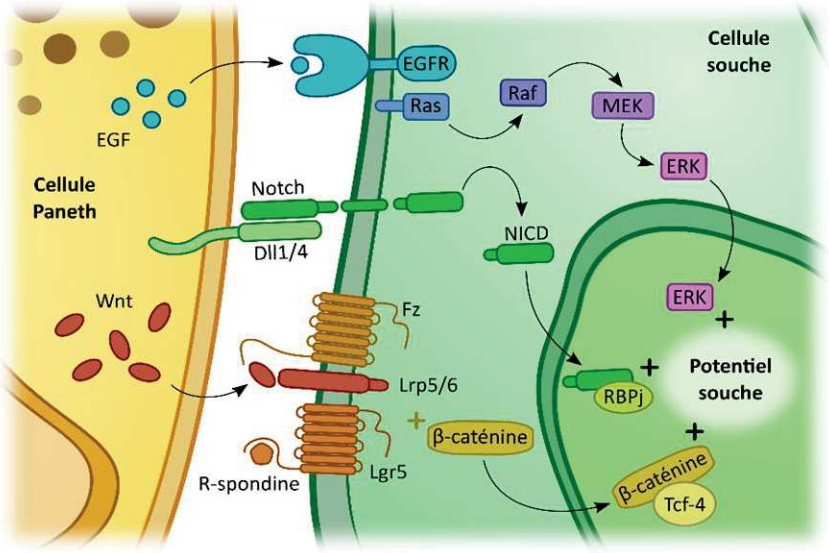


Figure 16 – Schéma représentatif de la niche moléculaire Paneth. (Inspiré de Sato and Clevers, 2013).

De manière intéressante, la perte d'expression du facteur *Wnt3*, principal ligand exprimé par les CP, n'induit pas de phénotype profond *in vivo* (Farin et al., 2012). De plus, l'ablation du lignage Paneth par la délétion du FT *Atoh1*, essentiel à la différenciation des cellules sécrétrices intestinales, est également palliée *in vivo* (Durand et al., 2012). Cependant, ces études montrent également que la culture des CSI en condition 3D *ex vivo*, basée sur la technique de culture mise au point par Sato (Sato et al., 2009), ne permet pas de générer des organoïdes en absence de ligands Wnt ou du lignage Paneth *ex vivo* (Durand et al., 2012; Farin et al., 2012). Ces données relatent bien le rôle essentiel des CP dans le maintien de l'identité et de la prolifération des CSI par la sécrétion de ligands WNT et l'activation de cette voie de signalisation. Il est cependant important de noter qu'*in vivo*, il existe une redondance de ces signaux provenant des cellules mésenchymateuses, comme présenté précédemment et que paradoxalement, les CP ont besoin de signaux WNT pour leur différenciation (van Es, Jay, et al., 2005).

Ensuite, la voie de signalisation NOTCH permet également le maintien de l'identité souche des CBC comme observé par plusieurs études suite à l''inhibition de l'activité de cette voie soit par la perte d'expression de son effecteur, *Rbpj*, l'inhibition du clivage membranaire des récepteurs Notch ou la délétion des récepteurs en eux-mêmes, *Notch1* et *2*, ou de leurs ligands *Dll1* et *4* (Pellegrinet et al., 2011; Riccio et al., 2008; van Es, van Gijn, et al., 2005). L'inhibition totale de la voie NOTCH se traduit par une perte complète de la prolifération épithéliale avec une différenciation des cellules progénitrices en cellules de Goblet ainsi qu'une perte d'expression des marqueurs souches des CBC en fond de cryptes. Il a été montré que l'inhibition de l'activité NOTCH et par conséquent l'inhibition de l'expression de ses gènes effecteur comme *Hes1* est associée à une levée de la répression des inhibiteurs de CDK (Cyclin-dependent kinase) *p27* et *p57* (Riccio et al., 2008). Ainsi, le programme transcriptionnel NOTCH activé par le contact entre les CP et les CBC permet de maintenir l'état prolifératif en combinaison avec l'activité de la voie WNT tout en réprimant la différenciation épithéliale engagée lorsque les cellules progénitrices perdent ce contact avec les CP et quittent la niche permissive.

La signalisation induite par l'EGF exerce une forte activité mitotique nécessaire à la prolifération et l'expansion des populations de CS actives. Les ligands de la famille EGF sont reconnus par les membres ERB-B de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase (RTK). Les récepteurs à l'EGF (EGFR) fonctionnent par homo ou hétéro-dimérisation. Une fois lié à leur ligand, leur domaine intracellulaire est activé par auto-phosphorylation des deux monomères et sert de site de liaison pour des molécules d'échafaudages enclenchant ensuite les signalisations MAPK, PI3K-AKT-mTOR (Phosphoinositide-3-kinase-Akt serine-threonine protein kinase-Mechanistic target of rapamycin kinase) et PLC-γ1-PKC (Phospholipase C, gamma 1-Protein kinase C) dont les multiples effecteurs stimulent la survie, le cycle et la prolifération cellulaire (Wee & Wang, 2017). Sécrétés par les CP, les ligands EGF induisent cette activité mitotique sur les CSI et les cellules du compartiment d'amplification transitoire qui expriment les EGFR (Abud et al., 2021; Sato et al., 2011; Suzuki et al., 2010). Bien que l'inhibition des signaux EGF ne présente pas de phénotype profond dans l'épithélium intestinal, relatant de la redondance signalétique avec les cellules stromales, la régénération épithéliale est en revanche dépendante de l'activation de la signalisation induite par les ligands EGF et notamment par NRG1 (Neuregulin 1) (Jardé et al., 2020; Y. Zhang et al., 2012). De manière intéressante, le marqueur souche LRIG1 réprime l'activité mitotique des CSI et régule ainsi leur nombre *via* l'inhibition de l'activité EGF (V. W. Y. Wong et al., 2012).

2 Les cancers colorectaux

2.1 Généralités

2.1.1 Epidémiologie et facteurs de risques

Les cancers sont le fléau de notre époque. Ils sont l'une des premières causes de mortalité liées aux maladies non transmissibles à l'échelle mondiale. Les cancers colorectaux (CCR) comptent parmi les plus incidents et mortels. En effet, en 2018, environ 1,8 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués sur l'année pour presque 900 000 cas de décès faisant de ces cancers le troisième en termes d'incidence, avec une prévalence chez l'homme, et le deuxième en termes de mortalité. L'incidence de ces cancers est prédominante dans les pays développés avec les plus forts taux dans les pays Européens et les plus faibles dans les pays d'Afrique et d'Asie du Sud (F. Bray et al., 2018) (Figure 17).

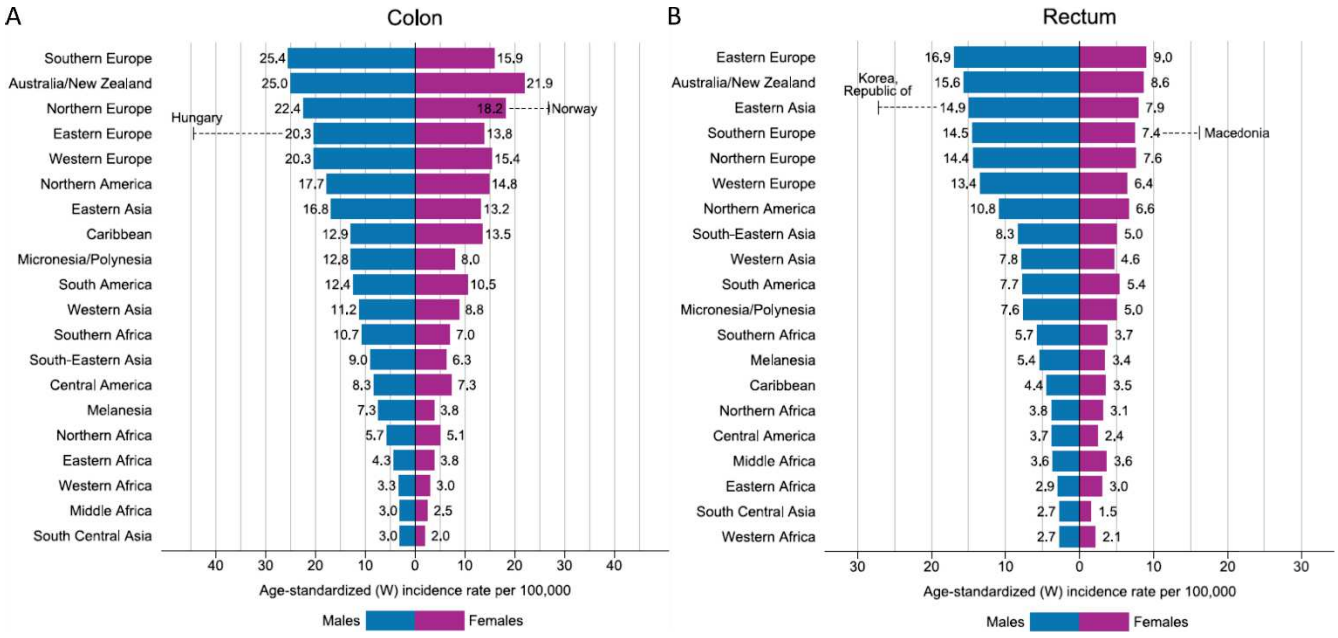


Figure 17 – Taux d'incidence des CCR à travers le monde. (F. Bray et al., 2018).

Différents profils d'évolution de la maladie ont été observés en fonction des régions du monde. Au cours de la dernière décennie, certains pays ont vu leur nombre de cas augmenter ainsi que la mortalité associée. D'autres ont une incidence croissante mais une mortalité décroissante. Enfin, une diminution de l'incidence et de la mortalité a été observée dans d'autres, notamment les pays les plus développés. La prévention, l'amélioration du diagnostic et le développement des

thérapies ainsi que la prise en charge des patients sont des explications aux différences évolutives de cette maladie entre certains pays (Arnold et al., 2017).

Malgré les disparités des données entres les pays, ces maladies restent néanmoins largement associées à des facteurs de développement sociaux-économiques. En effet, le taux d'incidence augmente par 3 dans les pays développés en comparaison aux pays en développement (F. Bray et al., 2018). De plus, il a été observé que ce taux d'incidence augmente sensiblement avec l'indice de développement humain, un composite de l'espérance de vie, de l'accès au savoir et du niveau de vie (Fidler et al., 2016). Par son caractère multi-factoriel, les facteurs de risques associés à l'apparition de cancers sont compliqués à estimer. Néanmoins, en association avec les observations précédentes, il a été établi que dans le cas des CCR sporadiques, représentant environ 80% des évènements, l'âge, le régime alimentaire, la consommation de tabac, l'inflammation chronique, l'inactivité physique, l'obésité et les facteurs environnementaux sont des facteurs associés à cette maladie et 20% correspondent à des formes héréditaires (F. Bray & Soerjomataram, 2015) (Figure 18).

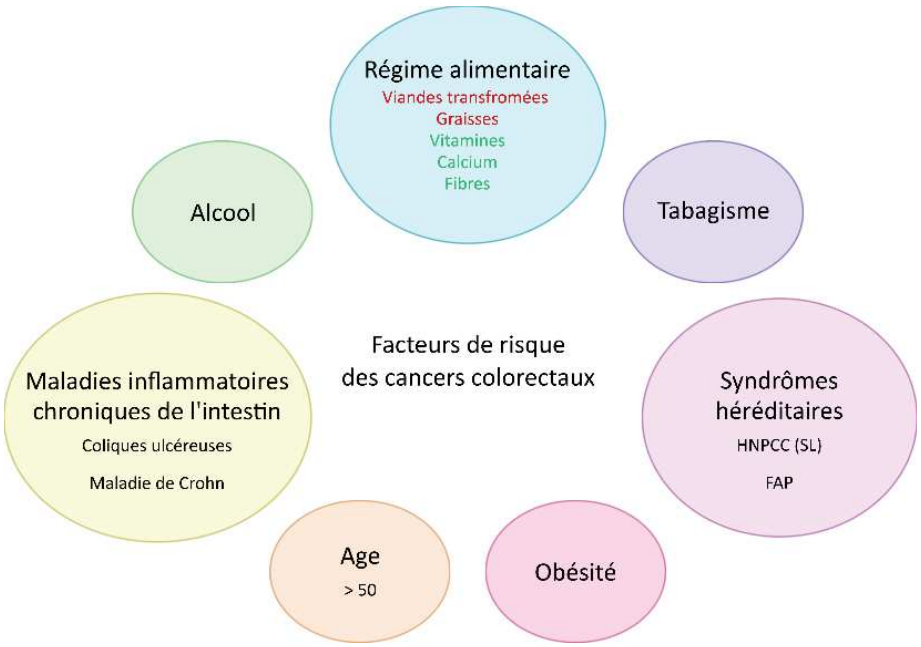


Figure 18 – Facteurs de risque des cancers colorectaux. (Inspiré de Aran *et al.*, 2016)

2.1.1.a Composantes environnementales et non-héréditaires

Par sa fonction, l'intestin est particulièrement sujet à l'influence du régime alimentaire. De manière générale, il a été montré qu'un régime riche en viande rouge, en graisse animale, faible en fibres, en vitamines et en calcium, favorise le risque d'apparition de CCR. Pour exemple et de manière non extensive, la viande rouge transformée est, entre autres, riche en composés nitrosylés qui sont

une source de dommage à l'ADN. Bien que controversé pour son efficacité, un apport riche en fibres semble être protecteur dans l'apparition des CCR par son effet bénéfique dans la digestion et le contrôle de la flore intestinale (Thanikachalam & Khan, 2019; Vargas & Thompson, 2012). De manière intéressante, l'utilisation d'un régime alimentaire calqué sur les habitudes et la consommation de nutriments des pays occidentaux induit un développement tumoral colique chez la souris avec une incidence, une latence et une fréquence similaire à l'humain (Newmark et al., 2001; Yang et al., 2008).

Ensuite, la consommation excessive d'alcool ainsi que la consommation de tabac sont deux facteurs à risques dans l'apparition des CCR. Le tabac, bien connu pour sa forte concentration en substances cancérigènes, et l'alcool présentent de fortes capacités d'induction du stress oxydatif par leur consommation générant de nombreux dommages cellulaires. Ces deux facteurs sont une source d'inflammation épithéliale en endommageant l'intégrité de la paroi intestinale (Thanikachalam & Khan, 2019; Vargas & Thompson, 2012).

L'inflammation de l'épithélium intestinal et notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un risque particulièrement important dans l'apparition des CCR. Les MICI sont représentées par deux maladies distinctes. La maladie de Crohn, retrouvée dans la partie distale de l'intestin, l'iléon, et le côlon, correspond à un défaut de maturation des CP dont la fonction de production des défensines, peptides anti-bactériens, est altérée. Les colites ulcéreuses, restreintes au côlon, sont à l'origine un défaut de maturation des cellules de Goblet. Etant moins nombreuses et présentant un défaut de sécrétion du mucus, l'épithélium intestinal n'est plus correctement protégé contre le passage du chyme et la flore bactérienne. Ces deux maladies se traduisent par une invasion de la muqueuse intestinale par la flore microbienne et une inflammation chronique de cette dernière (Gersemann et al., 2011). Bien que le risque induit par les MICI dans l'apparition de CCR soit bien réel, les mécanismes en sont encore mal définis avec pour causes leur nature complexe et multi-factorielle. Il est néanmoins clair que la persistance de ces maladies et de l'inflammation chronique dont elles sont responsables favorise le stress épithélial générant un terrain propice à l'apparition de mutations dont l'accumulation potentialise les processus de tumorigenèse (E. R. Kim & Chang, 2014).

2.1.1.a Composantes héréditaires

Les facteurs de risques environnementaux et non héréditaires sont impliqués dans les processus d'apparition des CCR sporadiques qui représentent environ 80% des cas. Il existe des facteurs de risques héréditaires dont la composante familiale et la valeur clinique sont associées à une prédisposition plus ou moins forte au développement de CCR. Ces facteurs sont pour la plupart des mutations dans la lignée germinale de gènes impliqués dans le développement tumoral.

Il existe plusieurs syndromes en relation avec ces facteurs dont deux sont majoritairement retrouvés avec une pénétrance importante chez les patients. Le syndrome de prédisposition HNPCC (Hereditary non polyposis colorectal cancer) et le syndrome de prédisposition FAP pour (Familial adenomatous polyposis) (Fearon, 2011).

Le syndrome HNPCC ou syndrome de Lynch (SL), du nom du médecin Henry Thompson Lynch, est associé à une mutation germinale d'un allèle des gènes impliqués dans les systèmes MMR (Mismatch Repair) de réparation des dommages à l'ADN, comme les mutations des gènes *MLH1* (*MutL homolg1*) et *MSH2* (*MutS homolog 2*) qui représentent environ 70% des mutations retrouvées chez les patients atteints du SL. Le risque de développer un CCR par la mutation somatique du deuxième allèle est d'environ 30 et 35% respectivement chez la femme et l'homme pour les patients présentant une mutation germinale du gène *MLH1* et de 50 et 36% pour les patients mutés *MSH2*. Les tumeurs développées présentent un profil très indifférencié avec peu de polypes et un fort infiltrat immunitaire (Fearon, 2011; Sinicrope, 2018; Wang et al., 2020).

Le syndrome FAP est associé à une mutation dominante du gène *APC* (*Adenomatous polyposis coli)*. Ce gène suppresseur de tumeur code pour l'une des protéines du complexe d'inhibition de la β-caténine réprimant ainsi l'activité de la voie de signalisation WNT. Sa mutation entraîne une perte de contrôle et une activation constante de cette voie se traduisant par une hyperprolifération cellulaire. La pénétrance des CCR associés au syndrome FAP atteint presque les 100% au cours de la vie d'un individu. Les tumeurs développées sont larges et nombreuses et sont retrouvées dans le côlon, le rectum et la partie duodénale de l'intestin (Fearon, 2011).

2.1.2 Dépistage et diagnostic

La détection des CCR est essentielle à l'amélioration de la prise en charge des patients et de la mise en place des soins. Il est en effet bien établi que plus la maladie est détectée tôt, à des stades précoces, meilleure en est l'issue. Les patients atteints de CCR sont détectés de différentes façons.

Au sein de programmes de dépistage entrant dans les recommandations cliniques établies, avec une forte recommandation à partir de 50 ans pour les individus sans historique familial, plusieurs méthodes de dépistage existent. Les tests non-invasifs, basés sur l'analyse des fèces, le test de gaïac et par immunochimie, permettent de détecter la présence de sang occulte et le test de détection de marqueurs moléculaires par analyse de l'ADN. Si positifs, ces tests doivent être complétés par d'autres analyses. La coloscopie, recommandée directement dès 50 ans, permet de visualiser l'ensemble du rectum et du côlon grâce à un endoscope flexible. La sigmoïdoscopie quant à elle, moins invasive, permet de visualiser le rectum et le côlon sigmoïde et descendant. Ces deux procédés permettent de

visualiser d'éventuels signes pathologiques au niveau de l'épithélium des patients et si besoin de réaliser un prélèvement. Enfin, le coloscanner, ou CTC (Computed tomographic colonoscopy), permet une visualisation virtuelle de l'abdomen et du pelvis par tomographie après injection d'un liquide de contraste ou d'un agent radiomarqué. Néanmoins cette technique ne permet pas la réalisation de biopsies. Deux autres tests, la détection de la Septine 9, un marqueur plasmatique des CCR, et la coloscopie par capsule, visualisation du tube digestif par ingestion d'une caméra, ont été approuvés mais ne sont pas nécessairement recommandés en première intention (F. Bray & Soerjomataram, 2015; Ladabaum et al., 2020; Rex et al., 2017). Dans le cadre d'un dépistage général de la population, ces procédés sont très importants permettant de d'identifier au plus tôt d'éventuelles apparitions de cancers chez des individus sans risque apparent. Cependant, certains dépistages peuvent être effectués à la suite de troubles digestifs importants comme une occlusion intestinale et dans certains cas, la découverte de CCR se fait directement au cours d'opération chirurgicale.

Dans le cas d'antécédents familiaux, le suivi des individus est beaucoup plus précoce. Pour les cas de FAP, des test génétiques sont effectués dès la puberté et si besoin une endoscopie peut être réalisée (Kalady et al., 2019). Dans le cas de patients ayant un SL, seulement 10 à 20% des cancers se déclarent avant 50 ans. Le dépistage et le diagnostic de ces individus suit un protocole rigoureux d'analyse des mutations et particulièrement des gènes du système DDR (Kalady et al., 2019; Umar et al., 2004). Enfin, les individus à haut risque présentant une MICI sont également étroitement suivis avec une coloscopie et la réalisation de biopsies plusieurs années après le début de la maladie et après rémission (E. R. Kim & Chang, 2014).

Une fois que la présence d'un CCR a été diagnostiquée chez un patient, la nature de la tumeur est étudiée par classification physiopathologique ainsi que sa caractérisation moléculaire. Ces analyses permettent d'établir la meilleure procédure afin d'éliminer la tumeur et de traiter le patient si besoin.

2.2 Bases moléculaires et cellulaires des cancers colorectaux

La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des aberrations cellulaires soutenant l'initiation et le développement tumoral est essentielle pour améliorer nos méthodes de prévention, de diagnostic et pronostic mais également pour adapter les thérapies et la prise en charge des patients.

2.2.1 Classification histologique et moléculaire des cancers colorectaux

D'un point de vue histopathologique, les CCR se développent suivant une séquence adénome-carcinome, signifiant que la tumeur passe par plusieurs stades allant d'une forme bénigne, l'adénome, à un stade malin invasif, le carcinome. L'adénome par définition correspond à une lésion clonale dysplasique dont les cellules présentant des noyaux larges et allongés commencent à se stratifier le long de la membrane basale de l'épithélium. Le stade d'adénocarcinome correspond à des structures invasives de la muqueuse et de la paroi épithéliale.

2.2.1.a Classification histopathologique et stades tumoraux

La plupart des adénocarcinomes colorectaux (environ 90%) sont dérivés des cellules épithéliales de la muqueuse. La forme histologique classique de ces tumeurs présente des structures glandulaires, critère histologique relatif à l'état de différenciation cellulaire. On distingue les tumeurs bien différenciées des moyennement et peu différenciées dont la masse tumorale présente respectivement plus de 95%, entre 50 et 95% et moins de 50% de structures glandulaires (Figure 19).

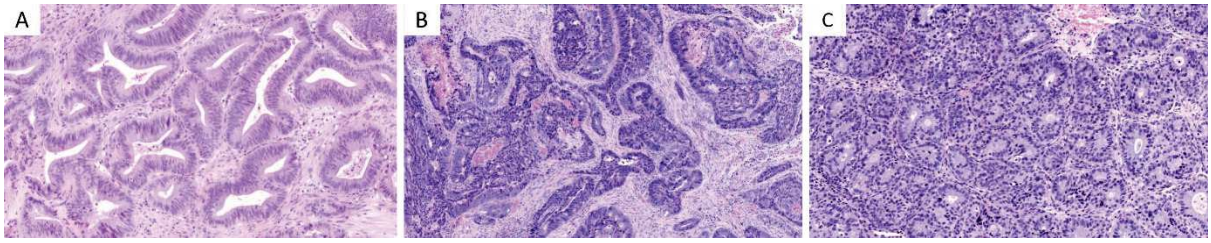


Figure 19 – Images représentatives de l'état de différenciation des adénocarcinomes colorectaux. (A) Tumeur bien différenciée, (B) tumeur moyennement différenciée et (C) tumeur peu différenciée (Shia et al., 2017).

Globalement, environ 70% des tumeurs colorectales présentent un état moyen de différenciation. Les tumeurs bien différenciées représentent 10% des cas et peu différenciées 20%. Si la plupart des tumeurs présentent cette structure tubulaire classique il existe d'autres variants morphologiques moins représentés, dont les 2 types majeurs sont brièvement décris ci-dessous.

Les adénocarcinomes mucineux représentent entre 4 et 19% des tumeurs colorectales et sont caractérisés comme tel lorsque plus de 50% de la masse tumorale est composée de mucine, autrement on parle simplement de tumeur à composante mucineuse. Ensuite, les adénocarcinomes en anneau cellulaire (Signet ring cell adenocarcinoma) sont très peu représentés, moins de 1% des CCR, et sont constitués de plus de 50% de cellules en anneau dont la forme très spéciale est due à une grande

vacuole de mucine poussant le noyau en bordure de cellule. De la même manière, si la quantité de cellules en anneaux est inférieure à 50%, on parle uniquement de composante en anneau cellulaire. Ces deux morphologies sont plutôt associées à un mauvais pronostic en comparaison aux adénocarcinomes à morphologie classique (Fleming et al., 2012; Schneider & Langner, 2014). Il existe d'autres morphologies comme les adénocarcinomes médullaires et micropapillaires mais sont très peu représentées (moins de 1%) et ne seront pas décrites ici.

La classification morphologique des adénocarcinomes colorectaux n'est pas suffisante pour définir correctement la nature de la tumeur. Le stade d'avancée tumoral permet d'affiner cette analyse. Il est défini par un ensemble de paramètres standardisés pour les tumeurs solides de type carcinome. Ces paramètres sont regroupés sous la classification TNM (Aaltonen et al., 2000). Validée internationalement, elle sert à évaluer l'étendue de la tumeur ainsi que sa dissémination (Figure 20).

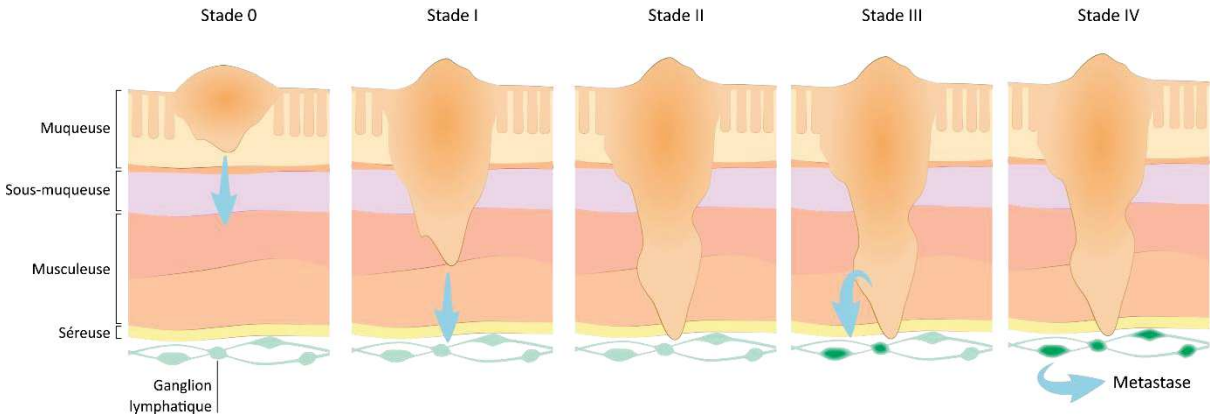


Figure 20 – Schéma représentatif de l'invasion et de la dissémination des adénocarcinomes colorectaux en fonction du stade tumoral.

Cette classification est basée sur 3 caractéristiques (Tableau 1), chacune correspondant à une lettre, incrémentée par une valeur correspondant à l'étendue de cette caractéristique :

- La lettre T correspond à l'extension au niveau local de la tumeur primaire. Sa taille et son invasion dans la muqueuse sont prises en compte.
- La lettre N relate de l'extension ganglionnaire en précisant la présence ou l'absence et le nombre éventuel de ganglions lymphatiques envahis.
- La lettre M quant à elle représente la dissémination cellulaire aux autres organes par la présence de métastases distantes ou non. Dans le cas des CCR, les organes cibles sont le foie, le péritoine et les poumons.

La combinaison de ces 3 lettres et de leur valeur permet ensuite de déterminer le stade d'avancée de la tumeur. Il est donné en chiffre romain allant de 0 à IV (Figure 20) et des lettres servent

à subdiviser les différentes combinaisons de la classification TNM pour chaque stade (Tableau 2) dont la signification simplifiée est la suivante :

- Stade 0 - Adénome superficiel avec une extension dans la *lamina propria* sans invasion de la sous-muqueuse. Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints avec aucun signe de métastase.
- Stade I – La tumeur a envahi la sous-muqueuse voir la musculeuse. Absence dans les ganglions lymphatique et absence de métastase.
- Stade II – La tumeur s'est développée jusqu'au péritoine voir aux organes annexes mais toujours absence d'invasion ganglionnaire et de métastase.
- Stade III – Peu importe le stade d'invasion de la tumeur, un ou plusieurs ganglions lymphatiques sont touchés mais absence de métastase.
- Stade IV – Peu importe le stade d'expansion de la tumeur ou le nombre de ganglions touchés, la présence de métastases distantes a été détectée.

Ainsi, ce système permet de déterminer précisément l'avancée de la maladie mais surtout permet de prendre en charge le patient de la manière la plus adaptée possible.

Tableau 1 - Classification TNM

T - Tumeur primaire

TX	La tumeur primaire ne peut pas être évaluée
T0	Pas d'évidence d'une tumeur primaire
Tis	Carcinome *in situ* : intra-épithélial ou invasion de la *lamina*
T1	La tumeur envahit la sous-muqueuse
T2	La tumeur envahit la musculeuse
T3	La tumeur envahit à travers la musculeuse jusqu'à la séreuse voir dans les tissus ou péritoine adjacent
T4	La tumeur envahit directement les organes adjacents et perfore le péritoine viscéral

N - Ganglions lymphatiques locaux

NX	Ganglions lymphatiques locaux ne peuvent pas être évalués
N0	Pas d'invasion des ganglions lymphatiques régionaux
N1	Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N2	Métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus

M - Métastases distantes

MX	Les métastases distantes ne peuvent être évaluées
M0	Pas de métastase distante
M1	Présence de métastases distantes

Tableau 2 - Evaluation des stades

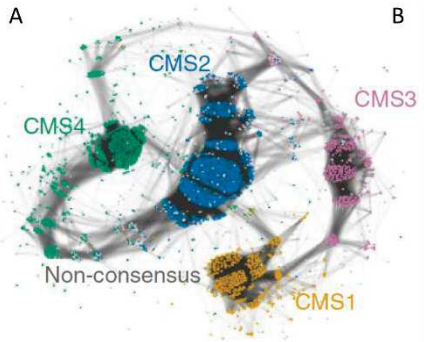
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Stade II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Stade III	Tous les T	N1	M0
Stade IV	Tous les T	Tous les N	M1

Tableau 1 et 2 – Classification TNM non exhaustive des adénocarcinomes colorectaux et combinaisons des stades d'avancée de la tumeur. (Adapté de Aaltonen *et al.*, 2000).

2.2.1.b Classification moléculaire

Au-delà des traits morphologiques des adénocarcinomes colorectaux, la caractérisation génétique et moléculaire des tumeurs est un aspect essentiel à la prise en charge des patients. Déterminer le profil moléculaire permet de comprendre le fonctionnement des cellules cancéreuses et apporte des informations essentielles pour la prise de décision thérapeutique.

Afin de résoudre les soucis d'incohérence entre les différentes classifications déjà existantes, un consortium international a été formé, le CRCSC (Colorectal cancer subtyping consortium), dans le but d'homogénéiser la stratification moléculaire des CCR dont les résultats ont été publiés en 2015 (Guinney et al., 2015). Basé sur 6 études pré-existantes, ce consortium a réuni 18 bases de données d'expression de gènes et d'échantillons de tissus, incluant au total 4 151 patients atteints de CCR. Brièvement, les 6 méthodes ont été appliquées sur l'ensemble des bases de données et les résultats ont ensuite été confrontés afin d'obtenir des signatures communes et robustes (Figure 21).



CMS1 MSI immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
BRAF mutations		*KRAS* mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF-β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Figure 21 – Classification moléculaire des cancers colorectaux. (A) Représentation du réseau de similarité des patients, chaque point correspondant à un patient. (B) Classification moléculaire proposée selon les différents CMS (Guinney et al., 2015).

Globalement, le profil moléculaire de chaque CMS a été déterminé en fonction du nombre d'altérations de copies somatiques des gènes, SCNA (Somatic copy number alterations), ainsi que du nombre de mutations génétiques dont certaines sont connues pour fortement influencer le développement tumoral, appelées mutations « driver », comme les mutations des gènes suppresseurs de tumeur *APC*, *P53* (*Tumor protein 53)* ou des pro-oncogènes *KRAS* (*KRAS proto-oncogene, GTPases*) et *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*). Ensuite, le statut microsatellitaire a été évalué. Particulièrement sujettes aux mutations, l'altération de la longueur somatique de ces séquences en comparaison à leur nombre germinale est appelée instabilité microsatellitaire (MSI), relatant de la déficience des systèmes MMR et est associé à un certain profil tumoral (Dietmaier et al., 1997). L'instabilité chromosomique est également prise en compte, à savoir la perte ou le gain de portions entières de chromosomes (Geigl et al., 2008). Le profil de méthylation, directement en lien

avec l'expression des gènes et notamment la méthylation des îlots CpG a été quantifiée. L'hyperméthylation de certains locus est un trait commun a plusieurs types de cancers et est à l'origine d'aberrations transcriptionnelles (Issa, 2004). Enfin, l'enrichissement des acteurs de grandes voies moléculaires ou de processus physiologiques a permis de caractériser le phénotype associé aux profils génétiques et épigénétiques obtenus en corrélation avec le pronostic clinique.

Ainsi, une stratification moléculaire des tumeurs a été obtenue présentant 4 groupes distincts appelés CMS (Consensus molecular subtypes). Chacun de ces groupes présente un ensemble de caractéristiques génétiques et épigénétiques qui sont associées à des particularités phénotypiques tumorales ainsi qu'un pronostic clinique (Figure 21).

Le CMS1 est associée à une forte signature immunitaire marquée par un infiltrat cellulaire significatif. Caractérisée par son statut MSI, une forte CIMP, un profil hypermuté et un enrichissement des mutations du gène *BRAF*, cette classe moléculaire représente 14% des CCR. Plus représenté chez les femmes, ce profil tumoral est associé à de hauts grades et un mauvais pronostic après rechute.

Le CMS2 est considérée comme la classe canonique des adénocarcinomes colorectaux par leur différenciation épithéliale et l'enrichissement des gènes cibles transcriptionnels de la voie WNT et de MYC (MYC proto-oncogene, bHLH-transcription factor). Associée à une forte CIN et beaucoup de SCNA, avec notamment une augmentation du nombre de copies des oncogènes et une diminution des gènes suppresseurs de tumeurs, cette classe moléculaire représente 37% des CCR et est plutôt de bon pronostic.

Les tumeurs du CMS3 présentent une forte signature métabolique et comptent pour 13% des CCR. Enrichie en mutations du gène *KRAS*, cette classe moléculaire présente un profil épigénétique assez hétérogène avec moins de SCNA que les CMS2 et 4 et plus de mutations associées à un statut MSI plus fort et une plus forte signature CIMP.

Enfin, le CMS4 est corrélé un profil mésenchymateux avec un enrichissement de la signature d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et un infiltrat stromal associé à un enrichissement de la voie des TGF-β. Caractérisé par un fort taux de SCNA, il présente cependant peu de mutations et un statut microsatellitaire stable avec peu d'aberrations chromosomiques. Le CMS4 représente 23% des tumeurs CCR qui sont diagnostiquées à des stades tardifs et est associé au plus mauvais pronostic.

Cette étude a apporté un réel bénéfice à la standardisation de la classification moléculaire des adénocarcinomes homogénéisant et facilitant la prise en charge des patients même si certains types tumoraux sont plus atypiques et ne peuvent pas être classés dans l'un ou l'autre des CMS (Figure 21).

2.2.1 Les instabilités génomiques de la séquence adénome-carcinome

Le développement des CCR suit un modèle relativement bien défini avec une évolution de la nature de la tumeur au cours du temps, d'une hyperplasie bénine au stade d'adéno-carcinome dysplasique et invasif (Fearon & Vogelstein, 1990). Cette maladie est fondamentalement considérée comme génétique par l'accumulation des mutations génétiques somatiques, favorisée par un terrain génomique instable, qui va promouvoir le développement de cette séquence d'évènements. Comme présenté précédemment, certains individus portent des mutations génomiques germinales, syndrome de FAP et HNPCC, qui favorisent fortement l'apparition de ces processus tumorigéniques. Néanmoins ces cas représentent une petite portion des CCR et si cet héritage génétique favorise l'initiation tumoral, son développement est sensiblement identique aux cas de CCR sporadiques (Kalady et al., 2019).

Il existe différentes altérations génétiques et épigénétiques favorisant l'apparition de mutations ou de phénotypes cellulaires cancéreux (Figure 22). Présentées brièvement dans la section précédente pour leur intérêt clinique dans la classification moléculaires de CCR (*cf.* section 2.1.3.b), ces altérations font référence à l'instabilité chromosomique (CIN), la méthylation des îlots CpG (CIMP) et l'instabilité microsatellitaire (MSI).

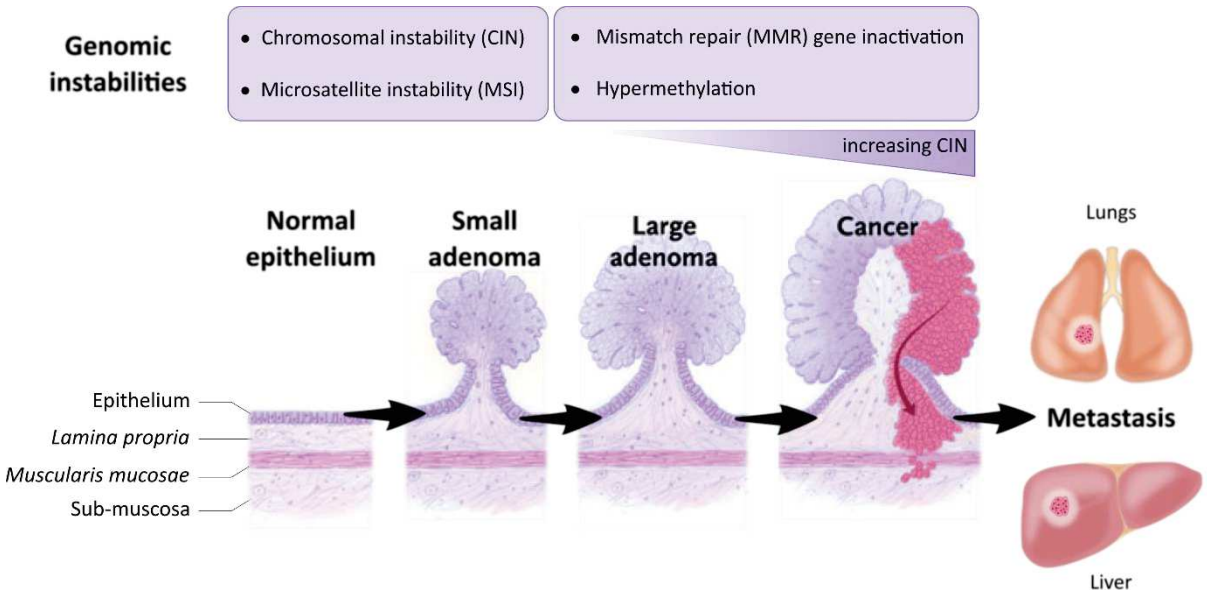


Figure 22 –Séquence adénome-carcinome et instabilités génomiques. (Adapté de Walther *et al.*, 2009 et Markowitz and Bertagnolli, 2010).

2.2.1.a L'instabilité chromosomique

Retrouvée dans 80 à 85% des cas de CCR, la CIN représente la perte ou le gain de portions entières de chromosomes. Cette définition pourtant simple est en fait largement utilisée pour décrire des mécanismes complexes incluant différents phénotypes (Geigl et al., 2008).

De manière générale, la CIN se traduit par une altération du nombre ou de l'intégrité des chromosomes cellulaires. On y inclue notamment l'aneuploïdie, déséquilibre dans le nombre et la taille des chromosomes à la suite d'une délétion, amplification ou translocation chromosomique ainsi que des défauts de ségrégation lors de la division cellulaire. La polyploïdie correspond à une trop grande quantité de chromosomes et on parle de cellule diploïde qui possède 2 fois le nombre de chromosomes, triploïdes, 3 fois, *etc*. Résultant d'un défaut de division cellulaire, ce phénotype peut être inclus dans la CIN. Néanmoins, si l'aneuploïdie et la polyploïdie sont des résultats de la CIN, l'inverse n'est pas vrai. La CIN est un phénotype qui doit être pris en compte dans son ensemble et en rapport avec le comportement d'une population. Par exemple, certaines cellules peuvent présenter une forte ou une faible CIN.

Cette instabilité engendre plusieurs problèmes génétiques comme la perte de l'hétérozygotie (LOH), qui peut mener à l'expression d'un phénotype jusqu'alors récessif. Des mutations peuvent être générées par ces aberrations chromosomiques ainsi que la perte de régulation de l'expression de gènes ou de groupes de gènes (Geigl et al., 2008; Lengauer et al., 1998). Il a notamment été montré que la perte d'une portion de chromosome est fréquente pour les bras chromosomiques 8p (petit bras), 17p et 18q (grand bras) et les gains pour le chromosome 7 et les bras chromosomiques 8q, 13q et 20q. Ces caryotypes évoluent selon le stade tumoral et affectent plus ou moins profondément le phénotype cellulaire en perturbant l'activité de voies moléculaires comme WNT ou EGF (Habermann et al., 2007).

2.2.1.b L'instabilité microsatellitaire

Le statut microsatellitaire d'une tumeur se définie par la longueur et le nombre de courtes séquences répétées d'ADN, appelées STR (Short tandem repeats), constituées d'un motif répété de 1 à 5 nucléotides présents en abondance dans le génome et majoritairement dans les régions non codantes. La variation du nombre ou de la longueur de ces séquences en comparaison à l'ADN d'origine relate d'un statut instable de la tumeur appelé instabilité microsatellitaire (MSI) (Dietmaier et al., 1997). Le statut MSI peut également être associé à de la CIN, il est néanmoins généralement considéré indépendamment pour ses particularités. Retrouvés dans environ 15% des cas de CCR il est

reconnaissable non seulement histologiquement mais également par le profil d'expression génique qui lui est associé et distinguable des profils microsatellitaires stables (MSS) (Fearon, 2011).

Le statut MSI résulte d'une inactivation par répression de l'expression ou mutations des gènes impliqués dans les systèmes de réparation des dommages à l'ADN et plus particulièrement le système MMR. Associé à la fourche de réplication cellulaire, le système MMR reconnait les mésappariements dans la séquence d'ADN pour ensuite les exciser, resynthétiser et liguer la bonne séquence d'ADN. La répression ou la mutation des gènes codants pour les protéines constituant ce système, notamment *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PSM2* (*PMS1 homolog 2, mismatch repair system component*), entrave son activité et laisse des erreurs au cours de la réplication de l'ADN. Les microsatellites sont particulièrement touchés par ces mésappariements et l'absence de réparation de la séquence d'ADN entraine un décalage du cadre de lecture générant des mutations « frameshift » et des protéines tronquées. Le statut MSI est catégorisé en fort, « MSI-high » (MSI-H), si plus d'un loci présente une instabilité et faible, « MSI-low » (MSI-L), si un seul loci est détecté (Vilar & Gruber, 2010).

Le statut MSI, retrouvé notamment chez les gens atteints du SL, amplifie fortement l'instabilité génomique et le taux de mutations somatiques. Une trentaine de gènes contenant des séquences répétées sont fréquemment mutés dans plusieurs cancers MSI-H. On retrouve entre autre des gènes impliqués dans la voie de signalisation TGF-β, WNT, l'apoptose ou encore le cycle cellulaire (Duval & Hamelin, 2002). De plus, le phénotype MSI est associé à un fort infiltrat immunitaire cytotoxique dû à la forte proportion de protéines mutées ce qui semble favoriser le pronostic de ces patients (Phillips et al., 2004).

2.2.1.c Altérations de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique qui affecte particulièrement les cytosines (C) quand elles sont associées à une guanine (G) formant un dinucléotide CpG. Le groupe méthyle apporté favorise la compaction de la chromatine réduisant l'accessibilité à l'information génétique et par conséquent réprimant l'expression des gènes. Certaines régions de l'ADN contiennent une forte concentration en dinucléotides CpG et sont appelés les îlots CpG. Chez les mammifères, environ 50% des gènes présentent des îlots CpG dans leur séquence promotrice, néanmoins dans des conditions physiologiques, la méthylation de ces îlots est plutôt retrouvée dans des régions extérieures aux gènes et peu dans ces régions promotrices qui restent ainsi accessibles. En revanche, dans plusieurs types de cancers et notamment le CCR, le profil de méthylation de l'ADN varie. Dans certains adénocarcinomes colorectaux, une hypométhylation modeste mais globale de l'ADN est observée tandis que les îlots CpG contenus dans les régions promotrices des gènes sont

fréquemment hyperméthylés. Ce phénotype CIMP touche environ 15% des CCR (Fearon, 2011; Issa, 2004; S. D. Markowitz & Bertagnolli, 2010).

Historiquement, l'altération de la méthylation de l'ADN et du phénotype CIMP dans les cancers a été identifiée il y a maintenant plus de 30 ans (Baylin et al., 1986; Feinberg & Vogelstein, 1983) et sert toujours de marqueur pour la classification des CCR (Guinney et al., 2015; Whitehall et al., 2002). Néanmoins, la méthylation de l'ADN n'avait jusque-là pas été prise en compte dans son ensemble au niveau génomique. En 2009, des travaux réalisés par Izizarry et collègues montrent que d'une part, la majorité des évènements d'hyperméthylation du génome dans les cas de CCR se situent 2 kb amont des îlots CpG des régions promotrices dans ce qu'ils appellent les « CpG island shores » et que ces régions semblent réguler l'expression de gènes au cours de la différenciation cellulaire (Irizarry et al., 2009). Les aberrations dans le profil de méthylation de l'ADN entraîne un défaut dans l'expression de gènes ou de groupes de gènes notamment impliqués dans la pluripotence, la différenciation ou le cycle cellulaire (Fearon, 2011; Irizarry et al., 2009). Pour exemple, l'hyperméthylation du gène *MLH1* est fréquente dans les CCR et est associée à un phénotype MSI en l'absence de mutation de ce gène (Cunningham et al., 1998).

2.2.2 Gènes et voies de signalisation impliqués dans les cancers colorectaux

Les instabilités génomiques, globalement représentées par des réarrangements ou altérations chromosomiques, microsatellitaires et des défauts dans le profil d'expression de l'information génétique, forment un terrain particulièrement propice au développement des cancers et dans le cas présent soutiennent l'évolution tumorale colorectale au travers de la séquence adénome-carcinome. Les mutations et le changement de l'expression des gènes engendrées par ces mécanismes sont au cœur même de cette évolution tumorale. Dans cette section sont présentés les mutations de pro-oncogènes ou suppresseurs de tumeur ainsi que les voies de signalisation fréquemment altérées au cours de l'évolution tumorale et qui ont pour particularité de conduire le changement phénotypique et morphologique des tumeurs (Figure 23).

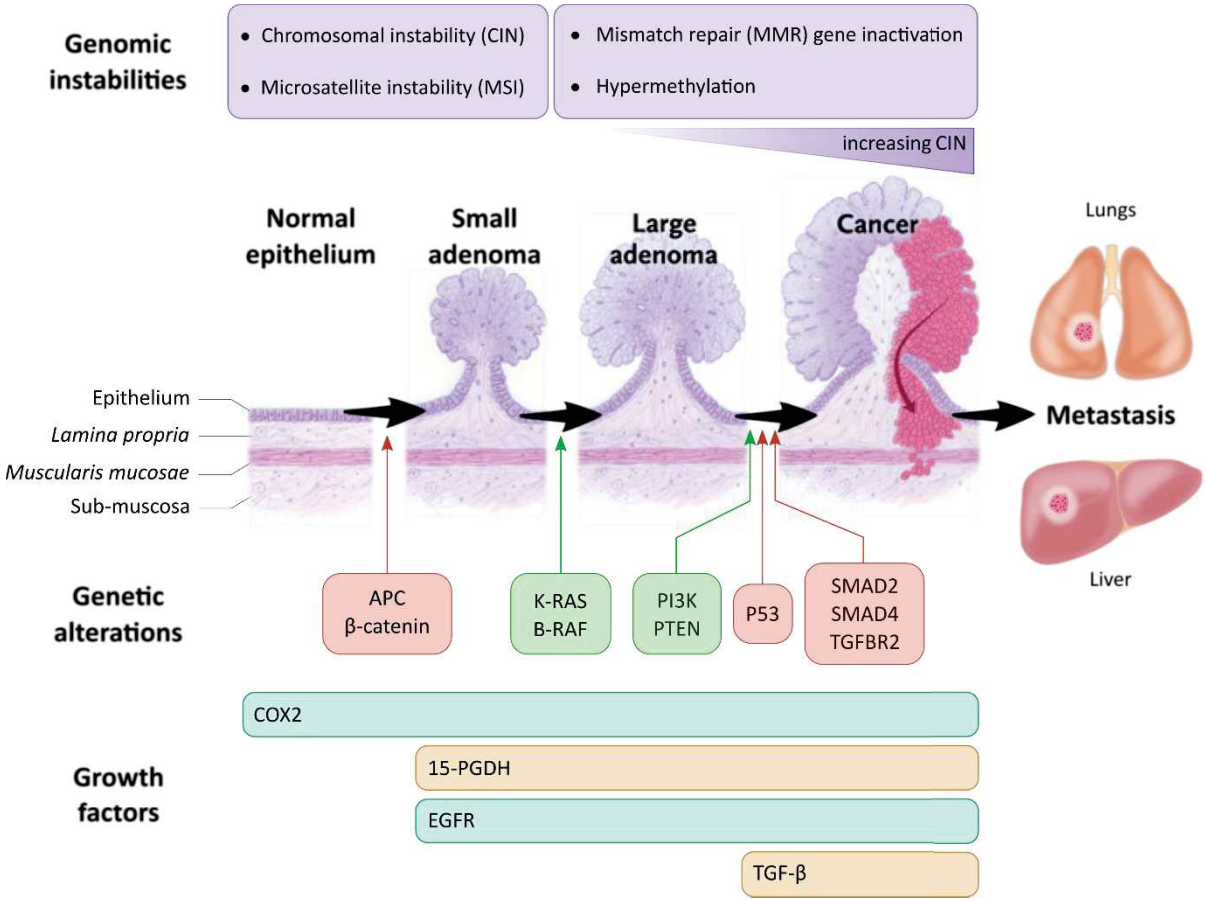


Figure 23 – Gènes et voies de signalisation de la séquence adénome-carcinome. Altérations génétiques de gènes suppresseurs de tumeurs en rouge et de pro-oncogènes en vert. Altération des voies de signalisation des facteurs de croissances anti-tumoraux en bleu et pro-tumoraux en orange (Adapté de Walther *et al.*, 2009 et Markowitz and Bertagnolli, 2010).

2.2.2.a L'activation constitutive de la voie WNT

L'un des premiers évènements initiant et soutenant le développement des adénocarcinomes colorectaux correspond à la sur-activation de la voie de signalisation WNT/β-caténine. Largement décrite pour son rôle essentiel dans le maintien de l'identité des CSI, du compartiment souche intestinal, de la prolifération et la différenciation cellulaire épithéliale (*cf.* section 1.3.1.a), l'altération du contrôle de cette voie perturbe profondément la physiologie épithéliale.

Les mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur *APC*, répresseur majeur de cette voie, ou du gène *CTNNB1*, codant pour la β-caténine, se traduisent par une accumulation excessive de cette protéine et une expression constitutive des gènes cibles de cette voie de signalisation à travers son interaction avec les facteurs de transcription TCF (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997). Les gènes ainsi sur-exprimés, comme *c-MYC*, *CYCLIN-D1*, *BMI1*, *ASCL2*, *SOX9*, amplifient le potentiel souche des cellules épithéliales, leur prolifération ou encore leur survie, favorisant l'hyperplasie épithéliale et l'initiation de processus oncogéniques (Gleizes et al., 2018; Herbst et al., 2014). Les

mutations du gène *APC*, produisant majoritairement des formes tronquées de la protéine, sont retrouvées dans plus de 80% des adénocarcinomes colorectaux dès les premiers stades du développement tumoral dans les ACF (Abberant-crypt foci), marqueur histopathologique de l'initiation tumorale, et les petits adénomes (Goss & Groden, 2000; Jen et al., 1994). Les mutations du gène de la β-caténine sont en revanche beaucoup moins représentées, moins de 5% des cas sporadiques de CCR (Fearon, 2011).

De manière intéressante, l'introduction de mutations ou la délétion d'un allèle ou d'un exon du gène *Apc* dans des modèles murins suffit à initier le développement tumoral au niveau de l'intestin grêle en faisant un modèle de choix pour l'étude du CCR, comme c'est le cas des souris $Apc^{\Delta 14/+}$ présentant une délétion de l'exon 14 du gène *Apc* donnant une forme tronquée inactive de la protéine (Colnot et al., 2004). Néanmoins, l'activation constitutive de la voie WNT par ces procédés n'est pas suffisante pour franchir le stade de l'adénome dans ces modèles, relatant de l'aspect mutli-factoriel de la séquence adénome-carcinome (Bürtin et al., 2020).

2.2.2.b Inactivation de la voie p53

Le gène suppresseur de tumeur *P53* (*Tumor protein p53*) est célèbre pour son rôle de gardien de l'intégrité cellulaire. La protéine P53 est un FT connu pour réguler l'expression d'une vaste palette de gènes impliqués dans différents processus cellulaires comme l'apoptose, l'autophagie, le cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, la sénescence et bien d'autres (Vousden & Prives, 2009).

Plusieurs signaux de stress cellulaires induisent l'activation de P53 comme les dommages liés à l'ADN qui en sont la principale source par exemple après irradiation ou en cas de fort stress oxydant. Les mécanismes de reconnaissance et de réparation de ces dommages vont indirectement activer P53 par modifications post-transcriptionnelles, stabilisant ainsi son expression et sa capacité de liaison à l'ADN et favorisant l'expression de ses gènes cibles. La protéine P53 est également connue pour son rôle suppresseur de tumeur au travers d'une boucle de régulation impliquant la protéine régulatrice du cycle cellulaire CDKN2A (Cyclin dependent kinase inhibitor 2A) ou $p14^{ARF}$ et l'ubiquitine ligase MDM2. L'activation aberrante de voies pro-oncogéniques par exemple médiée par la β-caténine, RAS ou c-MYC, inhibe l'expression de MDM2 responsable de la dégradation de P53 par le protéasome. Une fois stabilisé, P53 induit l'arrêt du cycle cellulaire freinant ainsi une prolifération non contrôlée et l'induction d'un processus tumoral (Harris & Levine, 2005; Weber et al., 2002).

L'altération de P53 dans la séquence adénome-carcinome des CCR est associé à une transition vers le stade adénocarcinome de la tumeur et est retrouvée dans environ 70% des cas de CCR. Doublée

de la mutation somatique d'un allèle, fréquemment située dans son domaine de liaison à l'ADN, et d'une LOH par la translocation du bras cours du chromosome 17 (locus du gène *P53*), P53 n'exerce plus son activité de gardien de l'intégrité cellulaire et de suppresseur de tumeur (Baker et al., 1990; Fearon, 2011; S. D. Markowitz & Bertagnolli, 2010).

2.2.2.c Inactivation de la voie de signalisation TGF-β

La voie de signalisation des TGF-β, incluant la famille des BMP, est essentielle au maintien de l'homéostasie épithéliale intestinale notamment à travers son rôle répresseur de la prolifération cellulaire (*cf.* section 1.3.1.d). Cette signalisation implique la liaison d'un ligand de la super-famille des TGF-β sur des récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase qui activent ensuite la voie des SMAD exerçant leur activité transcriptionnelle une fois transloquées au noyau (B. Jung et al., 2017).

Plusieurs composantes de cette voie de signalisation sont fréquemment mutées dans les CCR. Le récepteur TGFBR2 (Transforming growth factor beta receptor 2) est retrouvé muté dans environ 30% des cas de CCR. Une forte pénétrance des mutations somatiques inactivatrices est retrouvée dans les CCR avec un statut MSI-H, plus de 90%, et 15% pour les statuts MSS (Grady et al., 1999; S. Markowitz et al., 1995). Les mutations des protéines effectrices de la signalisation TGF-β, les SMAD, sont fréquentes. On retrouve environ 15% de mutations inactivatrices pour SMAD4 et 5% pour SMAD2 et 3 dans les CCR (Leary et al., 2008; Wood et al., 2007). De plus, les mutations de SMAD2 et 4 sont associées à une LOH du chromosome 18q dans 70% des CCR, locus de ces deux gènes (Fearon, 2011; Habermann et al., 2007).

L'altération de la signalisation TGF-β stimule la prolifération cellulaire et favorise la survie des cellules cancéreuses. L'inactivation de cette voie coïncide avec une transition du stade de l'adénome au carcinome invasif (Grady et al., 1998).De manière intéressante, dans des stades plus avancés de l'adénocarcinome, la signalisation TGF-β apporte un effet pro-tumoral en stimulant l'EMT *via* la production de TGF-β avec un effet paracrine sur les cellules stromales et un effet autocrine par l'activation de la signalisation non canonique des récepteurs au TGF-β, la voie des MAPK (Calon et al., 2012; B. Zhang et al., 2009).

2.2.2.d Les oncogènes de la famille RAS et la voie des MAPK

La famille RAS (Rat sarcoma factors) des petites protéines-G fonctionne comme des interrupteurs cellulaires en aval des récepteurs membranaires. La liaison du ligand à son récepteur initie l'activation des protéines RAS intracellulaires, à travers un échafaudage moléculaire, par

l'échange d'une guanosine diphosphate (GDP) pour une triphosphate (GTP) par les facteurs d'échange de guanosine (GEF). Une fois activées, ces protéines servent de radeaux moléculaires et lient les protéines RAF qui enclenchent la cascade de phosphorylation de la voie des MAPK. Ensuite, les petites protéines G se lient à des protéines activatrices de leur activité GTPase (GAP), hydrolysant leur GTP en GDP entrant ainsi en forme inactive. La famille de protéines RAS compte un grand nombre de membres qui représentent des points de contrôle cruciaux dans la régulation de la signalisation des récepteurs membranaires (Zenonos & Kyprianou, 2013).

Les protéines K-RAS et N-RAS sont fréquemment la cible de mutations dans les CCR qui induisent des changements conformationnels empêchant la liaison des protéines activatrices de l'activité GTPase des petites protéines G. Ainsi, les mutations associées à ces gènes se traduisent par une activation constitutive des protéines RAS. Les mutations du gène K-RAS sont les plus communes, représentant environ 40% des cas de CCR et N-RAS, moins représentées, moins de 5%. On retrouve également 5 à 10% de mutations dans le gène codant pour la protéine B-RAF, un des membres de la famille de protéines activées par les RAS et initiant la cascade des MAPK (Fearon, 2011). L'ensemble de ces mutations se traduit par une activation constitutive en aval des récepteurs membranaires. Une fois activé, l'effecteur ERK de cette voie des MAPK est transloqué au noyau ou il transactive des FT comme ELK1 (ETS transcription factor ELK1), c-JUN (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit), c-FOS (Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) ou c-MYC régulant ainsi plus ou moins directement la prolifération cellulaire entre autres par l'expression et la stabilisation de kinases dépendantes des cyclines (W. Zhang & Liu, 2002).

2.2.2.e Activation de la voie PI3K

Le PIP_3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) est un messager moléculaire secondaire. Issu du produit de la phosphorylation du PIP_2 (Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate) par la protéine kinase PI3K, il recrute à la membrane la kinase PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) et la sérine/thréonine kinase AKT. PDK1 phosphoryle AKT qui ainsi activé régule l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire et l'apoptose comme la *CDKN1B* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 1B*), *BCL2L11* (*BCL2 like 11*), *c-JUN* et *c-FOS* à travers la dégradation de FOXO1 (Forkhead box O transcription factor) et l'inactivation de la GSK3β. En résumé, un taux élevé de PIP_3 est associé à une stimulation du cycle cellulaire et de la survie cellulaire. Le niveau cellulaire de PIP_3 est néanmoins contrôlé par l'antagoniste catalytique de la PI3K, PTEN (Phosphatase and tensin homolog) qui hydrolyse PIP_3 en PIP_2 (L. Zhao & Vogt, 2008).

Les mutations des gènes régulateurs de la voie PI3K sont fréquentes. On rapporte environ 32% de mutations somatiques activatrices de la protéine PI3K dans les CCR (Samuels et al., 2004). Inversement, des mutations inactivatrices de la protéine PTEN sont retrouvées dans environ 10% des CCR (Danielsen et al., 2008). Ces mutations activatrices ou inhibitrices de l'une ou l'autre ce ces enzymes se traduisent par une augmentation du niveau cellulaire de PIP_3 et une stimulation excessive de la prolifération et de la survie cellulaire. De manière intéressante, les protéines RAS sont liées à la voie de signalisation PI3K. Il a été décrit que K-RAS stimule l'activité de la PI3K en stabilisant sa localisation à la membrane et qu'en retour PIP_3 stimule l'activation des protéines RAS (L. Zhao & Vogt, 2008). Ainsi, la présence concomitante des mutants K-RAS et PI3K apporte un effet synergique au développement tumoral et il a récemment été montré que les adénocarcinomes présentant cette bi-mutation sont de mauvais pronostic (Q. Luo et al., 2020).

2.2.2.f Voie de signalisation des facteurs de croissance

Les perturbations de l'activité de plusieurs voies de signalisation associées à certains facteurs de croissance jouent également un rôle de soutien dans le développement des adénocarcinomes colorectaux.

La voie de signalisation de l'EGF en fait partie. Bien connue pour son rôle dans la niche souche intestinale par son effet pro-prolifératif essentiel au maintien de l'activité des CSI (*cf.* section 1.3.2.b), une augmentation de l'expression des EGFR à la suite d'une amplification du nombre de copies de ce gène est fréquemment observée dans les CCR. Néanmoins, son impact sur le pronostic des patients est encore incertain. En revanche, la signalisation EGFR est transduite *via* les voies RAS-RAF-MAPK et PI3K qui, comme décrites dans les 2 sections précédentes, ont un effet pro-oncogénique certain en stimulant considérablement la prolifération et la survie cellulaire (Krasinskas, 2011).

Ensuite, la signalisation des facteurs de croissance de la vascularisation endothéliale VEGF (Vascular endothelial growth factor) représente une voie clé de la vascularisation tissulaire (S. D. Markowitz & Bertagnolli, 2010), processus essentiel au développement tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011). L'utilisation d'une thérapie anti-angiogénique par l'utilisation du bévacizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, en combinaison à la chimiothérapie améliore significativement la survie des patients atteints de stades avancés de CCR (Hurwitz et al., 2004). De manière intéressante, la signalisation intracrine du VEGF a été mise en évidence dans les cellules cancéreuses du sein (Lee et al., 2007) et joue un rôle dans la migration cellulaire et l'invasion tumorale dans les CCR (Bhattacharya et al., 2017).

Enfin, la voie de signalisation des prostaglandines est sur-activée dès les premiers stades du développement des CCR. En conditions physiologiques, les prostaglandines jouent un rôle dans l'inflammation tissulaire et la régulation de la réponse immunitaire (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Cependant, une forte production de PGE2 (Prostaglandine E2) est observée dans les CCR due à une augmentation de COX2 (Cyclooxygénase 2), qui catalyse la production de PGE2, et une diminution de la 15-PGDH (15-prostaglandin dehydrogenase), responsable de la dégradation de PGE2, observées respectivement dans environ 30% et 80% des CCR (S. D. Markowitz & Bertagnolli, 2010). L'exacerbation de cette voie soutien le développement du cancer de bien des façons par exemple en stimulant la survie cellulaire, le potentiel souche, l'angiogenèse et des processus métastatiques (Greenhough et al., 2009). L'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens prévient l'apparition de nouveaux adénomes et réduit ceux déjà existants par l'inhibition de COX2 (S. D. Markowitz, 2009; S. D. Markowitz & Bertagnolli, 2010).

La compréhension des mécanismes moléculaires liés à l'initiation et au développement d'une lésion initialement bénigne à une tumeur dysplasique et invasive a permis de mieux appréhender le comportement et la dynamique cellulaire soutenant ces processus.

2.2.3 Hétérogénéité tumorale et cellules souches cancéreuses

Les concepts associés au développement tumoral ont beaucoup évolué au cours des dernières décennies. Il est maintenant bien admis que la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse résulte de l'altération génétique de gènes impliqués dans le contrôle de la biologie cellulaire comme c'est le cas des mutations du gène *APC* dans les CCR (Herbst et al., 2014; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997). Les cellules cancéreuses développent plusieurs caractéristiques qui leurs sont propres comme une prolifération exacerbée, une insensibilité aux signaux de contrôle extracellulaires, une résistance à l'apoptose, une capacité à se diviser infinie et bien d'autres. Ces caractéristiques constituent le phénotype des cellules cancéreuses et sont acquises au travers des différentes altérations génétiques décrites jusqu'ici (Hanahan & Weinberg, 2011).

Si l'inactivation d'*Apc* initie la formation de cancers chez la souris (Colnot et al., 2004), cet évènement n'est cependant pas suffisant et beaucoup d'autres accompagnent la transformation cellulaire (S. D. Markowitz & Bertagnolli, 2010). Comme présenté précédemment, une accumulation de mutations dans un terrain génomique instable permet un changement profond de leur biologie. Les différentes cellules cancéreuses ainsi produites constituent la masse tumorale qui suit une évolution dite clonale. Présentée au milieu des années 70 par Peter C. Nowell (Nowell, 1976) et reprise au début des années 90 par Fearon et Vogelstein, au travers de leurs travaux sur le CCR, (Fearon &

Vogelstein, 1990), la théorie de l'évolution clonale postule que la première étape de la tumorigenèse intestinale consiste en une expansion clonale d'une cellule qui aurait acquise une ou plusieurs mutations activatrices d'oncogènes ou inhibitrices de suppresseurs de tumeurs. Ces cellules considérées comme initiatrice de tumeurs (CIT), forment alors une lésion néoplasique. Ensuite, d'autres mutations peuvent émerger conférant aux cellules de nouvelles caractéristiques. Si ce phénotype est associé à un avantage prolifératif par exemple, ce clone suivra à son tour une extension et ainsi de suite. La tumeur se développe ainsi suivant un schéma hiérarchique où plusieurs clones cellulaires présentant des profils génétiques différents forment une masse très hétérogène (Figure 24). On distingue notamment plusieurs régions dans les adénocarcinomes avec des morphologies et des phénotypes cellulaires différents (Hanahan & Weinberg, 2011). Plus récemment, une étude présente un modèle légèrement différent de cette évolution clonale, appelé modèle Big Bang (Sottoriva et al., 2015). Les travaux de Sottoriva et collègues montrent que l'évolution clonale présentée jusqu'ici est en fait principalement restreinte aux débuts du développement tumoral et que l'apparition de clones plus tardifs est limitée spatialement (Figure 24). En plus de cette hétérogénéité intra-tumorale, il est important de souligner cet aspect dans le micro-environnement. L'influence du micro-environnement formé par les cellules stromales, endothéliales et immunitaires est largement décrit pour favoriser l'hétérogénéité tumorale (Hanahan & Weinberg, 2011).

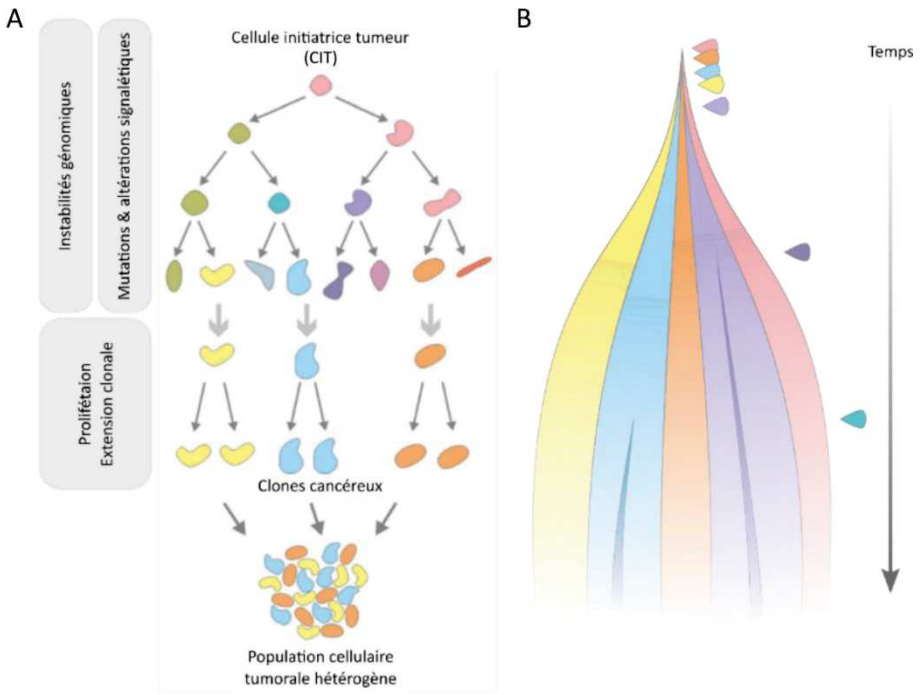


Figure 24 – Théorie de l'évolution clonale des tumeurs et modèle Big Bang. (A) Représentation schématique de la théorie de l'évolution clonale des tumeurs (Adapté de Fulawka, Donizy and Halon, 2014). (B) Représentation schématique de l'apparition (curseurs de couleurs) et du développement des clones cellulaires cancéreux au sein de la tumeur en fonction du temps suivant le modèle Big Bang (Inspiré de Sottoriva *et al.*, 2015).

Ainsi, suivant la théorie de l'évolution clonale et le modèle Big Bang, la nature des CIT conditionne déjà grandement le développement tumoral. L'identité de ces cellules est vaste, néanmoins elles se caractérisent par leur capacité à initier la formation tumorale (Dieter et al., 2011; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Plusieurs études ont notamment révélé la formation de tumeurs intestinales chez la souris après inactivation du gène suppresseur de tumeur *Apc* dans différents types cellulaires épithéliaux (Barker et al., 2009; Sangiorgi & Capecchi, 2008; Westphalen et al., 2014; Zhu et al., 2009). L'initiation tumorale reste largement associée aux CS dans les cancers intestinaux à travers la dérégulation de la signalisation WNT dans les cellules $LGR5^+$ et $BMI1^+$ (Barker et al., 2009; Sangiorgi & Capecchi, 2008). L'apparition de mutations dans les cellules différenciées ou progénitrices est éliminée avec le renouvellement épithéliale tandis que les CSI qui résident au fond des cryptes sont conservées. La compétition entre les clones de CSI est alors biaisée par l'avantage prolifératif conféré par la dérégulation des signaux WNT. Ainsi la CSI mutante colonise la crypte et commence son extension clonale (Vermeulen & Snippert, 2014; Visvader, 2011).

Il est cependant important de distinguer l'aspect CIT du concept de cellules souches. La CIT bien qu'initiatrice, ne soutient pas nécessairement le développement tumoral. Comme abordé précédemment, la tumeur se développe suivant un modèle hiérarchique où des clones cellulaires possédant un certain phénotype s'étendent et constituent la masse tumorale. Cette extension met en avant une population particulière de cellules possédant la capacité à se multiplier indéfiniment et à produire des cellules progénitrices, les cellules souches cancéreuses (CSC) (Figure 25) (Visvader, 2011).

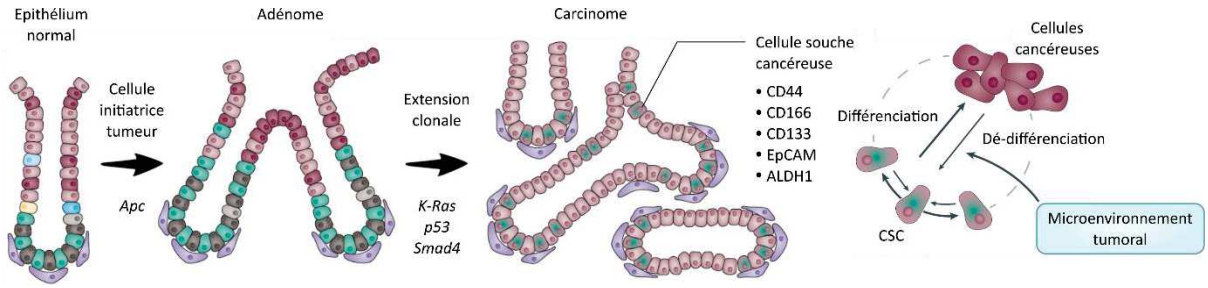


Figure 25 – Développement tumoral et cellules souches cancéreuses. (Adapté de Vermeulen and Snippert, 2014).

La nature exacte des CSC est encore vague. Elles ont été mises en évidence dans la LAM (Leucémie aiguë myéloïde) par Lapidot et collègues en 1994 par leur capacité à reformer la tumeur après transplantation chez des souris SCID (Severe combined immunodeficient) (Lapidot et al., 1994). De même, une population de CSC dans le côlon a été mise en évidence selon la même approche (O'Brien et al., 2007). Les CSC sont ainsi définies par une capacité à initier et soutenir la formation tumorale après transplantation chez la souris et une capacité d'auto-renouvellement essentielle au

maintien sur le long terme de la croissance tumorale (Kreso & Dick, 2014). De manière intéressante, les tumeurs obtenues après xénogreffe des CSC coliques chez la souris conservent la même hétérogénéité signifiant que les CSC sont capables de reproduire une tumeur similaire dans un environnement différent (O'Brien et al., 2007). En plus de leurs caractéristiques fonctionnelles, plusieurs marqueurs cellulaires sont associés à cette population tel que le récepteur à l'acide hyaluronique CD44, la glycoprotéine CD133 ou PROM-1 (Prominin-1), la glycoprotéine d'adhésion cellulaire CD166, le récepteur transmembranaire à la R-spondin LGR5, l'enzyme de détoxification cellulaire ALDH1 (Aldehyde dehydrogenase 1) ou encore la protéine d'adhésion cellulaire EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) (Figure 25). Néanmoins, la plupart de ces marqueurs ne sont pas spécifiques d'une population cellulaire et leur utilisation permet simplement d'enrichir la population de CSC (Y. Zhou et al., 2017). Deux études ont par ailleurs montré l'existence de ces populations de CSC par traçage cellulaire basé sur l'expression des marqueurs cellulaires *Lgr5* et *Dclk1* (*Doublecortin-like kinase 1*). Ces deux populations sont capables d'une part d'auto-renouvellement et d'autre part de produire des cellules cancéreuses dans les adénomes murins (Nakanishi et al., 2013; Schepers et al., 2012).

Ainsi, le développement tumoral soutenu par les populations de CSC suivant un modèle hiérarchique constitue la base du développement des cancers intestinaux et de la plupart des cancers. Ces populations ont un intérêt thérapeutique certain dans le traitement des cancers et du CCR afin d'enrailler la croissance tumorale mais sont difficiles à cibler d'une part à cause de leur hétérogénéité mais surtout à cause de la plasticité cellulaire dont elles font preuve. En effet, l'hétérogénéité tumorale est maintenue par des altérations génétiques et génomiques différentes au sein des populations cellulaires cancéreuses mais également par une hétérogénéité phénotypique et un équilibre entre différenciation et dédifférenciation cellulaire favorisant le développement de la tumeur et son agressivité (Figure 25) (Sottoriva et al., 2010). Il a été montré dans les CCR que l'influence des signaux WNT notamment de la composante stromale est déterminante dans la régulation du phénotype des CSC (Vermeulen et al., 2010). Cette plasticité phénotypique des cellules cancéreuses a été observée dans plusieurs types de cancers comme le cancer du sein par exemple (P. B. Gupta et al., 2011).

En conclusion, il est important de retenir que les adénocarcinomes colorectaux se forment à la suite de l'accumulation de plusieurs mutations majeures par une cellule épithéliale vraisemblablement souche qui engage alors une transition vers un état cancéreux. Cette CIT débute une extension clonale formant un adénome dont le paysage génomique et génétique favorise l'apparition de nouveaux clones se développant à leur tour, constituant la masse tumorale. L'accumulation des mutations et l'altération de voies moléculaires favorisent l'apparition d'un

phénotype souche cancéreux (Gleizes et al., 2018). Ces CSC sont la clé de voûte du développement de la tumeur en soutenant sa croissance. Ce phénotype est très instable et est notamment influencé par le micro-environnement tumoral qui régule l'équilibre entre différenciation et capacité souche des cellules cancéreuses. Cette hétérogénéité tumorale et la plasticité cellulaire associée sont de réels problèmes dans le traitement des cancers et font l'objet de beaucoup de travaux.

2.3 Stratégies thérapeutiques

La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires initiant et soutenant le développement des CCR et notamment de la séquence adénome-carcinome permet d'améliorer la prise en charge des patients. Les protocoles sont adaptés en fonction du stade de développement de la tumeur et de sa catégorie moléculaire. Cependant, l'arbre décisionnel des choix thérapeutiques est vaste, complexe et dépend d'un grand nombre de facteurs. De plus, le traitement des patients présentant des tumeurs rectales diffère des patients atteints de tumeurs coliques. Aussi, au cours de cette section, le choix du traitement n'est abordé que dans ses grandes lignes au travers des différents types de thérapies existantes.

Dans les cancers du côlon, la chimiothérapie seule est privilégiée tandis que pour les cancers rectaux, une combinaison de radiochimiothérapie est utilisée dans les thérapies adjuvantes. A des stades plus avancés de la tumeur avec présence de métastases distantes, les traitements par chimio- et ou radiothérapies sont couplés à de la thérapie ciblée visant une particularité moléculaire de la tumeur comme les mutations d'un pro-oncogène comme *K-RAS* (Schmoll et al., 2012).

Le choix des thérapies dépend beaucoup du profil moléculaire de la tumeur. Au stade II du développement tumoral, le statut microsatellitaire est pris en compte dans l'utilisation de thérapies adjuvantes. Un statut MSI-H est associé à une meilleure survie des patients et il a été observé que l'utilisation de chimiothérapies n'apportait pas de bénéfice dans la survie globale des patients. En revanche c'est le cas pour les patients MSI-L ou MSS (Aran et al., 2016). Ensuite, les thérapies ciblées dans le traitement des stades métastatiques sont les plus diversifiées. Elles ont pour but d'enrailler l'altération de grandes voies moléculaires pour améliorer l'efficacité thérapeutique de la radio- et/ou chimiothérapie comme c'est le cas des anticorps ou inhibiteurs dirigés contre les récepteurs à l'EGF ou des kinases comme K-RAS et N-RAS (Schmoll et al., 2012).

De manière générale, les composés utilisés dans le traitement des cancers ont pour particularité de cibler un phénotype cellulaire ou moléculaire altéré ou exacerbé dans les cellules cancéreuses. Malheureusement, ces mécanismes ne sont pas propres à ces cellules et les effets secondaires associés aux thérapies contre le cancer sont lourds. Les patients sont par conséquent

suivis de près d'une part pour la surveillance de leur état mais également un suivi dans le temps pour évaluer l'impact du traitement sur la maladie au fil des mois et des années. La procédure de suivi des patients est dépendante de l'individus et de sa maladie mais il est globalement préconisé qu'une visite médicale doit être faîte tous les 3 mois pendant 3 ans puis tous les 6 mois pendant 2 ans. Une coloscopie complète doit également être réalisée tous les 5 ans après le premier diagnostic (Schmoll et al., 2012).

2.3.1 Chirurgie

De manière générale, les chirurgies de résection restent la première approche dans les cas où elles sont possibles, à savoir des tumeurs localisées de stades I à III et au stade IV lorsque les métastases sont accessibles (Weiser & Garcia-Aguilar, 2019). Ces procédures peuvent être accompagnées par une chimio- et ou radiothérapie en fonction du développement tumoral. L'association d'une thérapie de fond à la chirurgie permet de réduire la masse tumorale en pré-opératoire pour faciliter la procédure par un décollement de la tumeur du péritoine par exemple, on parle alors de thérapie néo-adjuvante. En post-opératoire, la thérapie adjuvante permet d'éliminer de potentielles cellules cancéreuses résiduelles et de minimiser les risques de rechute chez les patients (Coyle, 2019). Globalement, la chirurgie de résection consiste à éliminer la portion de la paroi intestinale qui porte la tumeur avec les système sanguin et lymphatique associés. La taille de la résection dépend directement de la taille de la tumeur. On considère qu'une marge de 5 cm sur les côtés et 2 cm au-dessus et en dessous de la tumeur garantit une résection oncologique sûre. Cependant, une tumeur très invasive nécessite une résection plus conséquente avec l'enlèvement d'une portion des structures impliquées (Weiser & Garcia-Aguilar, 2019).

Il existe plusieurs méthodes de résection tumorale pour le côlon et le rectum. Pour une tumeur colique, une excision mésocolique totale est généralement appliquée correspondant à une résection de la tumeur ainsi que du mésenchyme portant le système lymphatique. Cette technique est préconisée pour les patients présentant un adénocarcinome sans signes métastatiques ou contre-indications opératoires. Une technique moins invasive appelée chirurgie laparoscopique peut-être employée. Elle ne nécessite pas de réaliser une grande incision dans la paroi abdominale mais prend beaucoup de temps à maitriser et certaines conditions, comme l'obésité, peuvent rendre cette procédure compliquée. Néanmoins, la robotisation de ces techniques améliore l'efficacité des chirurgiens (Weiser & Garcia-Aguilar, 2019).

La chirurgie des cancers rectaux est plus délicate à cause de sa localisation dans le conduit étroit et osseux du pelvis ainsi que la présence de l'appareil uro-génital, de gros vaisseaux sanguins et

du système nerveux. De manière similaire au côlon, la procédure principalement appliquée est une excision totale du mésorectum. Elle consiste dans ce cas aussi à exciser la tumeur avec une portion du tissu sain adjacent et le mésenchyme portant le système lymphatique local. Si la tumeur est localisée dans la partie distale du rectum et si les muscles contrôlant le canal anal sont touchés alors une excision abdominopérinéale est réalisée correspondant à une excision du canal anal et des muscles adjacents. Ces procédures sont invasives et nécessitent en général une incision large abdominale, ainsi certaines techniques comme dans le côlon, la laparoscopie manuelle ou robotisée et l'excision transanale-transabdominale totale du mésorectum permettent de diminuer les risques post-opératoires. Enfin, une excision locale de la paroi rectale peut être réalisée dans le cas de cancers détectés à des stades précoces I ou II avec une absence d'invasion des ganglions lymphatiques. Cependant cette procédure nécessite un examen méticuleux du rectum, de la sous-muqueuse, des ganglions et de la morphologie tumorale pour s'assurer de l'efficacité de la procédure (Weiser & Garcia-Aguilar, 2019).

Ainsi, le traitement par chirurgie reste la méthode de première intention pour des tumeurs qui ne présentent pas de métastases. Il augmente considérablement la survie des patients et réduit de manière significative le risque de rechute. Comme présenté précédemment, ces techniques opératoires peuvent être associées à des traitements néo-adjuvants qui facilite l'opération et adjuvants post-opératoires pour éliminer des cellules cancéreuses résiduelles.

2.3.2 Chimio-/radio-thérapies

Les traitements par chimiothérapies (CT) sont généralement utilisés avant (néo-adjuvant) ou après résection (adjuvant) pour les CCR et en combinaison avec la radiothérapie pour les cancers du rectum principalement (Coyle, 2019). Ces thérapies ciblent les cellules à forte prolifération, caractéristique exacerbée par les cellules cancéreuses, en générant des liaisons irréversibles à l'AND, létales au cours de la réplication cellulaire réduisant considérablement la masse tumorale.

Le traitement par radiations consiste à exposer la masse tumorale à des rayons-X ou γ au fort pouvoir ionisant créant des lésions directes à l'ADN, cassures doubles et simples brins, et en générant notamment des espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive oxygen species), créant des dommages indirects à la cellule (Baskar et al., 2014). La radiothérapie est principalement utilisée dans les cancers du rectum avec deux stratégies. Une exposition courte en deux doses de 5 Gy (Grays - unité de mesure de la radiation reçue) suivie d'une chirurgie après 2 à 3 jours ou une exposition au long terme de 40 à 50,4 Gy en 24 à 28 séances accompagnée d'une CT, radiochimiothérapie (RCT), suivie d'une chirurgie 4 à 8 semaines après exposition (Schmoll et al., 2012). Une RCT effectuée avant opération est

préférable pour les tumeurs nécessitant une réduction de leur masse. Il a notamment été montré que cette méthode, accompagnée d'une CT adjuvante post-opératoire de 4 à 6 mois, est associée à moins de récurrence locale et moins de toxicité en comparaison à une RCT post-opératoire. Dans les cancers du côlon, la radiothérapie n'est que rarement prescrite en première intention, les CT adjuvantes sont privilégiées et plutôt de manière post-opératoire (Roh et al., 2009; Sauer et al., 2004).

Les CT des CCR sont basées sur l'utilisation de composés génotoxiques qui altèrent l'intégrité génomique. Trois composés sont principalement utilisés, le 5-fluorouracil (5-FU), l'irinotecan et l'oxaliplatine, prescrits en combinaison suivant le stade de la maladie. Le 5-FU est un analogue de l'uracile, base ribonucléique de l'ARN. Les produits de sa catalyse inhibent l'activité de la thymidylate synthase (TS), enzyme impliquée dans la synthèse des bases thymidines, essentielle à la réplication de l'ADN. De plus, ses métabolites s'intègrent à l'ARN et l'ADN durant leur synthèse. Ainsi l'administration de 5-FU perturbe profondément la biologie des cellules cancéreuses en constante prolifération (Longley et al., 2003). L'irinotecan est un analogue des camptothécines dont le produit de dégradation le 7-éthyle-10-hydroxycamptothécine (SN-38) inhibe l'activité de la topoisomérase I, enzyme impliquée dans le déroulement de la chromatine libérant le passage à la fourche de réplication lors de la phase S du cycle cellulaire. L'inhibition de cette enzyme génère des cassures doubles brins dans l'ADN stoppant le cycle en phase S-G2 et entrainant la mort cellulaire (Fujita et al., 2015). L'oxaliplatine est un dérivé de platine se liant aux régions riches en G-C de l'ADN créant des ponts inter- et intra-brins ainsi que des liaisons protéines-ADN figeant la chromatine et générant de multiples dommages. Il inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN et induit l'apoptose cellulaire (Alcindor & Beauger, 2011).

L'utilisation du 5-FU en combinaison ou non avec l'oxaliplatine sont les composés principalement utilisés pour les patients présentant un CCR de stade II ou III (Schmoll et al., 2012). Cependant des incertitudes persistent quant à leur utilisation pour des patients présentant un adénocarcinome colique de stade II en considérant la toxicité associée, leurs inconvénients et le coût. Plusieurs études n'ont pas révélé d'impact positif sur la survie globale des patients ou alors un bénéfice relativement faible chez les patients MSS (Benson et al., 2004; O'Connor et al., 2011; QUASAR Collaborative Group, 2007; Sargent et al., 2014). L'utilisation de ces composés ont cependant fait leur preuve pour des patients présentant un adénocarcinome colique de stade III avec une diminution d'environ 20% des risques de rechute, DFS (Disease-free survival), et une augmentation similaire de la survie globale, OS (Overall survival) (André et al., 2004, 2009; Yothers et al., 2011). Pour les patients atteints de cancers du rectum de stade II et III, l'utilisation d'une RCT en thérapie néoadjuvante a montré un réel bénéfice dans le risque de rechute local et de survie au long terme (Ceelen et al., 2009; Valentini et al., 2011). Ce protocole n'apporte pas d'avantage pour les patients dont la tumeur n'a pas besoin d'être réduite avant opération. Elle est en revanche obligatoire pour ceux dont le stade est plus

avancé (Schmoll et al., 2012). L'utilisation d'une RCT post-opératoire, si non effectuée avant chirurgie, peut être réalisée pour les patients atteints de cancers du rectum de stade II et III. Une CT pré-opératoire suivie d'une chimiothérapie adjuvante est tout de même recommandée pour sa plus faible toxicité au long terme même si ces deux protocoles ne diffèrent pas en terme de rechute locale et d'OS chez les patients (Schmoll et al., 2012).

Le traitement des patients atteints d'une forme plus avancée de CCR, stade IV, est beaucoup plus délicat. Premièrement, une excision totale de la tumeur est nécessaire si possible, de même pour les métastases identifiées. Si la chirurgie n'est pas possible alors les traitements par CT sont privilégiés en combinant les 3 composés, 5-FU et oxaliplatine (FOLFOX), 5-FU et Irinotecan (FOLFIRI) ou la combinaison des 3 (FOLFIRINOX), testés ou non en association avec des thérapies ciblées par exemple pour les mutations *K-RAS*, *B-RAF* et/ou une inhibition de l'angiogenèse.

Le choix du traitement des patients est crucial est un grand nombre de critères sont pris en compte pour adapter au mieux la prise en charge thérapeutique et le choix des lignes de traitement en cas d'absence de réponse. Les patients sont répartis en 4 groupes de 0 à 3 déterminés en fonction de l'état de la tumeur et des métastases, opérables ou non, à progression rapide, la présence de symptômes liés à la tumeur et autres. Au sein de ces 4 groupes, l'objectif du traitement est également important et doit être soigneusement défini pour éviter une toxicité non nécessaire ou délétère en évaluant la balance bénéfice/risque déterminant ainsi l'intensité de la thérapie (Schmoll et al., 2012).

2.3.3 Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées, comme leur nom l'indique, visent une particularité des cellules tumorales et ont pour but de restreindre sa croissance ou sa propagation en inhibant ou bloquant le processus en question. Les tumeurs présentent un ensemble de caractéristiques résultant d'une altération de processus physiologiques cellulaires, cibles potentielles des traitements de précision (Hanahan & Weinberg, 2011). Dans les CCR, la plupart de ces thérapies ont pour but d'inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse et sont administrées en combinaison avec une chimiothérapie comme présenté dans la section précédente (Schmoll et al., 2012) (Figure 26).

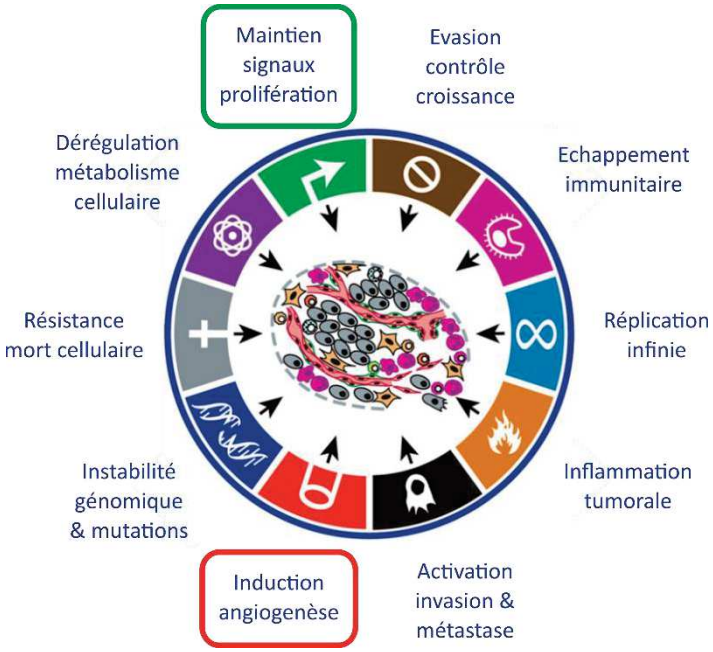


Figure 26 – Caractéristiques tumorales et ciblage thérapeutique. Thérapies ciblées dirigées contre une prolifération cellulaire exacerbée due à une activation constitutive des signaux cellulaires (rectangle vert) et inhibition de l'angiogenèse tumorale favorisant son développement (rectangle rouge) (Adapté de Hanahan and Weinberg, 2011).

Une des stratégies consiste à cibler la voie de signalisation EGF et notamment son récepteur EGFR connu pour être sur-exprimé dans les CCR (*cf.* section 2.2.2.f). Pour cela, plusieurs anticorps inhibant cette voie de signalisation ont été sélectionnés et approuvés en clinique. Le cetuximab et le panitumumab sont des anticorps monoclonaux humains dirigés contre l'EGFR empêchant la liaison du récepteur à son ligand réduisant la transduction du signal et limitant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses. Ces anticorps ont été approuvés cliniquement en combinaison avec une chimiothérapie FOLFOX ou FOLFIRI pour le panitumumab dans le traitement de patient atteints de CCR métastatiques présentant une forme sauvage de l'oncogène *K-RAS* (Douillard et al., 2010; Karapetis et al., 2008; Winer et al., 2009). Le bénéfice observé dans l'OS et la réponse au traitement est en revanche altérée pour des patients mutés *K-RAS* dont l'activation de la voie de signalisation ne dépend plus des récepteurs EGFR (Benvenuti et al., 2007). Les mutations du gène *B-RAF* ont également émergé comme facteur de mauvais pronostic chez les patients *K-RAS* sauvages traités avec une thérapie anti-EGFR au reflet de la transduction signalétique K-RAS/B-RAF (Van Cutsem et al., 2011).

Une autre stratégie anti-tumorale consiste à cibler l'angiogenèse en bloquant les récepteurs par des anticorps ou en entrant en compétition avec leurs ligands. L'inhibition de cette voie de signalisation réduit l'angiogenèse induite par le microenvironnement diminuant l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules cancéreuses limitant ainsi l'expansion tumorale. Le bévacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le ligand VEGF-A donné en combinaison avec les CT FOLFIRI et

FOLFOX (C. S. Fuchs et al., 2007; Giantonio et al., 2007; Hurwitz et al., 2004). L'aflibercept, donné en combinaison au FOLFIRI, est une protéine de fusion entre le domaine de liaison des VEGFR et une immunoglobuline humaine piégeant les ligands VEGF-A et B (Van Cutsem et al., 2012). Enfin le ramucirumab est un anticorps monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire du VEGFR-2 bloquant la liaison de ses ligands et donné en combinaison au FOLFIRI (Tabernero et al., 2015). Ces trois molécules ont montré un bénéfice dans l'OS des patients atteints de CCR métastatiques. Enfin des inhibiteurs de l'activité tyrosine/kinase ont été développés dans les traitements des CCR. Le régorafénib utilisé en monothérapie, est une molécule inhibitrice du VEGFR-2 et TEK, récepteur à tyrosine kinase également impliqué dans la régulation de l'angiogenèse, améliorant la DFS et l'OS des patients CCR métastatiques (Grothey et al., 2012). Ensuite le nintédanib, un pan-inhibiteur des tyrosine kinase VEGFR, PDGFR et FGFR (Fibroblast growth factor receptor), utilisé en combinaison au FOLFOX présente une efficacité et une toxicité similaire au bévacizumab (Cutsem et al., 2015). Enfin le cédiranib est un inhibiteur des VEGFR dont l'utilisation en combinaison au FOLFOX présente des résultats similaires au bévacizumab avec cependant un peu plus d'effets secondaires (Schmoll et al., 2012).

Ainsi le traitement des CCR présente 3 aspects complémentaires. La chirurgie de résection, permettant de retirer la masse tumorale, en association à des thérapies dites générales ciblant la prolifération exacerbée des cellules cancéreuses couplées à des thérapies ciblées pour des stades plus avancés des cancers à travers de l'inhibition des signaux prolifératifs et de l'angiogenèse tumorale. Ces protocoles ont pour but d'éliminer la tumeur et d'éventuelles métastases en éliminant les cellules cancéreuses par des traitements prolongés. L'amélioration de la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires soutenant le développement tumoral ont permis l'avancée des composés et procédures thérapeutiques ainsi que la prise en charge des patients dans les choix thérapeutiques. Malgré ces progrès, l'hétérogénéité des adénocarcinomes colorectaux rend cette maladie difficile à traiter et la résistance ainsi que l'adaptabilité des cellules cancéreuses posent des problèmes de rechute chez les patients.

2.3.4 Récidive tumorale et chimiorésistance

La rechute ou récurrence des cancers correspond à la réapparition de la maladie après une période durant laquelle elle n'a plus été détectée. Ce phénomène est dû à la présence de cellules cancéreuses rémanentes soit localement au site de la tumeur primaire soit métastatiques qui reforment une masse tumorale. Malgré les progrès réalisés depuis plusieurs années, le taux de récidive cumulé sur 10 ans après le premier diagnostic reste d'environ 40 à 50% des cas avec des

différences en fonction du stade auxquels la maladie a été prise en charge, de sa localisation, de l'âge et du sexe du patient (Kjeldsen et al., 1997; Kunst et al., 2020).

La récurrence des cancers est un réel problème en clinique. L'amélioration de la compréhension des mécanismes acteurs de ces processus et notamment de la résistance des cellules cancéreuses aux traitements fait l'objet de beaucoup de travaux scientifiques.

2.3.4.a Chimiorésistance et mécanismes moléculaires

La résistance des cellules cancéreuses aux thérapies est un phénomène multifactoriel, appelé MDR (Multidrug resistance), dépendant des propriétés cellulaires associées à des mécanismes moléculaires plus ou moins complexes. Il existe 2 formes de résistance, innée ou naturelle et acquise, et une multitude de mécanismes impliqués dans ces processus qui peuvent être globalement répartis en 3 groupes (Figure 27). En premier, une diminution de la concentration en drogue au niveau de sa cible due à des mécanismes de transport ou de détoxification. Ensuite, des altérations de l'interaction entre la drogue et sa cible. Enfin, une modification de la réponse cellulaire influençant sa survie (Gatti & Zunino, 2005).

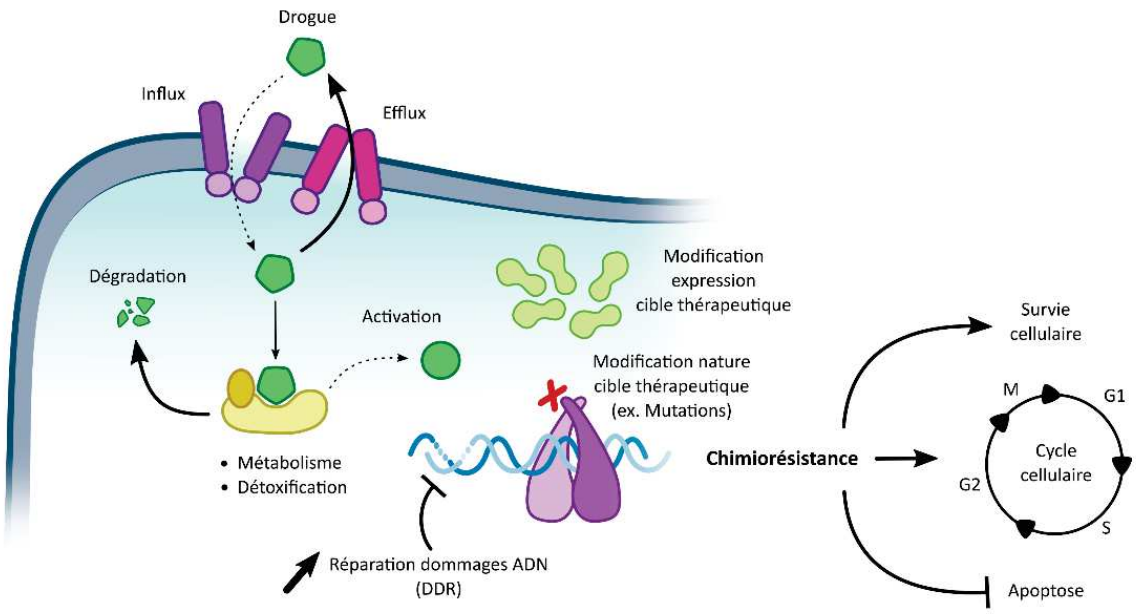


Figure 27 – Schéma représentatif des mécanismes de chimiorésistance cellulaire.

La régulation de l'influx et de l'efflux des composés toxiques est une des principales causes de résistance aux drogues. La superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) est fréquemment sur-exprimée dans les cancers. Ces protéines transmembranaires sont responsables de

l'efflux de toxines naturelles ou synthétiques dont les composés chimiothérapeutiques en sont fréquemment le substrat (Gatti & Zunino, 2005). Les protéines ABC sont notamment connues pour réguler l'efflux de l'oxaliplatine (Panczyk, 2014). De plus, une étude met en évidence le lien entre une variabilité de la réponse à l'irinotecan avec le polymorphisme du membre 2 de la sous-famille G des transporteur ABC (ABCG2) chez des patients présentant un CCR métastatique (J. Zhao et al., 2014). L'influx cellulaire est également fréquemment diminué dans les cancers et l'expression des protéines SLC22A1 et 2 (Solute carrier family 22 member 1 and 2), transporteurs régulant l'influx cellulaire, est corrélée à l'accumulation et la cytotoxicité de l'oxliplatine dans des lignées cellulaires de CCR (S. Zhang et al., 2006). Malgré le peu d'études cliniques relatant de l'impact de l'expression des transporteurs ABC dans la chimiorésistance des CCR, leur implication dans les processus de chimiorésistance sont largement détaillés dans plusieurs cas spécifiques et il apparait que le moyen le plus efficace, bien que délicat en pratique, soit d'augmenter les doses de drogue (Bukowski et al., 2020).

Les mécanismes de détoxification cellulaire sont également largement impliqués dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Le système glutathione (GSH) est un système anti-oxidant de détoxification cellulaire régulant l'équilibre rédox de la cellule en réduisant notamment les ROS et composés alkylants comme l'oxaliplatine. Le système GSH est également indirectement relié à l'efflux cellulaire, le métabolisme et la signalisation cellulaire au travers des enzymes dépendantes de la GSH (McLellan & Wolf, 1999). La GSH est surexprimée dans les cancers en réponse à une perturbation du métabolisme, l'altération mitochondriale et des mutations génétiques fréquentes. Son expression est corrélée à la progression tumorale et à une perte d'efficacité des composés chimiothérapeutiques dans plusieurs cancers (Bansal & Simon, 2018; Bukowski et al., 2020). Bien que non mis en évidence dans le cas des CCR, la GSH forme des conjugués avec les dérivés de platine reconnu comme substrat par les systèmes ABC stimulant ainsi l'efflux cellulaire et diminuant l'efficacité thérapeutique de ces composés (Hammond et al., 2016; Ishikawa & Ali-Osman, 1993; Meijer et al., 1992).

Certains agents nécessitent d'être métabolisés pour obtenir une forme active du composé et l'expression ou l'activité des enzymes clés de son métabolisme peuvent être des facteurs déterminants de leur efficacité thérapeutique. C'est notamment le cas du 5-FU pour lequel le premier métabolite actif est la FdUMP (Fluorodeoxyuridine monophosphate) qui inhibe l'activité de la TS et la production de thymidines (*cf.* section 2.3.2). L'enzyme initiatrice du catabolisme du 5-FU, la DPD (Dihydropyrimidine dehydrogenase) responsable de sa dégradation en DHFU (Dihydrofluorouracil), est déterminante dans l'activation du 5-FU. De manière intéressante, le niveau d'expression de la DPD dans les tumeurs colorectales issues de patients est associé à la valeur pronostic de la réponse au 5-FU et de l'OS estimée (Salonga et al., 2000).

L'altération des cibles thérapeutiques fait également partie des mécanismes perturbant l'activité des drogues. Ces altérations peuvent être de deux natures, soit un changement quantitatif par exemple suite à un changement de l'expression de la cible, soit une modification qualitative de la nature de la cible par exemple après mutation (Gatti & Zunino, 2005). C'est notamment le cas dans le métabolisme du 5-FU pour lequel il a été observé que la valeur pronostic est inversement corrélée au niveau d'expression de la TS chez les patients atteints de formes avancées de CCR et est un facteur prédictif de la réponse aux chimiothérapies à base de fluoropyrimidine comme le 5-FU (L.-X. Qiu et al., 2008). De manière intéressante, l'expression de la TS augmente dans les cellules CCR après exposition au 5-FU relatant d'une adaptation cellulaire à la chimiothérapie (Chu et al., 1993). Cette fois-ci de nature qualitative, l'activité de la forme active de l'irinotecan, le SN-38, peut être perturbée par l'altération de sa cible, la Topoisomérase I. En effet, il a été rapporté que des mutations ponctuelles du gène *Top1* codant pour cette protéine sont associées à la résistance cellulaire due à une altération de la liaison de la drogue à sa cible comme observé chez des patients atteints de cancers du poumon, NSCLC (Non-small cell lung cancer), et une étude *in vitro* sur lignée cellulaire CCR (Gongora et al., 2011; Tsurutani et al., 2002).

Ensuite, la réponse cellulaire aux dommages causés par les agents chimiothérapeutiques est un facteur déterminant de l'efficacité des traitements. Les systèmes de réparation des dommages à l'ADN, sont largement décrits pour leur rôle protecteur à la chimiothérapie dans les cancers présentant une activité accrue de ces mécanismes (Bukowski et al., 2020). Il existe plusieurs voies impliquées dans les systèmes DDR réparant soit les lésions simples brins, SSB (Single-strand breaks) ou doubles brins, DSB (Double-strand breaks). La réparation des lésions SSB est médiée par le système MMR reconnaissant et réparant les mésappariements nucléotidiques et les boucles d'insertion/délétion. Le système BER (Base-excision repair) reconnait les bases endommagées de l'ADN et les remplace. Le système NER (Nucleotide-excision repair) reconnait une distorsion de la double hélice de l'ADN associée à un nucléotide. Ensuite la réparation des DSB est médiée par deux mécanismes, la NHEJ (Non-homologous end-joining) et HR (Homologous recombination) (Jackson & Bartek, 2009). La résistance associée à l'activité accrue de ces mécanismes impacte particulièrement les CT qui sont essentiellement basées sur l'induction de lésions à l'ADN. Dans les cas de CCR, la protéine ERRC1 (Excision repair cross-complementation group 1), une des protéines effectrices principales du système NER, coordonne la reconnaissance des ponts ADN-Platinum induit par l'oxaliplatine. La forte expression de cette protéine est associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie au FOLFOX dans les tumeurs résistantes au 5-FU chez les patients atteints de CCR métastatiques (Shirota et al., 2001). Et de manière intéressante, les tumeurs résistantes à l'oxaliplatine montrent une induction de l'expression de cette protéine suggérant une capacité d'adaptation des

cellules cancéreuses aux thérapies par l'induction des systèmes de réparation de l'ADN dans le cas présent du système NER (Baba et al., 2012). Inversement, l'inactivation du système MMR dans les cancers est associée à une tolérance des dommages à l'ADN et une augmentation du taux de mutations ainsi que de la chimiorésistance (Bukowski et al., 2020). L'hyperméthylation du gène *MLH1* observée dans de nombreux cancers et notamment les CCR pourrait participer à de tels mécanismes à travers la baisse d'activité de ce système qui favorise entre autres le statut MSI (*cf.* section 2.2.1.b).

Les différents processus et les exemples associés à la résistance des CCR à la chimiothérapie abordés tout au long de cette section sont vastes et complexes. L'instabilité génomique et les évènements génétiques de la séquence-adénocarcinome favorisent grandement le développement de la résistance aux thérapies au travers de la perte de contrôle du cycle cellulaire et une résistance à l'apoptose normalement induite par exemple par les mécanismes contrôlant la dégradation des xénobiotiques comme le système GSH, ou l'arrêt du cycle cellulaire par les systèmes des réparations des dommages à l'ADN. Les mutations du gène suppresseur de tumeur *P53*, évènement majeur de la transition adéno-carcinome dans les CCR (*cf.* section 2.2.2.b) sont également responsables de la perte de sensibilité cellulaire aux contrôles du cycle cellulaire et de l'apoptose (Gatti & Zunino, 2005). On y retrouve également l'activation constitutive de nombreuses voies de signalisations qui soutiennent le développement tumoral (*cf.* section 2.2.2). La complémentarité de ces mécanismes est souvent responsable d'échecs thérapeutiques notamment vis à vis des thérapies ciblées (Hammond et al., 2016).

Ajouté à cela, l'hétérogénéité cellulaire des adénocarcinomes est également un réel problème. La variabilité dans les profils génomiques, génétiques et phénotypiques des cellules cancéreuses favorisent certaines populations en fonction des traitements utilisés (Figure 28). Les cellules peu cycliques sont par exemple moins sensibles à beaucoup de chimiothérapies majoritairement basées sur l'augmentation du stress cellulaire par induction des dommages à l'ADN. De manière générale, l'hétérogénéité tumorale permet son adaptation aux différentes thérapies qui sélectionnent indirectement certains clones cellulaires et permet potentiellement l'émergence d'un clone plus agressif (Figure 28). Les CSC sont connues pour être chimiorésistantes et sont ensuite capable de reconstituer la masse tumorale générant des phénomènes de rechutes chez les patients (Hanahan & Weinberg, 2011).

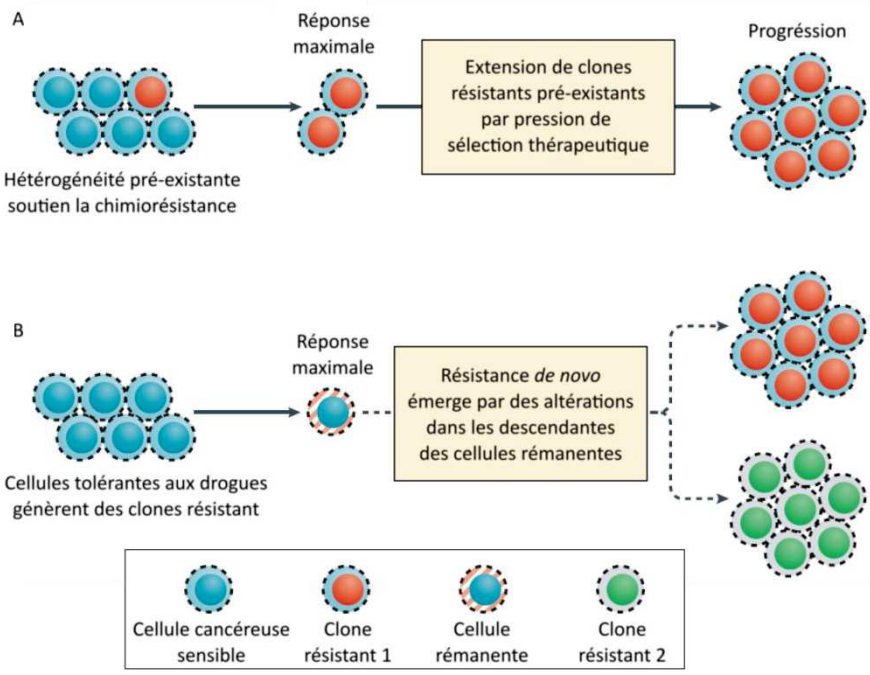


Figure 28 – Hétérogénéité tumorale et résistance clonale. (Adapté de Dagogo-Jack and Shaw, 2018).

2.3.4.b Cellules souches cancéreuses et chimiorésistance

Comme présenté précédemment, l'hétérogénéité tumorale est source de résistance et de rechute chez les patients atteints de CCR. Certaines populations cellulaires sont résistantes aux traitements ou acquièrent une résistance leur permettant de survivre et potentiellement de régénérer la tumeur. Cependant, comme lors du développement de la tumeur primaire, le soutien de la croissance tumorale suggère la présence de populations souches cancéreuses. L'implication de ces populations dans la résistance aux traitements en association aux échecs thérapeutiques en clinique est un sujet vastement étudié.

Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires de la résistance des CSC aux thérapies anti-cancéreuses ne soient pas entièrement élucidés, plusieurs caractéristiques entourant cette population ont pu être mises en évidence (Figure 29).

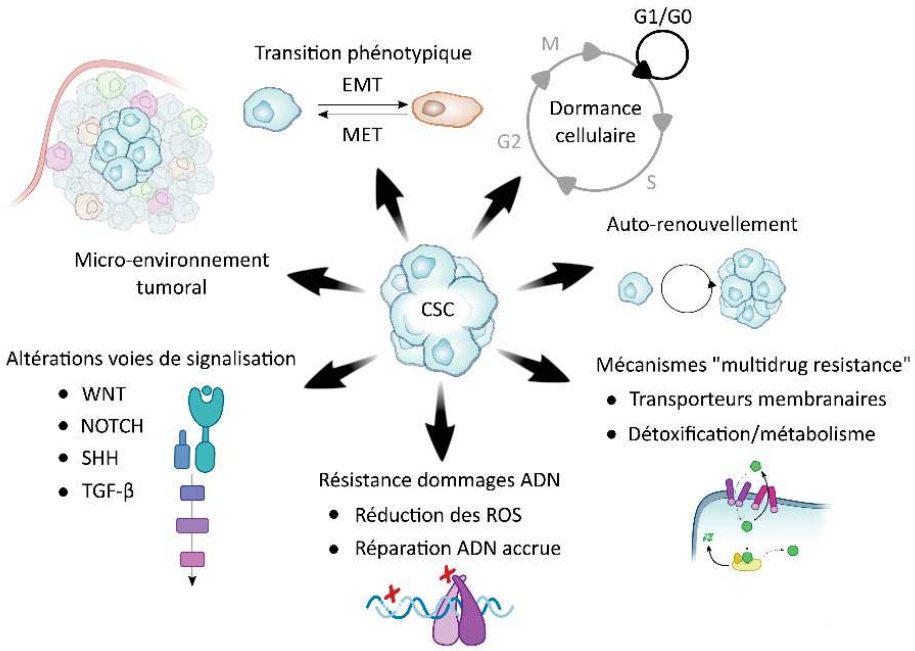


Figure 29 – Mécanismes de chimiorésistance des CSC. (Inspiré de Phi *et al.*, 2018).

2.3.4.b.1 Cellules souches cancéreuses et « multidrug resistance »

De manière générale, les populations de CSC présentent une forte activité des mécanismes MDR (*cf.* section 2.4.1) (Phi et al., 2018). L'expression des transporteurs ABC est enrichie dans les populations cancéreuses à caractère souche présentant une forte capacité d'efflux des drogues (Dean et al., 2005). Cette capacité peut être mise en évidence par FACS (Fluorescence-activating cell sorting) avec la distinction d'une sous-population cellulaire éliminant un marquage, par exemple au Hoechst, portant le nom de SP (Side-population) et présentant une certaine capacité à l'auto-renouvellement (Haraguchi et al., 2006). Il a notamment été montré que cette SP et l'activité du transporteur ABCG2 étaient induites par la voie PI3K/AKT dans les glioblastomes (Bleau et al., 2009), voie moléculaire elle-même activée et soutenant le développement des adénocarcinomes colorectaux (*cf.* section 2.2.2.e).

Les enzymes ALDH1 sont largement associées au phénotype des CSC dans bien des cancers comme le CCR (Huang et al., 2009a; Phi et al., 2018). Impliquées dans la détoxification cellulaire, elles régulent le niveau cellulaire des ROS et sont associées à la résistance des cellules cancéreuses colorectales aux chimiothérapies (Kozovska et al., 2018; Raha et al., 2014). De manière intéressante, l'expression de l'enzyme ALDH1A1 est positivement régulée par l'activité de la voie de signalisation WNT/β-caténine/TCF (Cojoc et al., 2015), elle-même connue pour être constitutivement activée dans les CCR (*cf.* section 2.2.2.a).

Le récepteur à l'acide hyaluronique CD44, connu pour être un marqueur d'enrichissement des CSC (Y. Zhou et al., 2017), joue également un rôle dans la résistance aux thérapies anti-cancéreuses

en régulant le taux de GSH impliqué dans les mécanismes de détoxification cellulaire au travers de la régulation de l'équilibre Redox et de la réduction des ROS (Ishimoto et al., 2011). L'expression de CD44 est également dépendante de la signalisation WNT/β-caténine/TCF (Wielenga et al., 1999).

En lien avec ces exemples, les CSC présentent généralement une forte activité des systèmes DDR dans plusieurs types de cancers (Peitzsch et al., 2013; Phi et al., 2018). Il a été montré que l'induction de dommages à l'ADN par irradiation était associée à une diminution du marquage des lésions DSB γH2AX en lien avec une augmentation de l'activation de la protéine ATM (Ataxia-telangiectasia mutated serine/threonine kinase), régulateur clé de la réponse aux lésions DSB de l'ADN (Stracker et al., 2013), dans des cellules au phénotype souche au sein de lignées CCR. Cette étude montre également une augmentation de l'expression de la protéine ERRC1, effectrice principale du système NER, dans ces mêmes populations cellulaires (Anuja et al., 2019). De manière intéressante, les CS coliques $LGR5^+$ sont capables d'augmenter l'activité de leurs systèmes DDR après dommages à l'ADN induits par traitement à l'azoxyméthane (AOM), un carcinogène génotoxique, révélant une certaine conservation de ces processus de défense entre les CS normales et cancéreuse (E. Kim et al., 2016).

En plus de la forte activité des mécanismes moléculaires MDR au sein de ces populations souches cancéreuses, plusieurs propriétés et phénotypes cellulaires sont associés à la résistance aux chimiothérapies.

2.3.4.b.2 Phénotype souche, plasticité et chimiorésistance

Si l'apparition du phénotype souche des cellules cancéreuses est intimement liée à l'altération du paysage génomique cellulaire et l'acquisition d'altérations génétiques se traduisant par l'activation d'oncogènes, l'inactivation de suppresseurs de tumeurs et l'activité aberrante de voies de signalisation cellulaires détaillées jusqu'ici, elle passe aussi par l'induction de la plasticité des cellules épithéliales qui acquièrent un phénotype mésenchymateux, l'EMT (Mesenchymal to epithelial transition) (Mani et al., 2008).

L'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses est principalement induite par l'activation aberrante de la voie de signalisation TGF-β à un stade tardif de la séquence adénome-carcinome (*cf.* section 2.2.2.c) qui va interagir avec d'autres voies de signalisation comme WNT, NOTCH et SHH dans l'induction de l'EMT, dont les facteurs de transcription SMAD sont au cœur de ce réseau de signalisation permettant l'échange entre les voies. Ce réseau signalétique contribue à enclencher la transformation des cellules épithéliales qui se traduit par une perte des jonctions et de la polarité épithéliale, une réorganisation du cytosquelette, de la forme et de la mobilité cellulaire.

Enfin une reprogrammation épigénétique médiée par plusieurs FT, à savoir SNAIL 1 et 2 (Snail family transcriptional repressor 1 or 2), ZEB1 et 2 (Zinc finger E-box binding homeobox 1 or 2) et TWIST (Twist family bHLH transcription factor), réprime le phénotype épithélial et favorise le phénotype mésenchymateux. L'EMT est généralement associée à un changement de l'expression des protéines d'adhésion cellulaire comme les cadhérines et intégrines ainsi que l'expression d'enzymes dégradant la matrice extra-cellulaire, les métalloprotéases (Derynck et al., 2014).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle à part entière de l'EMT dans la résistance aux thérapies, notamment ciblées, dû entre autres à une modification du répertoire des protéines de surface (B. C. Fuchs et al., 2008; Meidhof et al., 2015; Uramoto et al., 2010; Xie et al., 2012). Néanmoins, ce sont les conséquences de l'EMT qui présentent le plus de problèmes en clinique. D'une part, comme énoncé dans le premier paragraphe, l'EMT favorise le potentiel souche des cellules cancéreuses qui est associé à l'exacerbation des propriétés de résistances aux traitements, comme présenté dans la section précédente, et une capacité à soutenir la croissance tumorale (*cf.* section 2.2.3). Ensuite, il est bien admis que l'EMT favorise largement la migration des cellules cancéreuses et l'invasion tumorale ainsi que la dissémination des cellules depuis la tumeur primaire à un organe distant à l'origine de métastases (Pastushenko & Blanpain, 2019). De plus, il semble exister une forte relation entre les processus d'EMT et la dormance de cellules cancéreuses. Brièvement, la dormance, ou quiescence des cellules cancéreuses correspond à une sortie des cellules du cycle cellulaire en phase G1 pour entrer en phase G0. Cet état de dormance est réversible et dépendant de la niche cellulaire dans laquelle se trouve la cellule cancéreuse qui peut retourner dans le cycle cellulaire en fonction des signaux environnants (Phan & Croucher, 2020). Tout comme cet état de dormance, l'EMT n'est pas un état figé et peut être inversé, on parle de transition mésenchymato-épithéliale ou MET (Mesenchymal-epithelial transition). Les liens entre ces processus cellulaires sont étroits à la plasticité cellulaire mise en avant par l'équilibre entre l'EMT/MET et l'état actif/dormant des CSC pose beaucoup de problèmes en clinique (Weidenfeld & Barkan, 2018). La dormance cellulaire favorisée par l'EMT accroit fortement la résistance des CSC aux thérapies anti-cancéreuses. Ainsi, la dynamique des populations clonales influence sensiblement la réponse aux CT dans les CCR (Kreso et al., 2013) et plus récemment l'existence de plusieurs populations de CSC $LGR5^{+}$ a été mise en évidence, dont l'une d'entre elles, peu cyclique, présente une signature transcriptomique associée à la dormance cellulaire et à l'EMT. Cette population semble de plus soutenir la croissance tumorale et participer à sa régénération après traitement (Shiokawa et al., 2020).

En conclusion de cette section, l'hétérogénéité tumorale favorisée par des altérations aussi bien génomiques que génétiques favorisent l'émergence de clones plus ou moins résistants aux

chimiothérapies au travers des mécanismes MDR. Les CSC au sein de ces populations clonales présentent des mécanismes de résistance exacerbés et son particulièrement insensibles aux thérapies anti-cancéreuses. L'induction de l'EMT et de la dormance cellulaire favorise notamment ce phénotype. Les clones et CSC rémanents après traitements vont ainsi reformer la tumeur avec un phénotype potentiellement plus agressif et adapté aux thérapies alors utilisées et sont responsables de récidives tumorales chez les patients atteints de CCR. Le micro-environnement est notamment largement impliqué dans le contrôle de la biologie des CSC en régulant l'équilibre entre EMT et MET ainsi que l'entrée ou la sortie de la dormance cellulaire (Pastushenko & Blanpain, 2019; Phan & Croucher, 2020; Phi et al., 2018).

3 Le co-régulateur transcriptionnel RIP140

La protéine RIP140 (Receptor-interacting protein of 140 kDa), appelée aussi NRIP1 (Nuclear receptor-interacting protein 1), fait l'objet de nombreuses études scientifiques pour son rôle dans la co-régulation de l'activité des récepteurs nucléaires. Elle est notamment la protéine phare de notre laboratoire dont les travaux ont pour objectif de déterminer son rôle dans le développement de différents types de cancers en lien avec sa valeur pronostic en clinique. Les prochaines sections sont dédiées à la présentation de sa structure et de ses fonctions ainsi que ses implications physiopathologiques.

3.1 Généralités

L'étude des protéines co-régulatrices des facteurs de transcription est un domaine en constante expansion et le développement de techniques notamment de protéomique a étendu nos connaissances (Malovannaya et al., 2011). On estime aujourd'hui que plusieurs milliers de protéines jouent potentiellement un rôle de co-régulateur dans de nombreux processus élevant considérablement notre compréhension de la complexité et la finesse des mécanismes moléculaires cellulaires.

3.1.1 Structure et fonctions

Le co-régulateur RIP140 (Receptor Interacting Protein de 140 kDa), aussi appelé NRIP1 (Nuclear Receptor Interacting Protein-1), a été décrit comme ayant la capacité d'interagir avec de nombreux récepteurs nucléaires (RN) (pour revue, voir Nautiyal, Christian, et al., 2013) mais aussi des FT comme c-JUN (Teyssier et al., 2003).

La protéine codée par le gène *RIP140* est constituée de 1158 acides aminés pour un poids moléculaire de 140kDa dont la séquence présente plusieurs domaines fonctionnels (Figure 30). Tout d'abord, deux séquences de localisation nucléaire, NLS (Nuclear localization sequence), sont situées en position 97 et 856 de la séquence d'acides aminés permettant la translocation nucléaire (Augereau, Badia, Carascossa, et al., 2006). Le premier site monopartite présente une séquence KRKR et l'autre bipartite présente une séquence plus longue KRKRx10KKMK. Ensuite plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine ont été identifiés dont 9 présentant un motif LxxLL permettant l'interaction avec les récepteurs nucléaires (Augereau, Badia, Carascossa, et al., 2006; Heery et al., 1997) et un domaine LxxML spécifique des récepteurs RAR et RXR (Retinoid X receptor) (Chen et al., 2002).

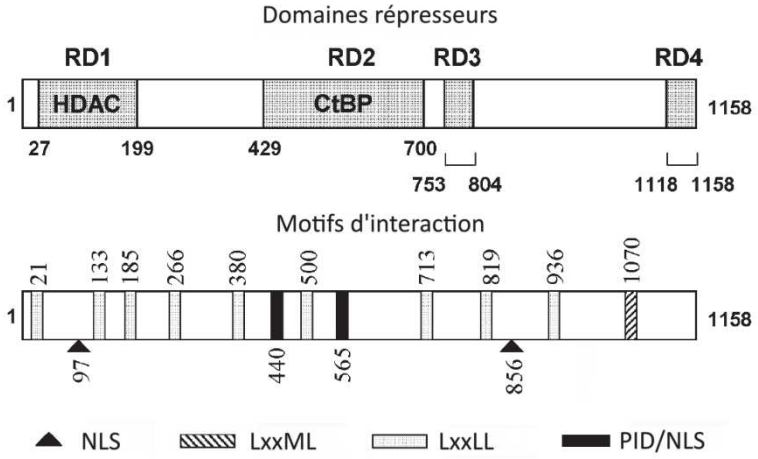


Figure 30 – Schéma représentatif des domaines et motifs de RIP140. (Adapté de Augereau *et al.*, 2006).

L'interaction de RIP140 avec ses protéines partenaires est principalement associée à un effet répresseur de la transcription. En effet, cette protéine présente 4 domaines répresseurs, RD (Repressive domain) (Figure 31). Le RD1 est situé entre les résidus 27 et 199 en position N-terminale de la protéine et recrute des enzymes de modifications de la chromatine, les HDAC (Histone deacetylases) (Wei et al., 2000). Le RD2 situé entre les acides aminés 429 et 739 recrute des CtBP (Carboxyl-terminal-binding protein) grâce à ses deux séquences PIDLS et PINLS (Vo et al., 2001). Le recrutement des CtBP en association aux HDAC induit la désacétylation des histones se traduisant par

la compaction de la chromatine inhibant l'expression des gènes (Chinnadurai, 2002; Delcuve et al., 2012). Ainsi, RIP140 réprime l'activation de la transcription *via* le recrutement de ces protéines modificatrices de la chromatine (Castet et al., 2004). Enfin les domaines RD3 et RD4 respectivement situés entre les acides aminés 753-804 et 1118-1158 sont associés à une forte répression de l'activité transcriptionnelle bien que leurs effecteurs n'aient pas été identifiés (Castet et al., 2004). De manière intéressante, RIP140 peut exercer des effets adverses sur la régulation de certains RN. C'est notamment le cas des ERR α et γ (Estrogen receptor-related receptors) pour lesquels l'activité transcriptionnelle est accrue de manière dépendante aux sites de liaison des FT SP1 et du domaine AF2 des ERR. En revanche, RIP140 exerce une activité co-répressive sur l'isoforme β des ERR (Castet et al., 2006).

L'interactome de RIP140 est aujourd'hui mieux caractérisé, il interagit principalement avec les RN mais également avec des FT, des enzymes et des protéines de modifications des marques épigénétiques de l'ADN suggérant une grande diversité de fonctions physiologiques (Figure 31) (Nautiyal, Christian, et al., 2013).

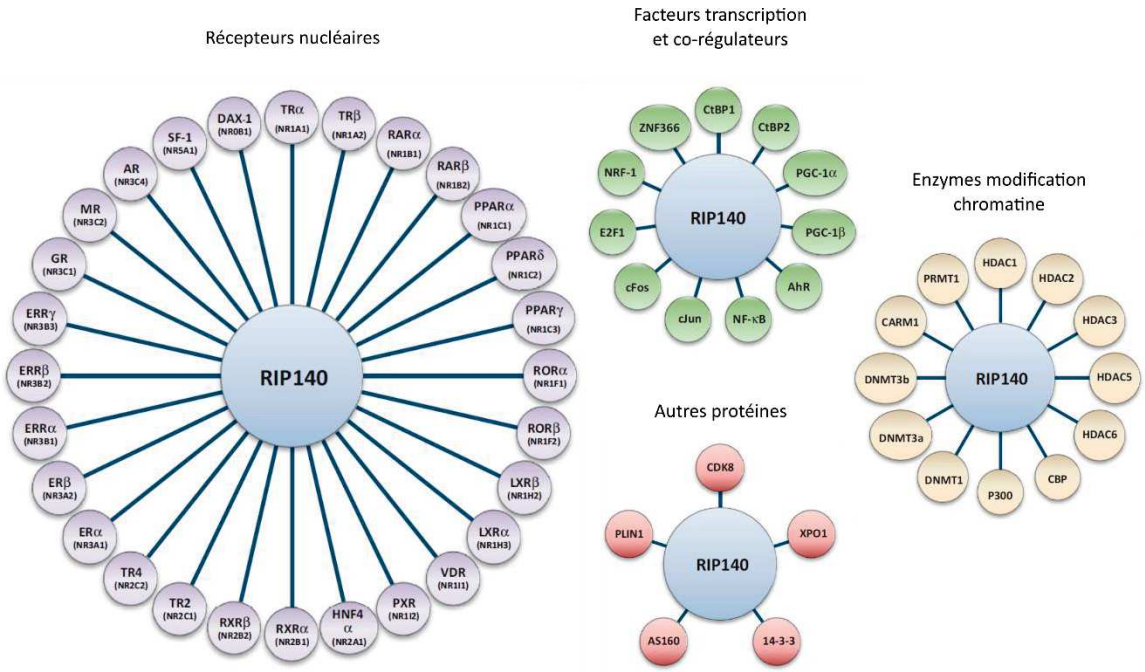


Figure 31 – Schéma représentatif de l'interactome de RIP140. (Adapté de Nautiyal, Christian and Parker, 2013).

3.1.2 Régulation de l'expression de RIP140

Le gène *RIP140* est situé sur le bras long du chromosome 21 chez l'Homme et dans le bras long du chromosome 16 chez la souris. De manière intéressante, sa séquence est dépourvue d'introns

mais présente un unique exon codant et 3 exons non-codants éliminés par épissage alternatif en région 5' du gène ainsi qu'un promoteur situé à 100 kb en amont du codon d'initiation. Relativement bien conservé entre les espèces, le gène *RIP140* présente 83% d'homologie avec son homologue murin (Augereau, Badia, Carascossa, et al., 2006).

RIP140 est exprimé de manière ubiquitaire chez l'humain (Figure 32) et retrouvé dans un grand nombre de lignées cellulaires (Augereau, Badia, Carascossa, et al., 2006; Lapierre et al., 2015). Son expression est contrôlée par une grande variété de FT et de RN. C'est notamment le cas des ER pour lesquels il a été montré que leur activation stimule l'expression de *RIP140 via* leur liaison à une séquence ERE (Estrogen reponse element), potentialisée par le FT FOXA1 (Forkhead box A1) et en compétition avec le RN AHR (Aryl-hydrocarbon receptor), et ce préférentiellement pour l'isoforme α des ER (Augereau, Badia, Fuentes, et al., 2006; Carroll et al., 2005). De manière intéressante RIP140 a d'abord été mis en évidence pour son rôle de co-activateur des ER (Cavaillès et al., 1995). Ces observations relatent de la complexité du paysage transcriptionnel associé à la régulation de *RIP140* et de la finesse des mécanismes dans lesquels il est impliqué notamment au travers de boucles de rétrocontrôle. C'est également le cas des RAR (Retinoic acid receptor) qui induisent l'expression de *RIP140* après traitement à l'acide rétinoïque *via* leurs séquences consensus situées dans la région régulatrice de *RIP140*, les RARE (Retinoid acid response element). Inversement aux ER, la sur-expression de *RIP140* inhibe l'activité transcriptionnelle de ces RN (Kerley et al., 2001). Le même schéma a été observé pour le FT E2F1 (Adenoviral early region 2 binding factor 1) en interaction avec le FT SP1 qui stimulent l'expression de *RIP140 via* leur séquences consensus, significativement augmentée à la transition G1/S et G2/M, et en retour RIP140 exerce son activité trans-répressive sur le facteur E2F1 associée à une diminution de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires (Docquier et al., 2010, 2012).

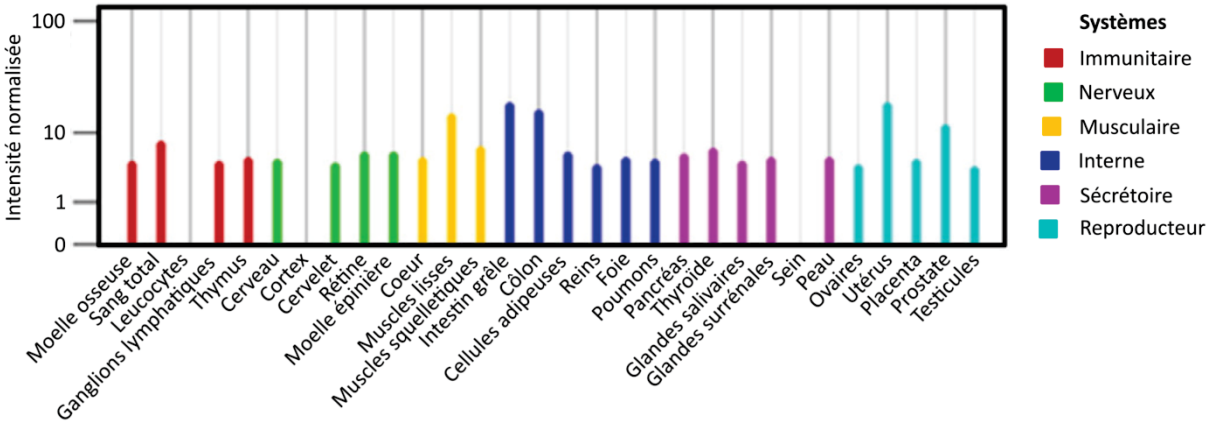


Figure 32 – Expression relative de *RIP140* dans les tissus humains. Normalisation de l'intensité d'analyses par « Microarray ». (Adapté de Lapierre *et al.*, 2015)

Ces quelques exemples soulignent la complexité du paysage transcriptionnel associé aux mécanismes de régulation de RIP140 qui peut également dépendre de différents processus biologiques comme le rythme circadien récemment mis en évidence dans les cellules hépatiques de souris où il régule l'expression diurne d'enzymes de détoxification cellulaire (M. Zhao et al., 2020).

3.1.3 Modifications post-traductionnelles et régulation de l'activité

L'intensité de l'activité répressive de RIP140 est conditionnée par la nature des modifications post-traductionnelles présentes sur plusieurs sites caractérisés tout au long de sa séquence d'acides aminés. Les modifications par acétylation de la protéine ont été identifiées sur 9 lysines situées en position 111, 158, 287, 311, 446, 482, 529, 607 et 932 (Figure 33) (Huq & Wei, 2005; Vo et al., 2001). De manière intéressante, l'acétylation de la partie N-terminale de la protéine est associée à une augmentation de son effet répresseur et de sa translocation alors que l'effet inverse est observé lorsque ce sont les résidus de la partie centrale qui sont modifiés (Huq & Wei, 2005). Ces données sont une source d'explication vis-à-vis des variations observées dans l'effet répresseur de RIP140 et de leur aspect vraisemblablement contextuel. Néanmoins, c'est l'acétylation du résidu 446 par la protéine CBP (CREB-binding protein) qui induit le phénotype le plus fort en inhibant la liaison de la protéine CtBP se traduisant par une perte de l'effet répresseur (Vo et al., 2001).

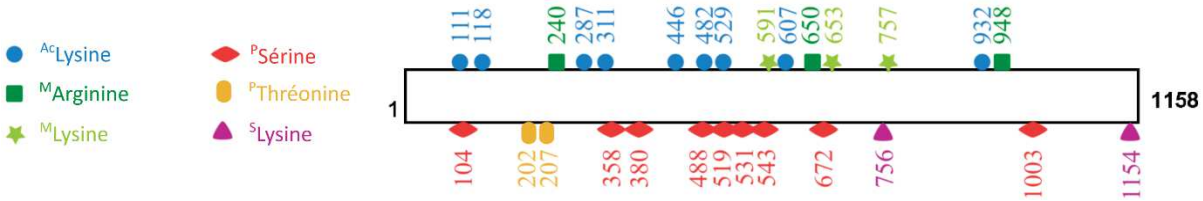


Figure 33 – Schéma représentatif des modifications post-traductionnelles du co-régulateur transcriptionnel RIP140. (Adapté de Augereau *et al.*, 2006).

Ensuite, la phosphorylation de RIP140 participe à la régulation de son activité répressive. 11 sites de phosphorylation ont été identifiés dont 9 d'entre eux correspondent à des résidus sérines situés en position 104, 358, 380, 488, 519, 531, 543, 672 et 1003 ainsi que 2 résidus thréonines situés dans le RD1 en position 202 et 207 (Figure 33) (Huq et al., 2005). La phosphorylation de ces deux résidus thréonines par les MAPK est associée à une augmentation significative de l'activité répressive de RIP140 (P. Gupta et al., 2005).

Des analyses par spectrométrie de masse et par mutagenèse dirigée ont révélé un rôle antagoniste de la méthylation de RIP140 (Figure 33). La modification des arginines situées en position 240, 650 et 948 par PRMT1 (Protein arginine methyltransferase 1) réduit l'activité répressive de

RIP140 en inhibant le recrutement des HDAC et stimulant son export nucléaire par l'interaction avec l'exportine 1 (Mostaqul Huq et al., 2006). Inversement, la méthylation des résidus lysines en position 591, 653 et 757 favorise son activité répressive. De manière intéressante, la mutagenèse dirigée des résidus arginines et lysines et l'analyse de la cinétique de leur méthylation révèle une hiérarchie entre ces résidus avec une mutation négative des résidus lysines associée à une induction de la méthylation des résidus arginines et ce de manière non réciproque. Cette hiérarchie peut refléter la régulation temporelle de la répression de certains gènes en fonction du statut de méthylation de RIP140 (Huq et al., 2009).

Enfin, la SUMOylation des résidus lysine 756 et 1154 (Figure 33), respectivement situés dans le RD3 et RD4, préférentiellement médiée par SUMO1 (Small ubiquitin-like modifier 1), est associée à la régulation de l'activité répressive de RIP140. En effet, la mutation de ces sites de modificationss post-traductionnelles est associée à une diminution de l'activité répressive de RIP140. Néanmoins, les effecteurs de ces domaines répresseurs restent toujours inconnus (Rytinki & Palvimo, 2008).

Ainsi, les modifications post-traductionnelles du co-régulateur transcriptionnel RIP140 sont largement impliquées dans la régulation positive ou négative de son activité répressive expliquant en partie les effets adverses de cette protéine dans la régulation de l'expression des gènes. Les mécanismes généraux associés à la régulation de RIP140 aussi bien en termes d'expression que d'activité en lien avec sa structure ou ses partenaires sont vastes et apparaissent souvent dépendant du contexte et de l'environnement moléculaire cellulaire. Généralement associé à une activité répressive de l'activité des FT ou RN, se traduisant par une inhibition de la transcription des gènes associés, RIP140 peut également exercer une activité activatrice sur l'expression de certains gènes. Son vaste interactome le rend essentiel à la régulation de beaucoup de processus physiologiques et pathologiques au sein desquels il exerce des fonctions adverses. RIP140 est par ailleurs le seul co-régulateur transcriptionnel rapporté pour des fonctions de co-répression et de co-activation (Nautiyal, 2017).

3.2 Rôles physiologiques de RIP140

Les connaissances du rôle du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans différents processus biologiques émergent principalement de modèles murins génétiquement modifiés présentant un KO (Knock-out) du gène *RIP140* (RIPKO) (White et al., 2000) ou sur-exprimant *RIP140* de manière constitutive (RIPTg) (Fritah et al., 2010). Deux phénotypes majeurs furent identifiés dans le modèle RIPKO, à savoir un désordre métabolique associé à une perte significative du poids des animaux (Leonardsson et al., 2004) et une infertilité chez les femelles associée à un défaut de l'ovulation (White

et al., 2000). Depuis, beaucoup d'études ont décrit maintes implications de ce co-régulateur transcriptionnel dans plusieurs processus physiopathologiques (Figure 34) (Nautiyal, 2017).

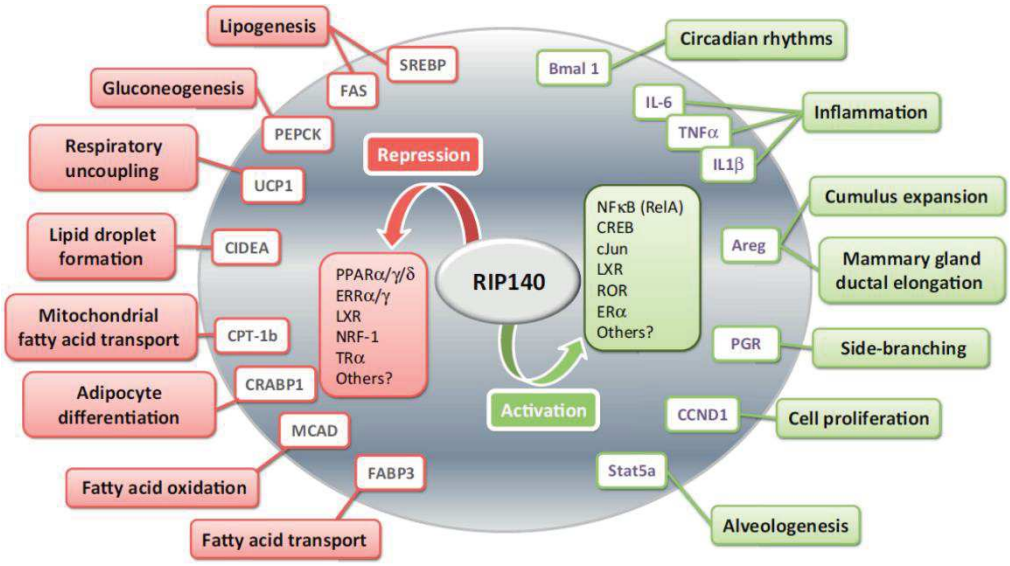


Figure 34 – Processus physiologiques et gènes cibles régulés par RIP140. (Nautiyal, Christian, et al., 2013).

3.2.1 Métabolisme

L'influence de RIP140 sur le métabolisme fut découverte au travers du modèle murin RIPKO dont les individus présentent une perte de poids significative, une résistance à la stéatose hépatique et l'obésité induite par un régime « high fat » ainsi qu'une forte consommation d'oxygène en comparaison aux souris sauvages (Leonardsson et al., 2004).

3.2.1.a Le tissu adipeux

La perte de poids des souris n'exprimant plus *RIP140* est associée à une diminution d'environ 70% de la masse graisseuse (Leonardsson et al., 2004). Le tissu graisseux, ou adipeux, est globalement divisé en deux types. Le tissu adipeux blanc majoritaire chez l'adulte, WAT (White adipose tissue), a pour fonction principale le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides. Le tissu adipeux brun majoritairement présent chez les nouveaux nés, BAT (Brown adipose tissue), présente une fonction de thermogenèse par l'oxydation des acides gras (Saely et al., 2012). RIP140 est fortement exprimé dans le WAT où il réprime l'expression de gènes impliqués dans l'absorption du glucose, la glycolyse, le cycle de Krebs, l'oxydation des acides gras, la biogenèse mitochondriale et la phosphorylation

oxydative influençant ainsi largement le métabolisme énergétique de ce tissu (Powelka et al., 2006). De plus, la délétion de *Rip140* dans des lignées murines d'adipocytes primaires issus du WAT entraîne une augmentation de l'expression de certains marqueurs du BAT tel que les gènes *UCP1* (*Uncoupling protein 1*), *CPT1β* (*Carnitine palmitoyltransferase 1b*) et *CIDEA* (*Cell-death-inducing DEF45-like effector A*). Ainsi l'expression de *Rip140* régule la balance énergétique du WAT (Christian et al., 2005). Moléculairement parlant, RIP140 interagit avec beaucoup de FT et RN impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique au travers des gènes *PPAR α* et *γ* (*Peroxisome proliferator activated receptor*), *TR* α et β (*Thyroid hormone receptor*) et ERRα, associé à une répression de leurs gènes cibles. De plus, ce co-régulateur transcriptionnel entre en compétition avec le co-activateur transcriptionnel PGC-1γ (PPARG coativator 1 gamma) avec un effet antagoniste sur la régulation de ses gènes, comme *CIDEA*, notamment au travers de leur interaction avec ERRα. RIP140 est également associé à une inhibition de l'expression de PGC-1γ. La balance entre ces deux co-régulateurs transcriptionnels semble essentielle à la régulation du phénotype adipeux où RIP140 réprimerait une transition du WAT vers un phénotype BAT (Kiskinis et al., 2014).

3.2.1.b Le foie

Le foie est un organe essentiel à la régulation du métabolisme énergétique. Il contrôle la glycémie à travers le catabolisme du glucose, la glycolyse, ou son anabolisme, la néoglucogenèse. Il régule également le stockage et le transport des acides gras ainsi que la production et la dégradation des lipides au travers de la lipogenèse et la β-oxydation (Rui, 2014). De plus, il joue un rôle important dans la digestion en produisant de la bile. Enfin, le foie est l'organe de détoxification par excellence en métabolisant de nombreux agents toxiques et drogues ingérés par le corps (Kalra et al., 2021).

Le rôle de RIP140 dans la physiologie hépatique est différent en fonction des gènes dont il régule l'expression et des voies métaboliques qu'il impacte. Il est connu pour réguler l'activité du RN LXR (Liver X receptor) contrôlant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, du cholestérol et du glucose. En revanche, des effets adverses ont été observés en fonction de la méthode utilisée. Dans un cas, une déplétion de *RIP140* est associée à un effet co-répresseur de l'activité de LXR sur ses gènes cibles (Berriel Diaz et al., 2008), tandis que la perte constitutive du gène *RIP140* est associée à un effet co-activateur de l'activité de LXR (Herzog et al., 2007). Néanmoins, basé sur le modèle murin RIPKO, RIP140 réprime l'activité de LXR inhibant ainsi la lipogenèse et le stockage des acides gras prévenant la stéatose hépatique, accumulation de corps gras dans les hépatocytes induite par un régime « high fat » comme observé par Leonardsson et collègues (Leonardsson et al., 2004). De plus, le co-régulateur transcriptionnel réprime la néoglucogenèse en inhibant l'expression de

PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*), gène cible de LXR, et de la *G6Pase* (*Gluocse-6-phosphatase*), deux enzymes clés de la néoglucogenèse (Herzog et al., 2007).

Enfin RIP140 est impliqué dans les mécanismes de détoxification hépatique. Il a été montré que son expression était notamment dépendante du rythme circadien dans le foie et qu'elle est associée à l'inhibition de l'expression du cytochrome p450 2b10 (*Cyp2b10*), enzyme de détoxification, au travers de la co-répression des RN CAR (Constitutive androstane receptor) et PXR (Pregnane X receptor) (M. Zhao et al., 2020).

3.2.1.c Le tissu musculaire

L'utilisation de modèles génétiques murins a permis de mettre en évidence le rôle de RIP140 dans le métabolisme du tissu musculaire comme dans le tissu strié squelettique et le tissu cardiaque.

Le muscle strié squelettique est composé de cellules musculaires appelées rhabdomyocytes contenant des fibres d'actine et de myosine responsables de la contraction. L'expression de *RIP140* dans ce tissu est dépendante du type de fibre musculaire. Ces fibres sont classées en 3 sous-types en fonction de l'isoforme de la myosine (Talbot & Maves, 2016). Les fibres de type I sont associées à une contraction lente basée sur une respiration aérobie et sont riches en mitochondries. Les fibres de type II sont à contraction plus lente et présentent une forte expression de *RIP140*. On distingue le sous-type IIa, basé sur une respiration aérobie avec la production d'ATP par phosphorylation oxydative et le sous-type IIb/IIx, basé sur un métabolisme glycolytique en anaérobie présentant moins de mitochondries. La délétion de *RIP140* dans ce tissu est associée à un rougissement des muscles qui se traduit par une augmentation de la respiration cellulaire par phosphorylation oxydative et du nombre de mitochondries. Au niveau moléculaire, RIP140 réprime l'expression de gènes cibles de PPARδ et ERRα impliqués dans la phosphorylation oxydative, la β-oxydation, le cycle de Krebs et la glycolyse (Seth et al., 2007). De manière semblable au tissue adipeux (*cf.* section 3.2.1.a), cette étude propose que la régulation de ces gènes, notamment par le RN PPAR, et du phénotype des cellules musculaires résiderait dans un équilibre entre les rôles opposés de PGC-1α, co-activateur de PPARδ, et du co-répresseur RIP140 (Benton et al., 2008; Handschin, 2010).

L'utilisation d'un modèle murin transgénique sur-exprimant *RIP140* de manière ubiquitaire a révélé une altération des fonctions cardiaques associée à une hypertrophie et une fibrose ventriculaire responsables d'une augmentation de la mort des individus à 5 mois après naissance. Ce phénotype se traduit notamment au niveau cellulaire par une diminution du potentiel de membrane mitochondrial et de la consommation d'oxygène. En lien avec ces observations, la sur-expression de *RIP140* est associée à une répression de l'expression de gènes impliqués dans l'activité mitochondriale comme le

cytochrome C, la *NADH déshydrogénase* et le FT mitochondrial, *MTFA* (*Mitochondrial transcription factor A*). Ensuite, le métabolisme des acides gras est modifié au travers de la répression des gènes *FABP3* (*Fatty acid binding protein 3*), *CD36* et *FATP* (*Fatty acid transport protein*). Il est intéressant de noter que la plupart de ces gènes sont des cibles connues des RN PPAR et ERR (Fritah et al., 2010).

3.2.2 Inflammation

En plus de son impact direct sur les adipocytes, RIP140 influence le remodelage de ce tissu par la régulation du phénotype des macrophages. En effet, ce tissu est largement infiltré par les cellules du système immunitaire et notamment les macrophages. Dans un contexte d'obésité, cette population de cellules est étroitement liée à l'inflammation de ce tissu. Les macrophages présentent une capacité de polarisation se traduisant par un phénotype M1, pro-inflammatoire visant à éliminer les pathogènes et inhibant la prolifération et l'activité des cellules environnantes en relarguant des cytokines pro-inflammatoires, et un phénotype M2, phénotype alternatif anti-inflammatoire supportant la cicatrisation (C. Li et al., 2018). Dans le tissu adipeux, le phénotype M1 est associé à l'insulino-résistance, à savoir une perte de sensibilité des cellules à l'insuline se traduisant par une altération de la captation et du stockage du glucose et enfin un taux anormalement élevé de glucose sanguin pouvant avoir des conséquences pathologiques graves (Kang et al., 2008; Petersen & Shulman, 2018).

Dans ce contexte, RIP140 joue un rôle de co-activateur dans l'expression des gènes impliqués dans le phénotype pro-inflammatoire des macrophages. Il favorise notamment l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le *TNF-α* (*Tumor necrosis factor α*), l'*interleukine 1β* et *6* (*IL-1β et 6*) au travers de la stabilisation d'un complexe tripartite composé de la protéine NF-κB (Nuclear factor κB), FT clé de la réponse inflammatoire, de la protéine CBP, co-activateur des FT, et de lui-même (Zschiedrich et al., 2008). De manière intéressante, l'absence d'expression de *RIP140* spécifiquement dans les macrophages est associée à une diminution du phénotype M1 des cellules circulantes et infiltrant le tissu adipeux ainsi qu'à un rétablissement du métabolisme pour ces souris suivant un régime « high fat » (P.-S. Liu et al., 2014).

3.2.3 Ovulation

L'un des phénotypes majeurs observé chez les individus femelles du modèle RIPKO est une infertilité due à un défaut dans le processus d'ovulation. Bien que l'étude histologique des gonades ait révélé une maturation normale du follicule et de l'ovocyte, les souris RIPKO présente l'incapacité

à expulser l'ovule mature hors des ovaires qui reste attaché aux cellules granuleuses du follicules, les cellules cumulus, qui soutiennent sa maturation finale avant et après expulsion (White et al., 2000). L'expulsion de ce complexe COC (Cumulus cell-oocyte complex) est déclenchée par un pic d'hormone lutéinisante, LH (Luteinizing hormone), qui induit une cascade d'évènements essentielle à la maturation finale de l'ovocyte, son détachement du follicule et son expulsion, appelée l'expansion du cumulus (Sánchez & Smitz, 2012). Plus tard, des travaux ont mis en évidence un défaut dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au pic LH chez les souris femelles RIPKO, à savoir des facteurs de croissance similaires à l'EGF, (EGF-like growth factors), l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG) et la betacelluline (BTC) (Nautiyal et al., 2010; Tullet et al., 2005). Il a ainsi été démontré que RIP140 régule ces processus en stimulant l'expression de ces gènes au travers du co-activateur CREB et du FT c-JUN avec un effet vraisemblablement co-activateur (Nautiyal et al., 2010).

3.2.4 Développement de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire est également affecté par l'expression de *RIP140*. La croissance de ce tissu suit 3 étapes bien précises avec une première étape embryonnaire, puis pubertaire et enfin reproductive. Lors du développement embryonnaire, plusieurs évènements se succèdent avec la différenciation des cellules de l'endoderme en cellules mésenchymateuses mammaires et l'ectoderme qui se spécifie en cellules épithéliales mammaires. Ce tissu épithélial mammaire primitif forme ensuite des sphères qui descendent dans le tissu mésenchymateux en initiant la formation de canaux. A la naissance, le tissu mammaire représente un réseau primitif se développant jusqu'à la puberté, caractérisé par la formation de la couche basale cellulaire entourant les alvéoles mammaires. A l'âge adulte, ce réseau se complexifie et s'intensifie en prévision de la lactation. Le développement du tissu mammaire dépend largement des interactions épithélio-stromales essentielles à la différenciation cellulaire et la morphogenèse du réseau mammaire (Macias & Hinck, 2012).

L'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés a révélé un effet réciproque de la perte d'expression et de la sur-expression de *RIP140* au cours du développement mammaire. La perte constitutive de *RIP140* dans les modèles RIPKO induit un défaut de l'élongation des canaux galactophores associé à un réseau alvéolaire sommaire à la puberté. Au contraire, l'expression ectopique du co-régulateur transcriptionnel se traduit par une croissance précoce du tissu mammaire associée à une division cellulaire exacerbée et une forte ramification du réseau de canaux. L'expression ectopique de *RIP140* étant associée à une mortalité précoce due à un défaut des

fonctions cardiaques, des expériences de recombinaison tissulaire ont été nécessaires à l'étude du développement de la glande mammaire qui consiste à extraire le tissu épithéliale RIPTg pour le greffer chez une souris WT. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence un effet positif de RIP140 sur l'expression de gènes régulateurs du développement mammaire comme *Areg*, la *cycline D1* (*Ccdn1*), *c-Myc* et *Stat5a* au travers de la co-activation de ERα. Ces régulations transcriptionnelles sont associées à une augmentation de la population cellulaire basale. De manière intéressante, cette population est connue pour héberger les cellules souches mammaires (Visvader & Stingl, 2014). En relation avec ces observations, une augmentation de la prolifération et de la proportion de cellules progénitrices luminales a également été observée (Nautiyal, Steel, et al., 2013). Ainsi RIP140 se présente comme un régulateur majeur du développement mammaire au travers de son influence positive sur la prolifération cellulaire par la co-activation de ERα.

3.2.5 Homéostasie intestinale

La physiologie de l'épithélium intestinal dépend également de l'expression de *RIP140*. Une étude réalisée par l'équipe a notamment révélé l'impact de RIP140 dans la régulation de l'homéostasie épithéliale (Lapierre et al., 2014).

En conditions normales physiologiques et comme beaucoup de facteurs contrôlant l'homéostasie épithéliale de l'axe crypto-villositaire, l'expression de *Rip140* est graduelle de manière croissante depuis le fond des cryptes jusqu'au sommet des villosités épithéliales et restreinte au noyau cellulaire (Figure 35). En lien avec ces observations, l'utilisation de modèles RIPKO et RIPTg a révélé une influence du co-régulateur transcriptionnel sur certaines dimensions du petit intestin des souris avec un effet réciproque entre la perte ou le gain d'expression de *Rip140* en comparaison aux individus sauvages. En premier lieu, les souris RIPKO présentent un intestin plus court ainsi que des villosités plus grandes suggérant un changement dans la dynamique épithéliale. En lien avec ces données, la révélation de la prolifération cellulaire par un marquage à l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), intercalant de l'ADN aux cellules en phase S, montre une augmentation du nombre de cellules en cours de réplication chez les individus RIPKO (Figure 35) confirmé notamment par l'induction de l'expression de *c-Myc* et *Pcna* (*Proliferating cell nuclear antigen*), deux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ensuite, le marquage des lésions à l'ADN par un essai TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling), révèle une augmentation du nombre de cellules en apoptose pour les individus RIPKO (Figure 35). Ainsi, Rip140 semble freiner le dynamisme épithélial en réprimant la prolifération et l'apoptose, deux mécanismes à la base du renouvellement épithélial (*cf.* section 1.2.1).

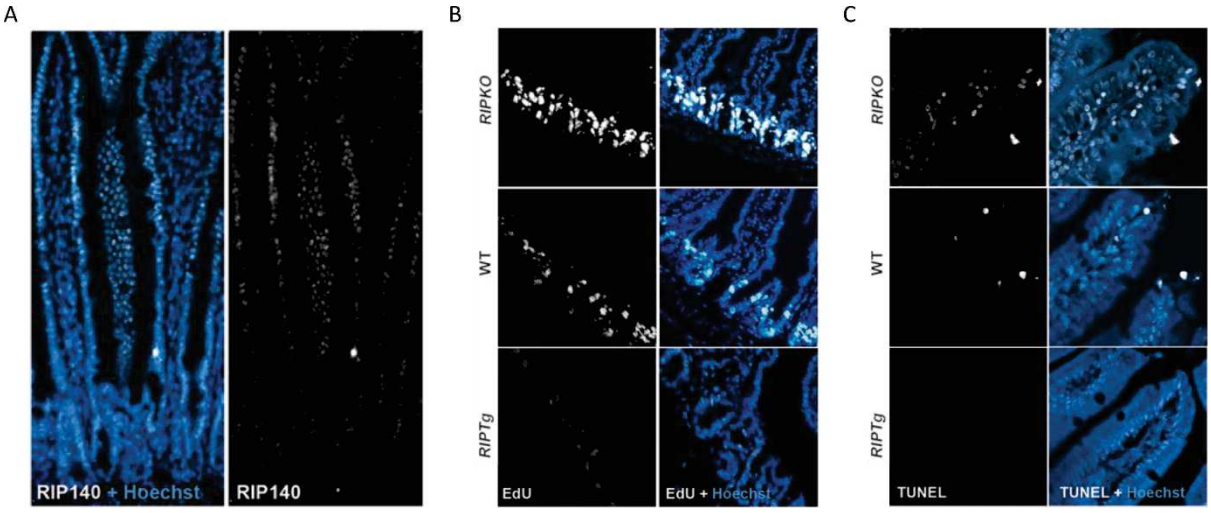


Figure 35 – Rip140 réprime la dynamique épithéliale intestinale. (A) Photo représentative du marquage par immunofluorescence de la protéine Rip140 (en blanc) dans l'épithélium intestinal de souris sauvages (WT) avec un contre-marquage nucléaire au Hoechst (en bleu). (B) Marquage des cellules en phase S par incorporation d'EdU et révélation par immunofluorescence (blanc) et (C) révélation des cellules en apoptose par essai TUNEL (en blanc) dans l'épithélium intestinal de souris RIPKO, sauvages (Wild-type – WT) et RIPTg avec un contre-marquage nucléaire au Hoechst (en bleu) (Lapierre et al., 2014).

De manière intéressante, la variation de l'expression de *Rip140* dans les modèles murins est associée à une modification de l'activation de la protéine effectrice de la signalisation WNT, la β-caténine. En effet, la délétion du co-régulateur transcriptionnel est associée à une augmentation de la β-caténine active, ABC (Active β-catenin), et de l'expression de certains de ses gènes cibles comme *c-Myc*, *Cldn1* (*Claudin 1)*, *Edn1* (*Endothelin 1)*, *Jag1* (*Jagged 1*) et *c-Jun*. De plus, ces observations sont accompagnées par une diminution de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs *Apc*, *Csk1e* et *Axin2* dont les protéines font partie du complexe de dégradation de la β-caténine. Confirmé dans des lignées cellulaires CCR, RIP140 régule positivement l'expression du gène *APC* en étant recruté sur la région proximale de son promoteur potentiellement à travers d'une interaction avec le FT SP1 qui possède une séquence consensus à ce niveau.

Ainsi RIP140 régule la dynamique épithéliale en réprimant la prolifération et l'apoptose des cellules épithéliales intestinales au travers de la répression de l'activation de la β-caténine par l'induction de l'expression du gène suppresseur de tumeur *APC* (Figure 36). En lien avec ces résultats et le rôle largement décrit de la signalisation WNT dans la régulation de la physiologie et notamment le maintien du comportement et de l'identité des CSI (*cf.* section 1.3.1.a), RIP140 pourrait être un acteur clé dans la régulation du caractère souche intestinal. Cette hypothèse est notamment corroborée par l'altération de la régénération épithéliale induite après irradiation des souris RIPTg. En effet, l'équipe présente notamment dans cette étude un défaut de la régénération épithéliale intestinale chez les souris RIPTg en comparaison aux souris sauvages tandis que ce processus est

exacerbé dans les souris RIPKO. Connaissant le rôle crucial des CSI et particulièrement des cellules de réserves dans la régénération post-irradiation (*cf.* section 1.2.3.b et c), RIP140 pourrait être impliqué dans le contrôle du comportement ou de l'identité de ces populations cellulaires.

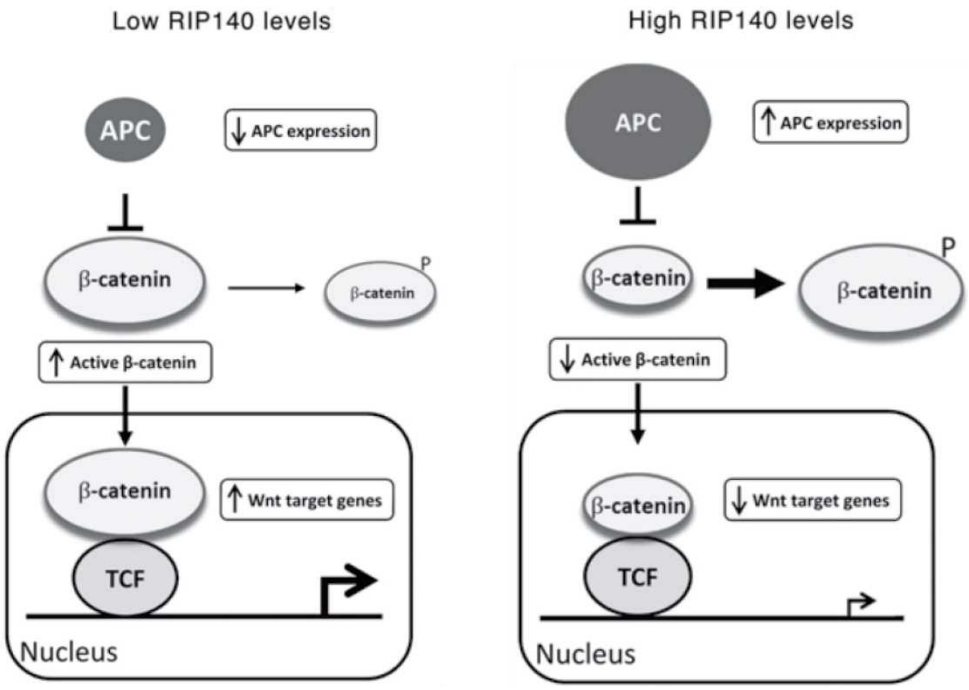


Figure 36 – Schéma représentatif de la régulation d'APC et de l'activité de la voie WNT/β-caténine par RIP140. (Lapierre et al., 2014).

3.3 Tumorigenèse

3.3.1 Cancers hormono-dépendants

Par ses fonctions biologiques dans le tissu mammaire et l'ovaire ainsi que ses fonctions régulatrices de l'activité des RN et notamment des ER, RIP140 apparait être un candidat intéressant dans le développement tumoral des cancers hormono-dépendants.

3.3.1.a Cancers du sein

Les cancers du sein font partie des cancers les plus fréquents à travers le monde avec plus de 2 millions de nouveaux cas par an chez la femme. Il touche environ 25% de la population féminine et reste la plus forte cause de mortalité associée aux cancers (F. Bray et al., 2018).

Comme présenté dans la section précédente, RIP140 est impliqué dans le développement mammaire avec un effet pro-prolifératif au travers de la co-activation du ERα et l'induction de

l'expression de ses gènes cibles (*cf.* section 3.2.4). Plusieurs études ont par ailleurs permis de comprendre l'implication de RIP140 dans le développement tumoral des cancers du sein (Nautiyal, 2017). Comme les CCR, les cancers du sein sont classifiés en fonction de la nature de la tumeur, son stade et dans les cas de cancers du sein en fonction du profil d'expression de différents marqueurs dont les 3 principaux sont les ER, les PR (Progesterone receptors), et les récepteurs HER2 (Human epiderminal growth factor receptor 2), associés à des pronostics cliniques différents (Yersal & Barutca, 2014).

Plusieurs études ont démontré l'occupation des sites ERE à la fois par les ER et par RIP140 dans des cellules cancéreuses du sein. De manière intéressante, l'expression des ER n'est pas homogène dans les cancers du sein dont les cellules peuvent exprimer soit ERα ou ERβ mais également les deux. ERα est associé à un effet pro-prolifératif par l'expression de la plupart des gènes du cycle cellulaire en réponse à l'œstradiol (E2), un agoniste des ER (Joseph et al., 2010). RIP140 se présente comme un co-activateur de ce RN et est essentiel à la formation du complexe d'activation de la transcription par ERα au travers de son interaction avec les FT FOXA1 et GATA3 (GATA binding protein 3) ainsi que les protéines co-activatrices p300 (E1A binding protein p300), CBP et p160 (MYB binding protein 1a) (Rosell et al., 2014). Quant à lui, ERβ seul apporte un effet anti-prolifératif avec une augmentation des cellules en phase G1/S dans les populations exprimant uniquement ce RN, activité palliée par l'effet trans-répresseur de RIP140 sur ERβ. De manière intéressante, ERβ palie la forte activité de ERα dans les cellules exprimant les deux formes du RN. A la lumière de ces observations, la perte d'expression de *RIP140* dans les cellules du cancer du sein est associée à une diminution de la prolifération cellulaire et de l'expression de gènes du cycle cellulaire par la perte de la trans-activation de ERα et de ERβ, avec qui RIP140 interagit préférentiellement (Madak-Erdogan et al., 2013). De plus, RIP140 favorise l'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses du sein en inhibant l'expression de *BCL2* (*BCL2 apoptosis regulator*), un gène anti-apoptotique (Ruddy et al., 2014). Chez les patientes ayant reçu un traitement hormonal au tamoxifène, un antagoniste des ER, la classification de l'expression des gènes dépendant de RIP140 permet notamment de stratifier la réponse et le pronostic de ces individus et permettrait d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein (Rosell et al., 2014).

Néanmoins, RIP140 n'exerce pas qu'un effet pro-prolifératif dans les cancers du sein. Plusieurs travaux démontrent son rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses du sein au travers de son interaction avec différents partenaires. Comme énoncé précédemment (*cf.* Section 3.1.2), il existe une boucle de rétro-contrôle négatif entre l'expression de *RIP140* stimulée par le FT E2F1 en interaction avec SP1 et en retour, RIP140 exerce son activité co-répressive sur ce FT (Docquier et al., 2012; Fritah et al., 2010). Les facteurs de la famille E2F et notamment E2F1 font partie

de l'axe de signalisation CDK-RB (Retinoblastome transcriptional corepressor)-E2F formant la machinerie centrale de régulation du cycle cellulaire s'assurant le bon déroulement de toutes les étapes de la réplication à la division cellulaire. Les facteurs E2F sont des FT régulant la plupart des aspects du cycle cellulaire et leur régulation minutieuse dépend de beaucoup de processus, de la transcription aux modifications post-traductionnelles. L'altération de la régulation de ces processus est largement décrite et est associée à une forte activité oncogénique des facteurs E2F notamment dans le cancer du sein (Kent & Leone, 2019). La répression de l'activité de E2F1 par RIP140 est associée à une diminution du nombre de cellules en phase S dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses mammaires humaines au travers de l'inhibition de l'expression des cyclines *CCNE1* et *CCNB2*. De plus, la corrélation inverse entre l'expression de *RIP140* et *E2F1* chez les patientes atteintes du cancer du sein permet de discriminer les cancers de type luminaux des basaux (Docquier et al., 2010). En relation avec l'effet anti-prolifératif de RIP140 dans les cancers du sein, il a également été montré que ce co-régulateur transcriptionnel est requis pour l'expression du co-répresseur *LCoR* (*Ligand-dependent corepressor*) qui exerce une forte activité répressive de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Au travers du recrutement de HDAC et CtBP, LCoR réprime l'expression du gène *CDKN1A* codant pour la protéine p21 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire en phase G1. De manière intéressante, RIP140 est également nécessaire à l'activité de ce-corégulateur transcriptionnel par interaction mutuelle et leur expression est positivement corrélée à la survie globale des patientes (Jalaguier et al., 2017).

3.3.1.b Cancers ovariens

Moins représentés que les cancers du sein, les cancers de l'ovaire sont les septièmes cancers les plus fréquents chez la femme avec presque 300 000 nouveaux cas par an (F. Bray et al., 2018). C'est en revanche le troisième cancer gynécologique le plus fréquent et avec le taux de mortalité le plus élevé (Momenimovahed et al., 2019).

Comme dans le cancer du sein, les ER jouent un rôle prépondérant dans la régulation de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses ovariennes et un défaut d'expression de l'un ou l'autre est associé à un déséquilibre dans ces processus de régulation. Le ERα présente une activité pro-prolifératives par la transcription de ses gènes cibles tandis que le ERβ réprime la prolifération cellulaire. Même si ces deux RN présentent une forte homologie de séquence, ils possèdent des différences notamment dans leur domaine LBD avec une certaine spécificité de l'un ou l'autre pour certains ligands. En effet, la stimulation par des agonistes naturels du ERβ est associée à une diminution de la survie, de la migration, l'invasion *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* des

cellules cancéreuses ovariennes ainsi qu'une augmentation de l'apoptose et de leur sensibilité aux chimiothérapies (J. Liu et al., 2017). Tandis que la signalisation œstrogène, induite par le pan-agoniste E2, est naturellement inhibée par la sur-expression du *ERβ* ainsi que son effet mitogène. De manière similaire au cancer du sein, RIP140 exerce une activité répressive sur ERβ inhibant l'expression de ces gènes cibles se traduisant par un effet mitogène du co-régulateur transcriptionnel.

En conclusion de cette section, les ER et notamment la balance entre ERα et ERβ est essentielle à la régulation de la physiologie de la glande mammaire et de l'ovaire ainsi qu'au contrôle de la tumorigenèse associée à ces tissus. Un déséquilibre de cette balance engendre des conséquences sensibles notamment dans la régulation de la prolifération cellulaire. Dans les cancers du sein comme de l'ovaire, RIP140 apparait comme un co-régulateur de ces RN avec des effets parfois adverses en termes de régulation de leur activité mais se traduisant par un effet pro-tumoral dans ces tissus. Néanmoins, comme dans beaucoup d'autres cas, les régulations transcriptionnelles associées à RIP140 sont vastes et complexes et il peut exercer des effets adverses au sein d'un même cancer comme c'est le cas avec LCoR dans les cancers du sein soulignant un rôle anti-tumoral.

3.3.2 Cancers digestifs

3.3.2.a Hépatocarcinome

Les cancers du foie compte parmi les cancers les plus fréquents au monde, ce sont les sixièmes en terme d'incidence et les quatrièmes en terme de mortalité (F. Bray et al., 2018). L'hépatocarcinome est la forme la plus fréquente des cancers du foie qui se présente la plupart du temps dans un contexte cirrhotique ou associé à une hépatite chronique. Ces cancers sont généralement associés à une sur-activation de la signalisation WNT/β-caténine caractérisée par une accumulation nucléaire de son effecteur dans plus de 50% des cas (Cavard et al., 2008).

De manière intéressante, une étude a révélé l'impact significatif de RIP140 dans le développement tumoral des hépatocarcinomes. En effet, on observe une réduction de l'expression du co-régulateur transcriptionnel de 70% dans les cellules cancéreuses en comparaison au tissu sain. De plus, la sur-expression de *RI1P40* dans des lignées cellulaires cancéreuses hépatiques est associée à une diminution de la croissance et de la migration cellulaire avec un effet miroir par sa déplétion également associée à une augmentation de la croissance et du potentiel métastatique de ces cellules *in vivo*. Cet effet anti-tumoral de RIP140 semble passer par une inhibition de la voie de signalisation WNT marquée par une réduction de l'expression des gènes cibles de la β-caténine avec laquelle il interagit (D. Zhang et al., 2015).

L'intérêt thérapeutique que présente alors RIP140 dans les cancers du foie a été récemment confirmé par l'utilisation de la Simvastatine, un hypolipidémiant de la famille des statines, dans une lignée cellulaire cancéreuse hépatique humaine. En effet, l'utilisation de cette molécule en combinaison avec la sur-expression de *RIP140* est associée à une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses et une augmentation de leur apoptose en corrélation avec une réduction de l'expression de la *β-caténine* et de l'expression de ses gènes cibles. De plus, la Simvastatine est capable d'induire l'expression de *RIP140* qui agit en synergie dans l'effet anti-tumoral de la molécule (Xia et al., 2018).

3.3.2.b Cancers gastriques

Les cancers gastriques représentent le deuxième type de cancer le plus fréquent du système digestif après le CCR. Tous types de cancers confondus, ils sont les cinquièmes en termes d'incidence et les troisièmes en termes de mortalité représentant environ 1 million de nouveaux cas par an avec un prévalence chez l'homme (F. Bray et al., 2018). Comme dans beaucoup de cancers, le dépistage des patients est essentiel à leur prise en charge. En effet, la survie des patients sur 5 ans est d'environ 90% pour une prise en charge aux stades I tandis qu'elle chute dramatiquement à moins de 20% pour des patients pris en charge au stade III, soulignant l'intérêt fondamental de l'amélioration du dépistage (Rawla & Barsouk, 2019).

De manière similaire à l'intestin, le développement des cancers gastriques est largement associé à la dérégulation de grandes voies de signalisation cellulaire comme WNT, NOTCH et HIPPO ainsi que l'inactivation de suppresseurs de tumeurs comme P53 ou APC et l'activation d'oncogènes comme KRAS (Zheng et al., 2004). A la lumière du rôle de RIP140 notamment dans la tumorigenèse hépatique (*cf.* section 3.3.2.b) et la physiologie intestinale (*cf.* section 3.2.5) au travers du contrôle de l'activité de la voie WNT, des études ont été menées par notre équipe sur l'impact potentiel de ce co-régulateur transcriptionnel dans la tumorigenèse gastrique. Les travaux de Triki et collègues ont mis en évidence la valeur pronostic de RIP140 et de son partenaire LCoR dans ces cancers. En effet, grâce à l'analyse de l'expression de ces deux co-régulateurs transcriptionnels dans des tumeurs de patients, il a été observé une corrélation positive de leur expression qui est significativement plus forte dans le tissu tumoral gastrique en comparaison au tissu sain. De plus, leur forte expression est associée à des stades tumoraux avancés et un état moins différencié en ce qui concerne RIP140. De manière générale, l'expression de ces co-régulateurs transcriptionnels est inversement corrélée à la survie globale des patients faisant d'eux des marqueurs de mauvais pronostic dans les cancers gastriques (Triki et al., 2017).

De manière surprenante, des travaux réalisés par notre équipe montrent que l'induction de l'expression de *RIP140* et de *LCoR* dans les cancers gastriques est associée à une diminution de la prolifération et de la migration dans des lignées cellulaires cancéreuses gastriques humaines. Au niveau moléculaire, ce phénotype est associé à l'induction de l'expression du gène *p21* impliqué dans la régulation négative du cycle cellulaire, par la transactivation du FT TEAD, effecteur de la voie de signalisation HIPPO (Triki et al., en préparation).

3.3.2.c Cancers colorectaux

Comme présenté précédemment (*cf.* section 2.1.1), les CCR comptent parmi les cancers les plus fréquents au monde, ce sont les troisièmes en termes d'incidence et les seconds en termes de mortalité et sont la forme la plus représentée des cancers digestifs (F. Bray et al., 2018).

L'étude du rôle de ce co-régulateur transcriptionnel dans l'homéostasie épithéliale intestinale, réalisée par Lapierre et collègues, a révélé un rôle de cette protéine dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales, deux mécanismes majeurs de la dynamique de ce tissu. RIP140 réprime notamment ces aspects cellulaires au travers du contrôle négatif de l'activité de la voie de signalisation WNT par l'induction de l'expression du gène suppresseur de tumeur *APC*, dont la protéine fait partie intégrante du complexe de dégradation de la β-caténine (Figure 37) (Lapierre et al., 2014).

De manière intéressante, et comme exposé tout au long de cette introduction, cette voie de signalisation cellulaire est une des voies majeures de la physiologie intestinale notamment au travers du contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire le long de l'axe crypto-villositaire mais surtout dans la régulation de l'identité et du comportement des CSI, clé de voûte de la physiologie intestinale (*cf.* section 1.3). De plus, les perturbations associées à la perte de contrôle de l'activité de cette voie de signalisation sont connues pour être un des évènements initiateurs de l'oncogenèse intestinale soutenant le développement tumoral ainsi que l'apparition de CSC (*cf.* section 2.2).

Comme attendu, RIP140 régule également le comportement des cellules CCR humaines au travers du mécanisme susmentionné. En effet, l'utilisation de ces lignées cellulaires a permis de mettre en évidence une répression non seulement de leur prolifération mais également de la croissance tumorale une fois greffées chez des souris immunodéprimées. Ces observations sont associées au niveau moléculaire à une diminution de l'activation de la β-caténine se traduisant par une diminution de l'expression de ses gènes cibles et ce de manière dépendante à l'induction de l'expression d'*APC*. Enfin, il est important de noter que l'expression de *RIP140* chez les patients atteints de CCR est diminuée dans les cellules cancéreuses en comparaison au tissu sain. De plus, son expression est

inversement corrélée à la survie des patients faisant de cette protéine un marqueur clinique intéressant notamment pour son rôle protecteur dans les CCR (Figure 37) (Lapierre et al., 2014).

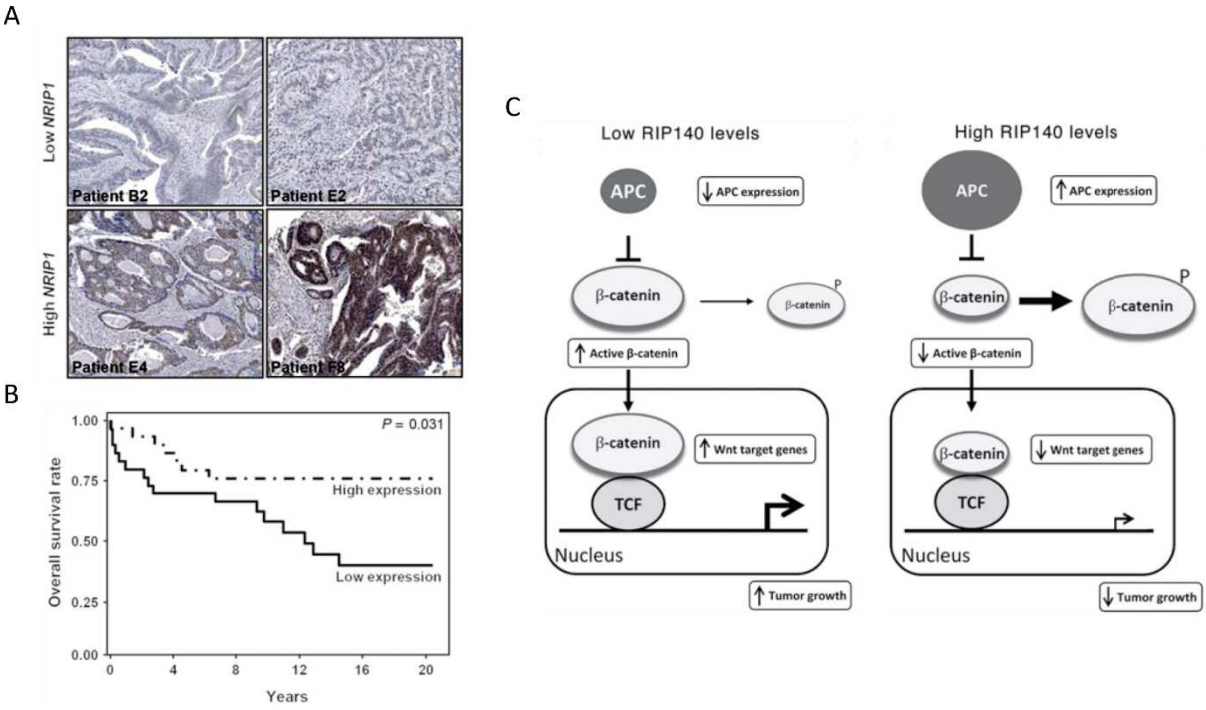


Figure 37 – RIP140, un marqueur clinique potentiel protecteur dans les CCR. (A) Marquage par immunohistochimie de la protéine RIP140 sur des biopsies de patients inclues en paraffine. (B) Survie globale des patients associée à l'expression tumorale forte (high) ou faible (low) de *RIP140*. (C) Schéma représentatif de la croissance tumorale associée à la régulation de l'activité de la voie de signalisation WNT au travers du contrôle de l'expression du gène suppresseur de tumeur *APC* par RIP140 (Lapierre et al., 2014).

Des résultats non publiés indiquent que RIP140 contrôle également la différenciation cellulaire au travers de la voie de signalisation NOTCH (Sfeir N et al., en préparation). En effet, RIP140 inhibe l'expression ainsi que l'activité mitogène de HES1, l'effecteur majeur de la voie NOTCH dans l'intestin, mais également favorise la différenciation en cellules à mucus au sein de cet épithélium au travers du contrôle de l'expression du gène *KLF4*. L'un des mécanismes par lequel RIP140 exerce sa fonction répressive sur l'expression du gène *HES1* fait intervenir la boucle de rétrocontrôle négative que ce facteur de transcription exerce sur sa propre expression, suggérant l'implication de RIP140 dans l'expression oscillatoire de *HES1*.

Par ailleurs, l'effet positif de RIP140 sur la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes du système MMR, *MSH2* et *MSH6*, qui forment le complexe MutSα a été mis en évidence par l'équipe (Palassin et al., 2021). La validité fonctionnelle de cette régulation a été explorée par des analyses d'instabilité microsatellitaire. Des cohortes de tumeurs ont permis de confirmer la corrélation d'expression entre *RIP140* et les gènes *MSH2* et *MSH6* chez les patients. Par ailleurs, nous

avons identifié une mutation de RIP140 (mutation RIPMSI) entraînant un décalage du cadre de lecture et générant une protéine tronquée avec perte de deux domaines répresseurs de la protéine, dans plus de 20% d'échantillons de tumeurs colorectales présentant une MSI. Cette mutation affecte les propriétés anti-prolifératives et trans-répressives de RIP140 ainsi que les régulations positives des gènes *MSH2* et *MSH6*. De plus, la mutation RIPMSI est associée à une moins bonne survie globale des patients et renforce la valeur pronostique de la mutation BRAF.

Au cours de ce chapitre, j'ai présenté le rôle du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la physiologie de plusieurs tissus que ce soit au niveau du métabolisme ou de l'inflammation mais encore dans le maintien de processus biologiques comme l'ovulation et enfin dans la régulation de l'homéostasie épithéliale intestinale. Par son interactome et les mécanismes épigénétiques qu'il régule, RIP140 est associé à différents rôles au sein de ces tissus avec parfois des effets adverses en rapport au réseau complexe dans lequel il interagit. Son activité est notamment dépendante du tissu et du contexte cellulaire ainsi que de ses partenaires. Néanmoins, comme beaucoup de protéines de son genre, il est essentiel au maintien de l'homéostasie des tissus et de fait est souvent impliqué dans les mécanismes de tumorigenèse. Encore une fois avec un impact différent en fonction du type de cancer, il présente un intérêt certain pour sa valeur pronostic dans plusieurs cancers. L'approfondissement des recherches sur son fonctionnement au sein de différents environnements tumoraux apportera un bénéfice certain à notre compréhension des mécanismes qui régissent l'oncogenèse pour essayer d'améliorer le traitement et la prise en charge des patients en clinique.

OBJECTIFS

Mon projet de recherche en tant que doctorant dans l'équipe Signalisation Nucléaire et Cancer, que j'ai intégrée fin 2018 au sein de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), s'inscrit dans la continuité du travail du Dr. Marion Lapierre.

Notre équipe est principalement intéressée par les mécanismes transcriptionnels régis par le co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans différents contextes, dont les fonctions décrites dans le troisième chapitre de mon introduction l'associe à un grand nombre de processus physiologiques et en font un candidat intéressant dans l'étude des cancers. Plus particulièrement, l'équipe s'est penchée sur le rôle de cette protéine dans la régulation de la physiologie intestinale et son implication dans les mécanismes associés à l'oncogenèse de ce tissu dont les travaux ont été publiés dans un article intitulé « RIP140 increases *APC* expression and control intestinal homeostasis and tumorigenesis » publié dans la revue *The Journal of Clinical Investigation* en 2014 (Lapierre et al., 2014). Ces travaux révèlent l'implication de ce co-régulateur transcriptionnel dans le contrôle de la dynamique épithéliale intestinale au travers de la répression de l'activité WNT/β-caténine aussi bien dans un contexte normal physiologique que cancéreux en corrélation avec son rôle protecteur dans les CCR en réprimant la prolifération cellulaire et la croissance tumorale *in vivo*.

A la lumière du rôle de RIP140 dans la physiopathologie intestinale, mes travaux de doctorat, faisant l'objet de ma thèse, portent sur l'étude des mécanismes notamment associés à la régulation de l'homéostasie épithéliale et du potentiel souche intestinale dans un contexte physiologique et tumoral. Dans un premier temps, j'ai participé à l'étude du rôle de cette protéine dans la physiologie intestinale au travers de la régulation du lignage des CP. Considérées comme chefs d'orchestre de la physiologie épithéliale, elles régulent largement l'identité et l'activité des CSI. La compréhension des mécanismes moléculaires associés à ce phénotype ont également permis de mieux caractériser le rôle de RIP140 dans les CCR. Ensuite, l'essentiel de mon travail fut d'étudier le rôle de RIP140 dans la biologie des CSI ainsi que la régulation du phénotype souche cancéreux et des propriétés de chimiorésistance des cellules cancéreuses. Le but étant de comprendre comment RIP140, par son effet protecteur dans le développement tumoral intestinal, influence ces populations et si par sa valeur de bon pronostic, il pourrait être un marqueur du développement des tumeurs mais surtout des populations CSC et présenter un intérêt dans la prise en charge des patients en améliorant l'orientation thérapeutique en clinique.

ARTICLE & RESULTATS

1 RIP140 réprime le lignage Paneth *via* la régulation de SOX9

Dans cette première partie, j'ai finalisé l'étude portant sur le rôle de Rip140 dans le contrôle de la différenciation des cellules de Paneth dans l'épithélium intestinal murin. En effet, les travaux publiés par Marion Lapierre et collègues ont permis de mettre en évidence le rôle de RIP140 dans la dynamique épithéliale par la répression de la prolifération et de l'apoptose des cellules épithéliales au travers du contrôle négatif de l'activité WNT/β-caténine révélé par la délétion constitutive de *Rip140* (Lapierre et al., 2014). De manière intéressante, l'altération de la voie WNT se traduit par une altération du nombre de CP (Lapierre et al., 2014). La différenciation des CP est contrôlée par un programme génétique dépendant de plusieurs FT et dont la spécialisation terminale dépend de SOX9 ainsi que de l'activité de la voie WNT (Bastide et al., 2007; van Es, Jay, et al., 2005).

Afin d'évaluer le rôle répresseur de ce co-régulateur transcriptionnel sur le lignage Paneth et les mécanismes moléculaires associés, nous avons utilisé différents modèles, notamment des souris génétiquement modifiées permettant la délétion spécifique de *Rip140* dans l'épithélium intestinal après traitement au tamoxifène. Par ailleurs, connaissant l'implication de SOX9 dans la régulation de la prolifération et du potentiel métastatique des cellules cancéreuses (Carrasco-Garcia et al., 2016a; Matheu et al., 2012a), nous avons également étudié le rôle pronostic de RIP140 et SOX9 chez des patients atteints de CCR.

Ces travaux de recherche ont fait l'objet d'une publication intitulée « RIP140 represses intestinal Paneth cell differentiation and interplays with SOX9 signaling in colorectal cancer » dans le journal *Cancers* (Gleizes et al., 2021).

1.1 Article

Cancers *2021*

RIP140 represses intestinal Paneth cell differentiation and interplays with SOX9 signaling in Colorectal Cancer

Antoine Gleizes, Mouna Triki, Sandrine Bonnet, Naomi Baccari, Gabriel Jimenez-Dominguez, Aurélie Covinhes, Nelly Pirot, Philippe Blache, Rong Yuan, Balázs Győrffy, Vincent Cavaillès and Marion Lapierre

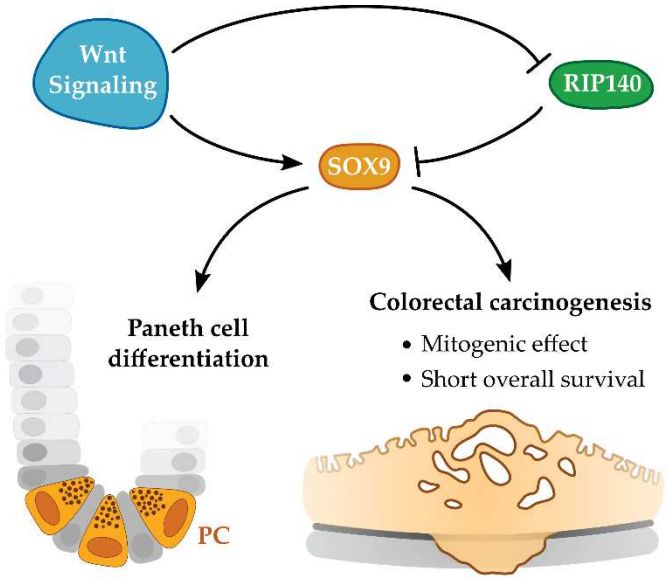


Figure 38 - Résumé graphique. Représentation graphique du rôle répresseur de RIP140 sur la différenciation Paneth et la tumorigenèse intestinale au travers de la répression de l'expression et de l'activité du FT SOX9. L'expression de *RIP140* est elle-même réprimée par la signalisation WNT connue pour activer l'expression de SOX9.

cancers

MDPI

Article

RIP140 Represses Intestinal Paneth Cell Differentiation and Interplays with SOX9 Signaling in Colorectal Cancer

Antoine Gleizes [1], Mouna Triki [1], Sandrine Bonnet [1], Naomi Baccari [1], Gabriel Jimenez-Dominguez [1], Aurélie Covinhes [2], Nelly Pirot [2], Philippe Blache [1], Rong Yuan [3], Balázs Győrffy [4,5], Vincent Cavaillès [1,†] and Marion Lapierre [1,*,†]

1 IRCM—Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut Régional du Cancer de Montpellier, CNRS, 208 rue des Apothicaires, F-34298 Montpellier, France; antoine.gleizes@inserm.fr (A.G.); Mouna.TRIKI@lyon.unicancer.fr (M.T.); sandrine.bonnet@inserm.fr (S.B.); naomi.baccari@etu.umontpellier.fr (N.B.); gabriel.jimenez-dominguez@etu.umontpellier.fr (G.J.-D.); philippe.blache@inserm.fr (P.B.); vincent.cavailles@inserm.fr (V.C.)

2 BioCampus, RHEM, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, F-34093 Montpellier, France; aurelie.covinhes@inserm.fr (A.C.); nelly.pirot@inserm.fr (N.P.)

3 Department of Medical Microbiology, Immunology and Cell Biology, School of Medicine, Southern Illinois University, Springfield, IL 62794-9628, USA; ryuan@siumed.edu

4 Department of Bioinformatics, Semmelweis University, 1094 Budapest, Hungary; gyorffy.balazs@med.semmelweis-univ.hu

5 Lendület Cancer Biomarker Research Group, Research Centre for Natural Sciences, 1117 Budapest, Hungary

* Correspondence: marion.lapierre@inserm.fr; Tel.: +33-(0)4-11-28-31-75

† Should be considered as co-senior authors.

Simple Summary: In the small intestine, the transcription factor SOX9 regulates the differentiation of Paneth cells, which are key actors in the intestinal antimicrobial defense and stem cell niche. SOX9 is also an important player in colon cancer development and progression. In this study, we demonstrate that the transcription coregulator RIP140 inhibits SOX9 expression and activity. Consequently, RIP140 and SOX9 exert opposite effects on Paneth cell differentiation and colon cancer cell proliferation. Their expression undergoes inverse regulation by the Wnt signaling pathway and inversely correlates with survival of patient with colon cancer. These results identify RIP140 as a major regulator of SOX9 signaling with functional relevance in intestinal physiopathology.

Abstract: RIP140 is a major transcriptional coregulator of gut homeostasis and tumorigenesis through the regulation of Wnt/APC signaling. Here, we investigated the effect of RIP140 on Paneth cell differentiation and its interplay with the transcription factor SOX9. Using loss of function mouse models, human colon cancer cells, and tumor microarray data sets we evaluated the role of RIP140 in SOX9 expression and activity using RT-qPCR, immunohistochemistry, luciferase reporter assays, and GST-pull down. We first evidence that RIP140 strongly represses the Paneth cell lineage in the intestinal epithelium cells by inhibiting Sox9 expression. We then demonstrate that RIP140 interacts with SOX9 and inhibits its transcriptional activity. Our results reveal that the Wnt signaling pathway exerts an opposite regulation on SOX9 and RIP140. Finally, the levels of expression of RIP140 and SOX9 exhibit a reverse response and prognosis value in human colorectal cancer biopsies. This work highlights an intimate transcriptional cross-talk between RIP140 and SOX9 in intestinal physiopathology.

Keywords: intestinal epithelium; cell differentiation; colon cancer; RIP140; SOX9; transcriptional regulation

check for updates

Citation: Gleizes, A.; Triki, M.; Bonnet, S.; Baccari, N.; Jimenez-Dominguez, G.; Covinhes, A.; Pirot, N.; Blache, P.; Yuan, R.; Győrffy, B.; et al. RIP140 Represses Intestinal Paneth Cell Differentiation and Interplays with SOX9 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 3192. https://doi.org/10.3390/cancers13133192

Academic Editors: Fortunato Ciardiello and Luca Roncucci

Received: 26 April 2021
Accepted: 21 June 2021
Published: 26 June 2021

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

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

1. Introduction

The intestines are one of the most rapidly self-renewing tissues. Due to permanent exposure to external compounds, the intestinal epithelium needs to be constantly renewed

to preserve its integrity and homeostasis. The intestinal epithelium is a mono-stratified cellular layer shaped by developmental cues into villi and Lieberkühn crypts, and housing intestinal stem cells (ISC) at the origin of the intestinal physiology. Lgr5-expressing crypt-based columnar (CBC) cells, located at the bottom of the crypts, are constantly cycling to produce progenitor cells, sustaining the high epithelial turn-over. Progenitors divide through the transit-amplifying compartment and their progeny, constrained by proliferative pressure, migrate to the top of the villi while undergoing differentiation to become highly specialized epithelial cells [1].

Absorptive progenitors differentiate into absorptive enterocytes, the most common population that are responsible for nutrient absorption, and secretory progenitors give rise to four different specialized cell types [2]. The goblet cells secrete mucus to protect the epithelium and lubricate the passage of the alimentary bowl towards the digestive tract [3]. Enteroendocrine cells produce hormones involved in metabolism regulation, nutrient uptake, and appetite [4]. Tuft cells, which present chemosensitive properties, are mainly involved in immune response [5]. Last but not least, considered the maestro of intestinal physiology, the Paneth cells (PC) coordinate host–microbiota interactions [6], are a sensor of environmental changes [7], the source of intestinal inflammation [8], and sustain the stem cell compartment [9].

PC fate is determined by several transcription factors, which regulate the HMG-box transcription factor SOX9 involved in final PC differentiation [10–12]. In addition to autonomous cellular signals, which maintain CBC identity and behavior, PCs provide the membrane and soluble factors composing the so-called stem cell niche localized at the bottom of the crypts. Several major signaling pathways, including Wnt, Notch, EGF, and BMP, control intestinal crypt physiology [13–16]. The Wnt pathway is of particular interest as it regulates ISC behavior and identity, and also promotes the formation of PC through the positive regulation of *SOX9* gene expression [9,17,18].

Colorectal carcinogenesis is a multifactorial process, and among sporadic colorectal cancers (CRC), a common sequence of molecular events (the so-called adenoma-carcinoma sequence) trigger and sustain the epithelial transformation. The mutation of the gene encoding the tumor suppressor APC is a major genetic hit driving the colorectal carcinogenesis found in approximately 80% of sporadic CRC cases [19,20]. As a consequence of this mutation, epithelial cells present a constitutive β-catenin activation, which is the major effector of the Wnt pathway, and thus a strong transcriptional activation of the β-catenin–TCF complex [21]. The constitutive activation of the Wnt pathway enhances cellular stemness and has been linked to chromosomal instability, as well as other cancer promoting factors [22]. Overexpression of some Wnt pathway target genes reinforces colorectal carcinogenesis, as is the case for SOX9. Indeed, this transcription factor is over-expressed in many cancer types, including CRC [23]. SOX9 particularly promotes CRC cell proliferation and enhances tumorigenicity in vivo [23,24].

For many years, we have been deciphering the role of the Receptor-Interacting Protein of 140 kDa (RIP140), also known as the Nuclear Receptor-Interacting Protein 1 (NRIP1), which was initially identified in human cancer cells as a corepressor of the estrogen receptor α [25]. It consists of 1158 amino acids in human, and 1161 amino acids in mouse, with 83% homology between the two sequences [26]. Knowledge of the biological functions of RIP140 came from studies on genetically modified mouse models of RIP140, i.e., the RIP140 knockout (RIPKO)(for a review, see [27]). Moreover, this transcriptional coregulator is involved in many physio-pathological processes [27] and molecular networks [28]. By its ability to recruit histone deacetylases or C-terminal binding proteins, RIP140 mainly acts as a transcriptional co-repressor [29]. Our work shed light on its ability to control intestinal homeostasis and tumorigenesis through the repression of Wnt/β-catenin signaling activity by positively regulating APC expression in a transgenic mice model and colorectal cancer cell lines. In correlation with these observations, RIP140 expression is associated with a decrease in CRC cell tumorigenicity when grafted onto nude mice [30].

To better understand its role in intestinal physio-pathological processes, we further deciphered the RIP140′ cross-talk with the Wnt/SOX9 signaling pathway. Our data indicate that RIP140 inhibits SOX9 expression and transcriptional activity. Interestingly, in human CRC cells, the Wnt signaling exerts an opposite regulation on SOX9 and RIP140 gene expression, thus explaining their reverse misregulation in human CRC biopsies. Finally, RIP140 and SOX9 exhibit opposite effects on CRC cell proliferation, and their expression in human CRC biopsies conversely correlates with patient overall survival.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

To generate the C57BL/6J mice line with conditional KO of the *Rip140* gene in the intestinal epithelium, RipKO^{Int} transgenic mice (obtained from the Yuan's lab, Springfield, USA [31]) were crossed with mice bearing a tamoxifen-dependent Cre recombinase, expressed under the control of the villin promoter [32]. Animals were genotyped by PCR using ComR1 primers specific to the floxed region (see Table S1 for primer sequences). All animals were maintained under standard conditions, on a 12:12-h light/dark schedule and fed a chow diet ad libitum, according to European Union guidelines for use of laboratory animals. In vivo experiments were performed in compliance with the French guidelines for experimental animal studies (agreement D3417227).

2.2. Organoids

Ex vivo organoid culture was established with whole crypts freshly isolated from mouse intestinal tissues (adapted from [33]). After a 30 min incubation of the minced tissue with 3 mM EDTA at 4 °C, the crypts were pelleted and passed through a 70 µm strainer. Crypts were seeded in Matrigel 1:1 IntestiCult^{TM} organoid growth medium (StemCell) and maintained in IntestiCult^{TM} medium for 5 days before passaging. Organoid development was followed day by day with classic optical microscopy and pictures were taken at a 4, 10, and 20× magnification with a ZEISS Primovert microscope in brightfield. Organoids were pelleted at day 5 for RNA analysis.

2.3. Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from cells or mouse tissues using a High Pure RNA Isolation kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. Sequential isolation of wild-type mouse small intestinal epithelial cells was performed as described [34]. Total RNA (1 µg) was subjected to reverse-transcription using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). RT-QPCR was performed on a Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) and was carried out in a final volume of 10 µL using 0.25 µL of each primer (25 µM), 5 µL of the supplied enzyme mix, 2.5 µL of H_2O, and 2 µL of the template diluted at 1:10. After pre-incubation at 95 °C, runs corresponded to 35 cycles of 15 s each at 95 °C, 5 s at 60 °C, and 15 s at 72 °C. Melting curves of the PCR products were analyzed using the Light Cycler software system to exclude amplification of unspecific products. Results were normalized to RS9 or 28S housekeeping gene transcripts. See Supplemental Table S1 for primer sequences.

2.4. Histological and Immunostaining Analysis

Mouse tissues were fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned (3 µm). Immunohistochemistry (IHC) was performed using a VENTANA Discovery Ultra automated staining instrument (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) and VENTANA reagents, according to the manufacturer's instructions. Sections were then incubated with antibodies specific for SOX9 (Ab185966, Abcam) and were counterstained with haematoxylin for 4 min and dehydrated before coverslip addition. Histology and IHC slides were scanned with a Nanozoomer Hamamatsu device (Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japan) and analyzed with Nanozoomer Digital Pathology (NDPview2) software (Hamamatsu Photonics).

2.5. Cell Culture and Transfections

HCT116 were grown in McCoy medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 100 mg/mL sodium pyruvate. SW480 and RKO cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 100 mg/mL sodium pyruvate. RKO cells were transitorily transfected with small interference RNA directed to RIP140 or SOX9 (Dharmacon). All transfections were carried out using Lipofectamine2000 (Invitrogen), as recommended by the manufacturer.

2.6. GST Pull-Down Assay

Briefly, ^{35}S-labelled proteins were cell-free-synthesized using a TNT lysate system (Promega) and incubated with purified GST fusion proteins overnight at 4 °C in NETN buffer containing 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol, and protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Protein interactions were analyzed by SDS–PAGE followed by quantification using a Phosphorimager (Fujix BAS1000). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (BioRad) to visualize the GST fusion proteins present in each track.

2.7. DuoLink Proximity Ligation Assay

The proximity ligation assay was performed to visualize interactions using a Duolink® kit (Sigma-Aldrich®), according to the manufacturer instructions. SW480 cells were plated on slides (5×10^4 cells per well) 24 h prior to fixation with paraformaldehyde 3.7% and permeabilization with Triton X-100 1%. After blocking with BSA 1% for at least 3 h, cells were incubated with two primary antibodies, RIP140 (Ab42126, Abcam) and SOX9 (Ab185966, Abcam), overnight at 4 °C. A pair of oligonucleotide-labeled secondary rabbit and goat antibodies IgG (Duolink® In Situ PLA® Probes) were used according to the manufacturer's instructions to bind to the primary antibodies. This pair of secondary antibodies generate a signal only when the two probes are in close proximity (40 nm). The PLA signals were assigned using Duolink® In Situ Detection Reagents Orange (554 nm laser line). Slides were counterstained with Hoechst (1/1000, Sigma Aldrich®) and mounted with Mowiol (Sigma-Aldrich®) for fluorescence microscopy. The images were obtained with ×40 magnification using an AxioImager microscope (Zeiss).

2.8. DNA Microarray and RNA Sequencing Analysis

Published DNA microarray datasets, GSE44076 (https://www.colonomics.org (accessed on January 2021)) and GSE39582 [35], were reanalyzed for RIP140 and SOX9 expression using the CANCERTOOL database [36]. RNA sequencing data from the TCGA [37] were reanalyzed using Cox proportional hazard regression [38], and RNAseq data obtained from CRC samples from the TCGA dataset were analyzed, as described previously [39]. The Kaplan–Meier method was used to estimate overall survival (OS) calculated from the diagnosis until death. Patients lost at follow-up were censored at the time of last contact.

2.9. Statistical Analysis

Data were presented as means ± SEM. Statistical comparisons were performed with Mann–Whitney or Spearman tests. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). The log-rank test was used to test the difference between groups. Differences were considered statistically significant at a $p < 0.05$ level. STATA statistical software (STATA, College Station, TX) was used for all analyses. For the CANCERTOOL database analysis, a Student T-test (when the comparison in between two groups) or an ANOVA test (for more than two groups) was performed in order to compare the mean between groups.

3. Results

3.1. Rip140 Inhibits Sox9 Expression and Paneth Cell Lineage in Mouse Intestine

We previously demonstrated that RIP140 was expressed in all intestinal epithelial cells with an increasing gradient along the crypt—villus axis [30]. Moreover, in constitutive Rip140 knock-out mice, Rip140 deletion was associated with an increase in the number of PC per crypt, suggesting that this transcription coregulator may drive the PC differentiation program of intestinal cells. Upon sequential isolation of wild-type mouse small intestinal epithelial cells, we observed that the levels of Rip140 mRNA were inversely correlated to those of Sox9, the master transcription factor required for PC terminal differentiation (Figure 1A). Reanalysis of data from the RNA sequencing of PC ($CD24^+$ cells) and non-PC provided by Yu et al. [40] confirmed this inverse correlation between Sox9 and Rip140 expression, since high levels of Sox9 were associated with low levels of Rip140 in $CD24^+$ cells and inversely in $CD24^-$ ones (Figure 1B).

We next used transgenic mice exhibiting a tamoxifen-inducible specific invalidation of the Rip140 gene in the intestinal epithelium ($RipKO^{int}$). As shown in Figure 1C, a strong decrease of Rip140 gene expression in the intestine was validated by RTqPCR, and we also confirmed that *Rip140* gene silencing in epithelial cells enhanced cell proliferation and apoptosis (data not shown). As expected, the Sox9 mRNA was increased in the $RipKO^{int}$ mice compared to their wild-type littermates, as well as the PC markers Lyzozyme (Lyz) and Defensins (Defa; Figure 1C). By contrast, the expression of the transcription factors Math1 and Gfi1, both involved in PC differentiation, was not significantly affected (Supplemental Figure S1A). These dysregulations were confirmed in two other mouse models, namely RIPKO and RIPTg mice, with a constitutive knock-out or overexpression of the Rip140 gene, respectively (Supplemental Figure S1B). In addition, the differences observed in the gene expression levels of Sox9 and Lyz genes among the abovementioned genotypes were also correlated with their protein level by immunohistochemistry (Figure 1D,E, respectively, and Supplemental Figure S1C,D). The number of PC at the bottom of the $RipKO^{int}$ crypts was clearly enhanced (arrows), although the higher Lyz staining intensity could also be due to more productive PC (Figure 1E).

3.2. Repression of Sox9 Expression and Paneth Cell Differentiation by Rip140 in Organoid Culture

We next determined whether Rip140 knock-out could affect the development of intestinal epithelium ex vivo. For this, we cultured small intestinal organoids from $RipKO^{int}$ and control mice. We performed kinetics to measure the growth efficiency and ability to form budding organoids (Figure 2A). We observed that the development of organoids was optimal at day 4, with the presence of PC in crypt-like structures. In these conditions, we confirmed by RT-qPCR the decrease of Rip140 expression in organoids from $RipKO^{int}$ mice compared to their wild-type littermates (Figure 2B), which was again correlated with a slight increased expression of Sox9 and a significant upregulation of Lyz and Defa genes in $RipKO^{int}$ organoids (Figure 2C). We also observed that $RipKO^{int}$ mice exhibited a significantly increased number of Sox9-positive cells compared to wild-type animals (Figure 2D), confirming that Rip140 regulates Sox9 expression at the protein level and PC differentiation.

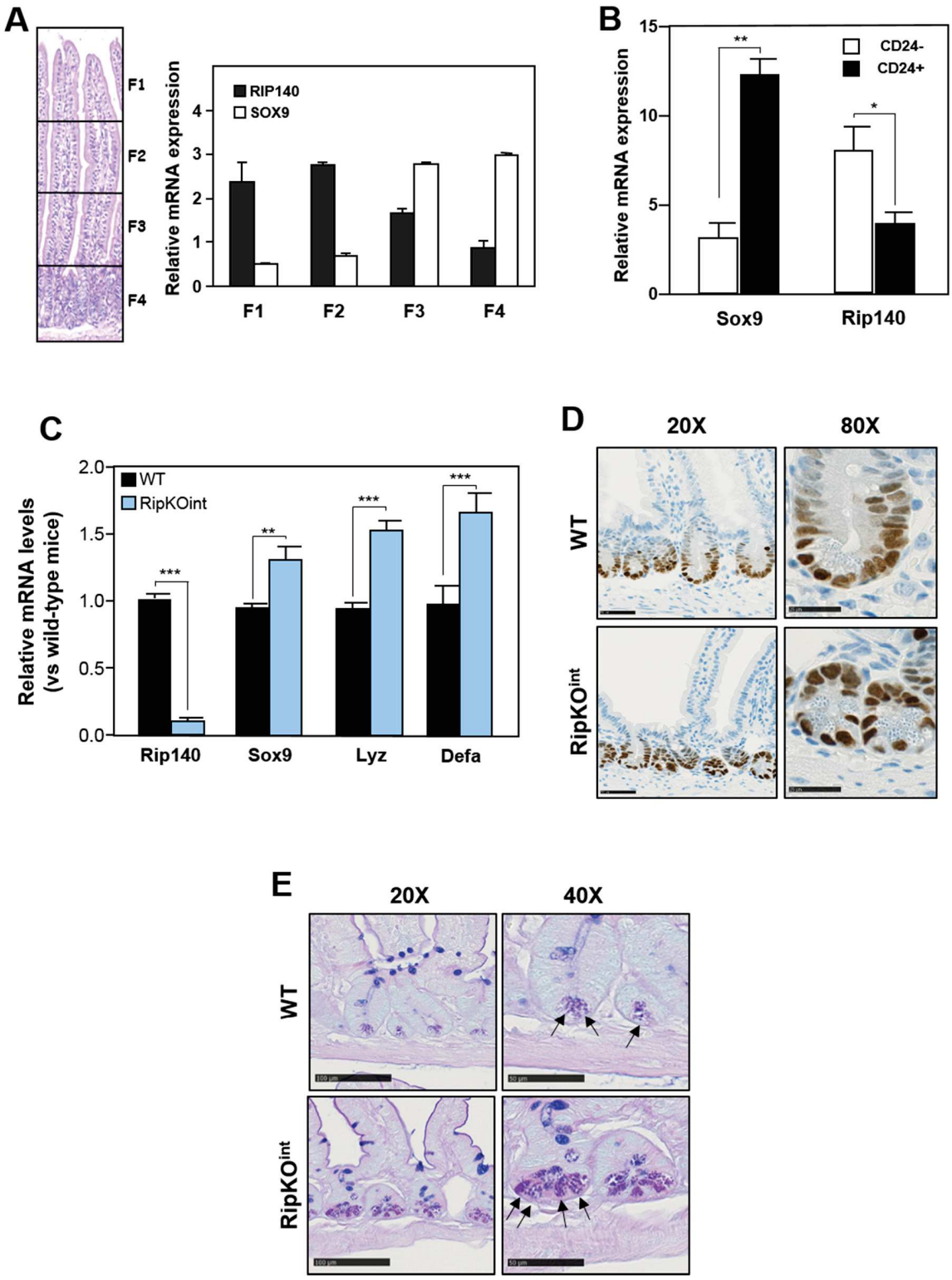


Figure 1. (**A**) RT-qPCR analysis of Rip140 and Sox9 in fractions of the epithelial cells along the villus—crypt axis of wild-type (WT) mouse tissues. The results are expressed in arbitrary units after normalization by RS9 mRNA levels. Values are the means ± SEM of 4 independent experiments. (**B**) Reanalysis of Rip140 and Sox9 mRNA expression from RNA sequencing of Paneth cells ($CD24^+$ cells) and non-Paneth cells provided by Yu et al. [2]. (**C**) RT-qPCR analysis of Rip140, Sox9, Lysozyme (Lyz), and Defensin (Defa) in small intestines of WT and $RipKO^{int}$ mice. (**D**) Immunostaining of Sox9 and (**E**) PAS-BA coloration of WT and $RipKO^{int}$ small intestines. A Student t test was used for statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

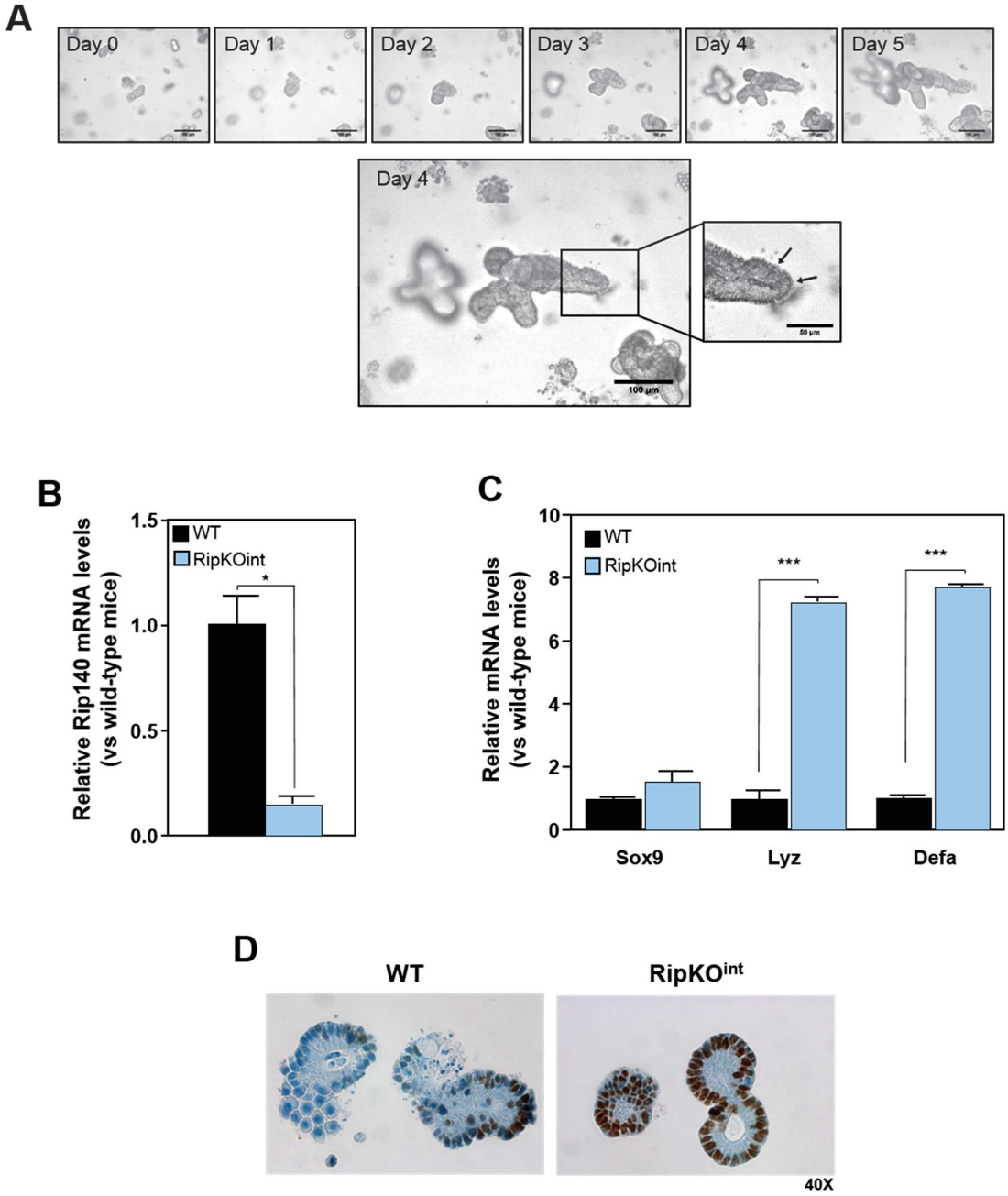


Figure 2. (**A**) Time course of an isolated single crypt growth. Differential phase contrast image reveals granule-containing Paneth cells at crypt bottoms (arrows). (**B**) RT-qPCR analysis of Rip140 and (**C**) Sox9, Lyz, and Defa in organoids derived from WT and RipKO^{int} mice. The results are expressed in arbitrary units after normalization by RS9 mRNA levels. Values are the means ± SEM of 3 independent experiments. (**D**) Immunostaining of Sox9 in WT and RipKO^{int} organoids. A Student t test was used for statistical analysis: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

3.3. RIP140 Is Transcriptionally Repressed by the Wnt Pathway in Human Colorectal Cell Lines

Given the critical role played by the Wnt signaling pathway in SOX9 expression and PC differentiation, we sought to establish whether RIP140 expression was impacted by Wnt signaling. To demonstrate the regulation of RIP140 by the Wnt pathway, we treated HCT116 and SW480 CRC cells with LiCl to inhibit the GSK3B kinase and activate Wnt signaling. In these conditions, we observed that the expression of SOX9 was significantly increased upon Wnt activation. On the contrary and as expected, the expression of RIP140 was dramatically decreased compared to non-treated cells (Figure 3A).

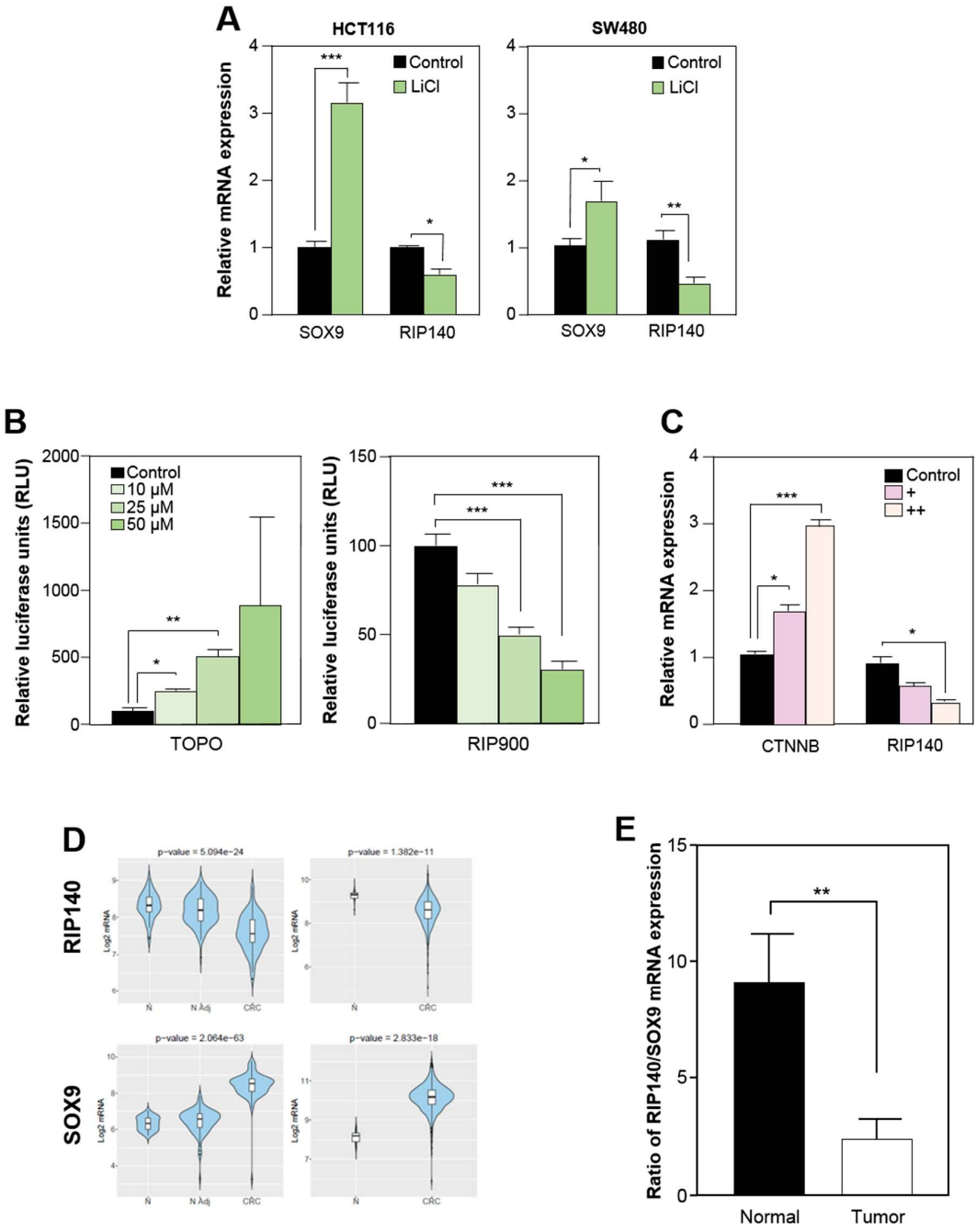


Figure 3. (**A**) RT-qPCR analysis of RIP140 and SOX9 expression in HCT116 (left panel) and SW480 (right panel) CRC cells after LiCl treatment (50 µM) for 24 h. The results are expressed in arbitrary units after normalization by 28S mRNA levels. Values are the means ± SEM of 3 independent experiments. (**B**) HCT116 cells were transfected with a β-catenin responsive reporter plasmid (left panel) or with RIP140 gene promoter reporter vector (right panel) and treated with a dose-response of LiCl. Relative luciferase activity was expressed as the mean ± SEM; n = 3. (**C**) RT-qPCR analysis of RIP140 and CTNNB expression after ectopic expression of TCF and β-catenin. The results are expressed in arbitrary units after normalization by 28S mRNA levels. Values are the means ± SEM of 3 independent experiments. (**D**) Analysis of RIP140 and SOX9 mRNAs expression in non-tumoral (N), CRC-adjacent non-tumoral tissues (N Adj), and CRC specimens in two different cohorts (GSE44076 on the left panel and GSE39582 on the right panel) using the CANCERTOOL database. Data are presented as violin plots showing the expression of the gene of interest (*p*-values are indicated). The *Y*-axis represents the Log2-normalized gene expression. (**E**) RIP140 and SOX9 mRNA levels expressed in arbitrary units (AU) after normalization to actin mRNA levels in 24 matched normal and tumor colon samples (means ± SEM). A Student t test was used for statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

We then performed a classical TCF reporter assay by transiently transfecting the two reporter plasmids (pTOPflash or pFOPflash) or the RIP900 reporter construct containing the 900 bp of the RIP140 promoter fused to the luciferase coding sequence into the HCT116 cell line in the presence of LiCl. As shown in Figure 3B, the level of β-catenin-driven transcriptional activity measured as the TOP/FOP luciferase reporter ratio was significantly increased by LiCl, in a dose-dependent manner. In contrast, we observed a clear decrease of luciferase activity upon co-transfection with a RIP140 promoter vector. This indicates that activation of the Wnt pathway was able to repress the promoter of the *RIP140* gene. Similar results were obtained upon ectopic expression of TCF and b-catenin (Figure 3C).

Owing to the major role of RIP140 and SOX9 in colon tumorigenesis, we then investigated the expression patterns of RIP140 and SOX9 in human CRC samples compared to normal colon tissues. Using the CANCERTOOL database [36], we first reanalyzed the published Affymetrix DNA microarray data from two cohorts, namely GSE44076 (https://www.colonomics.org (accessed on January 2021)) and GSE39582 [35]. As shown in Figure 3D, and in perfect agreement with the data from the mice, the results clearly showed a significant decrease of RIP140 mRNA levels in CRC biopsies, and inversely correlated with those of SOX9. We confirmed these findings using another database (TNMplot) and by comparing paired tumor and adjacent normal tissue (data not shown). These observations were also supported by RT-qPCR analysis on 24 pairs of normal and tumor colon tissue samples, showing a significant decrease of RIP140/SOX9 expression ratio in the tumoral tissues (Figure 3E).

3.4. RIP140 Interacts with SOX9 and Represses Its Activity

To further characterize the effect of RIP140 on SOX9, we investigated whether the two proteins were able to colocalize and to physically interact. Using SW480 cells, we observed by immunofluorescence that SOX9 (in red) and RIP140 (in green) formed nuclear foci (Figure 4A). Moreover, when the two channels were merged, the two images could be superimposed, indicating that RIP140 and SOX9 colocalized. Interestingly, we clearly observed that cells with high levels of SOX9 corresponded to cells with low RIP140 (left cell), and conversely, cells with low SOX9 corresponded to cells with high levels of RIP140 protein (right cell). The interaction between the two endogenous proteins was also detected in proximity ligation assay in intact SW480 CRC cells (Figure 4B). Moreover, as shown in Figure 4C, GST pull-down experiments clearly demonstrated that the C-terminal region of RIP140 (fragment which encompasses the RIP140 sequence from amino acid 683 to 916) was able to bind to the in vitro translated SOX9 protein. We then performed GST pull-down experiments in order to identify which domains were involved in this interaction. Deletion mutants of SOX9 protein revealed that the C-terminal domains of RIP140 interacted with the N-terminal region (105–208) of SOX9 (Figure 4D). Interestingly, mutants for the high-mobility group (HMG) domain of SOX9 (Supplemental Figure S2A) were unable to interact with RIP140 (Figure 4E). To determine if the transcriptional activity of SOX9 was affected by this interaction, we used a luciferase reporter plasmid containing SOX9-response elements. We observed that RIP140 was able to inhibit transactivation by SOX9 (Figure 4F and Supplemental Figure S2B) and did not affect transactivation by the SOX9 mutant (Supplemental Figure S2C). To confirm the inhibition of SOX9 transcriptional activity by RIP140, we performed RT-qPCR to quantify SOX9 target genes in our mouse models and observed a significant increase of Bapx2 and Slug expression, associated with a decrease of Runx2 expression in the RipKO^{int} mice as compared to the wild-type mice (Figure 4G). Altogether, these data indicated that, in addition to the regulation of SOX9 expression, RIP140 interacted with SOX9 and inhibited its transcriptional activity.

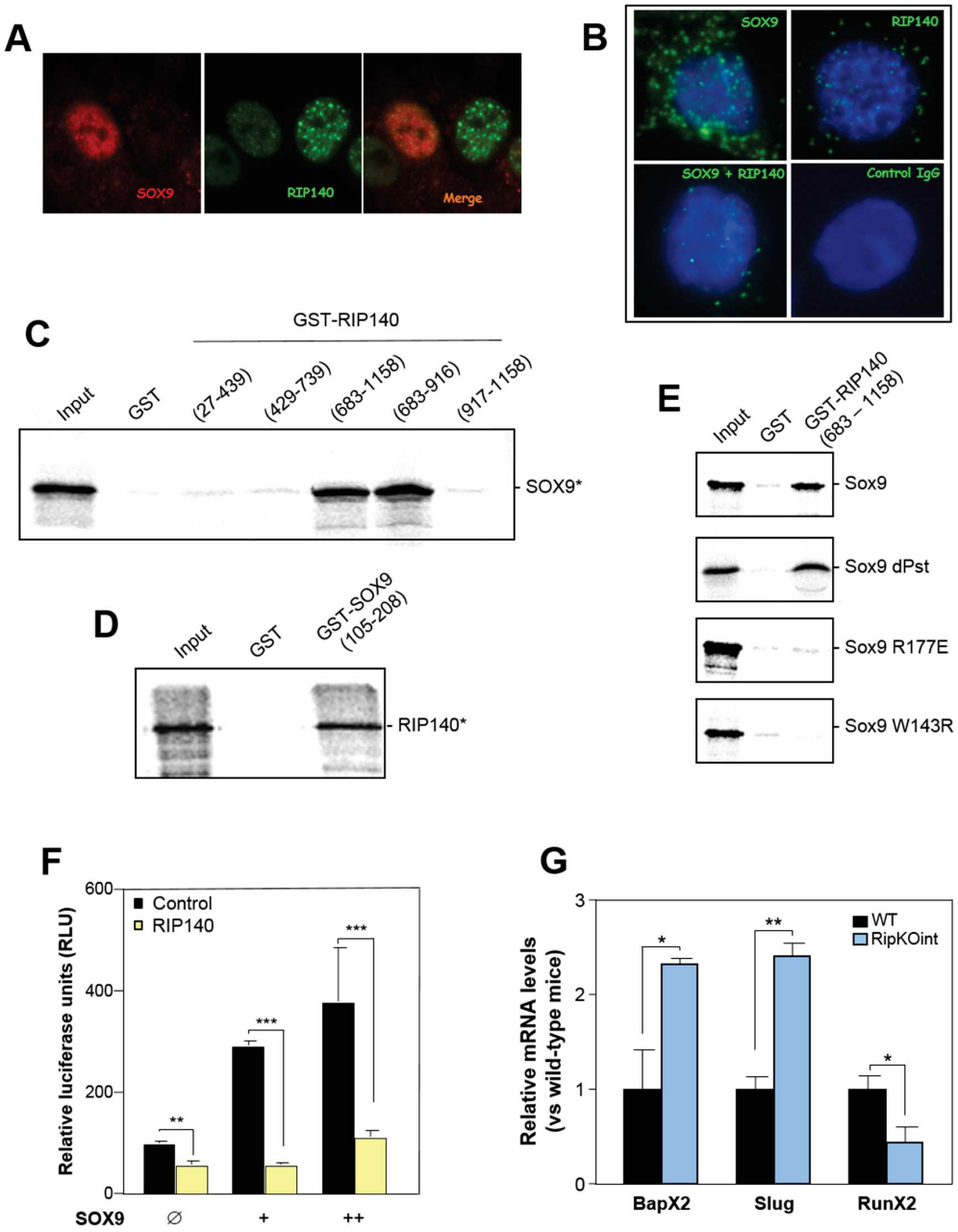


Figure 4. (**A**) Immunofluorescence of SOX9 and RIP140 in SW480 cells. Images show merged SOX9 (red) and RIP140 (green) detection. (**B**) In situ proximity ligation assays of SOX9 and RIP140, alone or in combination, in SW480 cells using primary anti-RIP140 and anti-SOX9 antibodies diluted in PBS–1%BSA. (**C**) GST pull-down assays were carried out using bacterially expressed GST, and GST-fused RIP140 fragments and ^{35}S-labeled SOX9. (**D**) Same as in (**C**) with GST-fused SOX9 fragment and ^{35}S-labeled RIP140. (**E**) GST pull-down assays were carried out as in (**C**) with GST and GST-fused SOX9 wild-type or mutant fragment and ^{35}S-labeled RIP140. (**F**) HCT116 cells were transfected with SOX9 response element reporter vector together or not with RIP140 expression plasmid and increasing doses of SOX9 expression vector. Relative luciferase activity was expressed as the mean ± S.D.; n = 3. (**G**) RT-qPCR analysis of Bapx2, Slug, and Runx2 in small intestines of WT and RipKO^{int} mice. A Student t test was used for statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

3.5. RIP140 and SOX9 Are Opposite Prognosis Markers in CRC

To determine the biological relevance of these regulations in human pathology, we investigated the impact of RIP140 on SOX9 oncogenicity. As shown in Figure 5A, RIP140 exerted a clear antiproliferative activity in SW480 CRC cells since its knockdown in human RKO CRC cells produced a significant mitogenic effect, confirming our previous results [30].

Conversely, silencing of SOX9 led to an inhibition of cell proliferation (Figure 5B). These data were confirmed in another cell line, RKO cells (Supplemental Figure S3A,B). Moreover, we performed rescue assays that revealed that RIP140 inhibition could reverse the inhibitory effect of SOX9 silencing on proliferation (Supplemental Figure S3C).

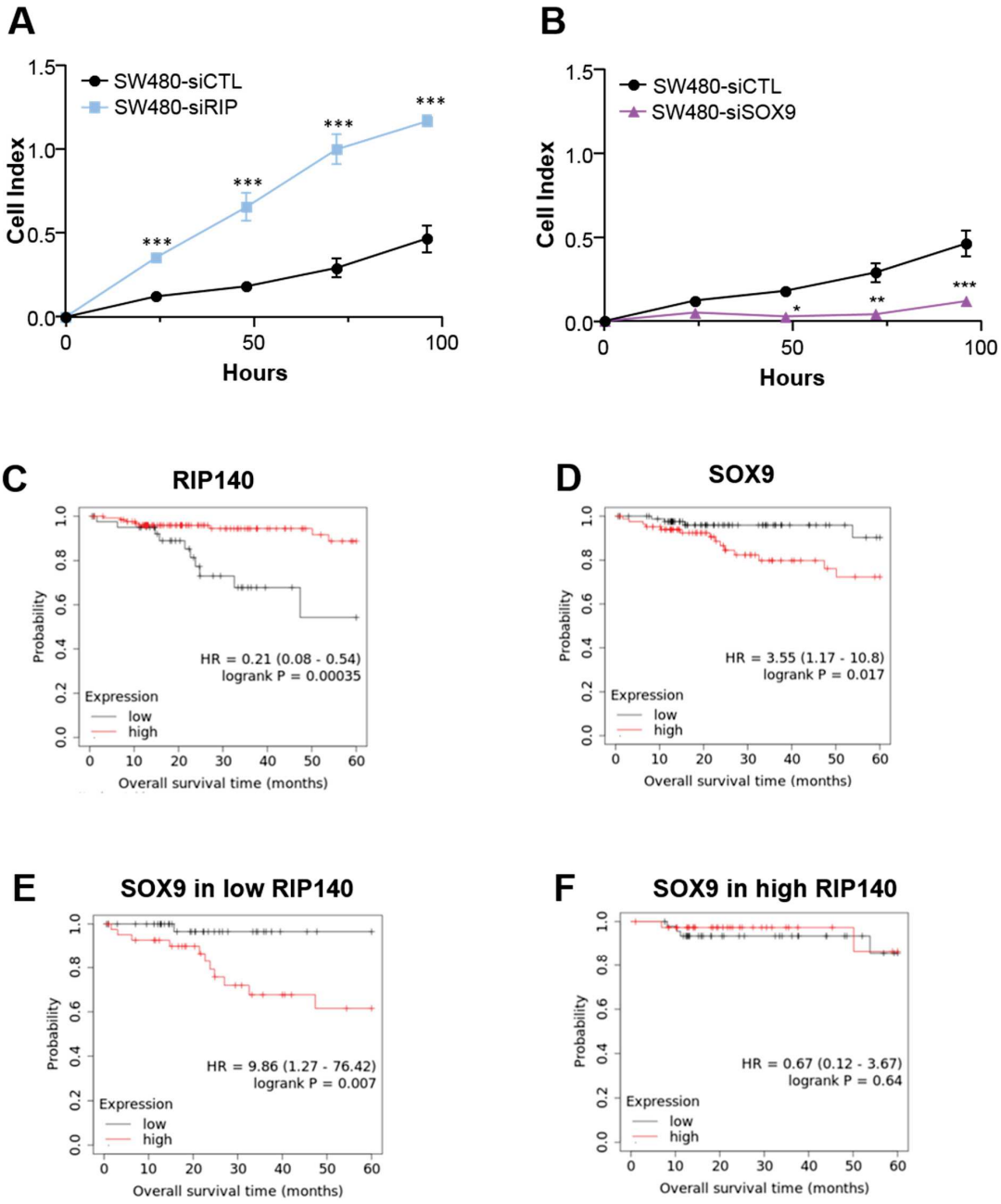


Figure 5. Cell index corresponding to the number of SW480 CRC viable cells, without (SW480 -control) or with siRNA-mediated knock-down of (**A**) RIP140 (SW480 -siRIP) or (**B**) SOX9 expression (SW480-siSOX9) A Student t test was used for statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (**C**,**D**) Kaplan-Meier analysis performed on TCGA RNA-seq data using the Kaplan–Meier plotter database. Patients were ranked according to RIP140 (**C**) or SOX9 (**D**) gene expression in their tumors and divided into two groups exhibiting low and high expression, respectively (best cut-off threshold). (**E**,**F**) Kaplan-Meier analysis of the cumulative OS of patients with low or high SOX9 gene expression (same cut-off used in panel (**D**) was performed on the groups exhibiting low or high RIP140 gene expression. A log-rank test was used for statistical analysis.

Based on these opposite effects on cell proliferation and on the inhibition of SOX9 signaling by RIP140, we investigated how the two transcription factors predicted the overall survival (OS) of patients with CRC. Using the Kaplan-Meier Plotter database, we reanalyzed RNAseq data obtained from 173 patients with localized colon adenocarcinoma (i.e., without lymph node invasion). We found that patients with high RIP140 mRNA levels in the tumor presented better rates of OS than patients with low RIP140 mRNA levels (Figure 5C). In contrast, SOX9 expression was significantly correlated with poor patient OS (Figure 5D).

This cohort was then separated into two groups of 86 patients with low and high RIP140 expression in the corresponding tumors using the median as a cutoff value (Figure 5E,F, respectively). In this context, we observed a statistically significant association of high expression of SOX9 with an increased risk of death in CRC patients, only when their tumor exhibited low RIP140 expression (Figure 5E). Altogether, the data strongly suggested that RIP140 influences the biological activity of the SOX9 protein, in accordance with our data demonstrating a strong effect of RIP140 on SOX9 expression and transcriptional activity.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that RIP140 is a major transcriptional regulator of Sox9 expression and activity with significant consequences for PC differentiation and intestinal tumorigenesis.

We first demonstrated that the expression of RIP140 and SOX9 are inversely correlated, both in the normal mouse intestinal epithelium and in human CRC samples. This reverse correlation might reflect an opposite regulation of these two genes by the Wnt signaling pathway. Indeed, it has been known for many years that Sox9 is a positive target of the Wnt pathway [18]. On the contrary, this study identified Rip140 as a Wnt-repressed gene. Although most studies have focused on the Wnt-mediated activation of transcription, several laboratories reported data suggesting that the activation of Wnt signaling also leads to repression of gene expression [41]. Moreover, a new mode of repression of Wnt target genes has been described, in which recognition of a novel DNA element by TCF specifies that β-catenin acts as a transcriptional repressor [42]. Interestingly, this specific DNA sequence was found in the RIP140 promoter (data not shown). Moreover, in line with these data, ChIP-seq characterization of the β-catenin and TCF4 cistromes in LS180 cells identified the RIP140 as a target of TCF4/β-catenin [43].

The present study also identified RIP140 as a SOX9 interactor able to inhibit its transactivation potential. Our data mapped the interaction domain of RIP140 to the HMG box of SOX9. The SOX9 HMG domain acts by binding to specific DNA sites to activate transcription of target genes [44]. It is therefore conceivable that the interaction of RIP140 with the HMG box of SOX9 strongly impaired its binding to DNA, thus explaining the observed inhibition of transactivation and the decrease in the levels of its target genes. Although very few reports have been published, it has been demonstrated that SOX9 interacts with other transcription factors, including β-catenin [11], RUNX2 (runt related transcription factor 2) [45], NFY [46], and Gli proteins [47]. Therefore, the regulation of SOX9 transcriptional activity might occur in the context of a SOX9 multiproteic complex, which might differ according to the cell and promoter contexts.

Concerning the biological consequences arising from the inhibition of Sox9 signaling, we observed a strong impact of RIP140 on PC differentiation. These cells are major regulators of the intestinal homeostasis implicated in host–microbiota interactions [6], in the sensing of environmental changes [7], and in intestinal inflammation [8]. In the small intestine, PCs are the primary source of antimicrobial proteins and peptides. A deficit in PC defensins affects the antibacterial host-defense capacity of the intestinal mucosa and is observed in ileal Crohn's disease, a subgroup of inflammatory bowel disease, whose pathogenesis endorses a concept of an ongoing immune activation driven by normal bacterial flora [48]. Based on our results, it will be interesting to investigate whether RIP140 might

play a role in this pathology. Moreover, further studies will be needed to determine if RIP140 could also play a role in the PC metaplasia associated with the detection of PC-like cells at the base of colonic crypts in inflammatory cecum and right colon [49,50]. In addition, PCs provide support to stem cells by secreting EGF, Wnt3a, and DLL4, while under injury conditions, PCs acquire stem features and generate all type of intestinal epithelial cells by activating Notch and Wnt signals [51]. Due to its negative effect on intestinal epithelial turnover after irradiation and on PC differentiation, determining whether RIP140 modulates the intestinal stem cell population could be an attractive proposition.

The oncogenic role of Sox9 [52,53] is linked to an increase in cell proliferation ([23] and Figure 5B of the present work) and in vivo tumorigenicity [23,24] and might be under the control of RIP140. Indeed, our data demonstrate that the expression level of RIP140 influences the potency of SOX9 as a predictor of patient survival. RIP140 expression could therefore be used as a marker for the identification of patients who might benefit from personalized anticancer therapies based on a SOX9 targeting by specific inhibitors or compounds that attenuate its expression [54]. Moreover, it would be interesting to investigate whether the same cross-talk between SOX9 and RIP140 also occurs in other types of cancer, including breast cancer [55].

5. Conclusions

This study demonstrates for the first time that the transcription coregulator RIP140 inhibits the PC lineage through the regulation of SOX9 expression and activity. In addition, we found a negative correlation between RIP140 and SOX9 expression in human CRC tissues. Interestingly, we observed a negative regulation of RIP140 expression by the Wnt pathway in CRC cells. Finally, we determined that RIP140 and SOX9 present opposite effects on cell proliferation and opposite prognosis markers in CRC. This work thus reinforces the role that RIP140 plays in intestinal tumorigenesis by controlling a major intestinal transcription factor involved in CRC.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13133192/s1, Figure S1: RIP140 regulates Paneth cell lineage in mouse intestine of constitutive mouse models by inhibiting SOX9 signaling. Figure S2: Comparative effects of SOX9 wild-type and mutants. Figure S3: Effect of RIP140 and SOX9 silencing, alone or in combination, on cell proliferation. Table S1: primer sequences.

Author Contributions: Conceptualization: V.C. and M.L.; Methodology: A.G., R.Y., N.P., V.C. and M.L.; Validation: A.G., M.T., S.B., N.B., G.J.-D., A.C., N.P., P.B. and M.L.; Formal analysis: A.G., G.J.-D., B.G. and M.L.; Investigation: A.G., M.T., S.B., N.B., A.C. and M.L.; Resources: V.C. and M.L.; Writing—original draft preparation, A.G. and M.L.; Writing—review and editing, A.G., V.C. and M.L.; Visualization: A.G., V.C. and M.L.; Supervision: V.C. and M.L.; Project administration: V.C. and M.L.; Funding acquisition: V.C. and M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by INSERM, Fondation pour la Recherche Médicale (Grant DEQ20170336713), Ligue Régionale Contre le Cancer (Grant RAB17007FFA), SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa-DGOS-Inserm_12553, Fondation Lejeune (Grant 1766), Université de Montpellier and the Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and following the French guidelines for experimental animal studies approved by the relevant Institutional Review Board (agreement D3417227).

Informed Consent Statement: Informed consent was not required due to retrospective analyses.

Data Availability Statement: The links to publicly archived datasets analyzed in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to J. Zilliacus (Karolinska Institutet Novum) for the kind gift of the pEGFP-C2-RIP140 vector. We thank the Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM) for histology facilities and F. Bernex for her expertise.

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

References

1. Barker, N. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 19–33. [CrossRef]
2. Cheng, H.; Leblond, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* **1974**, *141*, 461–479. [CrossRef]
3. Birchenough, G.M.H.; Johansson, M.E.; Gustafsson, J.K.; Bergström, J.H.; Hansson, G.C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal. Immunol.* **2015**, *8*, 712–719. [CrossRef]
4. Gribble, F.M.; Reimann, F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 226–237. [CrossRef]
5. Schneider, C.; O'Leary, C.E.; Locksley, R.M. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19*, 584–593. [CrossRef]
6. Bevins, C.L.; Salzman, N.H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 356–368. [CrossRef] [PubMed]
7. Yilmaz, Ö.H.; Katajisto, P.; Lamming, D.W.; Gültekin, Y.; Bauer-Rowe, K.E.; Sengupta, S.; Birsoy, K.; Dursun, A.; Yilmaz, V.O.; Selig, M.; et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* **2012**, *486*, 490–495. [CrossRef]
8. Adolph, T.E.; Tomczak, M.F.; Niederreiter, L.; Ko, H.-J.; Böck, J.; Martinez-Naves, E.; Glickman, J.N.; Tschurtschenthaler, M.; Hartwig, J.; Hosomi, S.; et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* **2013**, *503*, 272–276. [CrossRef] [PubMed]
9. Sato, T.; Van Es, J.H.; Snippert, H.J.; Stange, D.E.; Vries, R.G.; van den Born, M.; Barker, N.; Shroyer, N.F.; van de Wetering, M.; Clevers, H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **2011**, *469*, 415–418. [CrossRef]
10. Noah, T.K.; Donahue, B.; Shroyer, N.F. Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 2702–2710. [CrossRef] [PubMed]
11. Bastide, P.; Darido, C.; Pannequin, J.; Kist, R.; Robine, S.; Marty-Double, C.; Bibeau, F.; Scherer, G.; Joubert, D.; Hollande, F.; et al. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* **2007**, *178*, 635–648. [CrossRef] [PubMed]
12. Van Es, J.H.; Jay, P.; Gregorieff, A.; van Gijn, M.E.; Jonkheer, S.; Hatzis, P.; Thiele, A.; van den Born, M.; Begthel, H.; Brabletz, T.; et al. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 381–386. [CrossRef] [PubMed]
13. Van Es, J.H.; Van Gijn, M.E.; Riccio, O.; van den Born, M.; Vooijs, M.; Begthel, H.; Cozijnsen, M.; Robine, S.; Winton, D.J.; Radtke, F.; et al. Notch/γ-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **2005**, *435*, 959–963. [CrossRef]
14. Pellegrinet, L.; Rodilla, V.; Liu, Z.; Chen, S.; Koch, U.; Espinosa, L.; Kaestner, K.H.; Kopan, R.; Lewis, J.; Radtke, F. Dll1- and Dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1230–1240.e7. [CrossRef]
15. Wong, V.W.Y.; Stange, D.E.; Page, M.E.; Buczacki, S.; Wabik, A.; Itami, S.; van de Wetering, M.; Poulsom, R.; Wright, N.A.; Trotter, M.W.B.; et al. Lrig1 controls intestinal stem cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 401–408. [CrossRef]
16. Haramis, A.P.; Begthel, H.; van den Born, M.; van Es, J.; Jonkheer, S.; Offerhaus, G.J.; Clevers, H. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **2004**, *303*, 1684–1686. [CrossRef] [PubMed]
17. Farin, H.F.; Van Es, J.H.; Clevers, H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 1518–1529.e7. [CrossRef]
18. Blache, P.; Van de Wetering, M.; Duluc, I.; Domon, C.; Berta, P.; Freund, J.-N.; Clevers, H.; Jay, P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 37–47. [CrossRef]
19. Markowitz, S.D.; Bertagnolli, M.M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 2449–2460. [CrossRef]
20. Fodde, R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 867–871. [CrossRef]
21. Korinek, V.; Barker, N.; Morin, P.J.; van Wichen, D.; de Weger, R.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; Clevers, H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* **1997**, *275*, 1784–1787. [CrossRef]
22. Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1461–1473. [CrossRef]
23. Matheu, A.; Collado, M.; Wise, C.; Manterola, L.; Cekaite, L.; Tye, A.J.; Canamero, M.; Bujanda, L.; Schedl, A.; Cheah, K.S.E.; et al. Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1301–1315. [CrossRef]
24. Carrasco-Garcia, E.; Lopez, L.; Aldaz, P.; Arevalo, S.; Aldaregia, J.; Egaña, L.; Bujanda, L.; Cheung, M.; Sampron, N.; Garcia, I.; et al. SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32350. [CrossRef]
25. Cavaillès, V.; Dauvois, S.; L'Horset, F.; Lopez, G.; Hoare, S.; Kushner, P.J.; Parker, M.G. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* **1995**, *14*, 3741–3751. [CrossRef]

26. Ghosh, S.; Thakur, M.K. Tissue-specific expression of receptor-interacting protein in aging mouse. *Age* **2008**, *30*, 237–243. [CrossRef] [PubMed]
27. Nautiyal, J. Transcriptional coregulator RIP140: An essential regulator of physiology. *J. Mol. Endocrinol.* **2017**, *58*, R147–R158. [CrossRef]
28. Augereau, P.; Badia, E.; Carascossa, S.; Castet, A.; Fritsch, S.; Harmand, P.-O.; Jalaguier, S.; Cavaillès, V. The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nucl. Recept. Signal.* **2006**, *4*, nrs-04024. [CrossRef]
29. Christian, M.; Tullet, J.M.A.; Parker, M.G. Characterization of four autonomous repression domains in the corepressor receptor interacting protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15645–15651. [CrossRef] [PubMed]
30. Lapierre, M.; Bonnet, S.; Bascoul-Mollevi, C.; Ait-Arsa, I.; Jalaguier, S.; Del Rio, M.; Plateroti, M.; Roepman, P.; Ychou, M.; Pannequin, J.; et al. RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 1899–1913. [CrossRef] [PubMed]
31. Wang, J.; Chen, X.; Osland, J.; Gerber, S.J.; Luan, C.; Delfino, K.; Goodwin, L.; Yuan, R. Deletion of Nrip1 extends female mice longevity, increases autophagy, and delays cell senescence. *J. Gerontol. Ser. A* **2018**, *73*, 882–892. [CrossRef] [PubMed]
32. Marjou, F.E.; Janssen, K.-P.; Chang, B.H.-J.; Li, M.; Hindie, V.; Chan, L.; Louvard, D.; Chambon, P.; Metzger, D.; Robine, S. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* **2004**, *39*, 186–193. [CrossRef] [PubMed]
33. Schmitt, M.; Schewe, M.; Sacchetti, A.; Feijtel, D.; van de Geer, W.S.; Teeuwssen, M.; Sleddens, H.F.; Joosten, R.; van Royen, M.E.; van de Werken, H.J.G.; et al. Paneth cells respond to inflammation and contribute to tissue regeneration by acquiring stem-like features through SCF/c-kit signaling. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 2312–2328.e7. [CrossRef] [PubMed]
34. Kress, E.; Rezza, A.; Nadjar, J.; Samarut, J.; Plateroti, M. The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor alpha1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 1234–1241. [CrossRef]
35. Marisa, L.; Reyniès, A.D.; Duval, A.; Selves, J.; Gaub, M.P.; Vescovo, L.; Etienne-Grimaldi, M.-C.; Schiappa, R.; Guenot, D.; Ayadi, M.; et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: Characterization, validation, and prognostic value. *PLOS Med.* **2013**, *10*, e1001453. [CrossRef] [PubMed]
36. Cortazar, A.R.; Torrano, V.; Martín-Martín, N.; Caro-Maldonado, A.; Camacho, L.; Hermanova, I.; Guruceaga, E.; Lorenzo-Martín, L.F.; Caloto, R.; Gomis, R.R.; et al. CANCERTOOL: A visualization and representation interface to exploit cancer datasets. *Cancer Res* **2018**, *78*, 6320–6328. [CrossRef]
37. Muzny, D.M.; Bainbridge, M.N.; Chang, K.; Dinh, H.H.; Drummond, J.A.; Fowler, G.; Kovar, C.L.; Lewis, L.R.; Morgan, M.B.; Newsham, I.F.; et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **2012**, *487*, 330–337. [CrossRef]
38. Nagy, Á.; Munkácsy, G.; Győrffy, B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6047. [CrossRef] [PubMed]
39. Győrffy, B.; Lanczky, A.; Eklund, A.C.; Denkert, C.; Budczies, J.; Li, Q.; Szallasi, Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1809 patients. *Breast Cancer Res. Treat* **2010**, *123*, 725–731. [CrossRef]
40. Yu, S.; Tong, K.; Zhao, Y.; Balasubramanian, I.; Yap, G.S.; Ferraris, R.P.; Bonder, E.M.; Verzi, M.P.; Gao, N. Paneth cell multipotency induced by notch activation following injury. *Cell Stem Cell* **2018**, *23*, 46–59.e5. [CrossRef]
41. Hoverter, N.P.; Waterman, M.L. A Wnt-fall for gene regulation: Repression. *Sci. Signal.* **2008**, *1*, pe43. [CrossRef]
42. Blauwkamp, T.A.; Chang, M.V.; Cadigan, K.M. Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling. *EMBO J.* **2008**, *27*, 1436–1446. [CrossRef]
43. Meyer, M.B.; Goetsch, P.D.; Pike, J.W. VDR/RXR and TCF4/β-catenin cistromes in colonic cells of colorectal tumor origin: Impact on c-FOS and c-MYC gene expression. *Mol. Endocrinol.* **2012**, *26*, 37–51. [CrossRef] [PubMed]
44. Harley, V.R.; Clarkson, M.J.; Argentaro, A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) Box 9. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 466–487. [CrossRef]
45. Zhou, G.; Zheng, Q.; Engin, F.; Munivez, E.; Chen, Y.; Sebald, E.; Krakow, D.; Lee, B. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19004–19009. [CrossRef]
46. Shi, Z.; Chiang, C.-I.; Labhart, P.; Zhao, Y.; Yang, J.; Mistretta, T.-A.; Henning, S.J.; Maity, S.N.; Mori-Akiyama, Y. Context-specific role of SOX9 in NF-Y mediated gene regulation in colorectal cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 6257–6269. [CrossRef] [PubMed]
47. Leung, V.Y.L.; Gao, B.; Leung, K.K.H.; Melhado, I.G.; Wynn, S.L.; Au, T.Y.K.; Dung, N.W.F.; Lau, J.Y.B.; Mak, A.C.Y.; Chan, D.; et al. SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002356. [CrossRef] [PubMed]
48. Yang, E.; Shen, J. The roles and functions of Paneth cells in Crohn's disease: A critical review. *Cell Prolif.* **2021**, *54*, e12958. [CrossRef]
49. Symonds, D.A. Paneth cell metaplasia in diseases of the colon and rectum. *Arch. Pathol.* **1974**, *97*, 343–347.
50. Singh, R.; Balasubramanian, I.; Zhang, L.; Gao, N. Metaplastic Paneth cells in extra-intestinal mucosal niche indicate a link to microbiome and inflammation. *Front. Physiol.* **2020**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
51. Mei, X.; Gu, M.; Li, M. Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 349. [CrossRef] [PubMed]

52. Prévostel, C.; Blache, P. The dose-dependent effect of SOX9 and its incidence in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **2017**, *86*, 150–157. [CrossRef] [PubMed]
53. Aguilar-Medina, M.; Avendaño-Félix, M.; Lizárraga-Verdugo, E.; Bermúdez, M.; Romero-Quintana, J.G.; Ramos-Payan, R.; Ruíz-García, E.; López-Camarillo, C. SOX9 stem-cell factor: Clinical and functional relevance in cancer. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 6754040. [CrossRef] [PubMed]
54. Rahmanto, A.S.; Swartling, F.J.; Sangfelt, O. Targeting SOX9 for degradation to inhibit chemoresistance, metastatic spread, and recurrence. *Mol. Cell Oncol.* **2017**, *4*, e1252871. [CrossRef]
55. Jana, S.; Krishna, B.M.; Singhal, J.; Horne, D.; Awasthi, S.; Salgia, R.; Singhal, S.S. SOX9: The master regulator of cell fate in breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *174*, 113789. [CrossRef] [PubMed]

cancers

MDPI

Article

RIP140 Represses Intestinal Paneth Cell Differentiation and Interplays with SOX9 Signaling in Colorectal Cancer

Antoine Gleizes, Mouna Triki, Sandrine Bonnet, Naomi Baccari, Gabriel Jimenez-Dominguez, Aurélie Covinhes, Nelly Pirot, Philippe Blache, Rong Yuan, Balázs Győrffy, Vincent Cavaillès and Marion Lapierre

Suppelementary materials:

1. Supplemental Experimental Procedures.

Immunofluorescence (IF) analysis. Mouse tissues were fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and sectioned (5µm). For immunufluorescence analyses, following incubation in citrate buffer solution, paraffin-embedded tissue sections were incubated with blocking serum for 3 h to reduce non-specific binding. Sections were then incubated with antibodies specific for SOX9. IF revelation was performed using an Alexa-conjugated secondary antibody (Invitrogen). After washing, sections were counterstained with Hoechst (Sigma Aldrich) and mounted for fluorescence microscopy. Negative controls using rabbit or mouse IgGs were performed and no staining was observed in these conditions. Quantification of staining was realized by the Axiovision software.

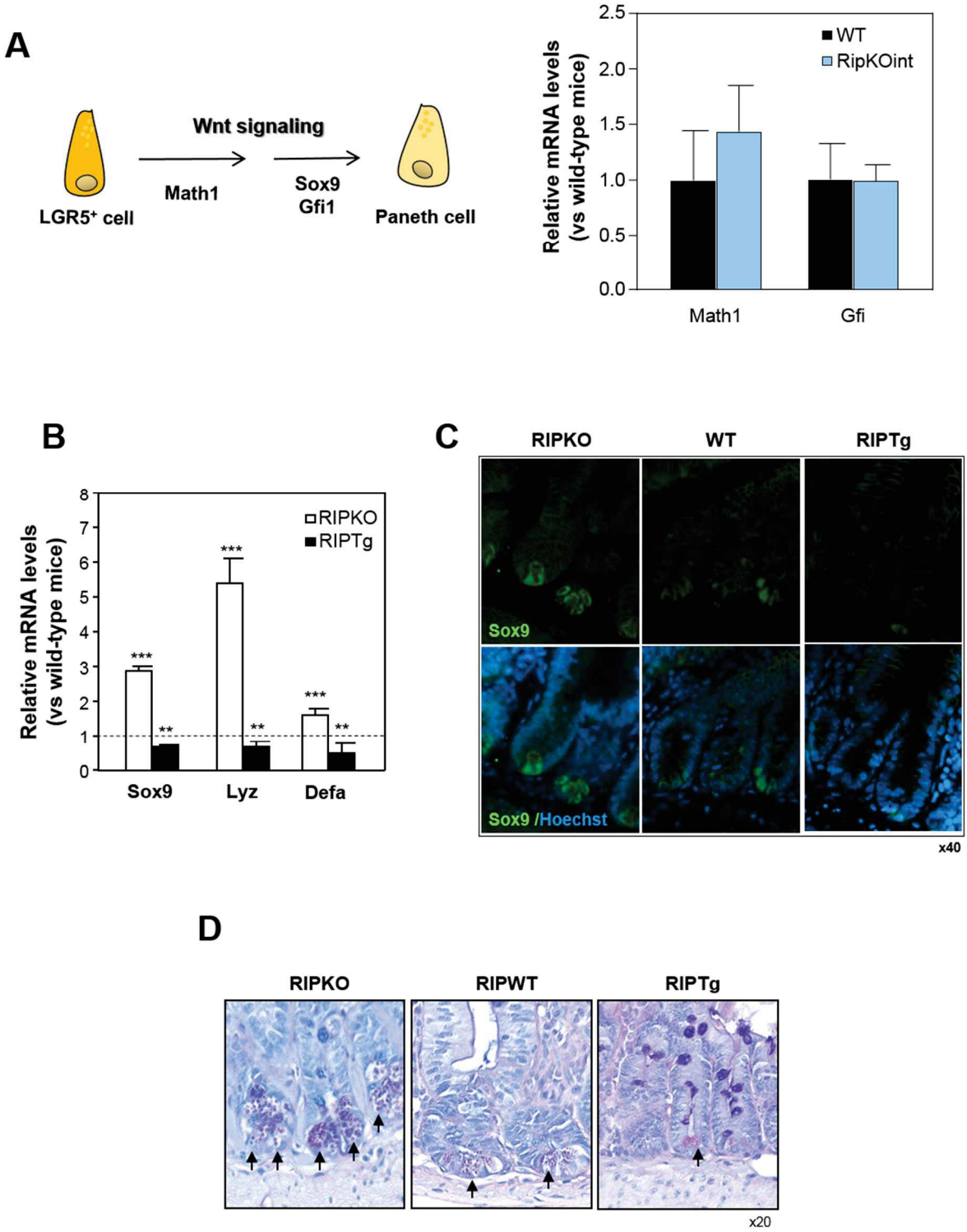


Figure S1. RIP140 regulates PC lineage and SOX9 signaling in the intestine of transgenic mouse models. A) Schematic of transcription factors involved in the differentiation of Paneth cells (left panel). RT-qPCR analysis of Math1 and Gfi1 in small intestines of WT and RipKO^{int} mice (right panel). The results are expressed in arbitrary units after normalization by RS9 mRNA levels. Values are the means ± SEM of 4 independent experiments. B) RT-qPCR analysis of Sox9, Lysozyme (Lyz) and Defensin (Defa) in small intestines from RIPKO, WT and RIPTg mice. C) Imunofluorescence of Sox9 expression in paraffin-embedded sections of small intestine from RIPKO, WT and RIPTg mice. Images show merged Sox9 detection (green) and nuclear staining (blue). Original magnification ×20. D) PAS-BA coloration of RIPKO, WT and RIPTg small intestines. Arrows indicate paneth cells. A Student t test was used for statistical analysis: *p <0.05, **p <0.001 and ***p <0.001.

.

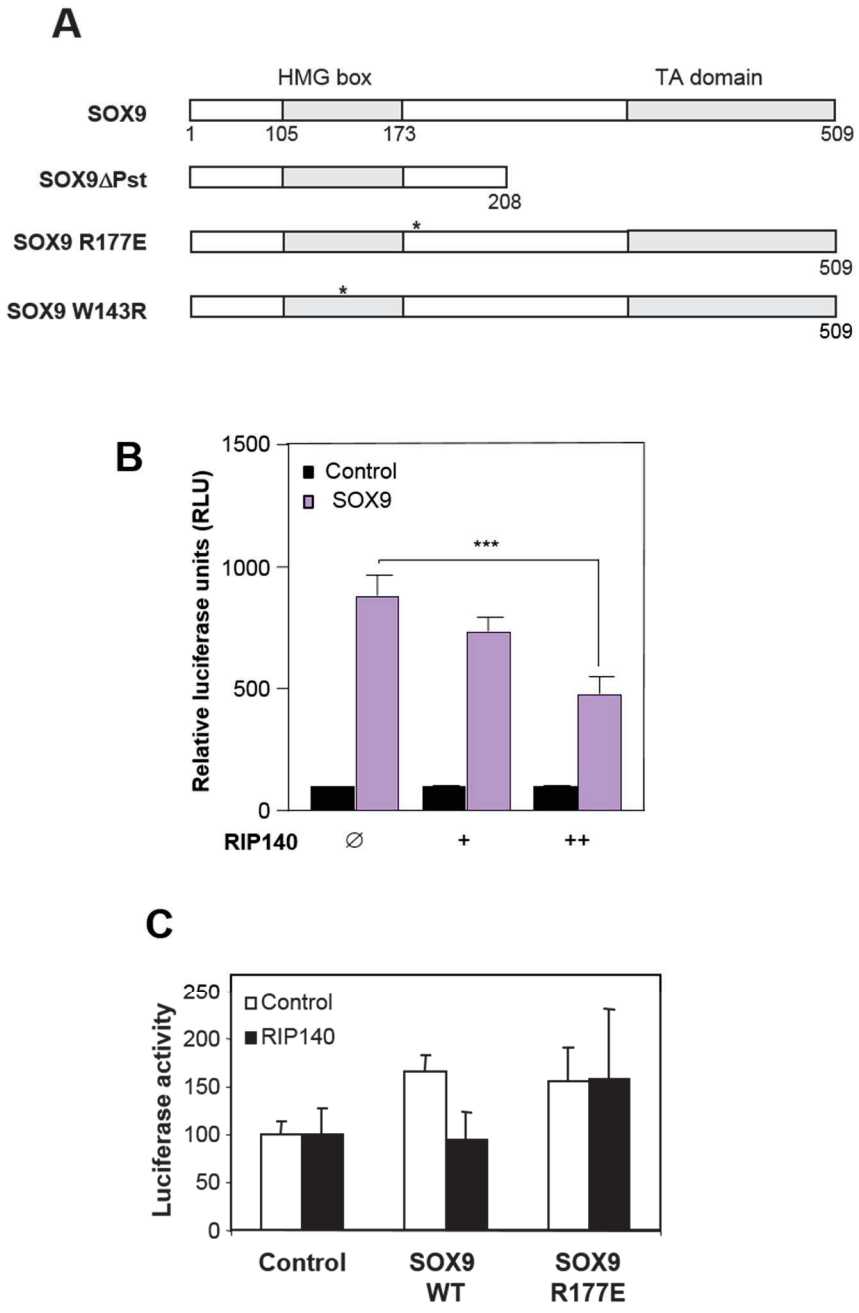


Figure S2. Comparative effets of SOX9 wild-type and mutants. A) Schematic representation of SOX9 mutants. The asterisks indicate the position of the corresponding mutation. B) HCT116 cells were transfected with SOX9 reporter vector together or not with RIP140 expression plasmid and either wild-type or mutant SOX9 expression vector. Relative luciferase activity was expressed as the mean ± S.D.; n = 3. C) HCT116 cells were transfected with SOX9 response element reporter vector together or not with SOX9 expression plasmid and increasing doses of RIP140 expression vector. Relative luciferase activity was expressed as the mean ± SEM.; n = 3. A Student t test was used for statistical analysis: *p <0.05, **p <0.001 and ***p <0.001.

.

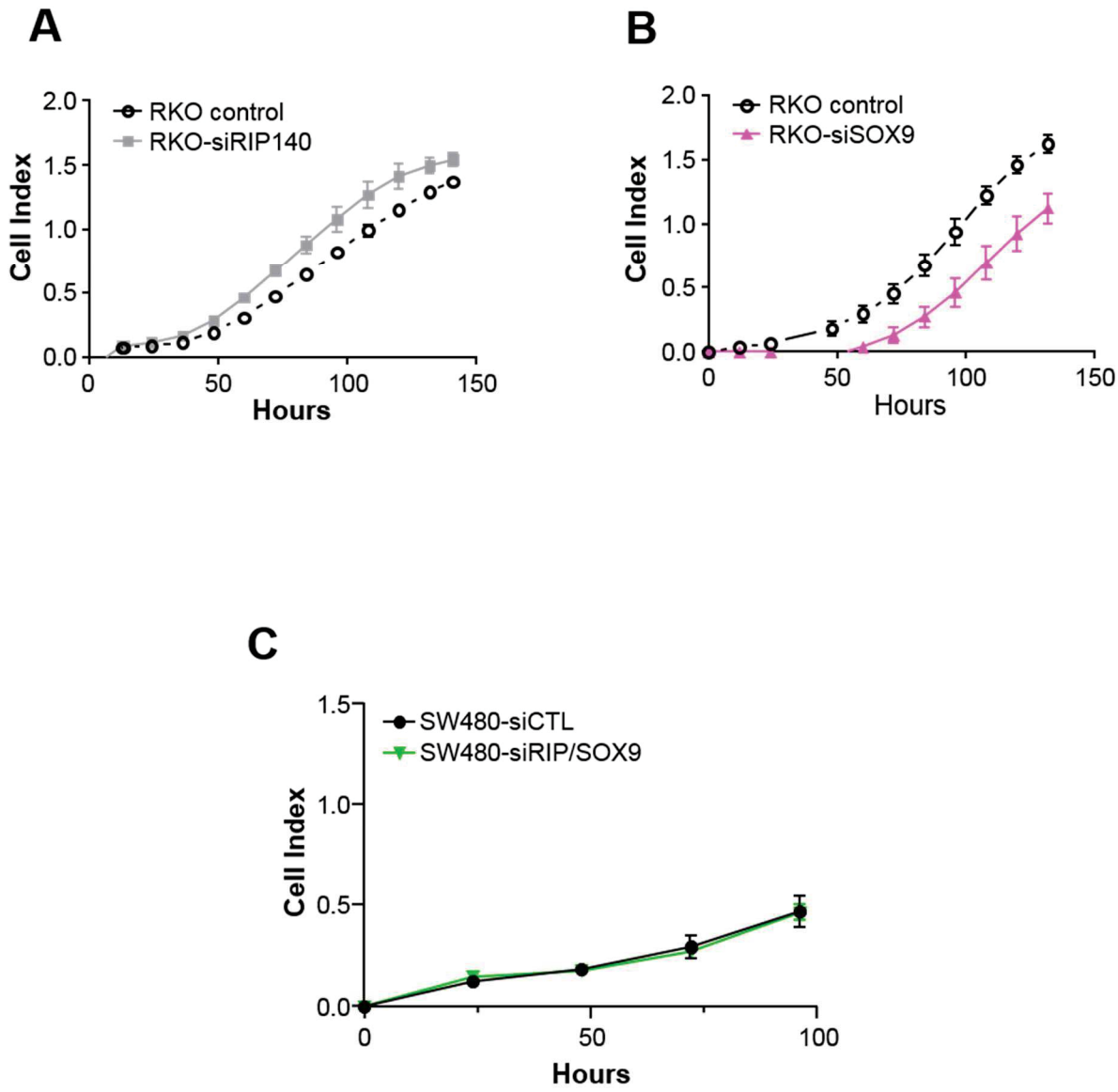


Figure S3. Comparative effets of RIP140 and SOX9 silencing on cell proliferation. Cell index corresponding to the number of RKO CRC viable cells, without (RKO-control) or with siRNA-mediated knock-down of A) RIP140 (RKO-siRIP) or B) SOX9 expression (RKO-siSOX9). C) Cell index corresponding to the number of SW480 CRC viable cells, without (RKO-control) or with siRNA-mediated knock-down of RIP140 and SOX9 expression (SW480-siRIP/SOX9).

Table S1. primer sequences.

Gene Symbol	Forward Sequence	Reverse Sequence
mDefa	GGACCAGGCTGTGTCTGTCT	TTGCAGCCTCTTGCTCTACA
mLyz	CATGGCGAGCACACTGTCA	GCGGTCAGACTCCGCAGTT
mRip140	AGAACGCACATCAGGTGGCA	GATGGCCAGACACCCCTTTG
mSox9	TCGGTGAAGAACGGACAAGC	TGAGATTGCCCAGAGTGCTCG
hCTNNB	GCTGGGACCTTGCATAACCTT	ATTTTCACCAGGGCAGGAATG
hRIP140	AATGTGCACTTGAGCCATGATG	TCGGACACTGGTAAGGCAGG
hSOX9	CGGAGGAAGTCGGTGAAG	CTGGGATTGCCCCGAGTGCT

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

2 RIP140 réprime le potentiel souche des cellules cancéreuses intestinales et favorise l'efficacité chimiothérapeutique

2.1 Introduction

Dans cette seconde partie, j'ai étudié le rôle du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la biologie des CSI et des CSC. En effet, comme mentionné précédemment, RIP140 est une protéine aux multiples facettes possédant un interactome et un panel d'activité très large (Augereau, Badia, Fuentes, et al., 2006; Nautiyal, 2017). Elle est impliquée dans la régulation du développement de plusieurs cancers et notamment dans les CCR (Lapierre et al., 2015). Ces observations révèlent un rôle protecteur du co-régulateur transcriptionnel dans les CCR et dans la biologie tumorale au travers de la régulation de l'axe de signalisation WNT/SOX9. Par ailleurs, le lien étroit entre l'activité WNT et le potentiel souche des cellules intestinales normales et cancéreuses suggère un impact potentiel de RIP140 sur la biologie de ces populations cellulaires. Cette hypothèse est corroborée par l'effet répresseur de Rip140 sur la régénération épithéliale après irradiation (Lapierre et al., 2014), connue pour être principalement médiée par les CSI et plus particulièrement par les populations dites de réserve notamment caractérisées par une forte expression du gène *Bmi1* (Sangiorgi & Capecchi, 2008).

Ainsi, j'ai étudié le rôle du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la biologie des cellules souches intestinales normales et cancéreuses de même que leurs propriétés de chimiorésistance. Le but de ces travaux est de comprendre si l'effet protecteur de cette protéine dans les CCR passe par une régulation du caractère souche et si RIP140 pourrait à terme servir de marqueur pronostic dans l'évolution de la maladie mais également dans la prédiction de la réponse aux traitements.

La caractérisation du développement d'organoïdes intestinaux à partir de nos modèles transgéniques murins (modèle murin RIP140$^{fl/fl}$/VillinCreERTam ; RIPKO^{int}) m'a permis dans un premier temps d'évaluer le rôle de cette protéine dans la biologie des CSI. Afin d'approfondir mes recherches, l'utilisation de lignées cancéreuses colorectales m'a permis de sélectionner les CSC et d'observer l'impact de la sur-expression de *RIP140* sur leur comportement en culture 3D. Ces travaux ont été plus amplement développés par la mise au point un modèle pré-clinique murin répondant à la chimiothérapie FOLFIRI, combinaison de 5-FU et irinotecan grâce au croisement des souris RIPKO^{int} avec la souche de souris APC$^{flox/+}$ conditionnelle qui développe des cancers intestinaux (RipApcKO^{int}) et qui ont été directement exposées ou non à des doses pertinentes de FOLFIRI. Ces travaux ont été étendus à l'utilisation de lignées cellulaires cancéreuses *in vitro* pour en comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. Enfin, l'analyse par séquençage des ARN totaux nous a permis de mettre

en évidence le paysage transcriptionnel associé à la perte d'expression de *Rip140* dans l'épithélium intestinal aussi bien dans un contexte sain que tumoral, avec ou sans traitement chimiothérapeutique.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Modèles transgéniques murins

La lignée murine transgénique C57BL/6j conditionnelle pour la délétion des gènes *Rip140* et/ou *Apc* spécifiquement dans l'épithélium intestinal après induction au tamoxifène a été obtenue par croisement de la lignée *Rip140*$^{fl/fl}$ *; Villin-CreERTam* (RipKO^{int}) et de la lignée *Apc*$^{fl/+}$ afin d'obtenir une lignée permettant la délétion concomitante de *Rip140* et d'*Apc* (RipApcKO^{int}). La descendance a été génotypée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant un couple d'amorces spécifiques des régions LoxP flanquant l'exon 4 de *Rip140* et d'amorces spécifiques des régions LoxP flanquant l'exon 14 du gène *Apc* (séquences des amorces en tableau 3). L'expression de la Cre recombinase est dépendante du promoteur de la villine, spécifiquement exprimée par les cellules épithéliales intestinales. Les souris RIP140$^{fl/fl}$/VillinCreERTam/APC$^{fl/+}$ et RIP140$^{+/+}$/VillinCreERTam/APC$^{fl/+}$ sont traitées par le tamoxifène (2mg suspendus dans de l'éthanol absolu déposés sur la peau ventrale de la souris) à l'âge de 8 semaines à raison de 1 application/jour pendant 5 jours la 1ère semaine puis 1 fois par semaine le reste du protocole (11 à 14 semaines), afin de permettre le défloxage des gènes *Apc* et/ou *Rip140*, et donc le développement spontané de tumeurs intestinales. A l'âge de 16 semaines, les souris sont traitées ou non avec le protocole de chimiothérapie FOLFIRI (50mg/ml de 5-FU et 30mg/ml d'irinotécan) par injection intra-péritonéale 2 fois par semaine durant 3 ou 6 semaines. En fin de protocole, les souris sont euthanasiées et l'intestin est prélevé. Les zones présentant des lésions visibles macroscopiquement sont dénombrées. Tous les animaux ont été maintenus dans des conditions standards d'élevage sur un cycle jour/nuit de 12h et nourris avec un régime standard *ad libitum*, en accord avec les recommandations européennes pour l'utilisation d'animaux de laboratoire. Les expériences *in vivo* ont été réalisées suivant les recommandations françaises pour l'expérimentation animale.

2.2.2 Culture d'organoïdes intestinaux

La culture *ex vivo* d'organoïdes intestinaux est établie à partir de cryptes intestinales entières (protocole adapté de Schmitt *et al.*, 2018) issues de souris RipKO^{int} traitées après induction de la délétion de *Rip140* pendant 5 jours. Après collection et nettoyage du tissu, les morceaux d'intestin

sont incubés pendant 30 minutes à 4°C sous agitation dans une suspension d'EDTA à 3mM. Après lavage, les cryptes sont dissociées mécaniquement puis filtrées sur un tamis cellulaire 70 µm. Après centrifugations et lavages successifs, les cryptes sont comptées au microscope optique en présence de bleu Trypan avant d'être ensemencées dans une matrice de Matrigel et de milieu IntestiCult™ (StemCell) avec un ratio 1 :1. Une fois polymérisées, les gouttes de Matrigel sont recouvertes de milieu IntestiCult™. Les organoïdes ainsi cultivés sont maintenus en incubateur à 37°C, 5%CO_2 pendant 5 jours avant passage. Leur développement est suivi par imagerie optique en champ clair et les images prises aux objectifs 4, 10 et 20x avec un microscope Primovert équipé d'une caméra (Zeiss). La quantification du nombre et de la taille des organoïdes a été réalisée avec le logiciel Fiji. Dans certains cas, des culots cellulaires sont réalisés pour analyse ARN à J5 de culture. Les organoïdes sont récupérés pour passage après 5 jours de culture et après lavage par centrifugation, puis ils sont dissociés mécaniquement par pipetage au PBS froid. Après comptage ils sont réensemencés dans du Matrigel 1 :1 IntestiCult™ et maintenus dans les mêmes conditions que précédemment.

Dans certains cas, l'induction de la recombinaison des séquences LoxP de *Rip140* dans les organoïdes issus de la lignée RipKO^{int} est réalisée *ex-vivo* 24h après ensemencement en lab-tek 8 puits par dépôt d'OH-Tamoxifène dans le milieu pour une concentration finale de 0,5 µM et un volume équivalent d'éthanol (EtOH) pour les contrôles. Après 48h d'induction, le milieu est changé par du milieu frais.

2.2.3 Marquage EdU

Au jour 5 de culture des organoïdes, une incorporation à EdU est réalisée par dépôt dans le milieu avec une concentration finale de 10 µM pendant 1h. La préparation et la révélation du marquage EdU est effectuée avec le kit Click-iT^R Plus EdU Imaging kit (Invitrogen) avec une révélation à l'azide 488. Un contre-marquage nucléaire au Hoechst est réalisé avant montage de la lamelle. Les organoïdes sont imagés par microscopie optique à fluorescence Axio Imager M2 (Zeiss) en configuration apotome aux objectifs 20 et 40x. Le traitement des images brutes est effectué sur le logiciel ZEN 2.3 et la quantification du marquage EdU sur le logiciel Fiji.

2.2.4 Histologie et immunomarquage

Les tissues murins sont fixés au paraformaldéhyde 4% et inclus en paraffine pour une destination à la coupe au microtome (section 3µm). L'immunohistochimie (IHC) est réalisée avec une machine automatisée VENTANA Discovery Ultra (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) et les

réactifs VENTANA en suivant les recommandations du fournisseur. Les sections sont ensuite incubées avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine BMI1 (ab269678). Un contre-marquage à l'Hématoxyline-Eosine (HE) est réalisé avant déshydratation du tissu et pose de la lamelle. Les coupes ainsi préparées sont ensuite scannées avec un automate Nanozoomer Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japon) et analysées avec le logiciel Nanozoomer Digital Pathology (NDPview2) (Hamamatsu Photonics).

2.2.5 Culture cellulaire et transfection

Les lignées cellulaires d'adénocarcinome colorectaux SW480 et HCT116 ont été transfectées de manière stable soit avec un vecteur vide pEGFP (Clontech), soit avec un vecteur contenant la forme complète humaine de l'ADNc de *RIP140* (Zilliacus et al., 2001). Les cellules transfectées ont été respectivement nommées SW480-GFP et -RIP140 et HCT116-GFP et -RIP140. Elles ont ensuite été sélectionnées par traitement au G418 et cultivées en milieu RPMI pour les lignées SW480 et Mc-Coy pour les lignées HCT116, supplémentés en SVF 10%, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml, pyruvate de sodium 100 mg/ml et G418 1 mg/ml. La transfection transitoire de petits ARN interférents (siRNA), dirigé contre l'ARNm de RIP140 (siRIP140) ou présentant une séquence aléatoire contrôle (siCtrl), est réalisée sur des cellules SW480 sauvages (WT) avec la Lipofectamine2000 (Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les cellules ainsi transfectées sont maintenues en milieu RPMI supplémenté en SVF 10%, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml et pyruvate de sodium 100 mg/ml à 37°C, 5% CO_2. La lignée cellulaire issue d'adénocarcinome colorectal HT29 est maintenue en milieu DMEM-F12 supplémenté en SVF 10%, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml et pyruvate de sodium 100 mg/ml à 37°C, 5% CO_2.

2.2.6 Essais luciférase

La transfection du rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur de *Bmi1* (pBmi1-Luc) est réalisée au Jet-PEI^R suivant les recommandations du fournisseur. 25 ng du pBmi1-Luc sont transfectés avec 50 ng de plasmide rapporteur rénilla pRL-TK-Renilla dans les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 24h après ensemencement en plaque 96 puits à raison de 3.10^4 cellules/puits. L'activité de la luciférase est mesurée au Centro LB 963 (Berthold) 24h après transfection et normalisée par l'activité de la Renilla.

2.2.7 Culture en colosphères

Les lignées cellulaires SW480-GFP et SW480-RIP140 sont mises en culture en cellule unique pour générer des colosphères. Après trypsination les suspensions cellulaires sont comptées au bleu Trypan et la concentration ajustée à 10^6 cellules/ml. Après centrifugation les cellules sont reprises dans 1 ml de PBS-1%SVF pour tri par cytométrie en flux. Les cellules uniques sont réensemencées par tri cellulaire en plaque 96 puits ULA à fond plat dans 100 µl de milieu DMEM supplémenté en B27 1/50ème, EGF 20ng/ml, FGFb 20ng/ml, Héparine 4µg/ml et Sodium de pyruvate 1/100ème puis maintenues 3 semaines à 37°C, 5%CO_2. A 21 jours de culture, chaque puit est observé au microscope et une image des structures générées est prise par puit avec un microscope optique inversé Primovert équipé d'une caméra (Zeiss) à l'objectif 10x. Le nombre de colosphères ainsi obtenu est ramené sur le nombre total de puits ensemencés et la quantification de l'aire des structures réalisée à partir des images obtenues grâce au logiciel Fiji. Au jours 21 les colopshères sont ensuite récupérées puis dissociées par digestion douce à l'Accumax^{TM} (Sigma-Aldrich) à 37°C pendant 10 à 15 minutes. Après centrifugation, les cellules sont récupérées dans 200 µl PBS-1%SVF puis réensemencées suivant la procédure décrite ci-dessus. L'analyse du nombre et de la taille des structures est réitérée à 21 jours de culture et ainsi de suite jusqu'à épuisement des populations cellulaires.

2.2.8 Culture en sphéroïdes et traitement par chimiothérapie

Les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 ainsi que SW480 WT transfectées transitoirement avec un siRIP140 ou siCtrl sont trypsinées puis comptées au bleu Trypan au compteur automatique avant d'être ensemencées à raison de 100 cellules/puits en plaque 96 puits ULA à fonds ronds en préparant 6 réplicats par condition. 48h après ensemencement, les agents chimiothérapeutiques sont déposés en suivant une gamme de concentration effectuée de 0 à 10 µM pour le 5-FU, 0 à 20 µM pour l'irinotecan et 0 à 32 µM pour l'oxaliplatine dont chaque gamme est étalée sur 8 points. Les traitements au FOLFIRI (5-FU et irinotecan) et FOLFIRINOX (5-FU, irinotecan et oxaliplatine) sont appliqués suivant une gamme de dilution allant d'une dilution à 10^3 jusqu'à 10^5 répartie sur 7 points avec un 8ème point non traité en contrôle. Chaque gamme de concentration ou de dilution est préparée au 2x pour respecter les concentrations finales dans les puits. La croissance des sphéroïdes est suivie toutes les 6h sur 7 à 10 jours avec le système Incucyte^R (Sartorius) à l'objectif 10x en condition de culture à 37°C, 5% CO_2. L'analyse des images ainsi obtenues est effectuée avec le logiciel Incucyte^R. La concentration (IC_{50}) ou la dilution inhibitrice (ID_{50}) de 50% de la croissance des sphéroïdes est obtenue par régression non linéaire sur le logiciel d'analyses statistiques Prism (GraphPad) à partir de la taille

relative des sphéroïdes après 4 jours de traitement par rapport au contrôle non traité et en fonction du logarithme en base 10 des concentrations en agents chimiothérapeutiques.

2.2.9 Activité ALDH

La révélation de l'activité ALDH est réalisée sur les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 cultivées en colosphères ou sphéroïdes après traitement chimiothérapeutique. Les cellules sont récupérées puis dissociées à l'Accumax pendant 10 à 15 minutes à 37°C. La révélation de l'activité ALDH est effectuée avec le kit AldeRed^{TM} ALDH Detection Assay (Sigma-Aldrich) suivant les recommandations du fournisseur, puis quantifiée par FACS. Le traitement des données est effectué avec le logiciel d'analyse Kaluza (Beckman Coulter) permettant l'acquisition du pourcentage de cellules possédant une forte activité ALDH en comparaison au contrôle négatif ainsi que de la moyenne de l'intensité de fluorescence.

2.2.10 PCR quantitative à transcription inverse

L'ARN total est extrait à partir des lignées cellulaires de CCR, ou tissus murins avec le kit E.Z.N.A^{R} Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek R6834-01) et avec le kit GenElute^{TM} Single Cell RNA Purification Kit (Sigma-Aldrich RNB300) pour les organoïdes intestinaux murins. La concentration en ARN est quantifiée avec l'appareil Nanodrop^{TM} 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Une transcription inverse est réalisée sur l'ARN messager total (1µg/échantillon) en utilisant le kit qScript^{R} cDNA synthesis kit (Quantabio) et la PCR quantitative (qPCR) est réalisée avec le kit SensiFAST^{TM} SYBR^{R} No-ROX kit (Bioline) suivant les recommandations du fournisseur après dilution au 1/10ème du produit de la RT-PCR pour un volume final de 10 µl et une concentration finale des amorces de 1,25 µM. La réaction de polymérisation est réalisée sur l'appareil LightCycler^{R} 480 II (Roche) suivant le programme suivant : pré-incubation à 95°C pendant 2 minutes ; 45 cycles d'amplification composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 secondes, une étape d'appariement à 60°C pendant 10 secondes et une étape de synthèse à 72°C pendant 20 secondes ; enfin une courbe de fusion des produits de PCR avant descente à 4°C de l'appareil. Les résultats de qPCR sont normalisés par l'expression des gènes de ménage Rs9 ou 28S respectivement pour les échantillons murins et humains. Les séquences des différentes amorces sont données dans le Tableau 3.

Tableau 3 – Liste des amorces.

Gènes	Séquences sens	Séquences antisens
mApc génotypage	CTGTTCTGCAGTATGTTATCA	CTATGAGTCAACACAGGATTA
mRip140 génotypage	CTAAATCAGAACCCACCCCGGAT	CCAGTGCTAGCATTCGCTGT
mRip140	AGAACGCACATCAGGTGGCA	GATGGCCAGACACCCCTTTG
hRIP140	AATGTGCACTTGAGCCATGATG	TCGGACACTGGTAAGGCAGG
mSox9	TCGGTGAAGAACGGACAAGC	TGAGATTGCCCAGAGTGCTCG
hmBMI1	TATAACTGATGATGAGATAATAAGC	CTGGAAAGTATTGGGTATGTC
mLgr5	GAGTCAACCCAAGCCTTAGTATCC	CATGGGACAAATGCAACTGAAG
mEphb2	CCATTGAACAGGACTACAGACTACC	CACCGTGTTAAAGCTGGTGTAG
hmMSI1	TCTGGCTCCCCTACTAACCTC	GGCAACTGGCTAATCCAAAA
mTert	GAAAGTAGAGGATTGCCACTGGC	CGTATGTGTCCATCAGCCAGAAC
mAscl2	TTTCCTGTGCCGCACCAGAACT	CAGCGACTCCAGACGAGGTGG
mLrig1	TTCAGCCAACGCTACCCTCACA	TAAGCCAGGTGATGCGTGGTGT
mAldh1a1	CACTGGCCGACTTGAAGATT	ACCTCCTCAGTTGCAGGGTT
mCd133	CTGCGATAGCATCAGACCAAGC	CTTTTGACGAGGCTCTCCAGATC
mPcna2	AGCAACTTGGAATCCCAGAACA	GGTCTCGGCATATACGTGCAA
h18S	CGATCCATCATCCGCAATG	AGCCAAGCTCAGCGCAAC
mRs9	CGGCCCGGGAGCTGTTGACG	CTGCTTGCGGACCCTAATGTGACG

2.2.11 Analyse séquençage ARN

Le séquençage des ARN totaux extraits de l'intestin total de souris WT (n=2), RipKO^{int} (n=2), ApcKO^{int} (n=3), RipApcKO^{int} (n=3), ApcKO^{int} à 3 semaines de traitement FOLFIRI (n=2) et RipApcKO^{int} à 3 semaines de traitement FOLFIRI (n=2), a été effectué par la société Genewiz^{R} avec la technologie Illumina^{R}. L'expression différentielle significative des gènes entre chaque groupe de comparaison a été établie par un test de Wald (p-value) et ajustée par la méthode Benjamini-Hochberg (p-adjusted value). La sélection des gènes significativement dérégulés dans chaque groupe de comparaison a été réalisée sur la base de la p-value ($p < 0,05$) et un fold d'expression de 2 pour élargir le champ de travail parfois trop restreint avec la p-value ajustée. Chaque liste de gènes associée à un groupe de comparaison a été confrontée à une analyse par enrichissement fonctionnel *via* le serveur g :Profiler (Raudvere et al., 2019) et TIMER 2.0 pour l'estimation des populations immunitaires (T. Li et al., 2020). La représentation en heatmap de l'expression de chaque gène différentiellement exprimé et le clustering des individus pour chaque comparaison ainsi que l'enrichissement fonctionnel des termes GO basée sur chaque groupe de gènes ont été effectués sur le logiciel d'analyse statistique et graphique informatique R version 4.1.0 respectivement avec les packages « ComplexHeatmap » (Gu et al., 2016) et « ClusterProfiler » (Yu et al., 2012).

2.2.12 Analyses statistiques

L'ensemble des données est représenté par la moyenne d'expériences indépendantes ± SEM. Lorsque le nombre d'expériences le permet, l'analyse statistique comparative entre deux groupes a été effectuée avec un t test ou Mann-Whitney en cas de différence de déviation standard entre les groupes. Pour la comparaison statistique de plus de 2 groupes, un test ANOVA ou t test à comparaison multiple ont été effectué. La significativité de la différence observée est exprimée par la p-value (p) < 0,05.

2.3 Résultats

2.3.1 Rôle de Rip140 dans la physiologie épithéliale intestinale

2.3.1.a Rip140 et la biologie des cellules souches intestinales

Comme énoncé dans l'introduction de cette section, Rip140 contrôle différents aspects de la physiologie épithéliale que ce soit au travers de la régulation de l'activité Wnt se traduisant par un effet répresseur sur la dynamique épithéliale (Lapierre et al., 2014) ou le contrôle de l'expression et de l'activité de Sox9 se traduisant par une inhibition du lignage cellulaire Paneth (Gleizes et al., 2021). De manière intéressante, *Rip140* est exprimé en gradient le long de l'axe crypto-villositaire avec une forte expression dans les compartiments différenciés villositaires et une faible expression dans les cryptes intestinales contenant les CSI et les cellules transitoires encore indifférenciées (Lapierre et al., 2014). Cette observation suggère l'existence d'une corrélation inverse entre le potentiel souche intestinal et le niveau d'expression de ce co-régulateur transcriptionnel (Figure 39).

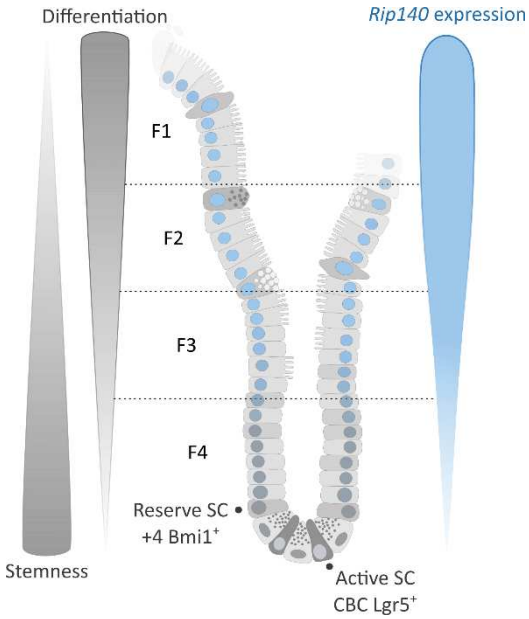


Figure 39 – Schéma représentatif de l'expression de *Rip140* le long de l'axe crypto-villositaire. Le profil d'expression de *Rip140* au sein de l'épithélium intestinal murin est graduel avec de faibles niveaux dans les cryptes intestinales qui hébergent les populations cellulaires souches et les cellules progénitrices immatures (F4). L'expression du co-régulateur transcriptionnel augmente ensuite le long de l'axe crypto-villositaire pour atteindre un niveau plus élevé dans les compartiments différenciés (F1 et 2). Inversement à l'état de différenciation des cellules intestinales, le potentiel souche des cellules épithéliales est maintenu uniquement dans la crypte intestinale de manière inversement proportionnelle à l'expression de *Rip140*.

Par ailleurs, l'analyse de données transcriptomiques obtenues par séquençage des ARNm de différentes populations cellulaires, réalisé par Yan et collègues en 2017 (Yan, Gevaert, Zheng, Anchang, Probert, Larkin, Davies, Cheng, Kaddis, Han, Roelf, Calderon, Cynn, Hu, Mandleywala, Wilhelmy, Grimes, Corney, Boutet, Terry, Belgrader, Ziraldo, Mikkelsen, Wang, Furstenberg, et al., 2017), confirme ces observations. L'expression de *Rip140* est effectivement plus forte dans des populations cellulaires présentant une signature transcriptomique associée aux cellules différenciées et inversement dans les populations présentant une signature souche (Figure 40A). De plus, l'utilisation de modèles transgéniques murins permettant l'expression spécifique de la *GFP* sous le contrôle du promoteur des gènes *Bmi1* et *Lgr5* a permis d'enrichir les populations cellulaires souches de réserve (Sangiorgi & Capecchi, 2008) et active (Barker et al., 2007) afin de réaliser un séquençage des ARNm de ces populations (Yan, Gevaert, Zheng, Anchang, Probert, Larkin, Davies, Cheng, Kaddis, Han, Roelf, Calderon, Cynn, Hu, Mandleywala, Wilhelmy, Grimes, Corney, Boutet, Terry, Belgrader, Ziraldo, Mikkelsen, Wang, Furstenberg, et al., 2017). L'analyse des données transcriptomiques révèle une diminution de l'expression de *Rip140* dans les populations positives Bmi1+ et Lgr5+ en comparaison aux populations n'exprimant pas ces marqueurs (Figure 40 B). Ainsi, en corrélation avec nos observations, il existe bien une relation inverse entre l'expression de notre protéine d'intérêt et le potentiel souche des cellules épithéliales intestinales.

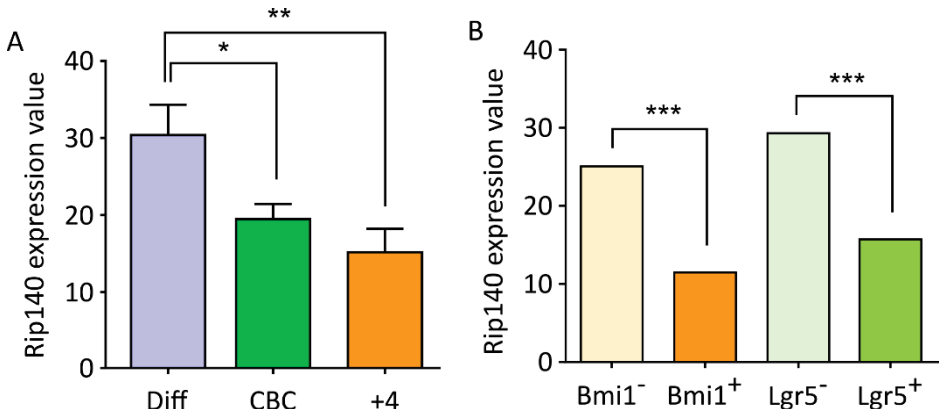


Figure 40 – Expression de *Rip140* dans les populations cellulaires intestinales. (A) Représentation graphique en histogrammes de l'expression relative de *Rip140* obtenue par séquençage des ARN messagers de populations cellulaires différenciées (Diff), de cellules présentant une signature CBC et enfin de cellules présentant une signature +4. (B) Représentation graphique en histogrammes de l'expression relative de *Rip140* obtenue par séquençage des ARN messagers de populations positives pour Bmi1 et Lgr5 en comparaison aux populations négatives pour ces marqueurs cellulaires souches. Les données transcriptomiques ont été obtenues à partir de la série GSE99815 issue de la base de données « Gene expression omnibus » (GEO). L'analyse statistique de l'expression du co-régulateur transcriptionnel entre les différentes populations cellulaires a été réalisé par un test ANOVA (n=3 à 6) (A) et un test Mann-Whitney (n=3 à 6) (B) avec une p-value < 0,05 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.3.1.b Rip140 réprime le phénotype souche des cellules intestinales

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de Rip140 dans la biologie des CSI, j'ai travaillé avec un modèle murin transgénique permettant la délétion spécifique de *Rip140* dans l'épithélium intestinal. Le croisement d'une lignée murine exprimant une Cre recombinase fusionnée à une forme mutée du LBD des récepteurs à l'œstrogène (CreERT2) sous le contrôle du promoteur de la *Villine*, gène spécifiquement exprimé dans les cellules épithéliales intestinales (Maunoury et al., 1992), avec une lignée murine présentant des régions LoxP flanquant la séquence codante de *Rip140* ($Rip140^{fl/fl}$), a permis l'obtention de cette lignée murine. La délétion de notre gène d'intérêt est initiée par induction au tamoxifène, antagoniste des récepteurs à l'œstrogène activant la CreERT2 (Feil et al., 1997), déposé sur l'abdomen des souris après rasage. Afin d'étudier le comportement des CSI, j'ai mis au point la technique de culture d'organoïdes intestinaux basée sur la capacité des CSI et plus largement des cryptes intestinales à regénérer un épithélium fonctionnellement similaire à celui observé *in vivo* dans des conditions de culture en 3D (Sato et al., 2009).

L'analyse du transcriptome associé à la délétion de *Rip140* a été réalisé par RT-qPCR à partir de l'ARN total des organoïdes obtenus après 5 jours de culture. Après confirmation de la délétion de *Rip140* (Figure 41A), l'expression de gènes marqueurs du potentiel souche a été évaluée à partir de l'ARN extrait des organoïdes $RipKO^{int}$ traités *in vivo* en comparaison aux organoïdes issus de souris WT (Figure 41B). On retrouve notamment une augmentation de l'expression de *Sox9* (de manière cohérente avec la répression de son expression décrite dans la section précédente) et une augmentation de certains gènes souches comme *Ephb2*, *Msi1*, *Tert*, *Ascl2*, *Lrig1, Aldh1a* et *CD133* (N. Li et al., 2014). En revanche, l'expression du gène *Lgr5* ne semble pas être affectée par la délétion de *Rip140* et l'expression de *Bmi1* semble diminuer (Figure 41B). De manière intéressante, j'ai pu constater l'induction de l'expression du gène *Pcna2*, marqueur de la prolifération cellulaire, dans les organoïdes $RipKO^{int}$ (Figure 41B).

Ainsi, la délétion conditionnelle inductible de *Rip140* dans l'épithélium intestinal murin ne semble pas présenter un phénotype aussi fort que celui observé dans le modèle constitutif RIPKO (Lapierre et al., 2014), suggérant une différence de l'influence de la perte d'expression de *Rip140* sur l'épithélium entre ces deux modèles. Cependant, l'analyse de l'expression des gènes marqueurs des populations souches intestinales révèle bien un effet répresseur de Rip140 sur leur expression.

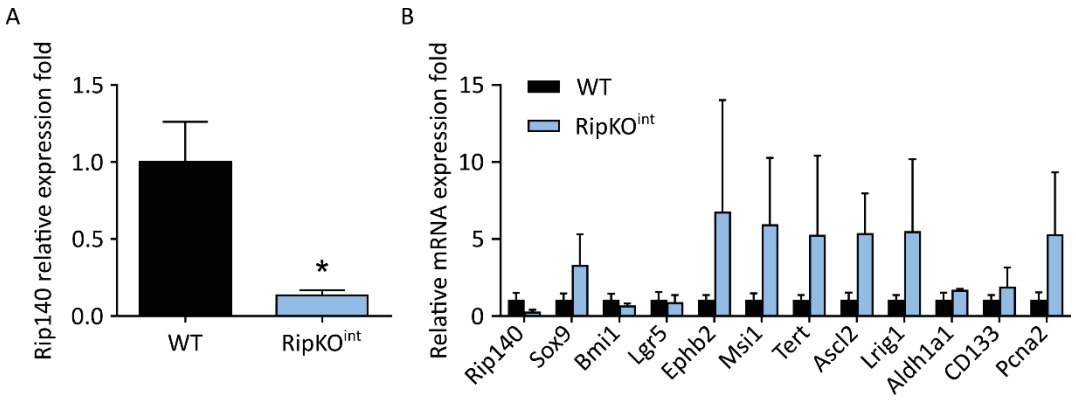


Figure 41 – Rip140 réprime l'expression de marqueurs de cellules souches. Expression relative de *Rip140* (A) et des gènes associés à l'identité souche et la prolifération des cellules épithéliales intestinales (B) dans les organoïdes à 5 jours de culture au passage initial après délétion de *Rip140* par induction au tamoxifène *in vivo* (RipKO^{int}) en comparaison au contrôle sauvage (WT). L'analyse statistique du niveau relatif des ARNm mesuré par RT-qPCR a été réalisé par un test Mann-Whitney sur un triplicat biologique pour les animaux sauvages (WT n = 3) et pour les animaux délétés pour *Rip140* (RipKO^{int} n = 3) (* $p < 0,05$).

2.3.1.c Rip140 ne modifie pas le comportement des CSI dans les organoïdes

Le développement des organoïdes en termes d'initiation, de taille et de morphologie a été suivi par prise de photo en microscopie optique à transmission (Figure 42 A). La délétion de *Rip140* semble être associée à une augmentation, bien que non significative, de l'initiation de la formation d'organoïdes au passage 0, ensemencement initial après extraction, en comparaison au contrôle WT. En effet, le ratio du nombre de structures viables sur le nombre de cryptes ensemencées révèle environ 70% d'initiation chez les WT pour environ 110% pour les organoïdes RipKO^{int}. Après dissociation et réensemencement de ces derniers (passage 1), ce ratio semble augmenter pour les WT et inversement diminuer pour les RipKO^{int} (Figure 42 B). Ces observations suggèrent une exacerbation du potentiel souche chez les RipKO^{int} qui se traduirait par une augmentation de leur capacité à former des structures organoïdes en culture 3D. Néanmoins, ce potentiel semble rapidement s'épuiser dès le premier passage.

La mesure de la taille de ces structures par analyse des photos prises en microscopie optique à transmission a révélé une légère diminution de la taille des organoïdes RipKO^{int} au jour 3 et 5 de culture, néanmoins il n'y a pas d'impact significatif de la délétion de *Rip140* sur la croissance globale des structures (Figure 42C). En corrélation avec cette observation, l'analyse de la prolifération épithéliale par incorporation d'EdU d'organoïdes RipKO^{int} traités *ex vivo* montre une diminution non significative du nombre de cellules en phase S en comparaison aux organoïdes contrôles WT traités à l'éthanol (Figure 42D et E). La divergence observée entre le marquage à l'EdU et l'expression de *Pcna2*

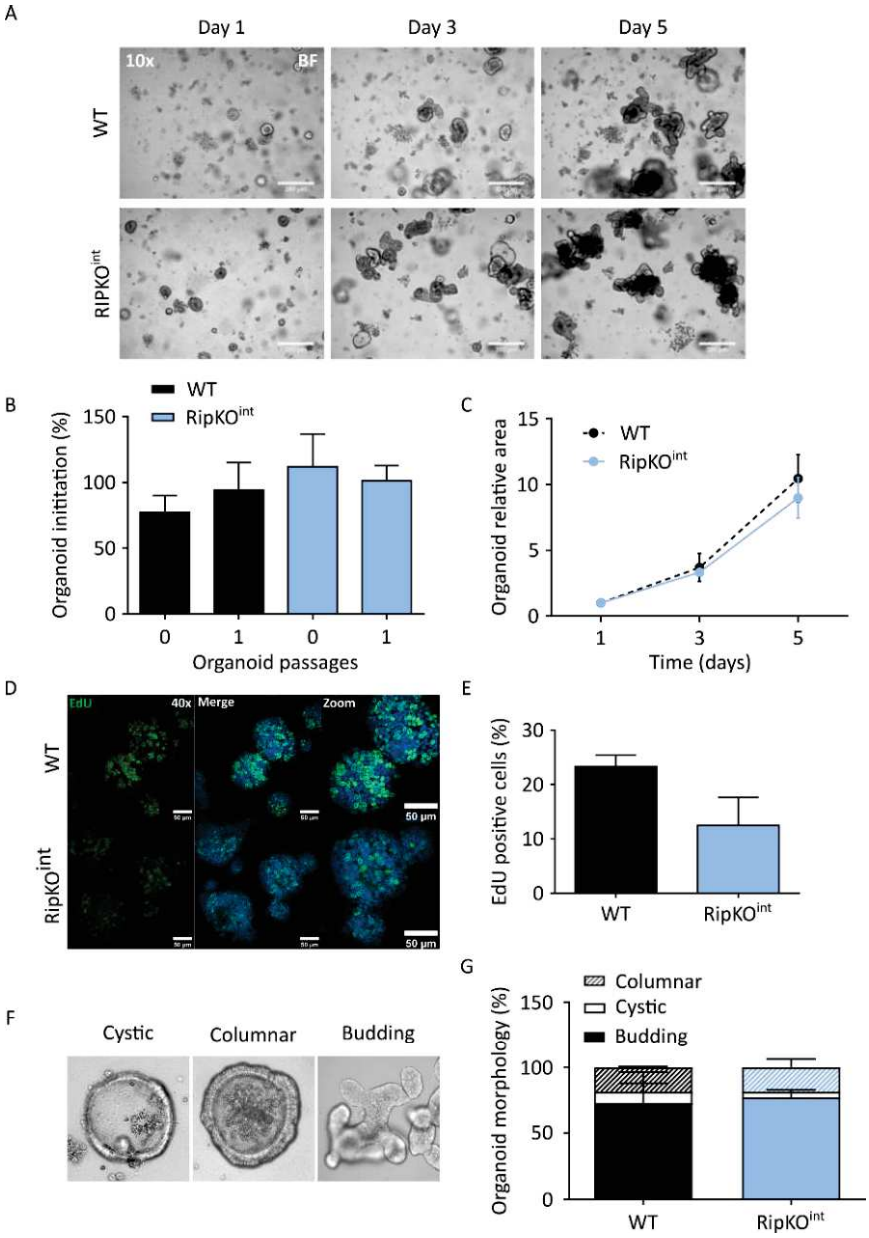


Figure 42 – Suivi du développement des organoïdes RipKO^{int}. (A) Photos représentatives des organoïdes issus de souris WT ou RipKO^{int} traités au tamoxifène *in vivo* au jour 1, 3 et 5 de culture (barre d'échelle 200 µm). (B) Représentation graphique en histogrammes du ratio du nombre d'organoïdes au 5ème jour de culture rapporté au nombre de cryptes ensemencées au premier ensemencement après extraction de l'animal (passage 0) et au premier passage (passage 1). (C) Représentation graphique en XY de la surface des organoïdes au cours du temps, rapportée à la surface initiale des structures formées au premier jour de culture. (D) Images représentatives d'organoïdes intestinaux traités au tamoxifène *ex vivo* à 5 jours de culture, marqués à l'EdU (en vert) avec un contre-marquage nucléaire au Hoechst (en bleu). (E) Quantification du nombre de cellules positives pour le marquage à l'EdU. (G) Quantification de la proportion de chaque morphologie rapportée au nombre total d'organoïdes formés au jour du passage 0. Plusieurs expériences indépendantes ont été réalisées pour l'initiation de la formation d'organoïdes (WT p0 n=5, p1 n=2 ; RipKO^{int} p0 n=4, p1 n=2) ainsi que pour la surface, la croissance et la morphologie des structures (WT n=3 et RipKO^{int} n=3). L'analyse statistique de l'initiation de la formation d'organoïdes, réalisé par un test ANOVA à comparaison multiple, et l'analyse de la proportion et de la croissance des organoïdes, réalisée par un t test à comparaison multiple, n'ont pas révélé de différence significative entre les groupes. L'analyse de la prolifération cellulaire des organoïdes traités au tamoxifène *ex vivo* a été réalisée avec le logiciel Fiji avec un duplicat biologique par condition (WT n=2 et RipKO^{int} n=2).

est probablement due à une différence dans la dynamique épithéliale entre les organoïdes traités *in vivo* et *ex vivo*, sachant que les organoïdes traités *ex vivo* ont été maintenus sur plusieurs passages. Néanmoins, la croissance des organoïdes traités *in vivo* ne semble pas non plus refléter l'expression de *Pcna2*.

Ensuite, par distinction manuelle sur les photos, j'ai analysé la morphologie des organoïdes à savoir le nombre de structures à forme cystique, organoïdes ronds dont l'épithélium n'est pas polarisé, ou columnaires, forme ronde avec un épithélium polarisé, ou enfin bourgeonnantes, formation de domaines cryptiques (Figure 42F). Ces différentes morphologies sont représentatives de l'état général de l'épithélium intestinal. Les formes cystiques sont associées à une transition épithéliale vers un état plutôt fœtal observé dans la régénération après dommage à l'épithélium. Les formes columnaires, dont les cellules épithéliales sont différenciées, ne récapitulent pas la physiologie épithéliale ne présentant pas les différents compartiments épithéliaux et l'ensemble des gradients moléculaires nécessaires au maintien de la physiologie et de la dynamique de l'épithélium. Enfin les formes bourgeonnantes sont les plus représentatives de l'épithélium *in vivo*. La quantification de la morphologie de ces structures ne semble pas montrer de différences morphologiques associées à la délétion de notre gène d'intérêt (Figure 42G). Ainsi, au travers de ce modèle de culture en organoïdes, la délétion de *Rip140* spécifique à l'épithélium intestinal murin ne semble pas impacter fonctionnellement le développement des organoïdes et par extension le comportement des CSI.

De manière surprenante, le développement des organoïdes ne reflète pas les résultats obtenus précédemment par Marion Lapierre pour lesquels on observe une augmentation de la dynamique épithéliale chez les souris constitutivement délétées pour *Rip140* (Lapierre et al., 2014). Plusieurs points sont mis en cause dans l'explication de la divergence entre les observations *in vivo* avec les souris RIPKO et *ex vivo* avec les organoïdes RipKO^{int}.

Le premier point concerne le modèle murin en lui-même. Les souris RIPKO présentent une délétion constitutive de *Rip140* qui n'est par conséquent pas spécifique à l'épithélium mais à l'ensemble des tissus et notamment de la *lamina propria* et de la sous-muqueuse épithéliale. Ainsi il est possible que l'augmentation de la dynamique épithéliale chez les souris RipKO soit en partie médiée par un changement du micro-environnement épithélial au travers de la régulation apportée par les cellules stromales et que la composante épithéliale ne suffise pas à elle seule à expliquer le phénotype observé chez les souris RIPKO.

Ensuite, d'un point de vue technique, l'utilisation du milieu commercial IntestiCult produit par StemCell n'est peut-être pas la plus adaptée pour étudier le rôle de Rip140 sur le développement des organoïdes. En effet, bien que la composition exacte de ce milieu ne soit pas divulguée, il semblerait que ce dernier contienne un inhibiteur de la GSK3 favorisant l'activation de la β-caténine afin

d'augmenter la survie cellulaire et faciliter la mise en culture des cellules ou cryptes intestinales, parfois délicate. RIP140 a été décrit par Marion Lapierre pour son effet positif sur l'expression d'*APC* se traduisant par une répression de l'activité de la signalisation WNT (Lapierre et al., 2014). Si effectivement le milieu IntestiCult contient un inhibiteur de la GSK3, l'effet répresseur par Apc s'en retrouverait altéré et la régulation de Rip140 sur la physiologie intestinale diluée. Cependant, un résultat préliminaire obtenu sur des organoïdes traités *ex vivo* au tamoxifène pendant 48h montre une augmentation du nombre de cellules en prolifération pour les structures issues de cryptes RipKO^{int} (Figure 43). L'incorporation de l'EdU a été effectuée au troisième jour de culture et non au cinquième comme présenté précédemment. De plus, j'ai pu observer de manière presque systématique un effondrement précoce des corps cellulaires pour les organoïdes RipKO^{int}. Il est ainsi possible que la visualisation de l'impact de la délétion de *Rip140* sur la prolifération des cellules épithéliales soit altérée par cet effondrement des corps cellulaires au cinquième jour de culture.

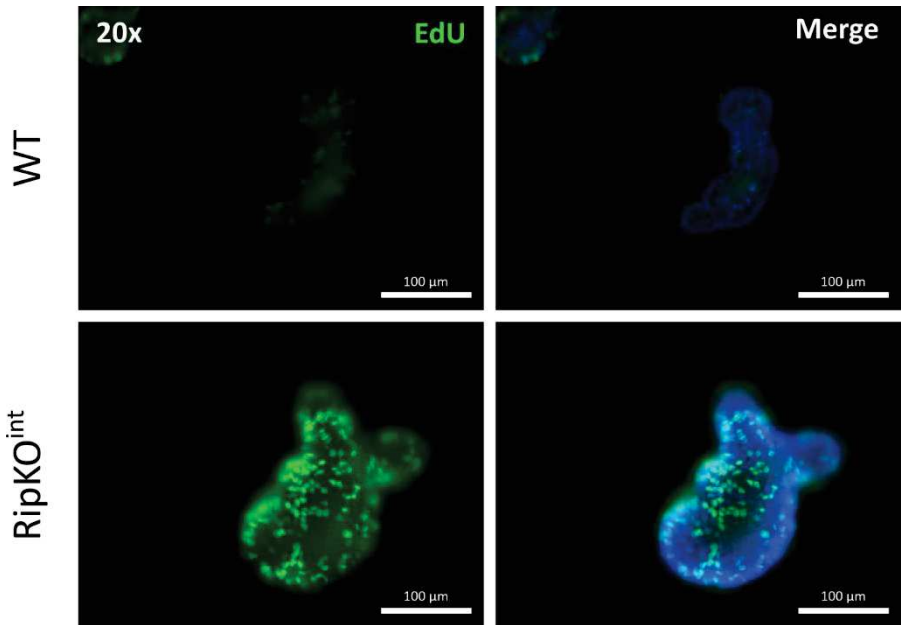


Figure 43 – Augmentation de la prolifération des organoïdes intestinaux. Images représentatives d'organoïdes intestinaux traités au tamoxifène *ex vivo* à 3 jours de culture, marqués à l'EdU (en vert) avec un contre-marquage nucléaire au Hoechst (en bleu).

Les résultats obtenus sur le développement des organoïdes issus de souris RipKO^{int} devront être reproduits en ajustant les conditions de culture et/ou d'acquisition de données notamment vis-à-vis de la prolifération cellulaire dont la cinétique semble cruciale. De plus, il serait intéressant d'étudier le rôle de Rip140 dans le micro-environnement stromal et son impact sur la physiologie épithéliale potentiellement au travers de co-culture d'organoïdes intestinaux et de myofibroblastes sub-épithéliaux par exemple.

2.3.2 Effet de RIP140 dans la tumorigenèse intestinale

2.3.2.a Rip140 réprime le développement tumoral

Comme présenté au cours de mon introduction de thèse et au vue des données obtenues au cours de mes travaux de doctorat, le co-régulateur transcriptionnel RIP140 se présente comme un gène protecteur dans les CCR associé à une valeur pronostic bénéfique en clinique (Gleizes et al., 2021; Lapierre et al., 2014) et un effet répresseur sur la tumorigenèse de cellules cancéreuses après greffe *in vivo* (Lapierre et al., 2014).

Afin d'étudier plus précisément le rôle de notre protéine d'intérêt dans le tumorigenèse intestinale, j'ai travaillé avec un modèle conditionnel inductible pour la délétion de *Rip140* dans les cellules épithéliales intestinales après traitement au tamoxifène de manière concomitante à la délétion d'un allèle du gène suppresseur de tumeur *Apc* spécifiquement dans l'épithélium intestinal murin (modèle RipApcKO^{int}), en comparaison avec un modèle ApcKO^{int} sauvage pour *Rip140* (Figure 44).

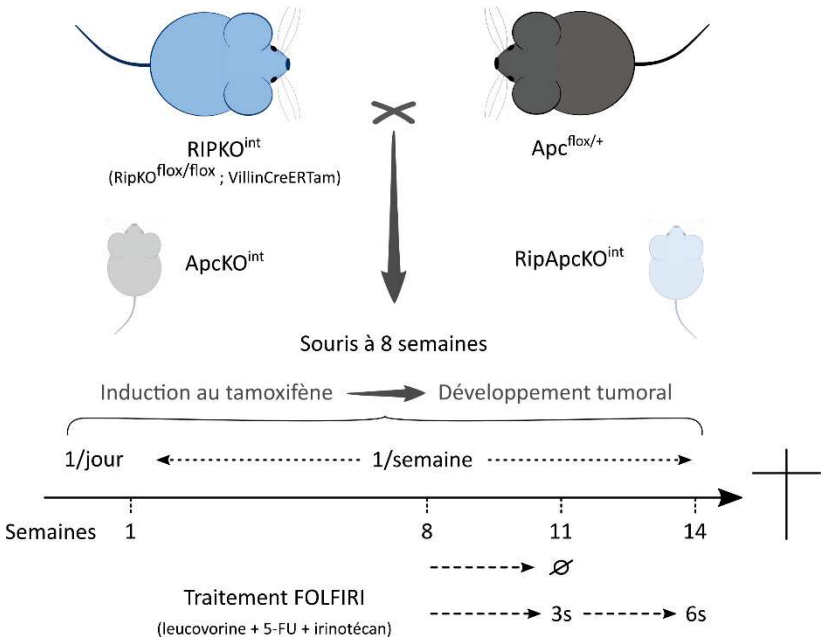


Figure 44 – Un modèle pré-clinique murin pour la chimiothérapie FOLFIRI. Schéma représentatif du croisement des lignées murines RipKO^{int} et Apc$^{flox/+}$ dans le but d'obtenir des individus ApcKO^{int} ou RipApcKO^{int}. La délétion d'un allèle du gène *Apc* de manière concomitante ou non avec la délétion totale de *Rip140* dans l'épithélium intestinal murin est induite par traitement au tamoxifène. En premier, un dépôt une fois par jour tous les 5 jours est effectué pour assurer une pénétrance maximale de la recombinaison. Enfin, un dépôt de tamoxifène est effectué une fois par semaine pendant 7 semaines pour maintenir la délétion des gènes d'intérêt au cours de la tumorigenèse. Les souris ainsi induites pour la délétion d'Apc et Rip140 sont éventuellement passée en protocole FOLFIRI où elles reçoivent une injection d'une suspension de leucovorine, 5-FU et irinotecan deux fois par semaine pendant 3 à 6 semaines. A la fin du protocole, les individus sont sacrifiés et l'intestin ainsi que le colôn sont récupérés pour effectuer les différentes analyses.

Après 8 semaines de développement tumoral, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs intestinales ont été dénombrées puis mesurées. Le nombre et la taille des foyers présentant une structure cryptique aberrante, « Aberrant crypt foci » (ACF), ont été évalués pour la valeur histopathologique de ces structures qui représente la première étape histologique d'un processus oncogénique dans l'épithélium intestinal (Takayama et al., 1998, 2001). De manière intéressante, le nombre d'ACF (Figure 45A) observé chez les individus RipApcKO^{int} est significativement supérieur à celui des animaux sauvages avec en moyenne 3 foyers par animal ApcKO^{int} et 15 foyers pour les animaux RipApcKO^{int} (Figure 45B). La surface des ACF est également accrue par la délétion de *Rip140* avec une taille des structures d'environ 0,05 mm² chez les animaux sauvages et de 0,07 mm² chez les animaux ApcRipKO^{int} (Figure 45C). En corrélation avec ces observations, le nombre d'adénomes (Figure 45D) est significativement plus important chez les souris RipAPcKO^{int} avec en moyenne environ 40 adénomes par animal pour environ 20 chez les individus ApcKO^{int} (Figure 45E). De même, la taille de ces structures à 8 semaine d'induction est significativement plus grande avec une surface moyenne d'environ 0,5 mm² pour les individus sauvages pour le co-régulateur transcriptionnel et une surface moyenne des adénomes de 0,9 mm² chez les individus RipApcKO^{int} (Figure 45F). En conclusion de ces observations, Rip140 réprime d'une part l'initiation des processus oncogéniques mais également le développement des adénomes intestinaux.

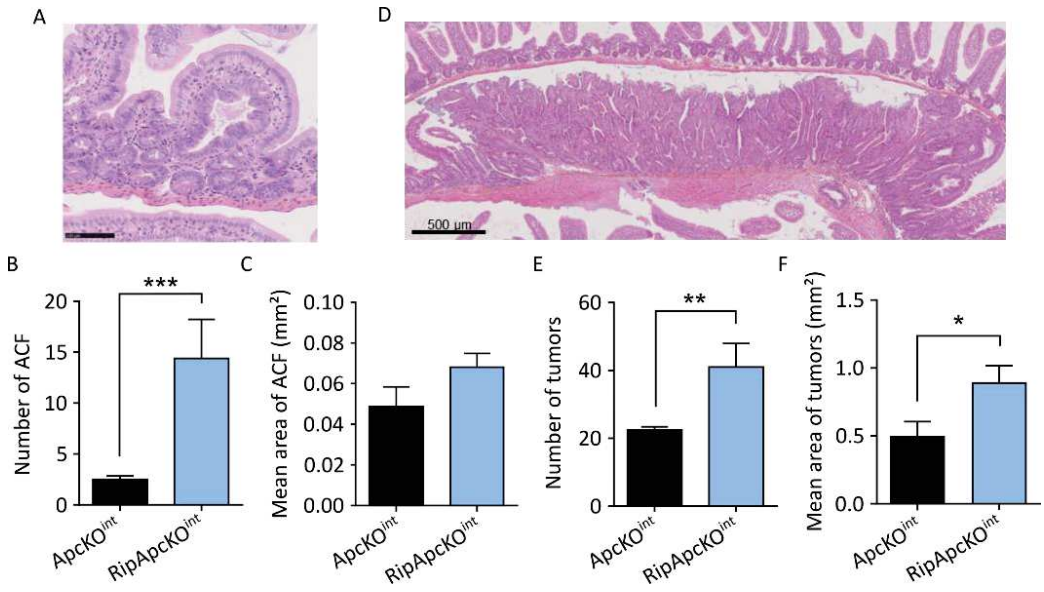


Figure 45 – Rip140 réprime la tumorigenèse intestinale. Photos représentatives d'un ACF (A) et d'une tumeur (D) à partir de coupe intestinale en paraffine avec une coloration H&E. Représentation graphique en histogramme du nombre moyen d'ACF (B), de la surface moyenne des ACF (C), du nombre moyen d'adénomes intestinaux (E) et de la surface moyenne des adénomes par animal (F) avec la cohorte de souris ApcKO^{int} (en noir) et les individus RipApcKO^{int} (en bleu). L'analyse statistique des cohortes d'animaux ApcKO^{int} (n=6) et RipApcKO^{int} (n=5) a été effectuée avec le logiciel Prism par une comparaison multiple en test ANOVA ordinaire à voie unique (* p=0,0332 ; ** p=0,0021 et *** p=0,0002).

2.3.2.b Expression de *RIP140* dans les cellules souches cancéreuses

Les populations souches cancéreuses ont la particularité de soutenir le développement tumoral par leur capacité d'auto-renouvellement et de pluripotence et sont responsables de rechute après traitement en régénérant la masse tumorale (Kreso & Dick, 2014; O'Brien et al., 2007). A la suite de nos observations de l'impact négatif de Rip140 sur le phénotype souche intestinal, son effet répresseur sur la tumorigenèse intestinale ainsi que sa valeur bénéfique chez les patients atteints de CCR, j'ai étudié le rôle de ce co-régulateur transcriptionnel sur la biologie des CSC au travers de l'utilisation de lignées cellulaires.

Un travail préliminaire réalisé en collaboration avec Jean-Marc Pascussi (IGF, Montpellier, France) nous a permis d'enrichir les populations CSC au sein de la lignée cellulaire cancéreuse d'adénocarcinome colorectale HT29 au travers de l'activité ALDH. Cette enzyme de détoxification cellulaire est fortement exprimée dans les populations souches cancéreuses et son activité a notamment était largement décrite comme moyen d'enrichissement des CSC (Huang et al., 2009b; Vishnubalaji et al., 2018). Ainsi par FACS, les populations ALDH+ et ALDH- ont pu être triées et l'analyse de l'expression de *RIP140* dans ces deux populations a été réalisée par RT-qPCR. De manière intéressante, on observe une diminution de l'expression de *RIP140* dans la population ALDH+ en comparaison à la négative (Figure 46A). Afin de conforter cette observation, j'ai mis au point la technique de culture en colosphère des lignées cellulaires HCT116 et SW480. Cette méthode de culture en 3D basée sur l'ensemencement en cellule unique en plaque à faible adhésion permet de sélectionner les populations de CSC qui ont une capacité de survie exacerbée et s'émancipe des signaux de contacte cellules-cellules et cellules-matrice (Vermeulen et al., 2008). Par analyse RT-qPCR j'ai comparé le niveau relatif d'expression de *RIP140* dans les lignées d'adénocarcinomes colorectaux HCT116 et SW480 en conditions 2D classique et colosphère. Dans un modèle de culture 3D, on observe une diminution significative de l'expression de notre protéine d'intérêt d'environ 70% pour la lignée HCT116 et d'un peu plus de 50% pour la lignée SW480 (Figure 46B).

Ainsi, l'enrichissement des populations de CSC au travers de leur activité ALDH ou une sélection fonctionnelle par culture en 3D m'a permis de mettre en évidence une répression de l'expression de *RIP140* dans les populations souches issues de lignées cellulaires d'adénocarcinomes colorectaux. Ces observations suggèrent encore une fois une corrélation inverse entre le potentiel souche des cellules intestinales et le niveau d'expression de *RIP140*.

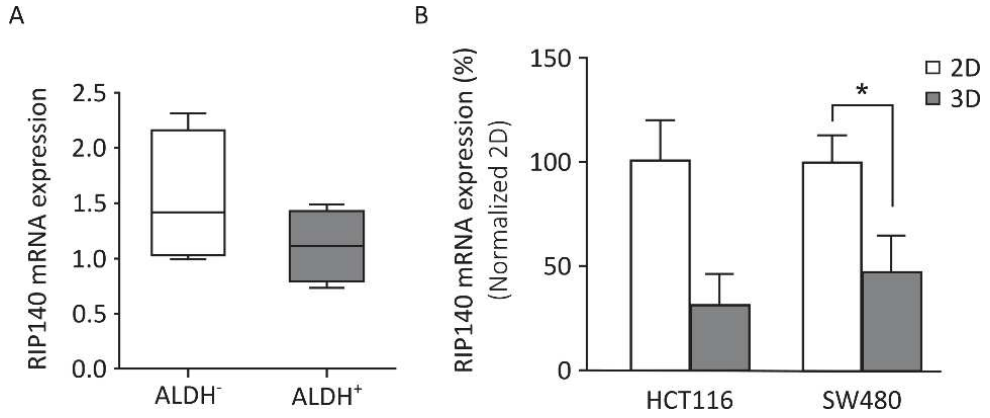


Figure 46 – *RIP140* est moins exprimé dans les populations souches cancéreuses colorectales. (A) Expression relative de *RIP140* analysée par RT-qPCR sur les ARN totaux extraits des populations ALDH négative (ALDH- en blanc) et positive (ALDH+ en gris foncé) après tri par FACS basé sur l'activité ALDH des cellules HT29. (B) Expression relative de *RIP140* analysé par RT-qPCR à partir des ARN totaux extraits des cellules HCT116 ou SW480 cultivées en conditions de culture en 2D (en blanc) ou en modèle 3D colosphère (en gris foncé). La valeur relative est rapportée en pourcentage de la valeur obtenue en condition de culture classique 2D. L'analyse statistique des données a été effectuée sur 3 échantillons différents pour chaque lignée (HCT116 2D n=5, HCT116 3D n=2, SW480 2D n=3 et SW480 3D n=3) et la significativité des résultats analysée par un t test pour la lignée SW480 (* p=0,013). Le nombre d'expériences indépendantes pour la lignée HCT116 cultivée en 3D est trop faible pour appliquer une analyse statistique.

2.3.2.c RIP140 réprime la croissance des CSC

Afin d'étudier l'impact fonctionnel de la sur-expression de *RIP140* sur le potentiel souche des cellules cancéreuses, j'ai travaillé avec les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 respectivement transfectée de manière stable pour l'expression de *RIP140* ou du vecteur vide GFP comme contrôle. De même que précédemment, j'ai employé la culture en colosphère afin d'observer l'impact de la sur-expression de *RIP140* sur la capacité de la lignée SW480 à initier la formation de structure 3D, relatif aux CSC, et sur la croissance de ces structures (Figure 47A). Le maintien de la sur-expression de *RIP140* après 21 jours de culture en modèle colosphère a été confirmé par RT-qPCR (Figure 47B). Malgré une légère augmentation du taux d'initiation, la lignée SW480-RIP140 ne semble pas former significativement plus de structures en culture 3D avec un taux d'initiation d'environ 25% pour les deux lignées cellulaires, ce qui signifie que la proportion de CSC semble rester la même que pour la lignée SW480-GFP (Figure 47C). En revanche, la taille des colosphères formée par la lignée SW480-RIP140 est significativement réduite de moitié après 21 jours de culture en comparaison avec la lignée SW80-GFP qui présentent des tailles respectives d'environ 3.10^4 µm² et 6.10^4 µm² (Figure 47D). La même expérience réalisée sur les lignées stables HCT116-GFP et HCT116-RIP140 n'a pas révélé de différence significative en termes d'initiation ou de taille des colosphères (Données non présentées).

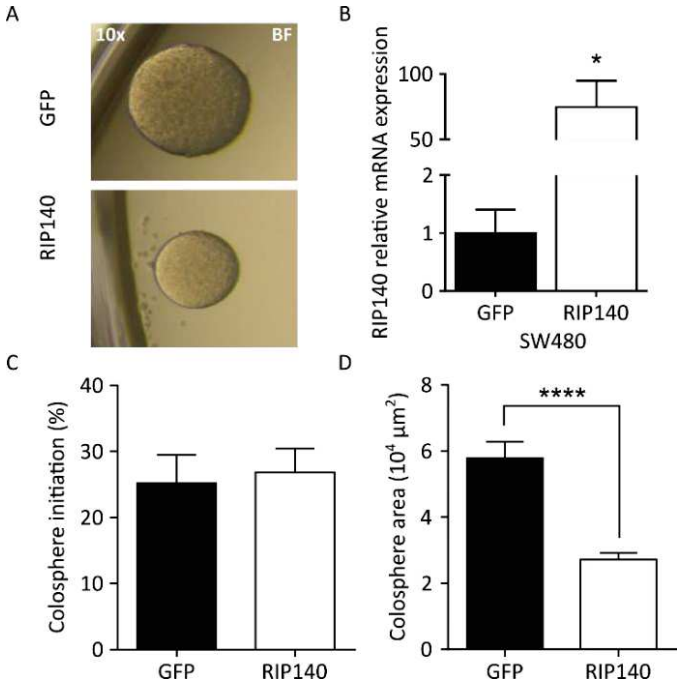


Figure 47 – RIP140 réprime la croissance des CSC en culture 3D. (A) Images représentatives de colosphères obtenues après 21 jours de culture en condition non-adhérente. (B) Représentation graphique en histogrammes de l'expression relative de *RIP140* analysée par RT-qPCR sur les ARN totaux extraits des colosphères SW480-GFP et SW480-RIP140 à 21 jours de culture. Chaque barre d'histogramme représente la moyenne de plusieurs expériences répliquées avec n=4 pour la lignée SW480-GFP (en noir) et n=4 pour la lignée SW480 RIP140 (en blanc). L'analyse statistique des données a été effectuée par un test Mann-Whitney (* $p < 0,05$) (C) Représentation en histogramme de la moyenne du ratio du nombre de colosphères obtenues après 21 jours de culture exprimée en pourcentage du nombre initial de puits ensemencés avec une cellule unique par tri cellulaire. (D) Représentation en histogramme de la surface moyenne des colosphères obtenues après 21 jours de culture exprimée en µm². Chaque barre d'histogramme représente la moyenne de plusieurs expériences répliquées avec n=9 pour la lignée SW480-GFP (en noir) et n=9 pour la lignée SW480 RIP140 (en blanc) (C et D). L'analyse statistique des données a été effectuée par un t test (**** $p < 0,0001$).

2.3.2.d RIP140 réprime la dynamique des populations souches

Afin d'étendre la compréhension du rôle de RIP140 dans la dynamique des populations souches en culture 3D, j'ai dissocié les structures obtenues à 21 jours de culture pour réaliser un nouvel ensemencement. Ce passage des colosphères devait permettre d'observer une éventuelle adaptation des lignées notamment la lignée SW480-RIP140 à la sur-expression du co-régulateur en conditions 3D.

Comme attendu, le nombre de cellules formant des colosphères diminue significativement après passage. Cependant, la lignée cellulaire SW480-RIP140 semble former plus de colosphères avec un taux d'initiation supérieur à 12% en comparaison à la lignée SW480-GFP dont seulement 4% des cellules ensemencées forme des colosphères (Figure 48A). La surface des structures obtenues après

21 jours de culture diminue également significativement dans les deux lignées cellulaires après passage avec une surface en moyenne 0,8 fois plus petite pour les cellules SW480-GFP et 0,6 fois plus petites pour les SW480-RIP140 (Figure 48B). En conclusion de ces observations, il semble que la répression du potentiel souche des lignées cellulaires issues d'adénocarcinomes de patients par la sur-expression stable de *RIP140* ralentisse la dynamique générale des colosphères favorisant la résistance des CSC au stress induit par le passage.

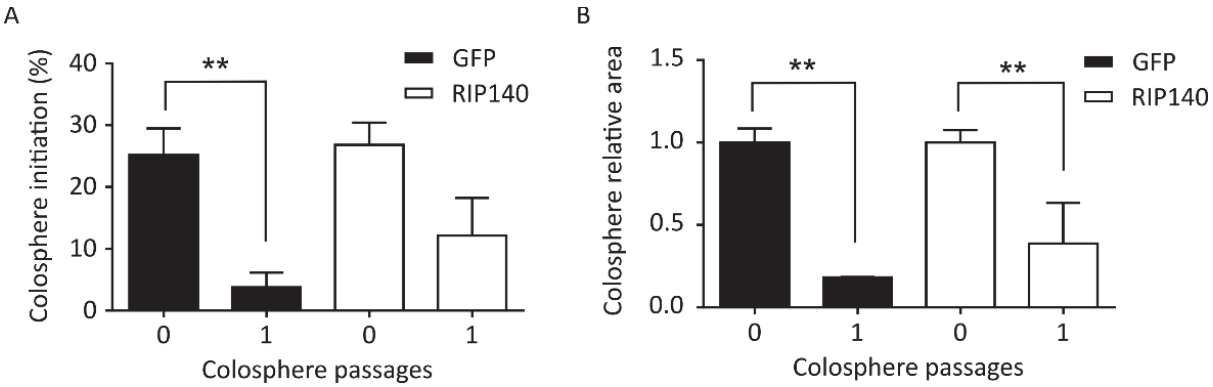


Figure 48 – RIP140 réprime la dynamique des colosphères. (A) Représentation en histogramme de la moyenne du ratio du nombre de colosphères obtenues pour chaque passage après 21 jours de culture exprimée en pourcentage du nombre initial de puits ensemencés avec une cellule unique par tri cellulaire. (B) Représentation en histogramme de la surface moyenne des colosphères obtenues pour chaque passage après 21 jours de culture et rapportée au passage 0 respectivement pour chaque lignée. Chaque barre d'histogramme représente la moyenne de plusieurs expériences répliquées avec pour le passage initial (passage 0) n=9 pour la lignée SW480-GFP (en noir) et n=9 pour la lignée SW480 RIP140 (en blanc). Pour le premier passage (passage 1), plusieurs expériences indépendantes ont pu être réalisées, n= 4 pour les deux lignées cellulaires SW480-GFP et SW480-RIP140. L'analyse statistique des données a été effectuée avec un t test non apparié entre les passages 0 et 1 respectivement à chaque lignée (** $p < 0,01$).

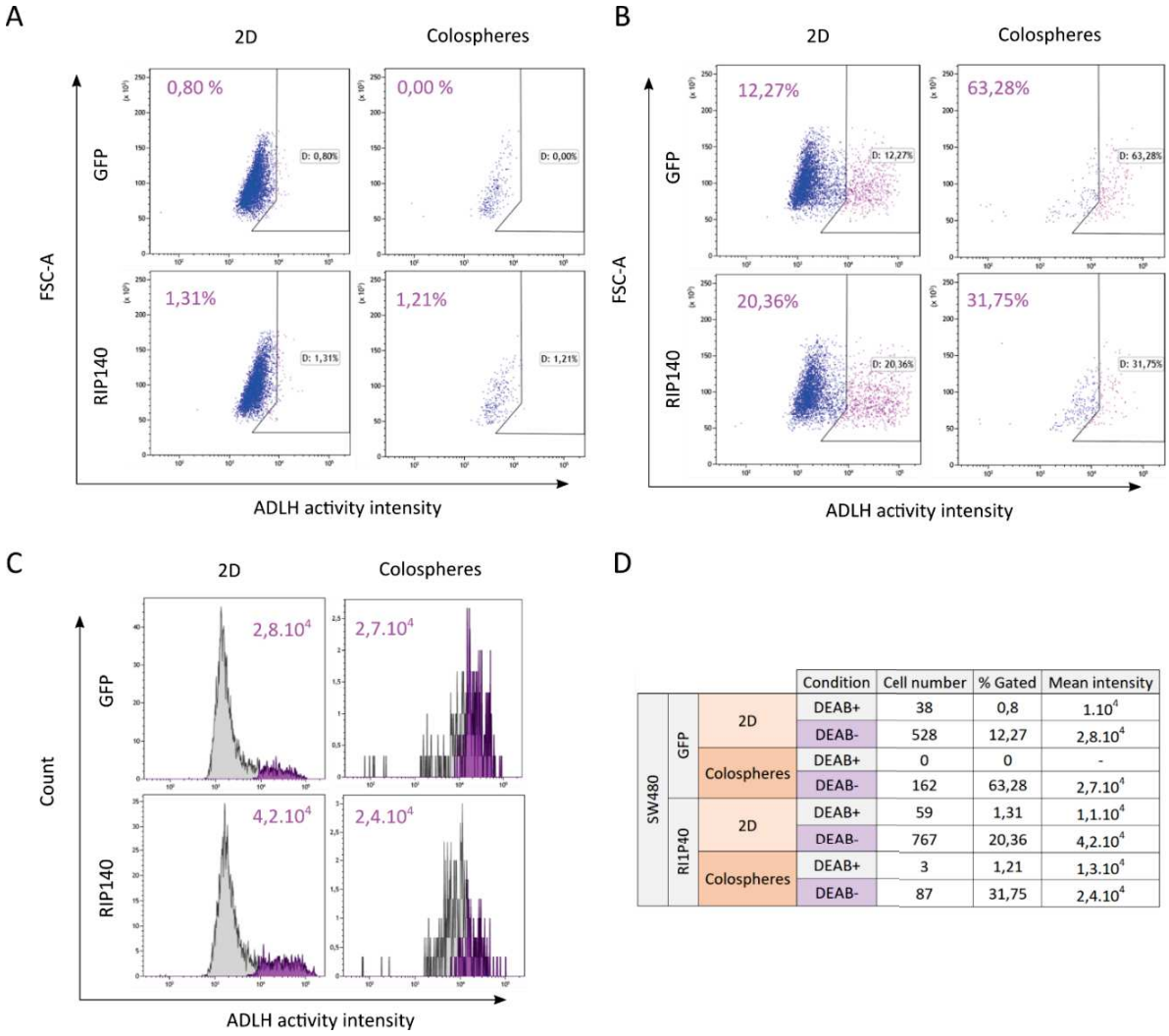
2.3.2.e RIP140 réprime le phénotype des CSC

Dans le but de caractériser le comportement des cellules initiatrices de colosphères au sein des lignées SW480-GFP et SW480 RIP140 j'ai observé l'activité ALDH des cellules avant ensemencement et après 21 jours de culture en modèle colosphère. L'analyse de cette activité enzymatique, révélatrice du potentiel souche des cellules cancéreuses, a été effectuée par cytométrie en flux sur suspension cellulaire après dissociation des colosphères.

La sélection des populations positives est basée la fluorescence du contrôle négatif propre à chaque condition pour lequel un inhibiteur de l'activité ALDH a été ajouté, le N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) (Morgan et al., 2015) (Figure 49A). De manière intéressante, le pourcentage de cellules ALDH+ augmente dans les deux lignées cellulaires SW480-GFP et SW480-

RIP140 entre l'ensemencement et le point d'arrêt de l'expérience, à 21 jours de culture en colosphères. En effet, on observe une augmentation d'environ 50% de cellules ALDH+ pour la lignée SW480-GFP et une augmentation d'environ 10% pour la lignée SW480-RIP140 (Figure 49B). Cette observation va en faveur d'un enrichissement en CSC par la culture en colosphère. De plus, cet enrichissement semble être moins important dans la lignée sur-exprimant *RIP140* de manière stable (Figure 49B). Enfin, après 21 jours de culture, on observe environ 63% de cellules ADLH+ dans la lignée SW480-GFP et environ 32% pour la lignée SW480-RIP140 (Figure 49B). Ainsi, nous pouvons en conclure que d'une part la culture en modèle colosphère enrichie la population de CSC par sélection fonctionnelle et d'une autre, que la sur-expression stable de *RIP140* réprime le phénotype CSC en conditions de culture 3D après ensemencement en cellule unique. De manière surprenante, le nombre de cellules ALDH+ augmente d'environ 8% entre les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 après culture 2D classique avant ensemencement en cellule unique. Cette observation suggère que la sur-expression stable de *RIP140* n'ait pas le même impact en fonction de la condition des cellules à savoir en 2D ou en 3D.

Enfin, l'intensité moyenne de fluorescence associée à la population ALDH+ a été mesurée après acquisition, relatant de l'intensité de l'activité enzymatique. L'intensité de fluorescence exprimée en unité arbitraire (UA) ne semble pas être influencée par la culture en colosphère pour la lignée SW480-GFP avec une valeur arbitraire d'environ $2,7.10^4$ UA (Figure 49C). De manière surprenante, aucune différence significative, si ce n'est une légère diminution de cette valeur, n'est observée entre les deux lignées stables après 21 jours de culture, avec une valeur de $2,4.10^4$ UA pour les cellules SW480-RIP140 (Figure 49C). Cependant, avant ensemencement, la lignée SW480-RIP140 présente une intensité moyenne de fluorescence de $4,2.10^4$ UA, plus forte que la lignée contrôle qui est à $2,8.10^4$ UA (Figure 49C). Cette observation soutien l'hypothèse d'une divergence dans le rôle de *RIP140* dans la régulation du potentiel souche entre une culture 2D classique *versus* une culture 3D basée sur un ensemencement en cellules uniques. Néanmoins, il semble que la sur-expression stable de notre protéine d'intérêt réprime l'intensité de fluorescence associée à l'activité ALDH par une adaptation des cellules SW480-RIP140 au cours de ces 21 jours de culture en colosphère et par extrapolation, une répression de l'activité ou de l'expression des enzymes ALDH. L'intensité des contrôles négatifs ainsi que l'ensemble des valeurs sont compilées dans un tableau (Figure 49D). Ces résultats sont cependant préliminaires et les observations réalisées jusqu'ici nécessitent reproduction.



			Condition	Cell number	% Gated	Mean intensity
SW480	GFP	2D	DEAB+	38	0,8	1.10^4
			DEAB-	528	12,27	$2,8.10^4$
		Colospheres	DEAB+	0	0	-
			DEAB-	162	63,28	$2,7.10^4$
	RI1P40	2D	DEAB+	59	1,31	$1,1.10^4$
			DEAB-	767	20,36	$4,2.10^4$
		Colospheres	DEAB+	3	1,21	$1,3.10^4$
			DEAB-	87	31,75	$2,4.10^4$

Figure 49 – RIP140 réprime la population ALDH+ en culture 3D. Représentation en « dot-plot » de l'aire du « Forward scatter » (FSC-A) en fonction de l'intensité de fluorescence de l'activité ALDH tous deux exprimés en UA pour les conditions contrôles contenant l'inhibiteur DEAB (A) et pour les conditions tests sans inhibiteur (B). (C) Représentation en histogramme du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence de l'activité ALDH exprimée en UA. Ces résultats correspondent à une seule expérience pour laquelle chaque l'activité ALDH a été évaluée pour les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 toutes les deux avant ensemencement (2D) et après 21 jours de culture en 3D (Colospheres). (D) Les résultats de l'ensemble des contrôles et tests sont compilés dans le tableau ci-dessus.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires associés à l'effet répresseur de RIP140 sur le potentiel souche des CSC, l'expression de marqueurs souches a été quantifiée par RT-qCPR. Des données préliminaires obtenues par la délétion ou la sur-expression constitutive de *Rip140* dans les modèles murins transgéniques constitutifs RIPKO et RIPTg ont révélé une augmentation de l'expression de *Bmi1* 4 fois supérieure à l'expression observée dans les animaux WT et une réduction de 0,7 fois son expression dans le modèle RIPTg (Figure 50A et B). *Bmi1* est connue pour être fortement exprimé dans les populations cellulaires souches intestinales et notamment la population

de réserve (+4) (N. Li et al., 2014; Sangiorgi & Capecchi, 2008). Ce membre du complexe répresseur Polycomb 1 (PRC1), impliqué dans la formation de l'hétérochromatine par modifications épigénétiques, régule un grand nombre de processus physiopathologiques en contrôlant le cycle cellulaire et la sénescence au travers de la répression du locus *Ink4a/Arf* codant pour les protéines p16 (Ink4a) et p19 (Arf). De plus, BMI1 est largement décrit pour son implication dans les mécanismes DDR et la régulation du potentiel souche notamment cancéreux (Bhattacharya et al., 2015; Gleizes et al., 2018). En effet, la délétion de *Bmi1* est associée à une réduction drastique de la tumorigenèse dans des modèles murins *Apc* muté et l'inhibition de son activité réduit significativement le nombre de CSC dans les cancers du colôn (Kreso et al., 2014; Maynard et al., 2014).

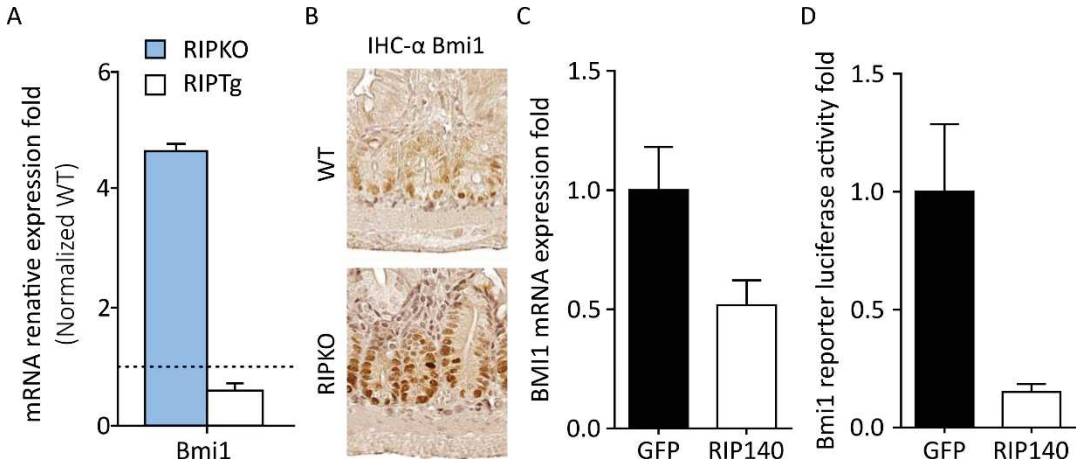


Figure 50 – RIP140 réprime l'expression du pro-oncogène BMI1 au niveau transcriptionnel. (A) Représentation graphique en histogrammes de l'expression de *Bmi1* mesurée par RT-qPCR à partir des ARN totaux extraits de l'épithélium intestinal murin de souris RIPKO (en bleu, n=3) et RIPTg (en blanc, n=3) et rapportée à son expression chez les souris WT (n=3) (B) Images représentatives du marquage par IHC de la protéine Bmi1 dans les cryptes intestinales des animaux WT et RIPKO. (C) Représentation graphique par histogramme de l'expression de *BMI1* mesurée par RT-qPCR dans la lignée SW480-RIP140 (en blanc, n=3) et rapportée à son expression dans la lignée contrôle SW480-GFP (en noir, n=3). L'analyse statistique de l'expression de relative de *BMI1* effectuée par un t test sans obtenir de significativité. (D) Représentation graphique par histogramme de l'activité luciférase dépendante du promoteur de *BMI1* dans la lignée SW480-RIP140 (en blanc, n=2) rapportée à l'activité luciférase obtenue dans la lignée SW480-GFP (en noir, n=2). Les analyses statistiques n'ont pas été effectuées car le nombre d'expériences indépendantes est trop petit.

Ainsi, j'ai étudié l'expression de *BMI1* dans les lignées cellulaires SW480-GFP et SW480-RIP140 dans des conditions de culture 2D et en colosphère. La sur-expression stable de *RIP140* n'a pas révélé de modification de l'expression de *BMI1* dans un modèle de culture 3D vraisemblablement dû à une forte variabilité entre les réplicats biologiques (données non présentées). Cependant, j'ai pu observer une diminution par moitié de l'expression de ce pro-oncogène dans la lignée SW480-RIP140 en comparaison à la lignée contrôle en culture 2D classique (Figure 50C). Enfin, j'ai réalisé des expériences de rapporteurs luciférase pour la région promotrice de *BMI1* révélant une diminution drastique de

plus de 80% de l'activité luciférase en condition de sur-expression stable de *RIP140* en comparaison à la lignée SW480-GFP (Figure 50D). Bien que ces expériences nécessitent d'être reproduites plus largement, elle suggèrent une répression de l'expression du pro-oncogène par la sur-expression de *RIP140* en corrélation avec l'effet répresseur du co-régulateur transcriptionnel sur le potentiel souche des cellules cancéreuses.

En conclusion de cette section, j'ai pu mettre en évidence une corrélation inverse entre l'expression de *RIP140* et le potentiel souche des cellules cancéreuses. De manière fonctionnelle, la sur-expression stable de ce gène dans la lignée cancéreuse colorectale SW480 réprime la croissance des CSC dans un modèle de culture 3D potentiellement associé à une prévention de l'épuisement des populations souches après passage des colosphères. De plus, bien que non retrouvé dans la culture 3D, RIP140 semble réprimer l'expression du pro-oncogène *BMI1* au niveau transcriptionnel dans des conditions de culture 2D classique. La régulation RIP140/BMI1 représente ainsi un axe moléculaire intéressant associé à l'effet répresseur de la croissance des CSC et devrait être plus amplement développé dans des modèles de culture 3D ou *in vivo*.

2.3.3 RIP140 influence la réponse tumorale au FOLFIRI

2.3.3.a RIP140 favorise la chimiorésistance des cellules cancéreuses *in vitro*

La valeur clinique bénéfique de *RIP140* pour la survie des patients atteints de CCR et le rôle répresseur de ce gène sur le comportement et le phénotype des CSC nous a incité à étudier le rôle de ce co-régulateur transcriptionnel dans la réponse aux chimiothérapies à la vue du lien qu'il existe entre les CSC, leurs capacités accrues de résistance aux chimiothérapies et leur faculté à régénérer la tumeur après traitement. Les chimiothérapies utilisées dans le traitement des CCR sont basées sur l'utilisation du 5-FU en combinaison au non à l'irinotecan (FOLFIRI) et l'oxaliplatine (FOLFIRINOX) utilisés en temps qu'adjuvants pour les patients atteints de CCR dès les stades II de la maladie (Schmoll et al., 2012).

Dans un premier temps, l'étude du rôle de RIP140 dans la réponse des cellules cancéreuses à la chimiothérapie a été réalisée sur les lignées cellulaires SW480-GFP et SW480-RIP140 *in vitro*. Chaque composé thérapeutique a été testé en gamme de concentration sur une culture 3D en sphéroïde. Comme attendu, un effet répresseur de la sur-expression stable de *RIP140* sur la croissance de ces structures a pu être observé dès les premiers jours de culture avec une différence significative à partir du sixième jour (Figure 51 A et B). Ces observations confirment les données obtenues précédemment par les travaux de Marion Lapierre (Lapierre et al., 2014) et l'effet répresseur du co-régulateur transcriptionnel sur la croissance des colosphères et le développement tumoral chez les souris ApcKO^{int}.

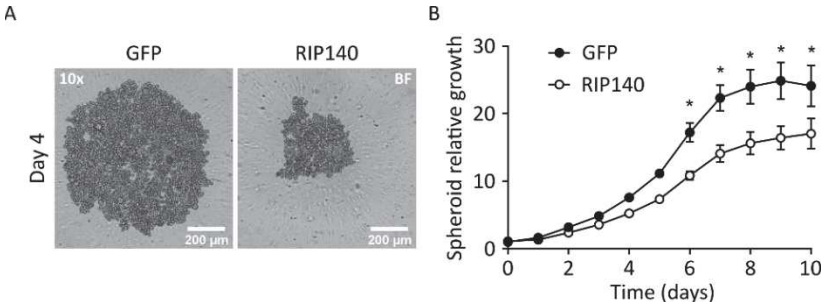


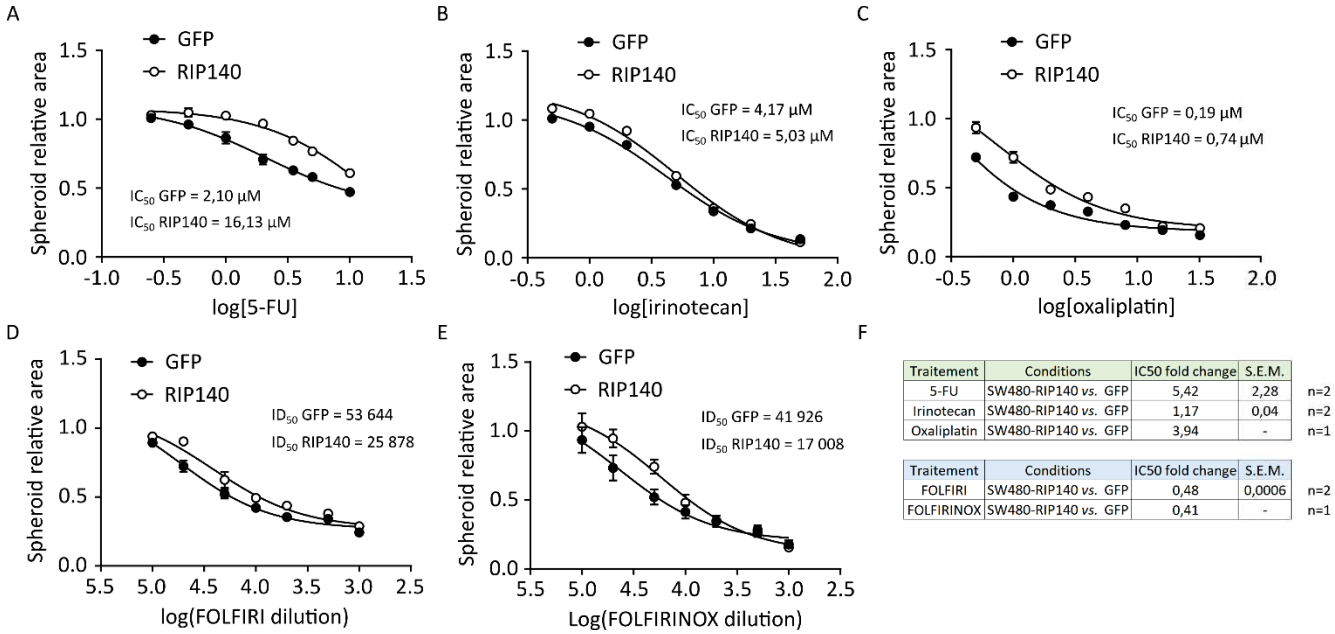
Figure 51 – RIP140 réprime la croissance des cellules cancéreuses en culture 3D. (A) Images représentatives des sphéroïdes obtenus au quatrième jour de culture. Photos prise en microscopie optique à transmission à l'objectif 10x (barre d'échelle 200 µm). (B) Représentation graphique en XY de la surface relative des sphéroïdes issus des lignées SW480-GFP (en noir, n=3) et SW480-RIP140 (en blanc, n=3) en fonction du temps (en jours). Les valeurs sont rapportées à la surface des structures 3D au premier jour de culture. L'analyse statistique de la différence de croissance a été réalisée par un test Mann-Withney avec un seuil pour la p-value $p<0,05$.

Par la suite, l'effet du 5-FU, de l'irinotecan et de l'oxaliplatine a été testé pour chaque molécule seule ou en combinaison FOLFIRI (5-FU et irinotecan) et FOLFIRINOX (5-FU, irinotecan et oxaliplatine) sur les deux lignées cellulaires en parallèle. La surface des sphéroïdes a été mesurée de manière automatique avec le système Incucyte sur plusieurs jours de culture pour suivre le développement des sphéroïdes en réponse aux différentes concentrations ou dilutions des composés. Chaque molécule testée séparément altère la croissance des structures dans les deux lignées cellulaires. Afin de quantifier plus précisément l'impact de chaque composé, le calcul de la concentration inhibitrice de 50% de la croissance des sphéroïdes (IC_{50}) a été réalisé par régression non linéaire de la surface relative des structures en fonction de la concentration en logarithme base 10 de chaque composant chimiothérapeutique.

Globalement, on observe une augmentation de l'IC_{50} pour chaque composé testé individuellement pour la lignée cellulaire SW480-RIP140. Une expérience représentative de l'effet du 5-FU sur la croissance des sphéroïdes montre une IC_{50} de 2,10 µM pour la lignée SW480-GFP et de 16,13 µM pour la lignée SW480-RIP140. De manière similaire, l'IC_{50} de l'irinotecan est de 4,17 µM pour la lignée GFP et passe à 5,03 µM pour la lignée sur-exprimant *RIP140*. Enfin, l'IC_{50} de l'oxaliplatine passe de 0,19 µM à 0,74 µM pour les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 respectivement (Figure 52A, B et C). Ces données confirment les résultats récemment publiés par l'équipe (Pallassin et al. Cancers. 2021). Ensuite, les combinaisons FOLFIRI et FOLFIRINOX ont été utilisées par dilution de la suspension initiale. Afin d'étudier l'effet de ces chimiothérapies, le calcul de la dilution inhibitrice de 50% de la croissance des sphéroïdes (ID_{50}) a été réalisé par régression non linéaire de la surface relative des structures en fonction de la dilution de chaque traitement, exprimée en logarithme base 10. On constate une diminution de l'ID_{50} qui passe de 53 644 à 25 878 pour le FOLFIRI et de 41 926 à 17 008 pour le FOLFIRINOX respectivement pour les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 (Figure 52D et E).

Le ratio de ces valeurs indique une augmentation de la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition de 50% de la croissance des sphéroïdes issus de la lignée SW480-RIP140 par environ 5,4 fois pour le 5-FU, 1,17 fois pour l'irinotecan et 3,93 fois pour l'oxaliplatine (Figure 52F). De même, le ratio de la dilution nécessaire pour obtenir une répression de 50% de la croissance des sphéroïdes issus de la lignée SW480-RIP140 indique une diminution de la dilution par 0,48 fois pour le FOLFIRI et 0,41 fois pour le FOLFIRINOX (Figure 52F).

Ainsi et en conclusion de ces observations, la sur-expression stable de *RIP140* dans des lignées humaines de CCR semble être associée à une augmentation de la résistance des sphéroïdes aux traitements chimiothérapeutiques et plus particulièrement le 5-FU et l'oxaliplatine.



Traitement	Conditions	IC50 fold change	S.E.M.	
5-FU	SW480-RIP140 *vs.* GFP	5,42	2,28	n=2
Irinotecan	SW480-RIP140 *vs.* GFP	1,17	0,04	n=2
Oxaliplatin	SW480-RIP140 *vs.* GFP	3,94	-	n=1

Traitement	Conditions	IC50 fold change	S.E.M.	
FOLFIRI	SW480-RIP140 *vs.* GFP	0,48	0,0006	n=2
FOLFIRINOX	SW480-RIP140 *vs.* GFP	0,41	-	n=1

Figure 52 – RIP140 semble induire la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Représentation graphique en XY de la surface des sphéroïdes relativement au contrôle non traité et en fonction du logarithme base 10 de la concentration en 5-FU (A), en irinotecan (B) et oxaliplatine (C) ou de la dilution du FOLFIRI (D) et FOLFIRINOX (E) pour les lignées cellulaires SW480-GFP (en noir) et SW480-RIP140 (en blanc). La régression linéaire calculée avec le logiciel Prism est représentée par une courbe correspondant à chaque lignée. La valeur de la concentration (IC_{50}) ou de la dilution (ID_{50}) inhibitrice de 50% de la croissance des sphéroïdes est donnée pour chaque expérience représentative. La moyenne du ratio de l'IC_{50} ou de l'ID_{50} obtenue entre les lignées SW480-GFP et SW480-RIP140 pour chaque composé seul ou en combinaison est représenté dans un tableau récapitulatif (F). Le nombre d'expériences indépendantes n'a pas permis de réaliser une analyse statistique des différences observées.

2.3.3.b Etude de la réponse au FOLFIRI chez les souris ApcKO^{int}

Pour approfondir l'étude du rôle de Rip140 dans la réponse des cellules cancéreuses et plus largement la réponse tumorale à la chimiothérapie, nous avons mis au point un protocole de

traitement au FOLFIRI chez les souris ApcKO^{int} et RipApcKO^{int}. Deux administrations hebdomadaires ont a été effectuées chez les souris à partir de 8 semaines d'induction au tamoxifène sur une période de 3 à 6 semaines (Figure 44). La première approche fut d'étudier l'impact du FOLFIRI sur nos animaux ApcKO^{int} sauvages pour *Rip140* pour évaluer l'efficacité du traitement en lui-même en dénombrant les tumeurs et mesurant la surface de celles-ci à 3 et 6 semaines de traitement en comparaison aux animaux non traités à 11 semaines d'induction au tamoxifène (Figure 44).

A la troisième semaine de traitement, on observe une diminution drastique du nombre de tumeurs moyennes par animaux avec un pourcentage de tumeurs résiduelles d'environ 27% qui chute à 6 semaines de traitement à environ 13% (Figure 53A). La taille moyenne des tumeurs est également largement impactée par le traitement FOLFIRI dès la troisième semaine de traitement pour atteindre une surface moyenne d'environ 0,25 mm² en comparaison aux contrôles non traitées qui présentent une taille moyenne des tumeurs d'environ 3 mm² et cette taille diminue encore à 6 semaines pour atteindre environ 0,1 mm² (Figure 53B). Ainsi, nous pouvons conclure que le traitement au FOLFIRI a une bonne efficacité en termes de réduction du nombre et de la taille des tumeurs chez les individus ApcKO^{int} en comparaison à des animaux non traités, validant ainsi le modèle pré-clinique mis en place.

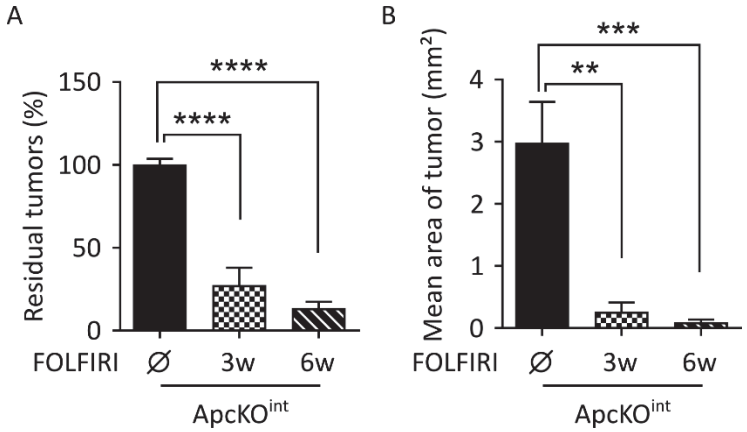


Figure 53 – Validation du traitement FOLFIRI dans le modèle ApcKO^{int}. Représentation graphique en histogrammes du pourcentage moyen de tumeurs résiduelles par animal à 3 et 6 semaines de traitement au FOLFIRI (respectivement barres noires quadrillées et rayées) (A) et de la surface moyenne des tumeurs résiduelles par animal à 3 et 6 semaines de traitement (B). Les données obtenues ont été comparées aux animaux non traités au FOLFIRI (Ø, barre noire pleine). L'analyse statistique des cohortes d'animaux ApcKO^{int} non traités (n=6), à 3 semaines de traitement (n=4) et 6 semaines de traitement (n=4) a été effectuée avec le logiciel Prism par une comparaison multiple en test ANOVA ordinaire à voie unique (** p=0,0021 ; *** p=0,0002 et **** p=0,0001).

L'impact du traitement au FOLFIRI sur l'épithélium intestinal murin a pu être évalué au niveau transcriptionnel par séquençage des ARN totaux extraits à partir de la paroi intestinale de souris ApcKO^{int} traitées pendant 3 semaines au FOLFIRI en comparaison du même matériel biologique issu de souris ApcKO^{int} n'ayant pas reçu de traitement chimiothérapeutique. En se basant sur une p-value < 0,05, 1449 gènes différentiellement exprimés en réponse au traitement FOLFIRI ont pu être

identifiés. L'enrichissement fonctionnel pour cette liste de gènes à partir de la base de données GO pour les processus biologiques (BP, biological processes) a été réalisé avec le serveur g:Profiler (Raudvere et al., 2019) dont les 30 termes les plus significatifs en sont représentés (Figure 54A).

De manière générale, de cette analyse émerge une forte signature immunitaire ainsi que des processus associés à la réponse cellulaire au stress ou plus largement à une réponse au changement du milieu extra-cellulaire. Afin d'étudier plus précisément la réponse cellulaire à la chimiothérapie, cet ensemble de gènes a été confronté à différentes bases de données dont quelques exemples sont présentés ci-après. L'analyse des fonctions moléculaires (MF) sur la base de données GO a révélé plusieurs termes associés notamment à l'activité d'oxydoréduction nécessaire à la détoxification cellulaire des ROS générées par la chimiothérapie (Conklin, 2004) (Figure 54A). L'analyse par la base de données KEGG a quant à elle révélée des termes associés notamment à la voie de signalisation p53 connue pour son rôle de gardien de l'intégrité cellulaire (Vousden & Prives, 2009), le métabolisme Glutathione, impliqué dans le métabolisme et l'efflux des xénobiotiques (McLellan & Wolf, 1999), et le cytochrome P450 pour son rôle de détoxification cellulaire également dans le métabolisme des xénobiotiques (Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg, 2006) (Figure 54A). Enfin, et comme exemple issu de l'analyse par la base de données TRANSFAC, bons nombres de gènes associés à la réponse au FOLFIRI possèdent un élément de régulation reconnu par le suppresseur de tumeur p53 (Figure 54A).

Un grand nombre de BP sont associés à la réponse immunitaire dont les acteurs sont connus pour influencer le développement tumoral. Une estimation de l'infiltration des différentes populations immunitaires basée sur leur signature transcriptomique au sein de l'épithélium des souris $ApcKO^{int}$ traitées au FOLFIRI a été réalisée à partir de la liste des 1449 gènes identifiés. Cette analyse révèle majoritairement une augmentation des populations lymphocytaires T CD8 et une diminution de l'infiltration des lymphocytes T CD4 et lymphocytes B. Les lymphocytes T sont particulièrement associés à l'évolution tumorale et au pronostic du patient avec les populations lymphocytaires T CD8 connues pour être de bon pronostic dans les CCR et les lymphocytes T CD4 dont la valeur pronostic dépend de l'orientation de leur fonctions « helper » avec un bon pronostic associé à la réponse immunitaire cellulaire Th1 et un mauvais pronostic pour la réponse inflammatoire Th17 (Fridman et al., 2012).

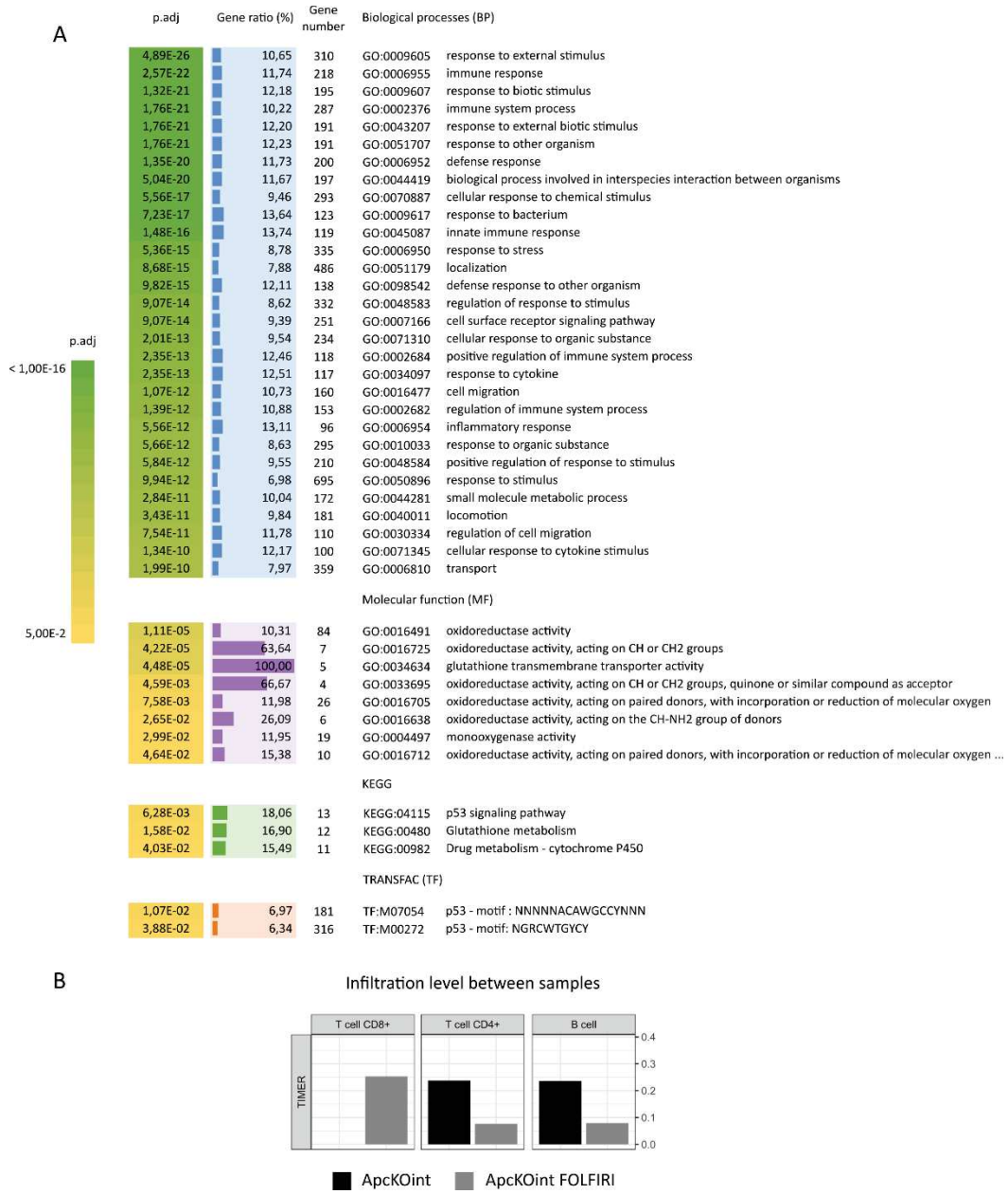


Figure 54 – Enrichissement fonctionnel et estimation de l'infiltration immunitaire associée à la réponse au traitement FOLFIRI. Représentation de l'analyse par GO des 30 processus biologiques (BP) les plus significatifs et d'exemples de fonctions moléculaires (MF), de termes KEGG et de facteurs de transcriptions (TF) associés à l'ensemble des gènes dérégulés par le traitement FOLFIRI chez les souris ApcKO^{int} dans l'épithélium intestinal murin. L'analyse de l'enrichissement fonctionnel des gènes différentiellement exprimés a été effectuée avec le serveur g:Profiler (Raudvere et al., 2019) avec les base de données GO pour les termes BP et MF, KEGG et TRANSFAC. Le nombre de gènes et l'intersection du nombre de gènes impliqués dans chaque BP par rapport au nombre total de gènes associés à chaque terme est exprimé en pourcentage représenté par une barre proportionnelle à leur valeur. La significativité des résultats a été corrigé par la méthode Benjamini-Hochberg (p.adj) avec un seuil à 0,05. (B) L'analyse de l'estimation des populations cellulaires immunitaires associées à l'ensemble des gènes différentiellement dérégulés en réponse au FOLFIRI a été effectuée avec le serveur et l'ensemble des bases de données TIMER 2.0 (T. Li et al., 2020). L'estimation de l'infiltration des populations immunitaires dans le tissu épithélial murin est exprimée en UA basé sur la moyenne des TPM (Transcript per kilobase million) normalisés pour chaque condition.

Afin d'approfondir l'étude de la réponse au FOLFIRI, l'association de ces gènes en fonction du niveau TPM par individus a été réalisée et représentée sous forme de heatmap. Bien que les deux individus traités au FOLFIRI semblent présenter une réponse transcriptomique différente, deux groupes de gènes dont l'expression est induite ou diminuée par la chimiothérapie ont pu être identifiés (Figure 55A). Le premier groupe comporte 856 gènes dont 107 d'entre eux sont communément induits chez les deux individus traités au FOLFIRI et 749 dont l'expression est fortement induite chez la souris ApcKO^{int} 660 traitée au FOLFIRI en comparaison aux souris non traitées (Figure 55A). En revanche la souris ApcKO^{int} 1561 ne semble pas présenter une réponse similaire pour l'expression de ces gènes qui est plus proche des valeurs observées chez les souris non traitées (Figure 55A).

L'analyse de l'enrichissement fonctionnel associée aux 107 gènes communs aux deux souris traitées n'a pas révélé de processus significativement enrichis. En revanche, l'enrichissement basé sur les 749 autres gènes récapitule l'ensemble des processus observés sur la totalité du groupe 1 (données non présentées). Ainsi, l'étude de l'enrichissement fonctionnel pour les BP issus de la base de données GO a été réalisé sur la totalité du groupe 1 (856 gènes). Les 30 BP les plus significatifs sont principalement associés à l'infiltration immunitaire, la réponse aux cytokines et chimiokines, le remodelage tissulaire et le métabolisme des ROS (Figure 55B). La régulation de Erk1 et 2 (Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) semble être fortement associée à la réponse au FOLFIRI (Figure 55B, cadres jaunes). Ces protéines font partie de la famille des MAPK et sont les principaux effecteurs de la cascade de phosphorylation en avale de récepteurs membranaires comme les RTK en activant de nombreux FT et régulant notamment beaucoup d'aspects associés à des voies de survie cellulaire (Buscà et al., 2016). De manière intéressante, les protéines Erk apparaissent comme des acteurs majeurs de la réponse à la chimiothérapie en favorisant la survie cellulaire en réponse au stress induit par ces composés. C'est notamment le cas pour les cellules cancéreuses colorectales qui sont plus résistantes au 5-FU après induction à l'IL-6 et phosphorylation des effecteurs de cette voie moléculaire comme les protéines Erk (S. Li et al., 2018). L'analyse de l'enrichissement fonctionnel du deuxième groupe de gènes dont l'expression globale diminue en réponse au traitement FOLFIRI a également été effectuée sur la base des BP issus de GO. Les 30 termes les plus significatifs sont largement associés à l'inflammation et la réponse immunitaire humorale (Figure 55B).

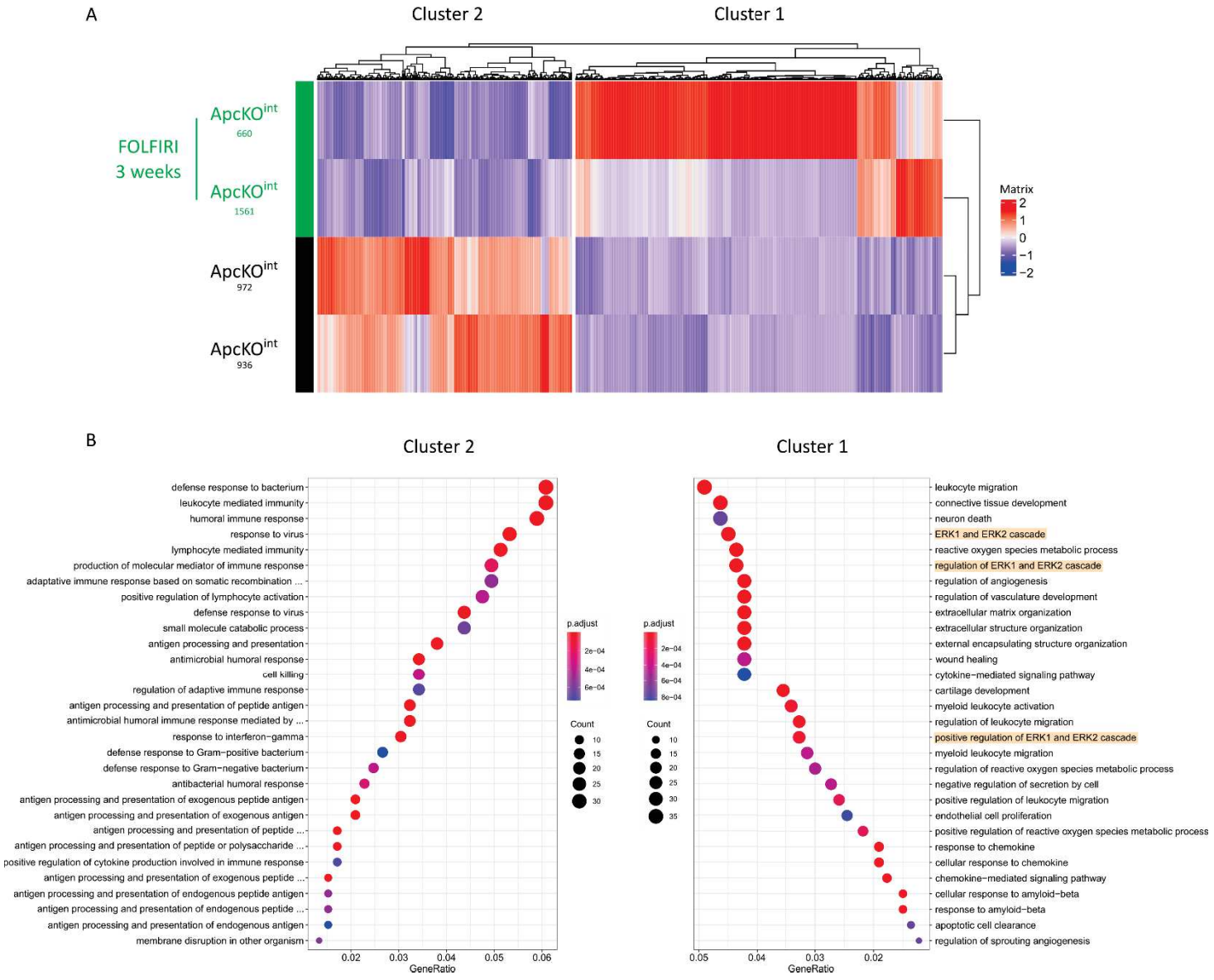


Figure 55 – Analyse transcriptomique associée à la réponse au FOLFIRI dans l'épithélium intestinal murin. (A) Représentation graphique en heatmap de l'expression des gènes différentiellement régulés chez les souris ApcKO^{int} non traitées (blocs noirs) ou traitées 3 semaines au FOLFIRI (blocs verts) basée sur le nombre de transcrits par million (TPM). (B) Représentation graphique en dot-plot de l'enrichissement fonctionnel des processus biologiques (BP) issus de la base de données « Gene ontology » (GO) pour le groupe de gènes dont la valeur en TPM augmente dans le groupe ApcKO^{int} traité au FOLFIRI (cluster 1) et le groupe de gènes dont la valeur en TPM diminue chez les individus ApcKO^{int} traités 3 semaines au FOLFIRI (cluster 2) en comparaison aux souris ApcKO^{int} non traitées. Le nombre de gènes associé à chaque BP est représenté par la taille des points (Count) qui sont étalés en fonction du pourcentage de l'intersection avec le nombre total de gènes impliqués dans chaque BP (Generatio). La valeur de la p-value ajustée est exprimée selon un code couleur associé à chaque dotplot. La correction de la p-value obtenue par l'analyse GO a été effectuée par la méthode Benjamini-Hochberg avec un seuil fixé à 0,05. Ces représentations ne sont pas une liste exhaustive de l'ensemble des BP associés à ces gènes, seulement les 30 BP les plus significatifs sont représentés.

Ainsi, la réponse transcriptomique associée au traitement FOLFIRI dans nos modèles ApcKO^{int} se reflète majoritairement par une modification du système immunitaire. Néanmoins, une modification des mécanismes cellulaires de résistance au stress comme le métabolisme des ROS et des xénobiotiques, une signature associée au gardien de l'intégrité cellulaire p53 et des protéines Erk impliquées dans la survie cellulaire, ont pu être observés. Les analyses tissulaires et transcriptomiques réalisées sur les souris ApcKO^{int} nous ont permis de confirmer l'efficacité du traitement FOLFIRI sur des souris sauvages pour *Rip140* avec un effet délétère certain sur le développement tumoral associé à une forte réponse immunitaire et l'induction de mécanismes de chimiorésistance dans le tissu épithélial des souris ApcKO^{int}.

2.3.3.c Rip140 favorise la réponse tumorale au FOLFIRI *in vivo*

Dans le but d'étudier le rôle potentiel de Rip140 dans la réponse aux chimiothérapies, une cohorte de souris RipApcKO^{int} a été soumise au même protocole de traitement que précédemment à savoir un traitement pendant 3 ou 6 semaines d'injection intra-péritonéale de FOLFIRI de manière hebdomadaire après induction de la tumorigenèse pendant 8 semaines (Figure 44).

En comparaison aux souris RipApcKO^{int} contrôles non traitées, on observe une diminution drastique du nombre de tumeurs après 3 semaines de traitement avec une réduction moyenne de 73% de la quantité de tumeurs (Figure 56A). Si à 3 semaines de traitement l'effet de FOLFIRI est identique chez les souris ApcKO^{int} et RipApcKO^{int}, ce n'est plus le cas à 6 semaines de traitement. En effet, on constate que la réduction observée entre 3 et 6 semaines de traitement chez les souris sauvages pour *Rip140* est perdue chez les souris RipApcKO^{int} qui présentent toujours une diminution du nombre de tumeurs de 73% comparé à plus de 90% chez les souris ApcKO^{int} (Figure 56A). En corrélation avec ces observations, la taille des tumeurs résiduelles à 3 semaines de traitement de la cohorte RipApcKO^{int} est en moyenne 78% plus petite que la cohorte contrôle tandis que la réduction observée chez les souris sauvages pour *Rip140* est d'environ 91% (Figure 56B). Cette différence s'estompe néanmoins à 6 semaines de traitement avec une surface moyenne des tumeurs résiduelles représentant environ 3 et 5% de la surface mesurée chez les souris contrôles non traités pour les cohortes ApcKO^{int} et RipApcKO^{int} respectivement (Figure 56B).

En conclusion de nos observations, il apparait que la délétion de *Rip140* dans ce contexte de traitement au FOLFIRI ralentisse la réponse tumorale avec une persistance du nombre de tumeurs après 6 semaines de traitement chez les individus RipApcKO^{int} et une latence dans la réduction de la surface tumorale. Ainsi, Rip140 semble améliorer la réponse tumorale au traitement FOLFIRI dans un modèle ApcKO^{int}.

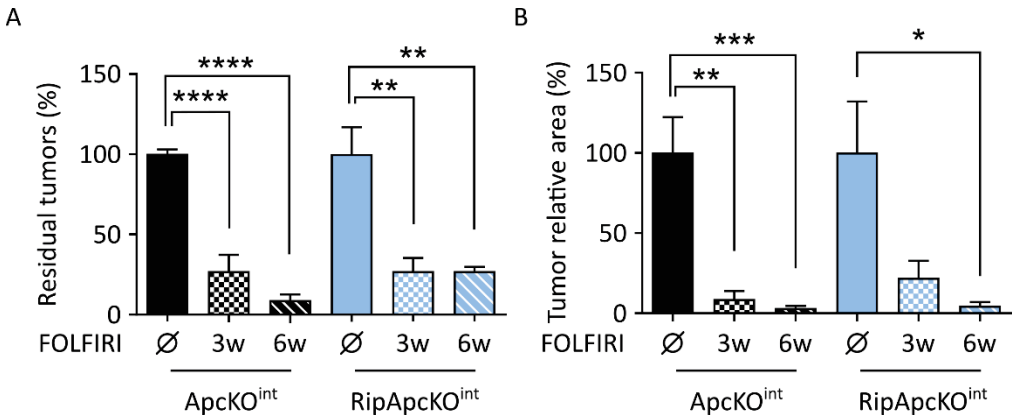


Figure 56 – Impact de la délétion de *Rip140* sur l'efficacité thérapeutique du FOLFIRI. Représentation graphique en histogramme du pourcentage moyen de tumeurs résiduelles par animal à 3 et 6 semaines de traitement au FOLFIRI (respectivement barres noires quadrillées et rayées) (A), de la surface moyenne des tumeurs résiduelles par animal après 3 et 6 semaines de traitement (B). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du nombre et de la surface des tumeurs des animaux non traités au FOLFIRI (Ø, barre noire et bleue pleine). L'analyse statistique de la différence entre les cohortes d'animaux (n=4 à 6) a été effectuée avec le logiciel Prism par une comparaison multiple en test ANOVA ordinaire à voie unique (* $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$ et **** $p < 0,0001$).

De manière surprenante, la réponse au FOLFIRI *in vivo* est opposée à mes observations *in vitro*. A la vue du rôle de Rip140 dans la régulation du système immunitaire dans des conditions physiologiques normales et le rôle évident de ces acteurs cellulaires dans la réponse au FOLFIRI observé chez les individus ApcKO^{int}, il serait tout à fait probable que Rip140 puisse exercer un effet adverse sur les cellules cancéreuses et sur le micro-environnement tumoral.

2.3.3.d Paysage transcriptionnel associé à Rip140 dans la réponse au FOLFIRI

Le paysage transcriptionnel associé au rôle de Rip140 dans la réponse au FOLFIRI a été étudié par séquençage des ARN totaux en comparant les gènes différentiellement exprimés entre les groupes de comparaison correspondant à la réponse au FOLFIRI dans un contexte sauvage pour *Rip140* et un contexte délétère pour *Rip140*. En d'autres termes, la liste de gènes différentiellement exprimés entre les souris ApcKO^{int} FOLFIRI *versus* ApcKO^{int} non traitées contenant 1449 gènes (Figure 57A) a été comparée à la liste obtenue entre les souris RipApcKO^{int} FOLFIRI *versus* RipApcKO^{int} non traitées contenant 1113 gènes (Figure 57B). Les 224 gènes communs à ces deux groupes de comparaison ne sont vraisemblablement pas dépendants de Rip140 (Figure 58A). En revanche, par déduction de ces gènes communs à la réponse au FOLFIRI dans un contexte sauvage ou délétère pour *Rip140*, j'ai pu obtenir la liste des gènes dont l'expression en réponse au FOLFIRI dépend de la présence (1225 gènes) ou de l'absence du co-régulateur transcriptionnel (889) (Figure 58A).

Dans un premier temps, l'ensemble de ces gènes (2114 gènes) a été confronté à un enrichissement fonctionnel pour les termes BP de la base de données GO afin de déterminer de manière globale, quels processus sont influencés par Rip140 dans la réponse au FOLFIRI. On retrouve un fort enrichissement de processus immunitaires et de la réponse au stress de manière similaire à ce qui a été observé précédemment pour la réponse au FOLFIRI chez les souris ApcKO^{int} seulement (données non présentées). L'enrichissement a ensuite été étendu à d'autres termes notamment les MF de la base de données GO et les termes KEGG. Basé sur mes connaissances, une sélection des termes associés à la réponse intrinsèque des cellules cancéreuses à la chimiothérapie a été effectuée manuellement. Globalement, on retrouve un ensemble de BP associés à la réponse et au métabolisme des drogues et xénobiotiques marquée par des BP du système GST. De manière intéressante, la régulation des kinases Erk1 et 2, décrites précédemment pour leur rôle majeur dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie, apparait être dépendante de Rip140 tout comme la régulation de la production de l'interleukine-6 (IL-6), impliquée dans la résistance des cellules CCR au 5-FU *via* la voie des MAPK (Figure 58B). L'enrichissement des fonctions moléculaires associées à ces 2214 gènes montre une régulation globale de l'oxydoréduction cellulaire et une régulation de l'activité des transporteurs ABC, largement décrits dans le contrôle de l'influx et l'efflux des xénobiotiques (Figure 58B). Enfin, les termes KEGG présentent des voies cellulaires associées au métabolisme des drogues *via* notamment les cytochromes p450 et le système GST. La voie de signalisation p53 semble également être régulée par Rip140 dans la réponse au FOLFIRI (Figure 58B).

Pour pousser la compréhension du rôle de Rip140 dans la réponse au FOLFIRI, j'ai confronté tous ces termes fonctionnels aux listes de gènes associés à la réponse au FOLFIRI en présence (1225 gènes – carrés bleus) ou en l'absence de Rip140 (889 gènes – carrés rouges). De manière surprenante, beaucoup de ces processus sont dépendants de la présence de Rip140 et perdus dans les cohortes RipApcKO^{int}. C'est notamment le cas de la régulation des kinases Erk1 et 2 et de la voie de signalisation p53 qui ne sont pas retrouvées chez les souris délétées pour *Rip140* (Figure 58B – carrés bleus). Au contraire, le métabolisme des drogues et xénobiotiques par le système GST et les cytochromes p450 semble être dérégulés en l'absence de Rip140 (Figure 58B – carrés rouges).

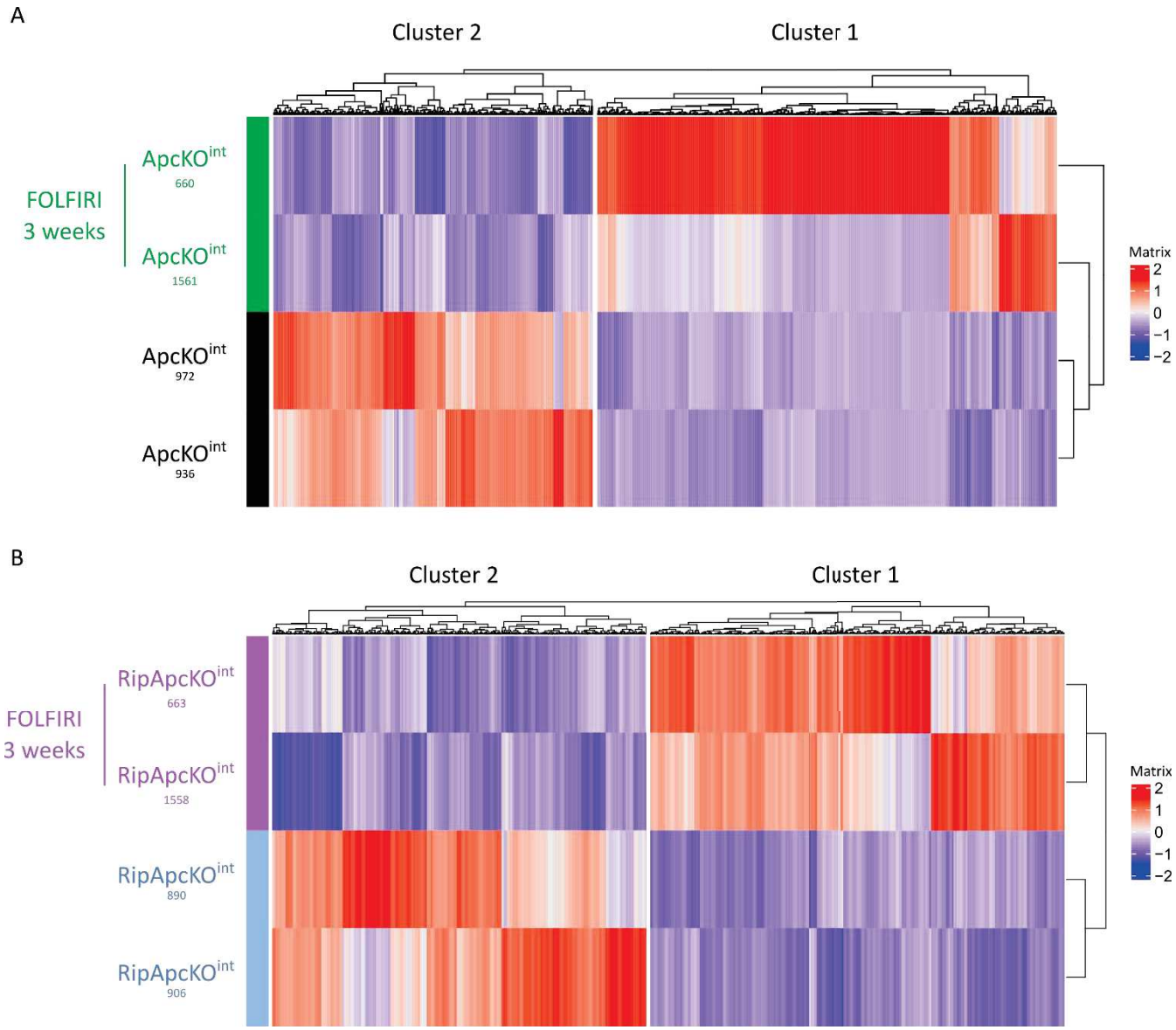


Figure 57 – Analyse transcriptomique associée à la réponse au FOLFIRI dépendante à Rip140.
(A) Représentation graphique en heatmap de l'expression des 1449 gènes différentiellement régulés chez les souris ApcKO^{int} non traitées (blocs noirs) et ApcKO^{int} traitées 3 semaines au FOLFIRI (blocs verts) basée sur le nombre de transcrits par million (TPM). (B) Représentation graphique en heatmap de l'expression des 1113 gènes différentiellement régulés chez les souris RipApcKO^{int} non traitées (blocs noirs) et RipApcKO^{int} traitées 3 semaines au FOLFIRI (blocs verts) basée sur le nombre de transcrits par million (TPM).

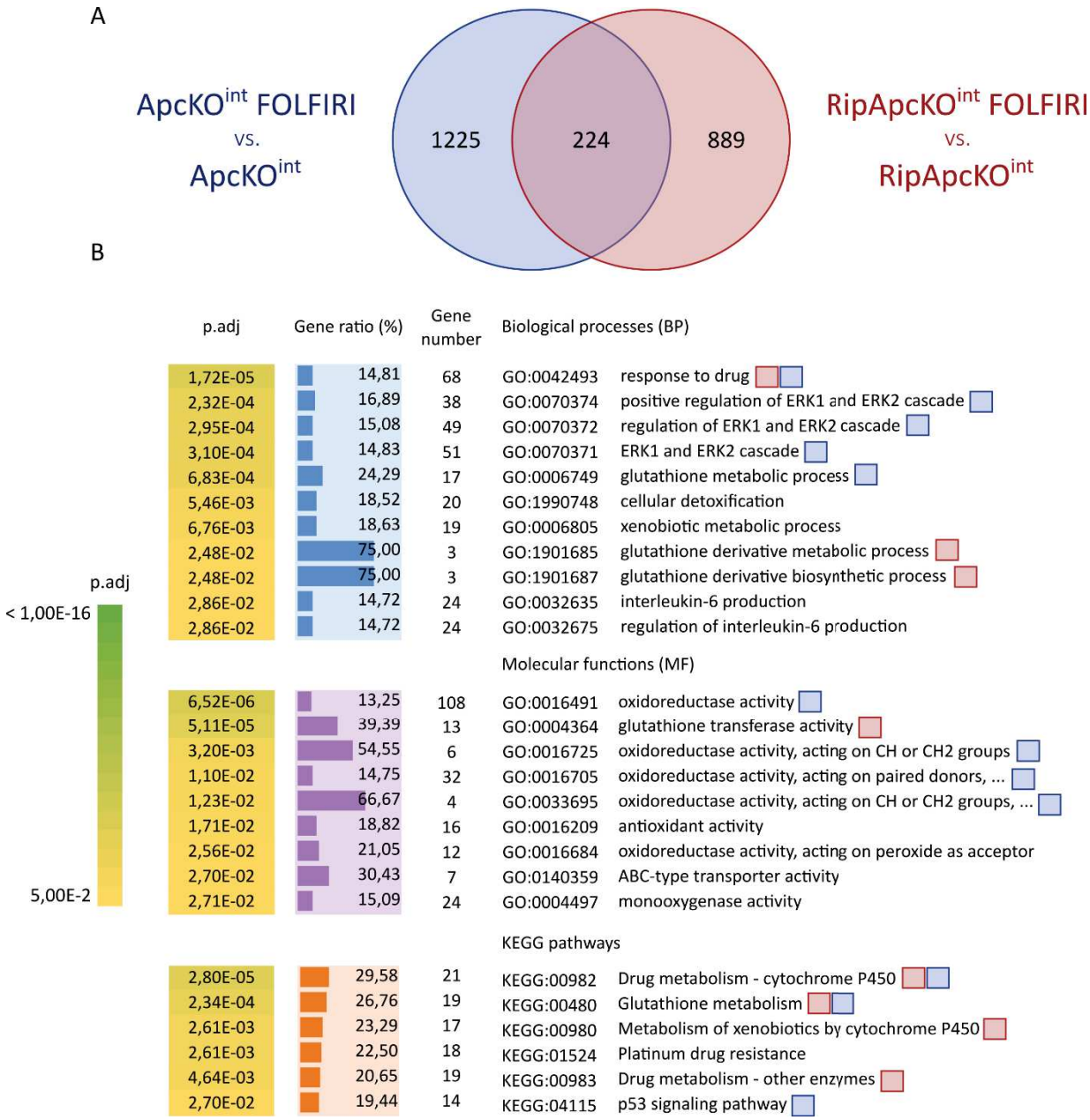


Figure 58 – Etude transcriptomique du rôle de Rip140 dans la régulation de la chimiorésistance des cellules cancéreuses en réponse au FOLFIRI. (A) Représentation en diagramme de Venn de la comparaison des gènes différentiellement exprimés en réponse au traitement FOLFIRI chez les individus sauvages pour *Rip140* (ApcKO^{int} en bleu avec un total de 1449 gènes) *versus* les individus délétés pour *Rip140* (RipApcKO^{int} en rouge avec un total de 1113 gènes). L'intersection de ces deux listes montre 224 gènes communément dérégulés en présence ou absence de Rip140. (B) Représentation de l'enrichissement fonctionnel pour les processus biologiques (BP), les fonctions moléculaires (MF) issus de la base de données GO et les termes KEGG associés aux 2214 gènes dépendants de la présence (carrés bleus) ou l'absence de *Rip140* (carrés rouges) dans la réponse au FOLFIRI. L'enrichissement a été effectué sur le serveur g:Prolifer avec une correction par la méthode de Benjamini-Hochberg et un seuil de la p-value ajustée à 0,05.

Comme observé précédemment, la réponse au FOLFIRI induit une forte réponse immunitaire au sein de l'épithélium intestinal se traduisant par une infiltration des lymphocytes T CD8 et une diminution de l'infiltration des lymphocytes B et T CD4. Afin d'étendre notre compréhension du rôle de Rip140 dans la réponse à la chimiothérapie, l'analyse transcriptomique de la réponse immunitaire associée à la muqueuse intestinale après 3 semaines de traitement au FOLFIRI a été évaluée en présence ou en absence de *Rip140* chez les souris ApcKO^{int}. Comme précédemment, un enrichissement fonctionnel basé sur l'ensemble des 2114 gènes régulés par *Rip140* dans la réponse au FOLFIRI a été effectué. Une sélection manuelle des BP associés à la réponse immunitaire a été effectuée sur la base de mes connaissances. On retrouve ainsi 77 BP associés à la régulation du système immunitaire sous de vastes aspects comme la réponse innée ou adaptative, la présentation antigénique, la migration et l'activation leucocytaire ou encore des processus associés aux cytokines (Figure 59A). N'ayant pas identifié de processus spécifiques, une approche globale a été privilégiée. Pour ce faire, je me suis intéressé à la proportion des BP régulés par la présence ou l'absence de *Rip140* ainsi que ceux retrouvés dans les deux cas. On observe qu'environ 32 % des BP identifiés sont identiques entre la présence ou l'absence du co-régulateur transcriptionnel mais sont régulés par des gènes différents (Figure 59B). De manière intéressante, la majorité des BP, soit environ 38% d'entre eux, sont spécifiques à la présence de *Rip140* tandis qu'environ 5% d'entre sont spécifiques à son absence (Figure 59B). Enfin, 25 % des BP identifiés parmi les 2114 gènes ne sont pas retrouvés spécifiquement à l'absence ou la présence de *Rip140* (Figure 59B).

Ainsi, en conclusion de ces observations, *Rip140* semble être largement impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire au traitement FOLFIRI. De manière surprenante, la majorité des processus impliqués dans cette réponse sont dépendants de la présence du co-régulateur transcriptionnel. Ainsi, il est vraisemblable que l'impact de *Rip140* sur le micro-environnement immunitaire puisse expliquer son rôle bénéfique dans la réponse tumorale à la chimiothérapie observée *in vivo* en régulant par exemple l'infiltration ou l'activation de certaines populations lymphocytaires. En définitive et en conciliant mes observations *in vivo* et *in* vitro avec l'étude transcriptomique de la réponse épithéliale au traitement FOLFIRI, il semblerait que *Rip140* puisse exercer des effets adverses avec un rôle plutôt inducteur de la chimiorésistance des cellules cancéreuses en elles-mêmes, tandis qu'il favoriserait la réponse tumorale à la chimiothérapie par la régulation du micro-environnement immunitaire. Toutefois, il est important de prendre en compte l'échantillonnage du tissu. En effet, l'extraction des ARN a été réalisée sur du tissu total non tumoral. Ce biais apporté par l'échantillonnage doit être considéré sachant que la transformation oncogénique du tissu modifie profondément le paysage moléculaire et cellulaire même si l'ensemble du tissu présente un génotype homogène.

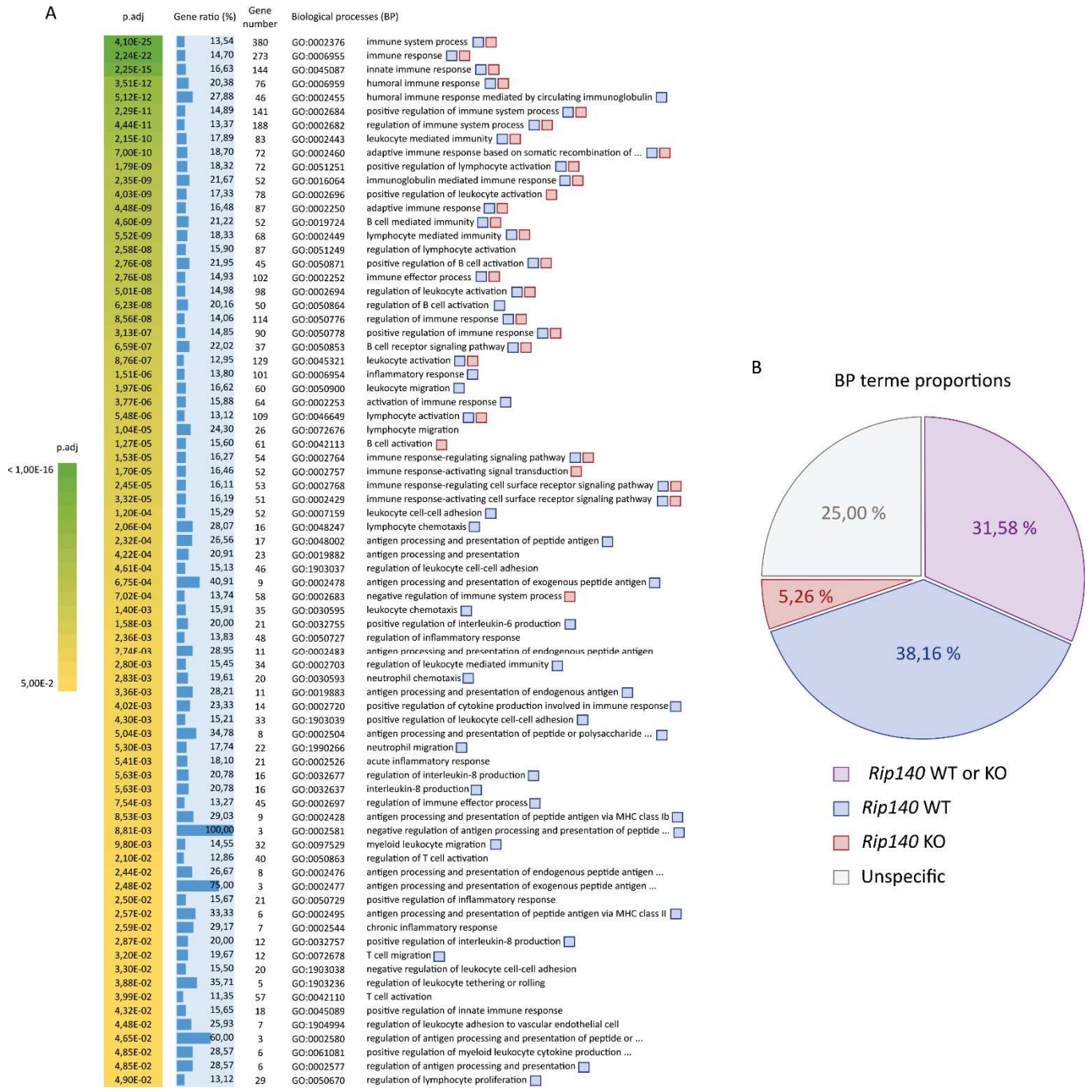


Figure 59 - Etude transcriptomique du rôle de Rip140 dans la régulation de la réponse immunitaire au traitement FOLFIRI. (A) Représentation de l'enrichissement fonctionnel pour les processus biologiques (BP) issus de la base de données GO associés aux 2214 gènes dépendants de la présence (carrés bleus) ou l'absence de *Rip140* (carrés rouges) dans la réponse au FOLFIRI. L'enrichissement a été effectué sur le serveur g:Prolifer avec une correction par la méthode de Benjamini-Hochberg et un seuil à 0,05 de la p-value ajustée. (B) Représentation graphique en secteur de la proportion de BP régulés spécifiquement par la présence ou l'absence de *Rip140* (en violet), uniquement la présence de *Rip140* (en bleu), uniquement l'absence (en rouge) et des termes régulés de manière aspécifique à la présence ou l'absence de *Rip140* (en gris). Le nombre de BP pour chaque condition a été ramené au nombre total des BP identifiés parmi les 2114 gènes régulés par *Rip140* dans la réponse au FOLFIRI.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les travaux précédents de l'équipe ont permis de mettre en avant les rôles variés de RIP140 dans la régulation de processus physiopathologiques dans différents tissus. Une étude publiée par Marion Lapierre présente notamment RIP140 comme un acteur du paysage transcriptionnel contrôlant la physiologie épithéliale au travers de la régulation de la voie de signalisation WNT (Lapierre et al., 2014), une des voies majeures de la survie et la prolifération cellulaire largement associée aux CSI. Les CSI ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires qui gravitent autour de ces populations constituent la clé de voûte de la physiologie intestinale. La perturbation de ces mécanismes est souvent à l'origine de la transformation oncogénique de l'épithélium intestinal dont les CSI en sont fréquemment le point d'initiation. De manière intéressante, *RIP140* se place comme un gène protecteur dans la tumorigenèse des cellules cancéreuses colorectales au reflet de son rôle dans le contrôle de la voie de signalisation WNT. De plus, sa valeur pronostic bénéfique chez les patients atteints de CCR fait de ce co-régulateur transcriptionnel un sujet d'étude pertinent pour étendre notre compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la tumorigenèse intestinale, démarche essentielle à l'amélioration de la prise en charge et du traitement des patients.

Ainsi, mes travaux de recherche réalisés au cours de ces 3 années de doctorat avaient pour objectif d'aborder le rôle du co-régulateur transcriptionnel dans la régulation de la physiologie et de la tumorigenèse intestinale. Plusieurs aspects ont été approfondis avec l'étude du lien fonctionnel entre *Rip140* et les populations souches intestinales au travers notamment de l'utilisation d'un modèle murin permettant la délétion de notre gène d'intérêt de manière conditionnelle et spécifique à l'épithélium intestinal et la culture d'organoïdes intestinaux. Ensuite, le lien fonctionnel entre *RIP140* et les cellules cancéreuses colorectales dont l'étude du potentiel souche a été l'axe principal de recherche en lien avec le rôle de *RIP140* dans la tumorigenèse intestinale par l'utilisation de modèle murins déficients pour le gène suppresseur de tumeur *Apc*. Enfin, la réponse à la chimiothérapie FOLFIRI des tumeurs générées chez les souris déficientes pour *Apc* et la sensibilité des cellules cancéreuses colorectales aux composés chimiothérapeutiques ont été étudiées en condition de déficience ou de sur-expression de *RIP140*. L'interprétation et la conclusion de mes travaux sont présentées à la suite de ce paragraphe avec une ouverture sur les perspectives qu'apportent ces travaux.

1 RIP140 réprime l'axe de signalisation WNT/SOX9

Au cours de mes travaux, j'ai participé à la mise en évidence de l'interaction entre le co-régulateur transcriptionnel RIP140 et le FT SOX9 au niveau moléculaire. *In vivo*, la délétion de *Rip140* est associée à une augmentation de l'expression de *Sox9* dans l'épithélium intestinal des souris RipKO^{int} (Gleizes et al., 2021). Ces résultats sont en corrélation avec l'augmentation de l'activité de la voie de signalisation Wnt observée dans l'épithélium intestinal des souris constitutivement délétées pour *Rip140* (Lapierre et al., 2014). Il est effectivement connu que l'expression de *SOX9* est positivement régulée par l'activation de la voie WNT au travers de son effecteur principal, la β-caténine formant un complexe avec le FT TCF-4 (Blache et al., 2004). Au niveau moléculaire, RIP140 agit à plusieurs niveaux sur cet axe WNT/SOX9. Notre équipe a montré d'une part que RIP140 induit l'expression du gène suppresseur de tumeur *APC*, protéine du complexe de répression de la β-caténine, favorisant ainsi l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de cette voie de signalisation (Lapierre et al., 2014). Ensuite, nous avons mis en évidence la répression de l'expression de *SOX9* par RIP140 au niveau transcriptionnel mais également un rôle trans-répressif de RIP140 sur l'activité de FT se traduisant par une inhibition de l'expression de ses gènes cibles (Gleizes et al., 2021). De manière intéressante, l'activation de la signalisation WNT est en retour associée à une inhibition de l'expression du co-régulateur transcriptionnel *RIP140* (Gleizes et al., 2021). En corrélation avec la régulation de cet axe de signalisation WNT/SOX9 (Figure 60), notre équipe a mis en évidence plusieurs implications de RIP140 dans la physiopathologie intestinale qui font l'objet des prochaines sections de cette discussion.

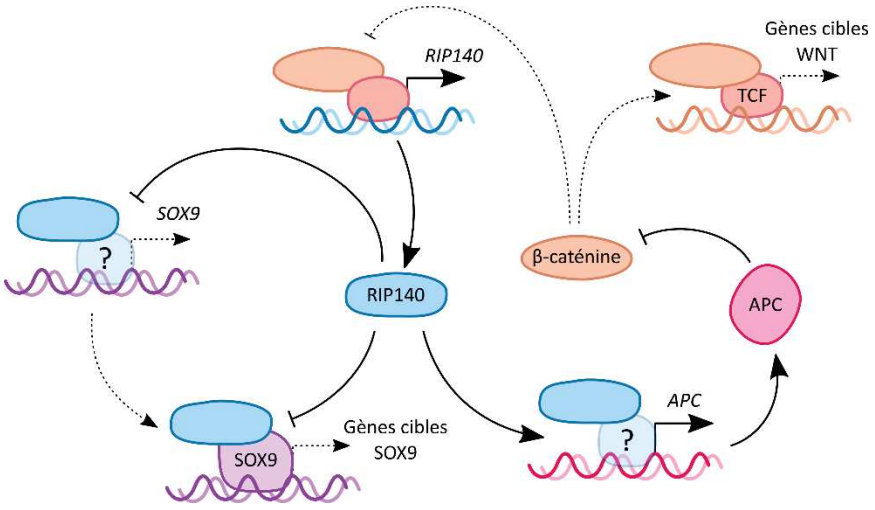


Figure 60 – Schéma représentatif du réseau transcriptionnel associé à l'axe de signalisation WNT/SOX9 et RIP140.

1 RIP140, un gardien de l'homéostasie épithéliale

1.1 RIP140 réprime le dynamisme de l'épithélium intestinal

Les travaux réalisés par Marion Lapierre ont mis en évidence le rôle de Rip140 dans le contrôle de la dynamique épithéliale au travers de la régulation de la voie de signalisation Wnt connue pour être au centre de l'homéostasie épithéliale (Lapierre et al., 2014). Le contrôle transcriptionnel qu'elle exerce au travers de son effecteur, la β-caténine, sur un ensemble de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, est essentielle au maintien de l'homéostasie du compartiment souche des cryptes intestinales (Korinek et al., 1998; Vanuytsel et al., 2013). Les ligands régulant l'activité de la voie Wnt sont principalement émis par les CP qui sont intercalées entre les CSI. Cette population cellulaire est considérée comme le chef d'orchestre de l'homéostasie épithéliale notamment par leur capacité à générer un environnement moléculaire permissif au maintien de l'identité souche et au contrôle du comportement de ces populations cellulaires (H. C. Clevers & Bevins, 2013; Sato et al., 2011; Yilmaz et al., 2012). De manière intéressante, la différenciation du lignage Paneth est étroitement dépendante du FT Sox9 et de la signalisation Wnt essentiels à la maturation des CP (Bastide et al., 2007; van Es, Jay, et al., 2005).

Ainsi, l'augmentation de la dynamique épithéliale observée chez les animaux RIPKO peut s'expliquer de plusieurs façons. D'une part, il a été montré que Rip140 induit l'expression d'*Apc* de manière globale dans les cellules épithéliales intestinales inhibant ainsi la voie de signalisation Wnt (Lapierre et al., 2014). Suivant cette logique, la délétion de *Rip140* dans l'épithélium intestinal augmenterait le niveau basal de la prolifération cellulaire notamment du compartiment souche et d'amplification transitoire, accélérant le renouvellement épithélial. Ensuite, la voie Wnt est largement décrite dans la régulation du compartiment souche et notamment dans le maintien de l'identité des CSI et du contrôle de leur activité. Par ailleurs, la délétion du FT Tcf-4 formant le complexe transcriptionnel effecteur de la voie Wnt avec la β-caténine est associé à une perte du compartiment souche (Korinek et al., 1998). Inversement, l'activation aberrante de la voie de signalisation voie par une mutation inactivatrice d'*Apc* ou l'activation constitutive de la β-caténine sont associées à une hyperplasie du compartiment souche et sont des évènements initiateurs d'une transformation maligne des CSI (Barker et al., 2009; Morin et al., 1997; Schepers et al., 2012). Compte tenu de la corrélation inverse entre l'expression de *Rip140* et le potentiel souche des cellules épithéliales ainsi que du rôle central des CSI dans la physiologie intestinale, l'augmentation de la dynamique épithéliale associée à la délétion de *Rip140* pourrait s'expliquer par une induction de l'activité ou du nombre de ces populations cellulaires (Vermeulen & Snippert, 2014). Enfin, en lien avec la régulation des CSI, le

rôle répresseur de Rip140 sur la différenciation Paneth étend encore l'axe de réflexion. Les CP ont pour fonction le soutien du compartiment souche par la présentation ou la sécrétion d'un ensemble de facteurs constituant un environnement moléculaire permissif au maintien de l'état souche des cellules intestinales (Sato et al., 2011; Sato & Clevers, 2013). De plus, les CP sont capables d'influencer l'activité des CSI comme cela a été démontré dans une situation de restriction calorique (Yilmaz et al., 2012). Ainsi, la répression du lignage Paneth par Rip140 impacte potentiellement les CSI en altérant l'homéostasie de la niche moléculaire dont elles sont dépendantes.

Rip140 se présente comme un acteur de l'homéostasie intestinale en réprimant la dynamique épithéliale au travers d'un contrôle négatif sur la signalisation Wnt et potentiellement d'une répression du potentiel souche au travers de l'inhibition de la différenciation Paneth et/ou des CSI directement (Figure 61). Néanmoins, ces hypothèses devront être étudiées notamment par des approches fonctionnelles. Dans un premier temps, l'activité répressive de Rip140 sur la voie de signalisation Wnt devra être confirmée dans le modèle transgénique murin RipKO^{int}. Ensuite, l'étude des populations de cellules souches et de leur activité en lien avec une modification éventuelle de la niche moléculaire formée par les CP sera une étape cruciale dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent le rôle de Rip140 dans la physiologie épithéliale.

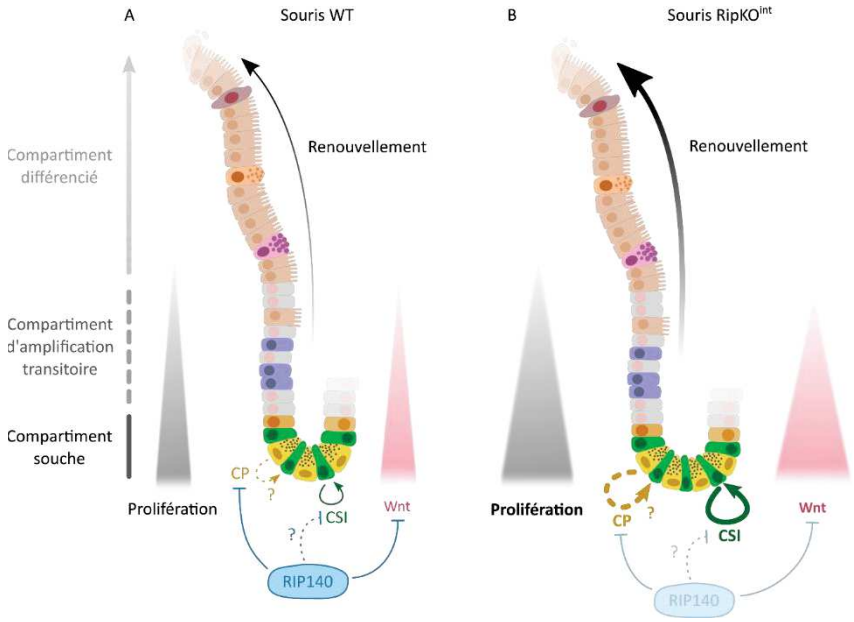


Figure 61 – Schéma représentatif du rôle répresseur de Rip140 sur la dynamique épithéliale et de ses potentiels modes d'actions. Mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la régulation de la dynamique épithéliale chez des souris sauvages (WT) (A) ou présentant une délétion spécifique de *Rip140* dans l'épithélium intestinal (RipKO^{int}) (B). La délétion de *Rip140* est associée à une augmentation du renouvellement ou de la dynamique épithéliale en corrélation avec une augmentation de l'activité Wnt. Au niveau cellulaire, Rip140 réprime la différenciation Paneth potentiellement associée à une diminution de l'activité des CSI. Enfin une corrélation inverse existe entre l'expression de *Rip140* et les populations souches intestinales suggérant un rôle direct du co-régulateur transcriptionnel sur leur identité et leur comportement.

1.2 RIP140, prédictif de l'inflammation et de la régénération épithéliale

Les CP sont au centre de la réponse et de la régulation des interactions hôte-microbiotes et de la réponse inflammatoire épithéliale. Un dysfonctionnement de ces populations est notamment associé à la dysbiose intestinale, source d'inflammation et représentant un facteur de risque dans l'apparition des MICI (Salzman & Bevins, 2013), elles-mêmes étant un facteur de risque dans le développement des CCR (E. R. Kim & Chang, 2014). De manière intéressante, une métaplasie des CP au niveau des cryptes coliques est observée en réponse à l'inflammation chronique dans le cas des MICI (Cunliffe et al., 2001) ou encore à l'inflammation induite par les radiations dans le cas de la chimiothérapie (Watanabe, 1978). En lien avec ces observations, les CP sont connues pour leur rôle dans la régénération épithéliale en réponse à l'inflammation ou des dommages causés à l'épithélium (Buczacki et al., 2013; Schmitt et al., 2018). De manière intéressante, nos résultats démontrent également qu'un gain de fonction de RIP140 est associé à une altération des cellules caliciformes (Sfeir N et al., en préparation). Un défaut dans le lignage de ces populations cellulaires est impliqué dans le développement de la rectocolite hémorragique (RCH). En collaboration avec l'équipe de M Allez (Hôpital Saint-Louis, Paris), des données préliminaires obtenues par réanalyse de données de séquençage ARN réalisées sur des biopsies de patients atteints de la maladie de Crohn suggèrent que l'expression de *RIP140* est fortement diminuée dans les muqueuses enflammées par rapport au tissu « normal » adjacent. Par ailleurs, des expériences préliminaires de colite expérimentale provoquée par l'AOM couplé au DSS (Dextran sulfate sodium) ont induit des anomalies histologiques (tels que des zones d'hyperplasie et des infiltrats de neutrophiles polymorphonucléaires) plus nombreuses chez des souris invalidées de façon constitutive et ubiquitaire pour le gène *Rip140*, en comparaison à des souris sauvages. De plus, l'équipe a déjà mis en évidence un effet répresseur de la sur-expression constitutive de *Rip140* (modèle RIPTg) sur la régénération épithéliale après irradiation avec un effet miroir chez les souris RIPKO (Lapierre et al., 2014). Ainsi RIP140 se présente comme un marqueur potentiel pour la prédiction de la réponse et de la régénération épithéliale à la suite d'un traitement par radiothérapie chez les patients atteints de CCR. En conclusion, il serait intéressant d'étudier les conséquences biologiques de la délétion de ce co-régulateur transcriptionnel dans des modèles murins mimant l'inflammation chronique afin d'étudier la valeur pronostic de ce gène dans les MICI.

2 RIP140, un gène protecteur dans la tumorigenèse intestinale

2.1 RIP140 réprime le potentiel souche des cellules cancéreuses

Il existe de toute évidence une corrélation inverse entre l'expression de *RIP140* et le potentiel souche cellulaire, comme présenté par nos observations *in vivo*, suggérant un rôle potentiel du co-régulateur transcriptionnel dans la biologie de ces populations cellulaires. De plus, l'axe de signalisation WNT/SOX9 mis en évidence par nos travaux est connu pour être largement impliqué dans la régulation du potentiel souche notamment des cellules CCR (Gleizes et al., 2018). En effet, d'une part l'activation aberrante de la signalisation WNT, par les mutations inactivatrices d'*APC* notamment, correspond à l'un des évènements majeurs de l'oncogenèse intestinale se traduisant par une expression constitutive des gènes cibles du complexe β-caténine/TCF et une exacerbation de la prolifération et de la survie cellulaire caractéristique des CS/CSC (Barker et al., 2009). De manière similaire, *SOX9* est connu pour être sur-exprimé dans beaucoup de cancers et notamment les CCR, favorisant la tumorigenèse (Matheu et al., 2012a).

Au travers de l'étude des CSC en modèle colosphère, j'ai pu observer une répression de la croissance des CSC en condition de sur-expression de *RIP140*. Ces observations confirment les résultats précédemment obtenus par le laboratoire mais cette fois-ci sur des populations souches. De plus, il semblerait que cette répression soit associée à une diminution de la dynamique des colosphères après passage. D'un point de vue moléculaire, la quantification par RT-qPCR de l'expression de plusieurs marqueurs souches n'a pas porté ses fruits. Néanmoins, des résultats obtenus chez les souris transgéniques RIPKO et RIPTg révèle une répression de l'expression du pro-oncogène *Bmi1*, marqueur des populations souches intestinales (Sangiorgi & Capecchi, 2008), par Rip140 que j'ai pu confirmer dans un modèle de culture 2D sur les mêmes lignées cellulaires et ce au niveau transcriptionnel. De manière intéressante, ce membre du complexe répresseur PRC1 est largement décrit pour son rôle pro-oncogène et notamment l'aspect essentiel de son expression dans le maintien des populations souches cancéreuses *in vivo* (Kreso et al., 2014; Maynard et al., 2014). L'aspect clonal de la culture en colosphère apporte une forte variabilité des résultats entre chaque expérience indépendante et peut expliquer que la régulation exercée par RIP140 sur l'expression de *BMI1* n'ait pas été pas observée en 3D. Néanmoins, la répression des populations CSC a pu être abordée au travers de la révélation de l'activité ALDH, enzyme de détoxification cellulaire et marqueur robuste des CSC (Huang et al., 2009b; Vishnubalaji et al., 2018), pour laquelle une diminution de moitié de la population ALDH positive a été observée pour les cellules sur-exprimant *RIP140* dans ces conditions de culture en colosphère.

Bien que ces expériences doivent être étendues, l'effet répresseur de la sur-expression de *RIP140* sur les populations CSC semble avéré du moins d'un point de vue fonctionnel. L'identification de marqueurs et de gènes impliqués dans la régulation de la biologie de ces populations sera une étape nécessaire à la compréhension du rôle de RIP140. L'effet de la délétion de *RIP140* devra être également étudié. La transfection d'un vecteur codant pour un « short-hairpin RNA » dirigé contre l'ARN de *RIP140* et ce de manière inductible permettrait une extinction sur long terme de l'expression de *RIP140* dans ce modèle de culture en colosphère. Ensuite, des expériences de sauvetage par la modification de l'expression de *BMI1* de manière concomitante ou non à celle de *RIP140* avant ensemencement en culture 3D permettrait de confirmer si RIP140 réprime bien les CSC via la régulation du pro-oncogène *BMI1*. Au regard du rôle de RIP140 sur l'axe WNT/SOX9 et de l'implication de ces acteurs dans la régulation de la biologie des cellules CCR et notamment des CSC, l'étude de ce réseau transcriptionnel serait aussi d'un intérêt certain dans la compréhension des mécanismes associés à la répression des populations CSC par RIP140. Tout d'abord, la quantification de l'activité de la voie de signalisation WNT et de l'expression de *SOX9* dans les colosphères devra être réalisée. Ensuite, par des approches similaires à l'étude de *BMI1*, déterminer de manière fonctionnelle si RIP140 régule la biologie des CSC au travers de ces acteurs. Enfin, à plus grande échelle, l'analyse transcriptomique par séquençage des ARNm extraits des colosphères pourrait apporter une vue d'ensemble du paysage transcriptionnel associé à la régulation du potentiel souche des cellules cancéreuses par RIP140.

2.2 RIP140 réprime la tumorigenèse intestinale

En lien avec mes résultats obtenus *in vitro* présentant un effet répresseur de RIP140 sur la croissance des CSC, j'ai pu observer un rôle protecteur de Rip140 dans la tumorigenèse intestinale chez les souris ApcKO^{int}. En effet, la délétion de *Rip140* est associée à une augmentation de l'initiation tumorale, se traduisant par une augmentation du nombre d'ACF et de tumeurs, ainsi qu'une augmentation de la taille des structures tumorales.

Afin de déterminer l'impact moléculaire de Rip140 sur l'initiation tumorale, la quantification de l'expression de *Rip140* dans ces structures ACF pourrait nous informer du rôle du co-régulateur transcriptionnel dès les premières étapes du processus oncogénique. En effet, chez l'Homme, les mutations associées au gène *APC* sont ponctuelles et ne sont pas nécessairement à l'origine de la transformation cellulaire sans quoi l'incidence et la pénétrance des CCR serait incroyablement élevée. Dans notre modèle murin ApcKO^{int}, l'ensemble de l'épithélium intestinal présente cette mutation du gène *Apc*, cependant les individus ne présentent que quelques tumeurs le long du tube digestif. Ainsi,

si la délétion de *Rip140* augmente le nombre d'ACF, il serait pertinent d'observer les niveaux d'expression de *Rip140* au niveau de ces structures et de déterminer si dans un modèle sauvage pour *Rip140*, les ACF présentent des niveaux plus faibles que le tissu adjacent facilitant la transformation oncogénique.

Ensuite, afin d'étudier le rôle de Rip140 dans la biologie des cellules cancéreuses et plus particulièrement des CSC, une caractérisation phénotypique des tumeurs serait appréciable. Dans un premier temps, la quantification l'activité de la voie de signalisation Wnt par l'accumulation de la forme active de la β-caténine ainsi que l'expression de *Sox9* apporterait des informations cruciales permettant de déterminer si Rip140 réprime la tumorigenèse intestinale via les mêmes mécanismes que son rôle répresseur dans la dynamique épithéliale des souris sauvages pour *Apc*. Enfin, l'étude des CSC par leur caractérisation phénotypique serait bienvenue. Une collaboration avec la plateforme d'histologie RHEM hébergée au sein de notre institut devra à terme permettre de réaliser un marquage par immunofluorescence en quadruplex de Rip140, mais également des marqueurs souches Bmi1 et Lgr5 et de l'activité ALDH avec un contre-marquage nucléaire afin d'observer ces populations *in situ*. Enfin, si ces résultats sont concluants, l'étude fonctionnelle des CSC issues des tumeurs murines par la culture en tumoroïdes dérivées des organoïdes serait une approche particulièrement intéressante (Xue & Shah, 2013). Elle permettrait notamment d'étudier l'implication potentielle de Bmi1 dans la régulation du phénotype souche par Rip140. L'utilisation d'un inhibiteur de l'expression de *Bmi1*, le PTC-209, a notamment fait ses preuves dans l'inhibition de la croissance tumorale et le renouvellement des CSC par traitement de xénogreffes de cellules CCR (Kreso et al., 2014).

2.3 RIP140 est un marqueur de bon pronostic

Les travaux réalisés par Mouna Triki et Marion Lapierre ont pu mettre en évidence une corrélation clinique entre l'expression de *RIP140* et le développement tumoral ainsi que la survie des patients atteints de CCR. En effet, l'expression du co-régulateur transcriptionnel est diminuée dans le tissu tumoral en comparaison au tissu sain. De plus, l'expression de *RIP140* est inversement corrélée au stade tumoral. Enfin, les patients qui présentent une forte expression de *RIP140* au niveau tumoral sont associés à une meilleure survie globale avant rechute (Lapierre et al., 2014; Triki et al., 2017).

Dans les CCR, l'hyper-activation de la voie WNT par les mutations du gènes APC est associée à une accumulation nucléaire de son effecteur, la β-caténine, dont le taux de translocation est associé à la progression tumorale (S. C. C. Wong et al., 2004). En lien avec la corrélation de son expression avec le stade tumoral, l'effet répresseur de RIP140 sur l'activité de la voie de signalisation WNT

pourrait expliquer l'amélioration du pronostic chez ces patients. Inversement à RIP140, une forte expression de *SOX9* est associée à un mauvais pronostic et ce FT est connu pour promouvoir la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que la tumorigenèse *in vivo* (Carrasco-Garcia et al., 2016b; Matheu et al., 2012b). De manière surprenante, la valeur de mauvais pronostic de SOX9 est perdue dans la cohorte de patients exprimant de haut niveau de *RIP140*. Cette observation est particulièrement intéressante dans le sens où elle relate le rôle protecteur de cette protéine dans les CCR potentiellement au travers de la répression de l'activité transcriptionnelle de SOX9 mais également de son expression par l'induction d'APC.

Enfin, la régulation négative de RIP140 sur l'expression de *BMI1* présente également un intérêt clinique potentiel. Plusieurs études ont proposé une analyse de la valeur pronostic de BMI1 dans les CCR. Certaines d'entre elles présentent ce marqueur comme de mauvais pronostic (Alajez, 2016; Du et al., 2010; D. Li et al., 2010) alors qu'une autre étude le présente plutôt comme de bon pronostic (Benard et al., 2014). Malgré ces résultats conflictuels quant à la valeur pronostic de BMI1 vis-à-vis de la survie des patients, il semble que son expression soit néanmoins corrélée au développement tumoral en favorisant notamment le potentiel souche des cellules cancéreuses et les processus métastatiques (J. H. Kim et al., 2004; Kreso et al., 2014; Maynard et al., 2014; Xu et al., 2021).

Ainsi, en conclusion de cette section, RIP140 pourrait se présenter d'une part comme un marqueur prédictif potentiel dans le dépistage des CCR par son influence sur l'initiation tumorale mais également comme marqueur prédictif de la survie des patients pour son rôle dans la tumorigenèse. Enfin, vis-à-vis de BMI1, RIP140 pourrait également représenter un marqueur prédictif potentiel de la rechute chez les patients atteints de CCR bien que les travaux mettant en avant la valeur pronostic de ce pro-oncogène soient encore conflictuels.

3 Effet adverse de RIP140 sur la sensibilité tumorale aux thérapies

La résistance des cellules cancéreuses aux différentes thérapies employées en clinique dans le traitement des cancers est un réel problème car souvent associée à des échecs thérapeutiques et la récurrence tumorale. La chimiorésistance cellulaire englobe un grand nombre de mécanismes allant de la régulation du flux des drogues à l'altération de la nature des cibles thérapeutiques en passant par le métabolisme des xénobiotiques ou encore une exacerbation de la survie cellulaire par une dérégulation des points de contrôles cellulaires (Gatti & Zunino, 2005). Les populations souches cancéreuses sont particulièrement résistantes aux thérapies. En effet, l'altération successive de voies

moléculaires ou de processus biologiques leur conférant leurs propriétés souches est associée à une augmentation des mécanismes de résistance aux traitements. La tolérance aux dommages à l'ADN, la perte de contrôle du cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose et l'expression exacerbée d'enzymes de détoxification ou des transporteurs de drogues sont associés au phénotype CSC (Dean et al., 2005; Phi et al., 2018). De plus, de par leur nature, les CSC sont généralement des populations cellulaires peu cycliques et par conséquent peu sensibles aux composés génotoxiques qui vont principalement altérer les cellules présentant une prolifération exacerbée (Shiokawa et al., 2020; Weidenfeld & Barkan, 2018). Après traitement, ces populations éventuellement rémanentes vont reconstituer la tumeur et sont responsables de rechute chez les patients.

Au cours de mes travaux, j'ai pu mettre en évidence une répression du phénotype souche cancéreux par RIP140. Dans ces populations, j'ai pu observer une diminution de l'activité ALDH, enzyme de détoxification impliquée dans la résistance aux thérapies en participant au métabolisme des ROS (Kozovska et al., 2018). L'expression de cette protéine est notamment contrôlée par la voie de signalisation WNT et représente un marqueur robuste des populations CSC (Cojoc et al., 2015; Vishnubalaji et al., 2018). Ensuite, le pro-oncogène *BMI1* est également bien connu pour son rôle dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN (Bhattacharya et al., 2015). Ainsi, en lien avec mes observations et le rôle de RIP140 dans la répression de la voie de signalisation WNT, de l'activité ALDH dans les CSC et de l'expression de *BMI1*, il est vraisemblable que ce co-régulateur transcriptionnel puisse être impliqué dans la réponse des cellules cancéreuses aux chimiothérapies.

3.1 RIP140 induit la chimiorésistance des cellules cancéreuses *in vitro*

De manière inattendue, la sur-expression stable de *RIP140* dans la lignée cellulaire SW480 est associée à une augmentation de la résistance des sphéroïdes aux composés chimiothérapeutiques. En effet, j'ai pu observer que la dose nécessaire pour atteindre une inhibition de 50% de la croissance de ces structures est plus forte pour le 5-FU, l'irinotecan et l'oxaliplatine dans la lignée cellulaire SW480-RIP140 en comparaison à la lignée contrôle SW480-GFP. La combinaison de ces composés en traitement FOLFIRI et FOLFIRINOX a, de manière similaire, révélé une induction de la résistance des sphéroïdes en condition de sur-expression de *RIP140*. Ces résultats devront être encore reproduits et étendus. En effet, il faudra en premier lieu réaliser des tests de cytotoxicité par analyse de la viabilité cellulaire, par FACS en combinant un marquage de l'annexine V et un intercalant de l'ADN ou encore par titration du relargage de l'ATP, afin de déterminer la nature de l'impact des composés thérapeutiques sur les cellules cancéreuses. Ensuite, une analyse de l'expression d'acteurs de la chimiorésistance cellulaire tel que les transporteurs ABC, l'enzyme ALDH ou encore des systèmes de

réparations des dommages à l'ADN pourrait apporter des éléments essentiels à la compréhension du rôle de RIP140 dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Des travaux réalisés par Pascale Palassin et récemment publiés par notre équipe montre une induction de l'expression des gènes *MSH2* et *MSH6* impliqués dans le système MMR associée à une induction de la chimiorésistance des cellules cancéreuses colorectales *in vitro* (Palassin et al., 2021). Enfin, une approche similaire en condition de déplétion de RIP140 serait également bienvenue.

Malgré une contradiction des résultats obtenus par le traitement des sphéroïdes avec le rôle de RIP140 sur le potentiel souche des cellules cancéreuses et l'hypothèse échafaudée, plusieurs points de discussion se dégagent de ces observations. D'une part, bien que les CSC présentent une forte capacité de chimiorésistance il est important de dissocier ces deux aspects qui ne sont pas réciproques. En effet, la chimiorésistance cellulaire est associée à de vastes processus et comme mentionné précédemment, le cycle cellulaire en représente un aspect majeur. Les travaux de Marion Lapierre ont notamment mis en évidence une accumulation du nombre de cellules en phase G1 au détriment de la phase S en condition de sur-expression de *RIP140* dans la lignée cancéreuse colorectale HCT116 (Lapierre et al., 2014). En considérant cette idée, le rôle répresseur de RIP140 sur la prolifération cellulaire pourrait expliquer une augmentation de la résistance aux propriétés génotoxiques du 5-FU, de l'irinotecan et de l'oxaliplatine. Ensuite, il serait intéressant d'effectuer une approche similaire sur une culture en modèle colosphère qui sélectionne fonctionnellement les CSC, ce qui n'est pas le cas de la culture en sphéroïdes.

3.2 RIP140 favorise la réponse tumorale au FOLFIRI *in vivo*

En parallèle des test *in vitro*, le rôle de Rip140 dans la réponse des cellules cancéreuses à la chimiothérapie au FOLFIRI a été évalué *in vivo* sur nos modèles ApcKO^{int}. Les thérapies à base de dérivés d'uracil éventuellement en combinaison avec de l'irinotecan sont les traitements standards prescrits aux patients atteints de CCR dès la stades II du développement tumoral (Schmoll et al., 2012). L'efficacité thérapeutique du FOLFIRI chez les souris ApcKO^{int} a été confirmée par analyse histologique avec une réduction significative du nombre et de la taille des tumeurs. L'analyse transcriptionnelle nous a notamment permis d'identifier une forte signature immunitaire avec une estimation de l'infiltration des populations immunitaires correspondantes aux lymphocytes T CD8 associés à une activité plutôt cytotoxique bénéfique dans les CCR tandis que l'estimation de l'infiltration des populations lymphocytaires B et T CD4 semblent diminuer et sont plutôt de mauvais pronostic du moins pour les T CD4 lorsqu'ils présentent une orientation Th17 (Fridman et al., 2012). Ces données confirment des analyses histologiques réalisées sur nos souris RipApcKO^{int} qui suggèrent une baisse

des infiltrats lymphocytaires dans les souris KO, comparé aux sauvages. De plus, une induction des mécanismes associés à la détoxification cellulaire a pu être observée avec notamment des processus associés au métabolisme des ROS, du système GST et des cytochromes p450 en corrélation avec l'induction de la voie de signalisation p53 et des kinases Erk connues pour réguler la réponse aux dommages à l'ADN, le cycle et la survie cellulaire (Bukowski et al., 2020; Buscà et al., 2016; Vousden & Prives, 2009). Nous avons pu ainsi valider la pertinence de l'utilisation du traitement FOLFIRI dans nos modèles murins ApcKO^{int}.

L'étude du rôle de *Rip140* dans la réponse au FOLFIRI par la comparaison histologique des tissus intestinaux de souris RipApcKO^{int} au souris ApcKO^{int} a révélé une diminution de l'efficacité du traitement FOLFIRI en condition délétère pour *Rip140* qui semble associée à une latence de la réponse tumorale notamment à 6 semaines de traitement. Ces observations suggèrent que Rip140 sensibilise les tumeurs intestinales au traitement chimiothérapeutique dans un contexte *in vivo*. Ces résultats ne sont pas en adéquation avec mes observations *in vitro* pour lesquels j'ai pu observer une induction de la résistance des cellules cancéreuses au FOLFIRI. Cependant, l'analyse transcriptomique associée à la comparaison des gènes différentiellement exprimés par la délétion de *Rip140* chez les souris à 3 semaines de traitement en comparaison aux souris non traitées nous a ouvert un terrain de réflexion intéressant.

En effet, l'interprétation des données transcriptomiques basée sur mes connaissances et la bibliographie m'a permis d'identifier plusieurs processus associés à la chimiorésistance intrinsèque des cellules cancéreuses parmi les gènes dont l'expression en réponse au FOLFIRI est dépendante de Rip140. On retrouve notamment la signalisation p53 et les kinases Erk dont les processus sont significativement enrichis en présence de Rip140 uniquement. Ces processus sont associés à la chimiorésistance cellulaire via le large spectre d'action de ces acteurs moléculaires. Ainsi il semblerait que d'un point de vue cellulaire, Rip140 favorise la chimiorésistance en réponse au FOLFIRI en corrélation avec mes observations *in vitro*. Ces résultats sont néanmoins préliminaires et l'analyse transcriptomique devra être confirmée sur les lignées cellulaires employées au cours de mes travaux. L'identification de candidats exerçant notamment une régulation transcriptionnelle associée à ces processus comme c'est le cas de p53 permettrait d'élaborer un modèle associé à la réponse cellulaire vis-à-vis du traitement FOLFIRI en lien avec l'activité de co-régulateur transcriptionnel de Rip140. De manière intéressante, des travaux en cours de soumission par notre équipe et réalisés par Valentin Jacquier mettent en évidence l'interaction de RIP140 avec P53 dans le contrôle de l'expression du transporteur du glucose GLUT3 dans des cellules fibroblastiques embryonnaires murines (Jacquier et al., 2020 en cours de soumission). Après caractérisation *in vivo*, l'étude de la réponse au FOLFIRI pourrait être envisagée sur un modèle de culture en tumoroïdes à partir des adénomes murins afin

de faciliter la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent nos observations avec une approche fonctionnelle pertinente.

Enfin, pour comprendre le rôle bénéfique de Rip140 dans la réponse tumorale au traitement FOLFIRI, une approche plus globale a été effectuée sur l'ensemble des gènes dérégulés par la réponse au FOLFIRI de manière dépendante à Rip140. Une signature immunitaire similaire à celle observée dans l'analyse transcriptomique de la réponse au FOLFIRI a été observée. De plus, en distinguant les processus enrichis de manière dépendante à la présence ou l'absence de Rip140, j'ai pu constater que la majorité de ces processus ne sont plus significativement dérégulés en condition délétère pour *Rip140*. Ainsi et en conclusion de ces observations, Rip140 semble favoriser l'efficacité de la chimiothérapie en régulant la réponse immunitaire associée au traitement FOLFIRI. A l'avenir, la caractérisation histologique de l'infiltrat immunitaire et notamment de populations lymphocytaires T, dont la nature est étroitement associée au développement tumoral (Fridman et al., 2012), pourrait offrir un axe de recherche intéressant pour comprendre les mécanismes associés à la réponse tumorale au FOLFIRI dans nos modèles pré-cliniques murins.

En conclusion de ces travaux, j'ai pu mettre en évidence un rôle global bénéfique de Rip140 dans la réponse tumorale au FOLFIRI *in vivo*. Cependant, l'analyse transcriptomique associée à cette réponse a mis en évidence une divergence entre le rôle du co-régulateur transcriptionnel dans les cellules cancéreuses et le micro-environnement tumoral. En corrélation avec mes observations *in vitro*, Rip140 semble promouvoir la chimiorésistance des cellules cancéreuses tandis qu'en corrélation avec l'analyse histologique dans nos modèles pré-cliniques murins, Rip140 sensibilise la réponse tumorale au FOLFIRI vraisemblablement au travers de la régulation de la réponse immunitaire (Figure 62).

3.3 RIP140 : valeur prédictive ?

Ces observations ont permis de mettre en évidence des effets adverses de Rip140 dans la réponse tumorale au FOLFIRI avec un rôle plutôt associé à la chimiorésistance des cellules cancéreuses et au contraire un rôle bénéfique dans la réponse globale de la tumeur au FOLFIRI par la régulation du micro-environnement immunitaire. Malgré cette divergence, les observations histologiques montrent bien un effet bénéfique globale dans la réponse tumorale à la chimiothérapie présentant ainsi Rip140 comme un marqueur prédictif potentiel à la chimiothérapie en clinique. Des travaux en cours de réalisation permettront, de manière similaire, de déterminer le rôle de Rip140 dans la réponse au FOLFIRINOX afin de se rapprocher des protocoles cliniques qui emploient l'oxaliplatine dans le traitement des CCR. De plus, les analyses *in vitro* suggèrent que la résistance induite par Rip140 est

plus forte avec l'oxaliplatine que l'irinotecan. Il faudra ainsi déterminer si l'utilisation de l'oxaliplatine en combinaison avec le 5-FU et l'irinotecan ne fait pas basculer la balance bénéfice/risque en favorisant la chimiorésistance des cellules cancéreuses au détriment de son rôle bénéfique dans la régulation du micro-environnement immunitaire. Enfin, une dernière étape intéressante consisterait à étudier la rémission des souris sur le long terme. En effet, Rip140 semble induire la chimiorésistance cellulaire au travers de la régulation de voies moléculaires comme p53 et les kinases effectrices Erk mais également au travers de la répression de la dynamique tumorale, en particulier par son contrôle négatif sur la croissance des CSC. Comme mentionné précédemment, la prolifération cellulaire est un aspect essentiel de la sensibilité aux composés génotoxiques. Ainsi, il faudrait s'assurer que Rip140 ne bénéficie pas à la récidive tumorale en favorisant la dormance des cellules cancéreuses. De plus, Rip140 régule la réponse immunitaire au FOLFIRI *in vivo* qui semble être associée à une infiltration des populations lymphocytaires CD8. Il a récemment été mis en évidence que la proportion de cellules T CD8 était de bon pronostic dans les CCR. En effet la mise en place d'un système de classification basé sur l'immunoscore globalement associé à l'infiltrat des lymphocytes T CD8 a mis au jour une forte corrélation de ce score avec la récidive tumorale (Pagès et al., 2018). Ainsi la caractérisation de l'expression de *RIP140* pourrait apporter des éléments supplémentaires dans la prédiction de la rémission et de la récidive tumorale. Ces approches permettraient de mieux délimiter le rôle de Rip140 d'une part en tant que marqueur pronostic mais également comme marqueur prédictif de la réponse tumorale à la chimiothérapie et à la rémission après traitement.

En conclusion, ces travaux pourraient apporter un bénéfice certain dans la prise en charge des patients au travers du choix thérapeutique en corrélation avec l'expression tumorale de *RIP140*. Dans le futur, on pourrait notamment imaginer que des patients présentant une expression tumorale élevée de *RIP140* se verrait recevoir des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires afin de stimuler la réponse immunitaire en combinaison avec une chimiothérapie par exemple (Sahin et al., 2019). De manière intéressante, un inhibiteur de Bmi1 induisant sa dégradation (Nishida et al., 2017), le PTC-596 a été testé pour des patients atteints de formes avancées de cancers solides en essai clinique de phase I (NCT02404480). Ainsi, on pourrait également envisager que des patients présentant de faibles niveaux d'expression de *RIP140* se verrait recevoir ce composé pour enrailler la croissance tumorale et la dynamique des CSC en combinaison avec la chimiothérapie. Bien entendu, ces démarches sont purement hypothétiques et il faudra d'abord amplement caractériser la nature de la réponse immunitaire ainsi que les acteurs moléculaires impliqués dans le réseau transcriptionnel associé à RIP140 dans les CCR.

CONCLUSION

Mes travaux de thèse portant sur l'étude de la biologie des CSI normales et cancéreuses ainsi que l'étude la chimiorésistance des cellules cancéreuses m'ont permis de mettre en évidence plusieurs rôles du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans ces processus.

Dans un premier temps, j'ai participé à l'identification du rôle répresseur de RIP140 sur l'expression et l'activité du facteur de transcription SOX9 en corrélation avec la répression de la différenciation des cellules de Paneth, maestro de la physiologie intestinale. Ce premier axe de recherche offre un terrain d'étude intéressant quant au rôle de Rip140 dans la régulation du potentiel souche intestinal à la vue du rôle crucial de ce lignage cellulaire dans la régulation du compartiment souche intestinal, mais également dans les processus inflammatoires et régénératifs associés à ce tissu. Ainsi, en lien avec les travaux réalisés précédemment, RIP140 semble largement influencer la dynamique épithéliale au travers de la régulation négative de l'axe de signalisation WNT/SOX9.

L'étude de la biologie des cellules cancéreuses et plus particulièrement des populations de CSC a été envisagée notamment à la lumière du rôle initiateur de l'activation aberrante de la voie WNT dans l'oncogenèse intestinale. J'ai pu observer que RIP140 réprime le phénotype et la croissance des CSC potentiellement au travers de la répression de l'expression du pro-oncogène *BMI1*, nécessaire à l'auto-renouvellement des CSC et la croissance tumorale. En lien avec ces observations, Rip140 joue un rôle protecteur dans la tumorigenèse intestinale, sa délétion étant associée à une augmentation de l'initiation et du développement tumoral chez les souris déficientes pour le gène suppresseur de tumeur *Apc* (Figure 62). Ces observations confortent la valeur de bon pronostic de RIP140 dans les CCR. Enfin, la réponse à la chimiothérapie a été étudiée au travers de différents modèles nous permettant de mettre en évidence un rôle adverse du co-régulateur transcriptionnel dans la réponse tumorale au traitement FOLFIRI. RIP140 semble induire la chimiorésistance intrinsèque des cellules cancéreuses (Figure 62) potentiellement au travers de la régulation de voies de signalisation comme p53 ou des MAPK, mais aussi par l'induction de l'expression de gènes impliqués dans le système de réparation des dommages à l'ADN *MSH2* et *MSH6*. Enfin, RIP140 semble favoriser la réponse tumorale globale par la régulation du micro-environnement immunitaire en réponse au traitement FOLFIRI (Figure 62).

Bien que beaucoup de points restent à élucider, RIP140 semble se dégager comme un marqueur prédictif de la réponse tumorale à la chimiothérapie et potentiellement même de la rémission des patients après traitement. A terme, ce projet apportera une valeur certaine de RIP140 dans la prise en charge des patients atteints de CCR d'un point de vue pronostic et prédictif qui sont des points cruciaux dans la démarche thérapeutique clinique.

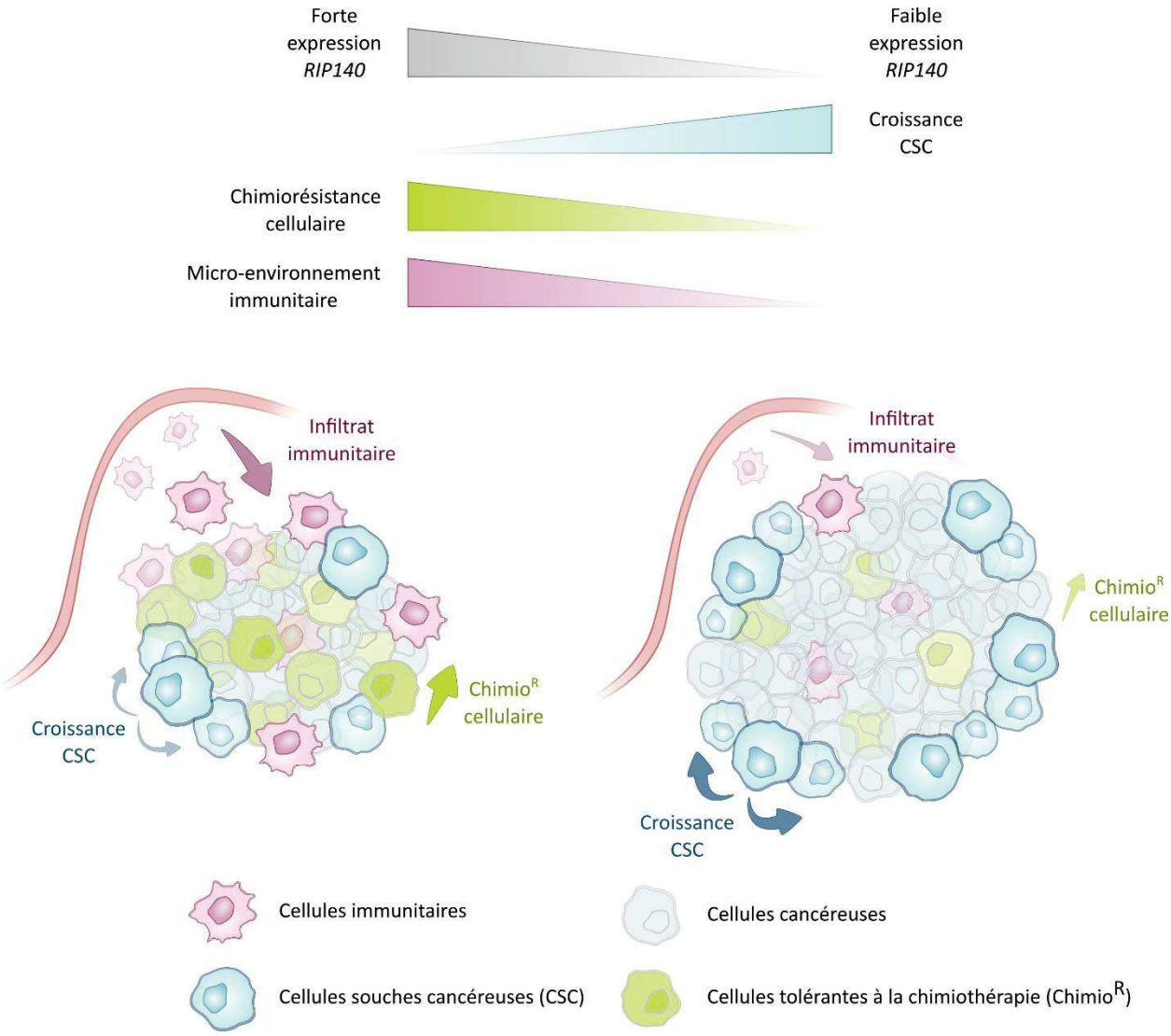


Figure 62 – Schéma représentatif du rôle de RIP140 dans le développement tumoral et la réponse à la chimiothérapie.

BIBLIOGRAPHIE

Aaltonen, L. A., Hamilton, S. R., World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer (Eds.). (2000). *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. IARC Press ; Oxford University Press (distributor,).

Abud, H. E., Chan, W. H., & Jardé, T. (2021). Source and Impact of the EGF Family of Ligands on Intestinal Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 685665. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685665

Adolph, T. E., Tomczak, M. F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J. N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., Flak, M. B., Cusick, J. L., Kohno, K., Iwawaki, T., Billmann-Born, S., Raine, T., Bharti, R., Lucius, R., Kweon, M.-N., … Blumberg, R. S. (2013). Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*, *503*(7475), 272–276. https://doi.org/10.1038/nature12599

Alajez, N. M. (2016). Significance of BMI1 and FSCN1 expression in colorectal cancer. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, *22*(4), 288–293. https://doi.org/10.4103/1319-3767.187602

Alcindor, T., & Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*, *18*(1), 18–25.

André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., de Gramont, A., & Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England Journal of Medicine*, *350*(23), 2343–2351. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709

André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Bonetti, A., Clingan, P., Bridgewater, J., Rivera, F., & de Gramont, A. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin,

fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(19), 3109–3116. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6771

Anuja, K., Chowdhury, A. R., Saha, A., Roy, S., Rath, A. K., Kar, M., & Banerjee, B. (2019). Radiation-induced DNA damage response and resistance in colorectal cancer stem-like cells. *International Journal of Radiation Biology*, *95*(6), 667–679. https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1580401

Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C. L., Golson, M. L., Zahm, A. M., Ray, M., Wiser, C. L., Wright, C. V. E., & Kaestner, K. H. (2016). Foxl1-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *2*(2), 175–188. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.12.004

Aran, V., Victorino, A. P., Thuler, L. C., & Ferreira, C. G. (2016). Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clinical Colorectal Cancer*, *15*(3), 195–203. https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.008

Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, *66*(4), 683–691. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912

Asfaha, S., Hayakawa, Y., Muley, A., Stokes, S., Graham, T. A., Ericksen, R. E., Westphalen, C. B., von Burstin, J., Mastracci, T. L., Worthley, D. L., Guha, C., Quante, M., Rustgi, A. K., & Wang, T. C. (2015). Krt19+/Lgr5− Cells Are Radioresistant Cancer-Initiating Stem Cells in the Colon and Intestine. *Cell Stem Cell*, *16*(6), 627–638. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.04.013

Auclair, B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y., & Perreault, N. (2007). Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Essential for Terminal Differentiation of the Intestinal Secretory Cell Lineage. *Gastroenterology*, *133*(3), 887–896. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.066

Augereau, P., Badia, E., Carascossa, S., Castet, A., Fritsch, S., Harmand, P.-O., Jalaguier, S., & Cavaillès, V. (2006). The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nuclear Receptor Signaling*, *4*, e024. https://doi.org/10.1621/nrs.04024

Augereau, P., Badia, E., Fuentes, M., Rabenoelina, F., Corniou, M., Derocq, D., Balaguer, P., & Cavailles, V. (2006). Transcriptional regulation of the human NRIP1/RIP140 gene by estrogen is modulated by dioxin signalling. *Molecular Pharmacology*, *69*(4), 1338–1346. https://doi.org/10.1124/mol.105.017376

Baba, H., Watanabe, M., Okabe, H., Miyamoto, Y., Sakamoto, Y., Baba, Y., Iwatsuki, M., Chikamoto, A., & Beppu, T. (2012). Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, *107*(12), 1950–1955. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.502

Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J. K. V., Hamilton, S., & Vogelstein, B. (1990). P53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research*, *50*(23), 7717–7722.

Bankaitis, E. D., Ha, A., Kuo, C. J., & Magness, S. T. (2018). Reserve Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Injury. *Gastroenterology*, *155*(5), 1348–1361. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.016

Bansal, A., & Simon, M. C. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*, *217*(7), 2291–2298. https://doi.org/10.1083/jcb.201804161

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(1), 19–33. https://doi.org/10.1038/nrm3721

Barker, N., Ridgway, R. A., van Es, J. H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A. R., Sansom, O. J., & Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, *457*(7229), 608–611. https://doi.org/10.1038/nature07602

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, *449*(7165), 1003–1007. https://doi.org/10.1038/nature06196

Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *1*, 24. https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00024

Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., Bibeau, F., Scherer, G., Joubert, D., Hollande, F., Blache, P., & Jay, P. (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of Cell Biology*, *178*(4), 635–648. https://doi.org/10.1083/jcb.200704152

Batlle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M. W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., & Clevers, H. (2002). β-Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB. *Cell*, *111*(2), 251–263. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01015-2

Baylin, S. B., Höppener, J. W. M., Bustros, A. de, Steenbergh, P. H., Lips, C. J. M., & Nelkin, B. D. (1986). DNA Methylation Patterns of the Calcitonin Gene in Human Lung Cancers and Lymphomas. *Cancer Research*, *46*(6), 2917–2922.

Benard, A., Goossens-Beumer, I. J., Hoesel, A. Q. van, Horati, H., Putter, H., Zeestraten, E. C. M., Velde, C. J. H. van de, & Kuppen, P. J. K. (2014). Prognostic Value of Polycomb Proteins EZH2, BMI1 and SUZ12 and Histone Modification H3K27me3 in Colorectal Cancer. *PLOS ONE*, *9*(9), e108265. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108265

Benson, A. B., Schrag, D., Somerfield, M. R., Cohen, A. M., Figueredo, A. T., Flynn, P. J., Krzyzanowska, M. K., Maroun, J., McAllister, P., Van Cutsem, E., Brouwers, M., Charette, M., & Haller, D. G. (2004). American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy

for stage II colon cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *22*(16), 3408–3419. https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.063

Benton, C. R., Wright, D. C., & Bonen, A. (2008). PGC-1alpha-mediated regulation of gene expression and metabolism: Implications for nutrition and exercise prescriptions. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, *33*(5), 843–862. https://doi.org/10.1139/H08-074

Benvenuti, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Zanon, C., Moroni, M., Veronese, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2007). Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Research*, *67*(6), 2643–2648. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4158

Berriel Diaz, M., Krones-Herzig, A., Metzger, D., Ziegler, A., Vegiopoulos, A., Klingenspor, M., Müller-Decker, K., & Herzig, S. (2008). Nuclear receptor cofactor receptor interacting protein 140 controls hepatic triglyceride metabolism during wasting in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *48*(3), 782–791. https://doi.org/10.1002/hep.22383

Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(5), 356–368. https://doi.org/10.1038/nrmicro2546

Bhattacharya, R., Fan, F., Wang, R., Ye, X., Xia, L., Boulbes, D., & Ellis, L. M. (2017). Intracrine VEGF signalling mediates colorectal cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, *117*(6), 848–855. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.238

Bhattacharya, R., Mustafi, S. B., Street, M., Dey, A., & Dwivedi, S. K. D. (2015). Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology. *Genes & Diseases*, *2*(3), 225–239. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.04.001

Birchenough, G. M. H., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H., & Hansson, G. C. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology*, *8*(4), 712–719. https://doi.org/10.1038/mi.2015.32

Bjerknes, M., & Cheng, H. (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. *The American Journal of Anatomy*, *160*(1), 77–91. https://doi.org/10.1002/aja.1001600107

Blache, P., Van De Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.-N., Clevers, H., & Jay, P. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *Journal of Cell Biology*, *166*(1), 37–47. https://doi.org/10.1083/jcb.200311021

Bleau, A.-M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E. I., Huse, J. T., Brennan, C. W., & Holland, E. C. (2009). PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell*, *4*(3), 226–235. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Bray, F., & Soerjomataram, I. (2015). The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control. In H. Gelband, P. Jha, R. Sankaranarayanan, & S. Horton (Eds.), *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343643/

Bray, S. J. (2006). Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(9), 678–689. https://doi.org/10.1038/nrm2009

Briscoe, J., & Thérond, P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(7), 416–429. https://doi.org/10.1038/nrm3598

Buczacki, S. J. A., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., & Winton, D. J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, *495*(7439), 65–69. https://doi.org/10.1038/nature11965

Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), 3233. https://doi.org/10.3390/ijms21093233

Bürtin, F., Mullins, C. S., & Linnebacher, M. (2020). Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, *26*(13), 1394–1426. https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i13.1394

Buscà, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*, 53. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053

Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., Wilde, R. F. de, Maitra, A., & Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes & Development*, *24*(21), 2383–2388. https://doi.org/10.1101/gad.1978810

Cairnie, A. B., Lamerton, L. F., & Steel, G. G. (1965). Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. *Experimental Cell Research*, *39*(2), 528–538. https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90055-8

Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V. F., Iglesias, M., Céspedes, M. V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X. H.-F., Byrom, D., Riera, A., Rossell, D., Mangues, R., Massagué, J., Sancho, E., & Batlle, E. (2012). Dependency of Colorectal Cancer on a TGF-β-Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell*, *22*(5), 571–584. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.013

Camargo, F. D., Gokhale, S., Johnnidis, J. B., Fu, D., Bell, G. W., Jaenisch, R., & Brummelkamp, T. R. (2007). YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Current Biology*, *17*(23), 2054–2060. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.039

Campbell, J., Berry, J., & Liang, Y. (2019). Chapter 71—Anatomy and Physiology of the Small Intestine. In C. J. Yeo (Ed.), *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)* (pp. 817–841). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00071-6

Carrasco-Garcia, E., Lopez, L., Aldaz, P., Arevalo, S., Aldaregia, J., Egaña, L., Bujanda, L., Cheung, M., Sampron, N., Garcia, I., & Matheu, A. (2016a). SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin. *Scientific Reports*, *6*, 32350. https://doi.org/10.1038/srep32350

Carrasco-Garcia, E., Lopez, L., Aldaz, P., Arevalo, S., Aldaregia, J., Egaña, L., Bujanda, L., Cheung, M., Sampron, N., Garcia, I., & Matheu, A. (2016b). SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin. *Scientific Reports*, *6*, 32350. https://doi.org/10.1038/srep32350

Carroll, J. S., Liu, X. S., Brodsky, A. S., Li, W., Meyer, C. A., Szary, A. J., Eeckhoute, J., Shao, W., Hestermann, E. V., Geistlinger, T. R., Fox, E. A., Silver, P. A., & Brown, M. (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*, *122*(1), 33–43. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.008

Castet, A., Boulahtouf, A., Versini, G., Bonnet, S., Augereau, P., Vignon, F., Khochbin, S., Jalaguier, S., & Cavaillès, V. (2004). Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Research*, *32*(6), 1957–1966. https://doi.org/10.1093/nar/gkh524

Castet, A., Herledan, A., Bonnet, S., Jalaguier, S., Vanacker, J.-M., & Cavaillès, V. (2006). Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(5), 1035–1047. https://doi.org/10.1210/me.2005-0227

Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J., & Parker, M. G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *The EMBO Journal*, *14*(15), 3741–3751.

Cavard, C., Colnot, S., Audard, V., Benhamouche, S., Finzi, L., Torre, C., Grimber, G., Godard, C., Terris, B., & Perret, C. (2008). Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. *Future Oncology (London, England)*, *4*(5), 647–660. https://doi.org/10.2217/14796694.4.5.647

Ceelen, W., Fierens, K., Nieuwenhove, Y. V., & Pattyn, P. (2009). Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, *124*(12), 2966–2972. https://doi.org/10.1002/ijc.24247

Chen, Y., Kerimo, A., Khan, S., & Wei, L.-N. (2002). Real-time analysis of molecular interaction of retinoid receptors and receptor-interacting protein 140 (RIP140). *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *16*(11), 2528–2537. https://doi.org/10.1210/me.2002-0124

Cheng, H. (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. II. Mucous cells. *The American Journal of Anatomy*, *141*(4), 481–501. https://doi.org/10.1002/aja.1001410404

Cheng, H. (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells. *The American Journal of Anatomy*, *141*(4), 521–535. https://doi.org/10.1002/aja.1001410406

Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *The American Journal of Anatomy*, *141*(4), 461–479. https://doi.org/10.1002/aja.1001410403

Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. *The American Journal of Anatomy*, *141*(4), 503–519. https://doi.org/10.1002/aja.1001410405

Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974c). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *The American Journal of Anatomy*, *141*(4), 537–561. https://doi.org/10.1002/aja.1001410407

Chinnadurai, G. (2002). CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Molecular Cell*, *9*(2), 213–224. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00443-4

Christian, M., Kiskinis, E., Debevec, D., Leonardsson, G., White, R., & Parker, M. G. (2005). RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(21), 9383–9391. https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9383-9391.2005

Chu, E., Koeller, D. M., Johnston, P. G., Zinn, S., & Allegra, C. J. (1993). Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Molecular Pharmacology*, *43*(4), 527–533.

Clevers, H. (2006). Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, *127*(3), 469–480. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018

Clevers, H. C., & Bevins, C. L. (2013). Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annual Review of Physiology*, *75*(1), 289–311. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744

Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Trautmann, F., Kunz-Schughart, L. A., Telegeev, G. D., Stakhovsky, E. A., Walker, J. R., Simin, K., Lyle, S., Fuessel, S., Erdmann, K., Wirth, M. P., Krause, M., Baumann, M., & Dubrovska, A. (2015). Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Research*, *75*(7), 1482–1494. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1924

Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., & Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: Influence of genetic and environmental modifiers. *Laboratory Investigation*, *84*(12), 1619–1630. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700180

Conklin, K. A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative Cancer Therapies*, *3*(4), 294–300. https://doi.org/10.1177/1534735404270335

Corr, M. (2008). Wnt-beta-catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, *4*(10), 550–556. https://doi.org/10.1038/ncprheum0904

Coyle, Y. (2019). Chapter 176 - Adjuvant and Neoadjuvant Therapy for Colorectal Cancer: Molecular-Based Therapy. In C. J. Yeo (Ed.), *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)* (pp. 2126–2136). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00176-X

Crompton, T., Outram, S. V., & Hager-Theodorides, A. L. (2007). Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. *Nature Reviews Immunology*, *7*(9), 726–735. https://doi.org/10.1038/nri2151

Cunliffe, R. N., Rose, F. R. a. J., Keyte, J., Abberley, L., Chan, W. C., & Mahida, Y. R. (2001). Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut*, *48*(2), 176–185. https://doi.org/10.1136/gut.48.2.176

Cunningham, J. M., Christensen, E. R., Tester, D. J., Kim, C.-Y., Roche, P. C., Burgart, L. J., & Thibodeau, S. N. (1998). Hypermethylation of the hMLH1 Promoter in Colon Cancer with Microsatellite Instability. *Cancer Research*, *58*(15), 3455–3460.

Cutsem, E. V., Prenen, H., D'Haens, G., Bennouna, J., Carrato, A., Ducreux, M., Bouché, O., Sobrero, A., Latini, L., Staines, H., Oum'Hamed, Z., Dressler, H., Studeny, M., & Capdevila, J. (2015). A phase I/II, open-label, randomised study of nintedanib plus mFOLFOX6 versus bevacizumab plus mFOLFOX6 in first-line metastatic colorectal cancer patients. *Annals of Oncology*, *26*(10), 2085–2091. https://doi.org/10.1093/annonc/mdv286

Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(2), 81–94. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166

Danielsen, S. A., Lind, G. E., Bjørnslett, M., Meling, G. I., Rognum, T. O., Heim, S., & Lothe, R. A. (2008). Novel mutations of the suppressor gene PTEN in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability- and TP53 mutation- status. *Human Mutation*, *29*(11), E252–E262. https://doi.org/10.1002/humu.20860

de Lau, W., Peng, W. C., Gros, P., & Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: Regulator of Wnt signal strength. *Genes & Development*, *28*(4), 305–316. https://doi.org/10.1101/gad.235473.113

Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews. Cancer*, *5*(4), 275–284. https://doi.org/10.1038/nrc1590

Degirmenci, B., Valenta, T., Dimitrieva, S., Hausmann, G., & Basler, K. (2018). GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells. *Nature*, *558*(7710), 449–453. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0190-3

Delcuve, G. P., Khan, D. H., & Davie, J. R. (2012). Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: Emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clinical Epigenetics*, *4*(1), 5. https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-5

Derynck, R., Muthusamy, B. P., & Saeteurn, K. Y. (2014). Signaling pathway cooperation in TGF-β-induced epithelial–mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*, *31*, 56–66. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.001

Dieter, S. M., Ball, C. R., Hoffmann, C. M., Nowrouzi, A., Herbst, F., Zavidij, O., Abel, U., Arens, A., Weichert, W., Brand, K., Koch, M., Weitz, J., Schmidt, M., von Kalle, C., & Glimm, H. (2011). Distinct Types of Tumor-Initiating Cells Form Human Colon Cancer Tumors and Metastases. *Cell Stem Cell*, *9*(4), 357–365. https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.08.010

Dietmaier, W., Wallinger, S., Bocker, T., Kullmann, F., Fishel, R., & Rüschoff, J. (1997). Diagnostic microsatellite instability: Definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Research*, *57*(21), 4749–4756.

Docquier, A., Augereau, P., Lapierre, M., Harmand, P.-O., Badia, E., Annicotte, J.-S., Fajas, L., & Cavaillès, V. (2012). The RIP140 gene is a transcriptional target of E2F1. *PloS One*, *7*(5), e35839. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035839

Docquier, A., Harmand, P.-O., Fritsch, S., Chanrion, M., Darbon, J.-M., & Cavaillès, V. (2010). The transcriptional coregulator RIP140 represses E2F1 activity and discriminates breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *16*(11), 2959–2970. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3153

Douillard, J.-Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocákova, I., Ruff, P., Błasińska-Morawiec, M., Šmakal, M., Canon, J.-L., Rother, M., Oliner, K. S., Wolf, M., & Gansert, J. (2010). Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(31), 4697–4705. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.4860

Du, J., Li, Y., Li, J., & Zheng, J. (2010). Polycomb group protein Bmi1 expression in colon cancers predicts the survival. *Medical Oncology*, *27*(4), 1273–1276. https://doi.org/10.1007/s12032-009-9373-y

Durand, A., Donahue, B., Peignon, G., Letourneur, F., Cagnard, N., Slomianny, C., Perret, C., Shroyer, N. F., & Romagnolo, B. (2012). Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(23), 8965–8970. https://doi.org/10.1073/pnas.1201652109

Duval, A., & Hamelin, R. (2002). Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: Toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Research*, *62*(9), 2447–2454.

Farin, H. F., Van Es, J. H., & Clevers, H. (2012). Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem Cells and Promote Formation of Paneth Cells. *Gastroenterology*, *143*(6), 1518-1529.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.031

Fearon, E. R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *6*(1), 479–507. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759–767. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I

Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *237*(3), 752–757. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124

Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, *301*(5895), 89–92. https://doi.org/10.1038/301089a0

Fidler, M. M., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2016). A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *International Journal of Cancer*, *139*(11), 2436–2446. https://doi.org/10.1002/ijc.30382

Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *3*(3). https://jgo.amegroups.com/article/view/410

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, *435*(7044), 964–968. https://doi.org/10.1038/nature03589

Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 298–306. https://doi.org/10.1038/nrc3245

Fritah, A., Steel, J. H., Nichol, D., Parker, N., Williams, S., Price, A., Strauss, L., Ryder, T. A., Mobberley, M. A., Poutanen, M., Parker, M., & White, R. (2010). Elevated expression of the metabolic regulator receptor-interacting protein 140 results in cardiac hypertrophy and impaired cardiac function. *Cardiovascular Research*, *86*(3), 443–451. https://doi.org/10.1093/cvr/cvp418

Fuchs, B. C., Fujii, T., Dorfman, J. D., Goodwin, J. M., Zhu, A. X., Lanuti, M., & Tanabe, K. K. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Research*, *68*(7), 2391–2399. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2460

Fuchs, C. S., Marshall, J., Mitchell, E., Wierzbicki, R., Ganju, V., Jeffery, M., Schulz, J., Richards, D., Soufi-Mahjoubi, R., Wang, B., & Barrueco, J. (2007). Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: Results from the BICC-C Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(30), 4779–4786. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.3357

Fujita, K., Kubota, Y., Ishida, H., & Sasaki, Y. (2015). Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(43), 12234–12248. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i43.12234

Fulawka, L., Donizy, P., & Halon, A. (2014). Cancer stem cells – the current status of an old concept: Literature review and clinical approaches. *Biological Research*, *47*(1), 66. https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-66

Gagné-Sansfaçon, J., Allaire, J. M., Jones, C., Boudreau, F., & Perreault, N. (2014). Loss of Sonic hedgehog leads to alterations in intestinal secretory cell maturation and autophagy. *PloS One*, *9*(6), e98751. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098751

Gatti, L., & Zunino, F. (2005). Overview of Tumor Cell Chemoresistance Mechanisms. In R. D. Blumenthal (Ed.), *Chemosensitivity: Volume II: In VIVO Models, Imaging, and Molecular Regulators* (pp. 127–148). Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-889-7:127

Geigl, J. B., Obenauf, A. C., Schwarzbraun, T., & Speicher, M. R. (2008). Defining 'chromosomal instability'. *Trends in Genetics*, *24*(2), 64–69. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.006

Gerbe, F., Legraverend, C., & Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(17), 2907–2917. https://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V. S., Taylor, N., Maizels, R. M., & Jay, P. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, *529*(7585), 226–230. https://doi.org/10.1038/nature16527

Gersemann, M., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2011). From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *17*(27), 3198–3203. https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i27.3198

Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., Schwartz, M. A., Benson, A. B., & Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(12), 1539–1544. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.6305

Gleizes, A., Cavaillès, V., & Lapierre, M. (2018). Transcriptional Regulation of the Intestinal Cancer Stem Cell Phenotype. *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells - Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics*. https://doi.org/10.5772/intechopen.71859

Gleizes, A., Triki, M., Bonnet, S., Baccari, N., Jimenez-Dominguez, G., Covinhes, A., Pirot, N., Blache, P., Yuan, R., Győrffy, B., Cavaillès, V., & Lapierre, M. (2021). RIP140 Represses Intestinal Paneth Cell Differentiation and Interplays with SOX9 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers*, *13*(13), 3192. https://doi.org/10.3390/cancers13133192

Gongora, C., Vezzio-Vie, N., Tuduri, S., Denis, V., Causse, A., Auzanneau, C., Collod-Beroud, G., Coquelle, A., Pasero, P., Pourquier, P., Martineau, P., & Del Rio, M. (2011). New Topoisomerase I mutations are associated with resistance to camptothecin. *Molecular Cancer*, *10*, 64. https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-64

Goss, K. H., & Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *18*(9), 1967–1979. https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.9.1967

Grady, W. M., Myeroff, L. L., Swinler, S. E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J. D., Neumann, A., Brattain, M. G., Chang, J., Kim, S.-J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Willson, J. K. V., & Markowitz, S. (1999). Mutational Inactivation of Transforming Growth Factor β Receptor Type II in Microsatellite Stable Colon Cancers. *Cancer Research*, *59*(2), 320–324.

Grady, W. M., Rajput, A., Myeroff, L., Liu, D. F., Kwon, K., Willis, J., & Markowitz, S. (1998). Mutation of the Type II Transforming Growth Factor-β Receptor Is Coincident with the Transformation of Human Colon Adenomas to Malignant Carcinomas. *Cancer Research*, *58*(14), 3101–3104.

Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE 2 pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, *30*(3), 377–386. https://doi.org/10.1093/carcin/bgp014

Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal Physiology and Function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *239*, 1–16. https://doi.org/10.1007/164_2016_118

Gregorieff, A., Liu, Y., Inanlou, M. R., Khomchuk, Y., & Wrana, J. L. (2015). Yap-dependent reprogramming of Lgr5 + stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature*, *526*(7575), 715–718. https://doi.org/10.1038/nature15382

Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., & Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*, *129*(2), 626–638. https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.06.007

Gribble, F. M., & Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(4), 226–237. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8

Grothey, A., Sobrero, A. F., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Lenz, H.-J., Yoshino, T., Cihon, F., Wagner, A., & Van Cutsem, E. (2012). Results of a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial (CORRECT) of regorafenib plus best supportive care (BSC) versus placebo plus BSC in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) who have progressed after standard therapies. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(4_suppl), LBA385–LBA385. https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.4_suppl.lba385

Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, *32*(18), 2847–2849. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., … Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, *21*(11), 1350–1356. https://doi.org/10.1038/nm.3967

Guiu, J., Hannezo, E., Yui, S., Demharter, S., Ulyanchenko, S., Maimets, M., Jørgensen, A., Perlman, S., Lundvall, L., Mamsen, L. S., Larsen, A., Olesen, R. H., Andersen, C. Y., Thuesen, L. L., Hare, K. J., Pers, T. H., Khodosevich, K., Simons, B. D., & Jensen, K. B. (2019). Tracing the origin of adult intestinal stem cells. *Nature*, *570*(7759), 107–111. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1212-5

Gupta, P. B., Fillmore, C. M., Jiang, G., Shapira, S. D., Tao, K., Kuperwasser, C., & Lander, E. S. (2011). Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell*, *146*(4), 633–644. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026

Gupta, P., Huq, M. D. M., Khan, S. A., Tsai, N.-P., & Wei, L.-N. (2005). Regulation of Co-repressive Activity of and HDAC Recruitment to RIP140 by Site-specific Phosphorylation*. *Molecular & Cellular Proteomics*, *4*(11), 1776–1784. https://doi.org/10.1074/mcp.M500236-MCP200

Habermann, J. K., Paulsen, U., Roblick, U. J., Upender, M. B., McShane, L. M., Korn, E. L., Wangsa, D., Krüger, S., Duchrow, M., Bruch, H.-P., Auer, G., & Ried, T. (2007). Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *46*(1), 10–26. https://doi.org/10.1002/gcc.20382

Hammond, W. A., Swaika, A., & Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: A review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *8*(1), 57–84. https://doi.org/10.1177/1758834015614530

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Handschin, C. (2010). Regulation of skeletal muscle cell plasticity by the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, *30*(6), 376–384. https://doi.org/10.3109/10799891003641074

Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., Mao, X., Ma, Q., Zamponi, R., Bouwmeester, T., Finan, P. M., Kirschner, M. W., Porter, J. A., Serluca, F. C., & Cong, F. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, *485*(7397), 195–200. https://doi.org/10.1038/nature11019

Haraguchi, N., Utsunomiya, T., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Barnard, G. F., & Mori, M. (2006). Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *24*(3), 506–513. https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0282

Haramis, A.-P. G., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G. J. A., & Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5664), 1684–1686. https://doi.org/10.1126/science.1093587

Hardwick, J. C. H., Van Den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Ballester, I., Van Den Brande, Jan. M. H., Keller, J. J., Offerhaus, G. J. A., Van Deventer, S. J. H., & Peppelenbosch, M. P. (2004). Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology*, *126*(1), 111–121. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.10.067

Hardwick, J. C., Kodach, L. L., Offerhaus, G. J., & van den Brink, G. R. (2008). Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *8*(10), 806–812. https://doi.org/10.1038/nrc2467

Harris, S. L., & Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene*, *24*(17), 2899–2908. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615

He, X. C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., & Li, L. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt–β-catenin signaling. *Nature Genetics*, *36*(10), 1117–1121. https://doi.org/10.1038/ng1430

Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., & Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, *387*(6634), 733–736. https://doi.org/10.1038/42750

Herbst, A., Jurinovic, V., Krebs, S., Thieme, S. E., Blum, H., Göke, B., & Kolligs, F. T. (2014). Comprehensive analysis of β-catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/β-catenin signaling. *BMC Genomics*, *15*(1), 74. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-74

Herzog, B., Hallberg, M., Seth, A., Woods, A., White, R., & Parker, M. G. (2007). The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and

glucose metabolism by liver X receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *21*(11), 2687–2697. https://doi.org/10.1210/me.2007-0213

Holmberg, J., Genander, M., Halford, M. M., Annerén, C., Sondell, M., Chumley, M. J., Silvany, R. E., Henkemeyer, M., & Frisén, J. (2006). EphB Receptors Coordinate Migration and Proliferation in the Intestinal Stem Cell Niche. *Cell*, *125*(6), 1151–1163. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.030

Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J. Z., Wicha, M. S., & Boman, B. M. (2009a). Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis. *Cancer Research*, *69*(8), 3382–3389. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4418

Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J. Z., Wicha, M. S., & Boman, B. M. (2009b). Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis. *Cancer Research*, *69*(8), 3382–3389. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4418

Huq, M. D. M., Ha, S. G., Barcelona, H., & Wei, L.-N. (2009). Lysine methylation of nuclear co-repressor receptor interacting protein 140. *Journal of Proteome Research*, *8*(3), 1156–1167. https://doi.org/10.1021/pr800569c

Huq, M. D. M., Khan, S. A., Park, S. W., & Wei, L.-N. (2005). Mapping of phosphorylation sites of nuclear corepressor receptor interacting protein 140 by liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. *PROTEOMICS*, *5*(8), 2157–2166. https://doi.org/10.1002/pmic.200401090

Huq, M. D. M., & Wei, L.-N. (2005). Post-translational Modification of Nuclear Co-repressor Receptor-interacting Protein 140 by Acetylation*. *Molecular & Cellular Proteomics*, *4*(7), 975–983. https://doi.org/10.1074/mcp.M500015-MCP200

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., & Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.

The New England Journal of Medicine, *350*(23), 2335–2342. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691

Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J. B., Sabunciyan, S., & Feinberg, A. P. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics*, *41*(2), 178–186. https://doi.org/10.1038/ng.298

Ishikawa, T., & Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(27), 20116–20125.

Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., … Saya, H. (2011). CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System xc− and Thereby Promotes Tumor Growth. *Cancer Cell*, *19*(3), 387–400. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.038

Issa, J.-P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *4*(12), 988–993. https://doi.org/10.1038/nrc1507

Itzkovitz, S., Blat, I. C., Jacks, T., Clevers, H., & van Oudenaarden, A. (2012). Optimality in the development of intestinal crypts. *Cell*, *148*(3), 608–619. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.025

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071–1078. https://doi.org/10.1038/nature08467

Jacquier, V., Gitenay, D., Fritsch, S., Linares, L. K., Bonnet, S., Jalaguier, S., Cavaillès, V., & Teyssier, C. (2020). *RIP140 inhibits glycolysis-dependent proliferation of cancer cells by regulating transcriptional crosstalk between hypoxia induced factor and p53* (p. 2020.07.30.228759). https://doi.org/10.1101/2020.07.30.228759

Jadhav, U., Saxena, M., O'Neill, N. K., Saadatpour, A., Yuan, G.-C., Herbert, Z., Murata, K., & Shivdasani, R. A. (2017). Dynamic Reorganization of Chromatin Accessibility Signatures during Dedifferentiation of Secretory Precursors into Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *21*(1), 65-77.e5. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.05.001

Jalaguier, S., Teyssier, C., Nait Achour, T., Lucas, A., Bonnet, S., Rodriguez, C., Elarouci, N., Lapierre, M., & Cavaillès, V. (2017). Complex regulation of LCoR signaling in breast cancer cells. *Oncogene*, *36*(33), 4790–4801. https://doi.org/10.1038/onc.2017.97

Jardé, T., Chan, W. H., Rossello, F. J., Kaur Kahlon, T., Theocharous, M., Kurian Arackal, T., Flores, T., Giraud, M., Richards, E., Chan, E., Kerr, G., Engel, R. M., Prasko, M., Donoghue, J. F., Abe, S., Phesse, T. J., Nefzger, C. M., McMurrick, P. J., Powell, D. R., … Abud, H. E. (2020). Mesenchymal Niche-Derived Neuregulin-1 Drives Intestinal Stem Cell Proliferation and Regeneration of Damaged Epithelium. *Cell Stem Cell*, *27*(4), 646-662.e7. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.06.021

Jen, J., Powell, S. M., Papadopoulos, N., Smith, K. J., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1994). Molecular Determinants of Dysplasia in Colorectal Lesions. *Cancer Research*, *54*(21), 5523–5526.

Johnson, R., & Halder, G. (2014). The two faces of Hippo: Targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(1), 63–79. https://doi.org/10.1038/nrd4161

Joseph, R., Orlov, Y. L., Huss, M., Sun, W., Kong, S. L., Ukil, L., Pan, Y. F., Li, G., Lim, M., Thomsen, J. S., Ruan, Y., Clarke, N. D., Prabhakar, S., Cheung, E., & Liu, E. T. (2010). Integrative model of genomic factors for determining binding site selection by estrogen receptor-α. *Molecular Systems Biology*, *6*, 456. https://doi.org/10.1038/msb.2010.109

Jung, B., Staudacher, J. J., & Beauchamp, D. (2017). Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, *152*(1), 36–52. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.015

Jung, P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F. M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M. A., Sancho, E., Clevers, H., & Batlle, E. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nature Medicine*, *17*(10), 1225–1227. https://doi.org/10.1038/nm.2470

Kahai, P., Mandiga, P., Wehrle, C. J., & Lobo, S. (2021). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Large Intestine. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470577/

Kalady, M. F., Boland, C. R., & Church, J. M. (2019). Chapter 165—Inherited Colorectal Cancer and the Genetics of Colorectal Cancer. In C. J. Yeo (Ed.), *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)* (pp. 1959–1980). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00165-5

Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2021). Physiology, Liver. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/

Kang, K., Reilly, S. M., Karabacak, V., Gangl, M. R., Fitzgerald, K., Hatano, B., & Lee, C.-H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metabolism*, *7*(6), 485–495. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.002

Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., Simes, R. J., Chalchal, H., Shapiro, J. D., Robitaille, S., Price, T. J., Shepherd, L., Au, H.-J., Langer, C., Moore, M. J., & Zalcberg, J. R. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, *359*(17), 1757–1765. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804385

Kent, L. N., & Leone, G. (2019). The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *19*(6), 326–338. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0143-7

Kerley, J. S., Olsen, S. L., Freemantle, S. J., & Spinella, M. J. (2001). Transcriptional activation of the nuclear receptor corepressor RIP140 by retinoic acid: A potential negative-feedback

regulatory mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *285*(4), 969–975. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5274

Kim, E., Davidson, L. A., Zoh, R. S., Hensel, M. E., Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Callaway, E. S., Allred, C. D., Turner, N. D., Weeks, B. R., & Chapkin, R. S. (2016). Homeostatic responses of colonic LGR5 + stem cells following acute in vivo exposure to a genotoxic carcinogen. *Carcinogenesis*, *37*(2), 206–214. https://doi.org/10.1093/carcin/bgv250

Kim, E. R., & Chang, D. K. (2014). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(29), 9872–9881. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9872

Kim, J. H., Yoon, S. Y., Kim, C.-N., Joo, J. H., Moon, S. K., Choe, I. S., Choe, Y.-K., & Kim, J. W. (2004). The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Letters*, *203*(2), 217–224. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.07.009

Kim, J.-E., Fei, L., Yin, W.-C., Coquenlorge, S., Rao-Bhatia, A., Zhang, X., Shi, S. S. W., Lee, J. H., Hahn, N. A., Rizvi, W., Kim, K.-H., Sung, H.-K., Hui, C., Guo, G., & Kim, T.-H. (2020). Single cell and genetic analyses reveal conserved populations and signaling mechanisms of gastrointestinal stromal niches. *Nature Communications*, *11*(1), 334. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14058-5

Kiskinis, E., Chatzeli, L., Curry, E., Kaforou, M., Frontini, A., Cinti, S., Montana, G., Parker, M. G., & Christian, M. (2014). RIP140 Represses the “Brown-in-White” Adipocyte Program Including a Futile Cycle of Triacyclglycerol Breakdown and Synthesis. *Molecular Endocrinology*, *28*(3), 344–356. https://doi.org/10.1210/me.2013-1254

Kjeldsen, B. J., Kronborg, O., Fenger, C., & Jørgensen, O. D. (1997). The pattern of recurrent colorectal cancer in a prospective randomised study and the characteristics of diagnostic tests. *International Journal of Colorectal Disease*, *12*(6), 329–334. https://doi.org/10.1007/s003840050118

Kolterud, A., Grosse, A. S., Zacharias, W. J., Walton, K. D., Kretovich, K. E., Madison, B. B., Waghray, M., Ferris, J. E., Hu, C., Merchant, J. L., Dlugosz, A. A., Kottmann, A. H., & Gumucio, D. L. (2009). Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: New roles for hedgehog in gastrointestinal patterning. *Gastroenterology*, *137*(2), 618–628. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.002

Kopan, R., & Ilagan, Ma. X. G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, *137*(2), 216–233. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., & Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genetics*, *19*(4), 379–383. https://doi.org/10.1038/1270

Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., Wichen, D. van, Weger, R. de, Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Clevers, H. (1997). Constitutive Transcriptional Activation by a β-Catenin-Tcf Complex in APC−/− Colon Carcinoma. *Science*, *275*(5307), 1784–1787. https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784

Kosinski, C., Li, V. S. W., Chan, A. S. Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., Leung, S. Y., & Chen, X. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(39), 15418–15423. https://doi.org/10.1073/pnas.0707210104

Kosinski, C., Stange, D. E., Xu, C., Chan, A. S., Ho, C., Yuen, S. T., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Clevers, H., Leung, S. Y., & Chen, X. (2010). Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. *Gastroenterology*, *139*(3), 893–903. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.014

Kozovska, Z., Patsalias, A., Bajzik, V., Durinikova, E., Demkova, L., Jargasova, S., Smolkova, B., Plava, J., Kucerova, L., & Matuskova, M. (2018). ALDH1A inhibition sensitizes colon cancer cells to chemotherapy. *BMC Cancer*, *18*(1), 656. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4572-6

Krasinskas, A. M. (2011). EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Pathology Research International*, *2011*, e932932. https://doi.org/10.4061/2011/932932

Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*, *14*(3), 275–291. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006

Kreso, A., O'Brien, C. A., van Galen, P., Gan, O. I., Notta, F., Brown, A. M. K., Ng, K., Ma, J., Wienholds, E., Dunant, C., Pollett, A., Gallinger, S., McPherson, J., Mullighan, C. G., Shibata, D., & Dick, J. E. (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6119), 543–548. https://doi.org/10.1126/science.1227670

Kreso, A., van Galen, P., Pedley, N. M., Lima-Fernandes, E., Frelin, C., Davis, T., Cao, L., Baiazitov, R., Du, W., Sydorenko, N., Moon, Y.-C., Gibson, L., Wang, Y., Leung, C., Iscove, N. N., Arrowsmith, C. H., Szentgyorgyi, E., Gallinger, S., Dick, J. E., & O'Brien, C. A. (2014). Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nature Medicine*, *20*(1), 29–36. https://doi.org/10.1038/nm.3418

Kullander, K., & Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of eph and ephrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *3*(7), 475–486. https://doi.org/10.1038/nrm856

Kunst, N., Alarid-Escudero, F., Aas, E., Coupé, V. M. H., Schrag, D., & Kuntz, K. M. (2020). Estimating Population-Based Recurrence Rates of Colorectal Cancer over Time in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *29*(12), 2710–2718. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0490

Ladabaum, U., Dominitz, J. A., Kahi, C., & Schoen, R. E. (2020). Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*, *158*(2), 418–432. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.043

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after

transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645–648. https://doi.org/10.1038/367645a0

Lapierre, M., Bonnet, S., Bascoul-Mollevi, C., Ait-Arsa, I., Jalaguier, S., Del Rio, M., Plateroti, M., Roepman, P., Ychou, M., Pannequin, J., Hollande, F., Parker, M., & Cavailles, V. (2014). RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(5), 1899–1913. https://doi.org/10.1172/JCI65178

Lapierre, M., Docquier, A., Castet-Nicolas, A., Gitenay, D., Jalaguier, S., Teyssier, C., & Cavaillès, V. (2015). The emerging role of the transcriptional coregulator RIP140 in solid tumors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1856*(1), 144–150. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.006

Leary, R. J., Lin, J. C., Cummins, J., Boca, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Sjöblom, T., Park, B.-H., Parsons, R., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K. V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Kopelovich, L., Papadopoulos, N., Pennacchio, L. A., Wang, T.-L., … Velculescu, V. E. (2008). Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(42), 16224–16229. https://doi.org/10.1073/pnas.0808041105

Lee, T.-H., Seng, S., Sekine, M., Hinton, C., Fu, Y., Avraham, H. K., & Avraham, S. (2007). Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1. *PLOS Medicine*, *4*(6), e186. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040186

Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, *396*(6712), 643–649. https://doi.org/10.1038/25292

Leonardsson, G., Steel, J. H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., So, P.-W., Medina-Gomez, G., Vidal-Puig, A., White, R., & Parker, M. G. (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(22), 8437–8442. https://doi.org/10.1073/pnas.0401013101

Li, C., Xu, M. M., Wang, K., Adler, A. J., Vella, A. T., & Zhou, B. (2018). Macrophage polarization and meta-inflammation. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *191*, 29–44. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.004

Li, D., Tang, H., Fan, J., Yan, D., Zhou, C., Li, S., Wang, X., & Peng, Z. (2010). Expression level of Bmi-1 oncoprotein is associated with progression and prognosis in colon cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *136*(7), 997–1006. https://doi.org/10.1007/s00432-009-0745-7

Li, N., Nakauka-Ddamba, A., Tobias, J., Jensen, S. T., & Lengner, C. J. (2016). Mouse Label-Retaining Cells Are Molecularly and Functionally Distinct From Reserve Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology*, *151*(2), 298-310.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.049

Li, N., Yousefi, M., Nakauka-Ddamba, A., Jain, R., Tobias, J., Epstein, J. A., Jensen, S. T., & Lengner, C. J. (2014). Single-Cell Analysis of Proxy Reporter Allele-Marked Epithelial Cells Establishes Intestinal Stem Cell Hierarchy. *Stem Cell Reports*, *3*(5), 876–891. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.09.011

Li, S., Tian, J., Zhang, H., Zhou, S., Wang, X., Zhang, L., Yang, J., Zhang, Z., & Ji, Z. (2018). Down-regulating IL-6/GP130 targets improved the anti-tumor effects of 5-fluorouracil in colon cancer. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, *23*(5–6), 356–374. https://doi.org/10.1007/s10495-018-1460-0

Li, T., Fu, J., Zeng, Z., Cohen, D., Li, J., Chen, Q., Li, B., & Liu, X. S. (2020). TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Research*, *48*(W1), W509–W514. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa407

Li, X., Madison, B. B., Zacharias, W., Kolterud, Å., States, D., & Gumucio, D. L. (2007). Deconvoluting the intestine: Molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. *Physiological Genomics*, *29*(3), 290–301. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00269.2006

Lieberkühn, J. N. (1745). *Dissertatio anatomico-physiologica de fabrica et actione villorum intestinorum tenuium hominis*. apud Conrad et. Georg. Jac. Wishof.

Liu, J., Viswanadhapalli, S., Garcia, L., Zhou, M., Nair, B. C., Kost, E., Rao Tekmal, R., Li, R., Rao, M. K., Curiel, T., Vadlamudi, R. K., & Sareddy, G. R. (2017). Therapeutic utility of natural estrogen receptor beta agonists on ovarian cancer. *Oncotarget*, *8*(30), 50002–50014. https://doi.org/10.18632/oncotarget.18442

Liu, P.-S., Lin, Y.-W., Lee, B., McCrady-Spitzer, S. K., Levine, J. A., & Wei, L.-N. (2014). Reducing RIP140 Expression in Macrophage Alters ATM Infiltration, Facilitates White Adipose Tissue Browning, and Prevents High-Fat Diet–Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, *63*(12), 4021–4031. https://doi.org/10.2337/db14-0619

Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, *3*(5), 330–338. https://doi.org/10.1038/nrc1074

Lopez-Garcia, C., Klein, A. M., Simons, B. D., & Winton, D. J. (2010). Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6005), 822–825. https://doi.org/10.1126/science.1196236

Luo, K. (2017). Signaling Cross Talk between TGF-β/Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(1), a022137. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022137

Luo, Q., Chen, D., Fan, X., Fu, X., Ma, T., & Chen, D. (2020). KRAS and PIK3CA bi-mutations predict a poor prognosis in colorectal cancer patients: A single-site report. *Translational Oncology*, *13*(12), 100874. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100874

Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *1*(4), 533–557. https://doi.org/10.1002/wdev.35

Madak-Erdogan, Z., Charn, T.-H., Jiang, Y., Liu, E. T., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (2013). Integrative genomics of gene and metabolic regulation by estrogen receptors α and β, and their coregulators. *Molecular Systems Biology*, *9*, 676. https://doi.org/10.1038/msb.2013.28

Madison, B. B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X. T., & Gumucio, D. L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development*, *132*(2), 279–289. https://doi.org/10.1242/dev.01576

Malovannaya, A., Lanz, R. B., Jung, S. Y., Bulynko, Y., Le, N. T., Chan, D. W., Ding, C., Shi, Y., Yucer, N., Krenciute, G., Kim, B.-J., Li, C., Chen, R., Li, W., Wang, Y., O'Malley, B. W., & Qin, J. (2011). Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell*, *145*(5), 787–799. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.006

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. Ng., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, *133*(4), 704–715. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027

Markowitz, S. D. (2009, October 9). *Aspirin and Colon Cancer—Targeting Prevention?* (world) [Editorial]. Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1056/NEJMe078044; Massachusetts Medical Society. https://doi.org/10.1056/NEJMe078044

Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2010, January 28). *Molecular Basis of Colorectal Cancer* (world) [Review-article]. Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1056/NEJMra0804588; Massachusetts Medical Society. https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Et, A. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, *268*(5215), 1336–1338. https://doi.org/10.1126/science.7761852

Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A. J., Canamero, M., Bujanda, L., Schedl, A., Cheah, K. S. E., Skotheim, R. I., Lothe, R. A., López de Munain, A., Briscoe, J., Serrano, M., & Lovell-Badge, R. (2012a). Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Research*, *72*(5), 1301–1315. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3660

Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A. J., Canamero, M., Bujanda, L., Schedl, A., Cheah, K. S. E., Skotheim, R. I., Lothe, R. A., López de Munain, A., Briscoe, J., Serrano, M., & Lovell-Badge, R. (2012b). Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Research*, *72*(5), 1301–1315. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3660

Maunoury, R., Robine, S., Pringault, E., Léonard, N., Gaillard, J. A., & Louvard, D. (1992). Developmental regulation of villin gene expression in the epithelial cell lineages of mouse digestive and urogenital tracts. *Development (Cambridge, England)*, *115*(3), 717–728.

Maynard, M. A., Ferretti, R., Hilgendorf, K. I., Perret, C., Whyte, P., & Lees, J. A. (2014). Bmi1 is required for tumorigenesis in a mouse model of intestinal cancer. *Oncogene*, *33*(28), 3742–3747. https://doi.org/10.1038/onc.2013.333

McCarthy, N., Kraiczy, J., & Shivdasani, R. A. (2020). Cellular and molecular architecture of the intestinal stem cell niche. *Nature Cell Biology*, *22*(9), 1033–1041. https://doi.org/10.1038/s41556-020-0567-z

McCarthy, N., Manieri, E., Storm, E. E., Saadatpour, A., Luoma, A. M., Kapoor, V. N., Madha, S., Gaynor, L. T., Cox, C., Keerthivasan, S., Wucherpfennig, K., Yuan, G.-C., de Sauvage, F. J., Turley, S. J., & Shivdasani, R. A. (2020). Distinct Mesenchymal Cell Populations Generate the Essential Intestinal BMP Signaling Gradient. *Cell Stem Cell*, *26*(3), 391-402.e5. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.008

McLellan, L. I., & Wolf, C. R. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resistance Updates*, *2*(3), 153–164. https://doi.org/10.1054/drup.1999.0083

Meidhof, S., Brabletz, S., Lehmann, W., Preca, B.-T., Mock, K., Ruh, M., Schüler, J., Berthold, M., Weber, A., Burk, U., Lübbert, M., Puhr, M., Culig, Z., Wellner, U., Keck, T., Bronsert, P., Küsters, S., Hopt, U. T., Stemmler, M. P., & Brabletz, T. (2015). ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Molecular Medicine*, *7*(6), 831–847. https://doi.org/10.15252/emmm.201404396

Meijer, C., Mulder, N. H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W. J., Meersma, G. J., & de Vries, E. G. (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Research*, *52*(24), 6885–6889.

Meran, L., Baulies, A., & Li, V. S. W. (2017). Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem Cells International*, *2017*, 7970385. https://doi.org/10.1155/2017/7970385

Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *16*(3), 251–263. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.009

Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., & Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*, *11*, 287–299. https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604

Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. A., Farilla, L., Kranendonk, M. E. G., Henderson, D. E., Baffour-Awuah, N. Y., Ambruzs, D. M., Fogli, L. K., Algra, S., & Breault, D. T. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(1), 179–184. https://doi.org/10.1073/pnas.1013004108

Morgan, C. A., Parajuli, B., Buchman, C. D., Dria, K., & Hurley, T. D. (2015). N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) as a substrate and mechanism-based inhibitor for human ALDH isoenzymes. *Chemico-Biological Interactions*, *234*, 18–28. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.008

Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997). Activation of β-Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β-Catenin or APC. *Science*, *275*(5307), 1787–1790. https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1787

Mostaqul Huq, M. D., Gupta, P., Tsai, N.-P., White, R., Parker, M. G., & Wei, L.-N. (2006). Suppression of receptor interacting protein 140 repressive activity by protein arginine methylation. *The EMBO Journal*, *25*(21), 5094–5104. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601389

Muñoz, J., Stange, D. E., Schepers, A. G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K. S., Koster, J., Radulescu, S., Myant, K., Versteeg, R., Sansom, O. J., van Es, J. H., Barker, N., van Oudenaarden, A., Mohammed, S., Heck, A. J. R., & Clevers, H. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: Robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *The EMBO Journal*, *31*(14), 3079–3091. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.166

Nakanishi, Y., Seno, H., Fukuoka, A., Ueo, T., Yamaga, Y., Maruno, T., Nakanishi, N., Kanda, K., Komekado, H., Kawada, M., Isomura, A., Kawada, K., Sakai, Y., Yanagita, M., Kageyama, R., Kawaguchi, Y., Taketo, M. M., Yonehara, S., & Chiba, T. (2013). Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nature Genetics*, *45*(1), 98–103. https://doi.org/10.1038/ng.2481

Nautiyal, J. (2017). Transcriptional coregulator RIP140: An essential regulator of physiology. *Journal of Molecular Endocrinology*, *58*(3), R147–R158. https://doi.org/10.1530/JME-16-0156

Nautiyal, J., Christian, M., & Parker, M. G. (2013). Distinct functions for RIP140 in development, inflammation, and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *24*(9), 451–459. https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.001

Nautiyal, J., Steel, J. H., Mane, M. R., Oduwole, O., Poliandri, A., Alexi, X., Wood, N., Poutanen, M., Zwart, W., Stingl, J., & Parker, M. G. (2013). The transcriptional co-factor RIP140 regulates mammary gland development by promoting the generation of key mitogenic signals. *Development*, *140*(5), 1079–1089. https://doi.org/10.1242/dev.085720

Nautiyal, J., Steel, J. H., Rosell, M. M., Nikolopoulou, E., Lee, K., DeMayo, F. J., White, R., Richards, J. S., & Parker, M. G. (2010). The Nuclear Receptor Cofactor Receptor-Interacting Protein 140 Is a Positive Regulator of Amphiregulin Expression and Cumulus Cell-Oocyte Complex Expansion

in the Mouse Ovary. *Endocrinology*, *151*(6), 2923–2932. https://doi.org/10.1210/en.2010-0081

Newmark, H. L., Yang, K., Lipkin, M., Kopelovich, L., Liu, Y., Fan, K., & Shinozaki, H. (2001). A Western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C57Bl/6 mice. *Carcinogenesis*, *22*(11), 1871–1875. https://doi.org/10.1093/carcin/22.11.1871

Nishida, Y., Maeda, A., Kim, M. J., Cao, L., Kubota, Y., Ishizawa, J., AlRawi, A., Kato, Y., Iwama, A., Fujisawa, M., Matsue, K., Weetall, M., Dumble, M., Andreeff, M., Davis, T. W., Branstrom, A., Kimura, S., & Kojima, K. (2017). The novel BMI-1 inhibitor PTC596 downregulates MCL-1 and induces p53-independent mitochondrial apoptosis in acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood Cancer Journal*, *7*(2), e527. https://doi.org/10.1038/bcj.2017.8

Noah, T. K., Donahue, B., & Shroyer, N. F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Experimental Cell Research*, *317*(19), 2702–2710. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.006

Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23–28. https://doi.org/10.1126/science.959840

O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, *445*(7123), 106–110. https://doi.org/10.1038/nature05372

O'Connor, E. S., Greenblatt, D. Y., LoConte, N. K., Gangnon, R. E., Liou, J.-I., Heise, C. P., & Smith, M. A. (2011). Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer With Poor Prognostic Features. *Journal of Clinical Oncology*. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.3426

Pagel, R., Bär, F., Schröder, T., Sünderhauf, A., Künstner, A., Ibrahim, S. M., Autenrieth, S. E., Kalies, K., König, P., Tsang, A. H., Bettenworth, D., Divanovic, S., Lehnert, H., Fellermann, K., Oster, H., Derer, S., & Sina, C. (2017). Circadian rhythm disruption impairs tissue homeostasis and exacerbates chronic inflammation in the intestine. *FASEB Journal: Official Publication of the*

Federation of American Societies for Experimental Biology, *31*(11), 4707–4719. https://doi.org/10.1096/fj.201700141RR

Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T. T., Berger, M. D., Nagtegaal, I. D., Vink-Börger, E., Hartmann, A., Geppert, C., Kolwelter, J., Merkel, S., Grützmann, R., Van den Eynde, M., Jouret-Mourin, A., … Galon, J. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: A prognostic and accuracy study. *The Lancet*, *391*(10135), 2128–2139. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30789-X

Palassin, P., Lapierre, M., Pyrdziak, S., Wagner, A., Stehle, R., Corsini, C., Duffour, J., Bonnet, S., Boulahtouf, A., Rodriguez, C., Ho-Pun-Cheung, A., Lopez-Crapez, E., Boissière-Michot, F., Bibeau, F., Thezenas, S., Elarouci, N., Selves, J., Hoffmann, J.-S., Roepman, P., … Castet-Nicolas, A. (2021). A Truncated NRIP1 Mutant Amplifies Microsatellite Instability of Colorectal Cancer by Regulating MSH2/MSH6 Expression, and Is a Prognostic Marker of Stage III Tumors. *Cancers*, *13*(17), 4449. https://doi.org/10.3390/cancers13174449

Pan, D. (2010). The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Developmental Cell*, *19*(4), 491–505. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011

Panczyk, M. (2014). Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(29), 9775–9827. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9775

Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, *29*(3), 212–226. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001

Pearson, C., Uhlig, H. H., & Powrie, F. (2012). Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends in Immunology*, *33*(6), 289–296. https://doi.org/10.1016/j.it.2012.04.004

Peitzsch, C., Kurth, I., Kunz-Schughart, L., Baumann, M., & Dubrovska, A. (2013). Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiotherapy and Oncology: Journal*

of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, *108*(3), 378–387. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.003

Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K. H., Kopan, R., Lewis, J., & Radtke, F. (2011). Dll1- and Dll4-Mediated Notch Signaling Are Required for Homeostasis of Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology*, *140*(4), 1230-1240.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.005

Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *98*(4), 2133–2223. https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017

Phan, T. G., & Croucher, P. I. (2020). The dormant cancer cell life cycle. *Nature Reviews Cancer*, *20*(7), 398–411. https://doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0

Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y.-G., Lee, S.-H., Jun, N., Kim, K. S., Lee, Y. K., & Kwon, H. Y. (2018). Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International*, *2018*, e5416923. https://doi.org/10.1155/2018/5416923

Phillips, S. M., Banerjea, A., Feakins, R., Li, S. R., Bustin, S. A., & Dorudi, S. (2004). Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *British Journal of Surgery*, *91*(4), 469–475. https://doi.org/10.1002/bjs.4472

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., & Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & Development*, *17*(14), 1709–1713. https://doi.org/10.1101/gad.267103

Ponder, B. a. J., Schmidt, G. H., Wilkinson, M. M., Wood, M. J., Monk, M., & Reid, A. (1985). Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells. *Nature*, *313*(6004), 689–691. https://doi.org/10.1038/313689a0

Potten, C. S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature*, *269*(5628), 518–521.

Powelka, A. M., Seth, A., Virbasius, J. V., Kiskinis, E., Nicoloro, S. M., Guilherme, A., Tang, X., Straubhaar, J., Cherniack, A. D., Parker, M. G., & Czech, M. P. (2006). Suppression of oxidative

metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(1), 125–136. https://doi.org/10.1172/JCI26040

Powell, A. E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E. J., Means, A. L., Washington, M. K., Higginbotham, J. N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S. E., Guo, Y., Shyr, Y., Aronow, B. J., Haigis, K. M., Franklin, J. L., & Coffey, R. J. (2012). The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell*, *149*(1), 146–158. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.042

Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., Li, B., Han, J.-D. J., & Chen, Y.-G. (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5 + stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nature Communications*, *8*(1), 13824. https://doi.org/10.1038/ncomms13824

Qiu, J. M., Roberts, S. A., & Potten, C. S. (1994). Cell migration in the small and large bowel shows a strong circadian rhythm. *Epithelial Cell Biology*, *3*(4), 137–148.

Qiu, L.-X., Tang, Q.-Y., Bai, J.-L., Qian, X.-P., Li, R.-T., Liu, B.-R., & Zheng, M.-H. (2008). Predictive value of thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer patients receiving fluoropyrimidine-based chemotherapy: Evidence from 24 studies. *International Journal of Cancer*, *123*(10), 2384–2389. https://doi.org/10.1002/ijc.23822

QUASAR Collaborative Group. (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: A randomised study. *The Lancet*, *370*(9604), 2020–2029. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61866-2

Raha, D., Wilson, T. R., Peng, J., Peterson, D., Yue, P., Evangelista, M., Wilson, C., Merchant, M., & Settleman, J. (2014). The Cancer Stem Cell Marker Aldehyde Dehydrogenase Is Required to Maintain a Drug-Tolerant Tumor Cell Subpopulation. *Cancer Research*, *74*(13), 3579–3590. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3456

Ramalho-Santos, M., Melton, D. A., & McMahon, A. P. (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, *127*(12), 2763–2772. https://doi.org/10.1242/dev.127.12.2763

Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., & Vilo, J. (2019). g:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W191–W198. https://doi.org/10.1093/nar/gkz369

Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. *Przeglad Gastroenterologiczny*, *14*(1), 26–38. https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001

Rex, D. K., Boland, C. R., Dominitz, J. A., Giardiello, F. M., Johnson, D. A., Kaltenbach, T., Levin, T. R., Lieberman, D., & Robertson, D. J. (2017). Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *The American Journal of Gastroenterology*, *112*(7), 1016–1030. https://doi.org/10.1038/ajg.2017.174

Riccio, O., van Gijn, M. E., Bezdek, A. C., Pellegrinet, L., van Es, J. H., Zimber-Strobl, U., Strobl, L. J., Honjo, T., Clevers, H., & Radtke, F. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Reports*, *9*(4), 377–383. https://doi.org/10.1038/embor.2008.7

Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(5), 986–1000. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, *445*(7123), 111–115. https://doi.org/10.1038/nature05384

Richmond, C. A., Shah, M. S., Deary, L. T., Trotier, D. C., Thomas, H., Ambruzs, D. M., Jiang, L., Whiles, B. B., Rickner, H. D., Montgomery, R. K., Tovaglieri, A., Carlone, D. L., & Breault, D. T. (2015).

Dormant Intestinal Stem Cells Are Regulated by PTEN and Nutritional Status. *Cell Reports*, *13*(11), 2403–2411. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.035

Roche, K. C., Gracz, A. D., Liu, X. F., Newton, V., Akiyama, H., & Magness, S. T. (2015). SOX9 Maintains Reserve Stem Cells and Preserves Radioresistance in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology*, *149*(6), 1553-1563.e10. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.004

Rodriguez-Antona, C., & Ingelman-Sundberg, M. (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, *25*(11), 1679–1691. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209377

Roh, M. S., Colangelo, L. H., O'Connell, M. J., Yothers, G., Deutsch, M., Allegra, C. J., Kahlenberg, M. S., Baez-Diaz, L., Ursiny, C. S., Petrelli, N. J., & Wolmark, N. (2009). Preoperative Multimodality Therapy Improves Disease-Free Survival in Patients With Carcinoma of the Rectum: NSABP R-03. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(31), 5124–5130. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.0467

Rosell, M., Nevedomskaya, E., Stelloo, S., Nautiyal, J., Poliandri, A., Steel, J. H., Wessels, L. F. A., Carroll, J. S., Parker, M. G., & Zwart, W. (2014). Complex formation and function of estrogen receptor α in transcription requires RIP140. *Cancer Research*, *74*(19), 5469–5479. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3429

Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., Kulkarni, S., Sim, S., Qian, D., Beachy, P. A., Pasricha, P. J., Quake, S. R., & Clarke, M. F. (2012). Identification of a cKit+ Colonic Crypt Base Secretory Cell That Supports Lgr5+ Stem Cells in Mice. *Gastroenterology*, *142*(5), 1195-1205.e6. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.006

Ruddy, S. C., Lau, R., Cabrita, M. A., McGregor, C., McKay, B. C., Murphy, L. C., Wright, J. S., Durst, T., & Pratt, M. A. C. (2014). Preferential estrogen receptor β ligands reduce Bcl-2 expression in hormone-resistant breast cancer cells to increase autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(7), 1882–1893. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-1066

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, *4*(1), 177–197. https://doi.org/10.1002/cphy.c130024

Rytinki, M. M., & Palvimo, J. J. (2008). SUMOylation modulates the transcription repressor function of RIP140. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(17), 11586–11595. https://doi.org/10.1074/jbc.M709359200

Saely, C. H., Geiger, K., & Drexel, H. (2012). Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology*, *58*(1), 15–23. https://doi.org/10.1159/000321319

Sahin, I. H., Akce, M., Alese, O., Shaib, W., Lesinski, G. B., El-Rayes, B., & Wu, C. (2019). Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms. *British Journal of Cancer*, *121*(10), 809–818. https://doi.org/10.1038/s41416-019-0599-y

Salonga, D., Danenberg, K. D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D. D., Lenz, H.-J., Leichman, C. G., Leichman, L., Diasio, R. B., & Danenberg, P. V. (2000). Colorectal Tumors Responding to 5-Fluorouracil Have Low Gene Expression Levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, and Thymidine Phosphorylase. *Clinical Cancer Research*, *6*(4), 1322–1327.

Salzman, N. H., & Bevins, C. L. (2013). Dysbiosis—A consequence of Paneth cell dysfunction. *Seminars in Immunology*, *25*(5), 334–341. https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.006

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*, *304*(5670), 554–554. https://doi.org/10.1126/science.1096502

Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1822*(12), 1896–1912. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013

Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*, *40*(7), 915–920. https://doi.org/10.1038/ng.165

Sargent, D. J., Shi, Q., Yothers, G., Tejpar, S., Bertagnolli, M. M., Thibodeau, S. N., Andre, T., Labianca, R., Gallinger, S., Hamilton, S. R., Monges, G., Pogue-Geile, K. L., Paik, S., Klingbiel, D., Roth, A., Pavey, E. S., Kim, G. P., Sinicrope, F. A., & ACCENT Collaborative Group. (2014). Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. *Journal of Clinical Oncology*, *32*(15_suppl), 3507–3507. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.3507

Sasaki, N., Sachs, N., Wiebrands, K., Ellenbroek, S. I. J., Fumagalli, A., Lyubimova, A., Begthel, H., Born, M. van den, Es, J. H. van, Karthaus, W. R., Li, V. S. W., López-Iglesias, C., Peters, P. J., Rheenen, J. van, Oudenaarden, A. van, & Clevers, H. (2016). Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(37), E5399–E5407. https://doi.org/10.1073/pnas.1607327113

Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science*, *340*(6137), 1190–1194. https://doi.org/10.1126/science.1234852

Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*(7330), 415–418. https://doi.org/10.1038/nature09637

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262–265. https://doi.org/10.1038/nature07935

Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W., Rödel, C., Wittekind, C., Fietkau, R., Martus, P., Tschmelitsch, J., Hager, E., Hess, C. F., Karstens, J.-H., Liersch, T., Schmidberger, H., & Raab, R. (2004). Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, *351*(17), 1731–1740. https://doi.org/10.1056/NEJMoa040694

Schepers, A. G., Snippert, H. J., Stange, D. E., Born, M. van den, Es, J. H. van, Wetering, M. van de, & Clevers, H. (2012). Lineage Tracing Reveals Lgr5+ Stem Cell Activity in Mouse Intestinal Adenomas. *Science*, *337*(6095), 730–735. https://doi.org/10.1126/science.1224676

Schmitt, M., Schewe, M., Sacchetti, A., Feijtel, D., van de Geer, W. S., Teeuwssen, M., Sleddens, H. F., Joosten, R., van Royen, M. E., van de Werken, H. J. G., van Es, J., Clevers, H., & Fodde, R. (2018). Paneth Cells Respond to Inflammation and Contribute to Tissue Regeneration by Acquiring Stem-like Features through SCF/c-Kit Signaling. *Cell Reports*, *24*(9), 2312-2328.e7. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.085

Schmoll, H. J., Cutsem, E. V., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., Nordlinger, B., Velde, C. J. van de, Balmana, J., Regula, J., Nagtegaal, I. D., Beets-Tan, R. G., Arnold, D., Ciardiello, F., Hoff, P., Kerr, D., Köhne, C. H., Labianca, R., Price, T., … Cervantes, A. (2012). ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*, *23*(10), 2479–2516. https://doi.org/10.1093/annonc/mds236

Schneider, N. I., & Langner, C. (2014). Prognostic stratification of colorectal cancer patients: Current perspectives. *Cancer Management and Research*, *6*, 291–300. https://doi.org/10.2147/CMAR.S38827

Schröder, N., & Gossler, A. (2002). Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene Expression Patterns*, *2*(3), 247–250. https://doi.org/10.1016/S1567-133X(02)00060-1

Seth, A., Steel, J. H., Nichol, D., Pocock, V., Kumaran, M. K., Fritah, A., Mobberley, M., Ryder, T. A., Rowlerson, A., Scott, J., Poutanen, M., White, R., & Parker, M. (2007). The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metabolism*, *6*(3), 236–245. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.004

Shia, J., Schultz, N., Kuk, D., Vakiani, E., Middha, S., Segal, N. H., Hechtman, J. F., Berger, M. F., Stadler, Z. K., Weiser, M. R., Wolchok, J. D., Boland, C. R., Gönen, M., & Klimstra, D. S. (2017).

Morphological characterization of colorectal cancers in The Cancer Genome Atlas reveals distinct morphology–molecular associations: Clinical and biological implications. *Modern Pathology*, *30*(4), 599–609. https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.198

Shiokawa, D., Sakai, H., Ohata, H., Miyazaki, T., Kanda, Y., Sekine, S., Narushima, D., Hosokawa, M., Kato, M., Suzuki, Y., Takeyama, H., Kambara, H., Nakagama, H., & Okamoto, K. (2020). Slow-Cycling Cancer Stem Cells Regulate Progression and Chemoresistance in Colon Cancer. *Cancer Research*, *80*(20), 4451–4464. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0378

Shirota, Y., Stoehlmacher, J., Brabender, J., Xiong, Y. P., Uetake, H., Danenberg, K. D., Groshen, S., Tsao-Wei, D. D., Danenberg, P. V., & Lenz, H. J. (2001). ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *19*(23), 4298–4304. https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.23.4298

Shoshkes-Carmel, M., Wang, Y. J., Wangensteen, K. J., Tóth, B., Kondo, A., Massasa, E. E., Itzkovitz, S., & Kaestner, K. H. (2018). Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature*, *557*(7704), 242–246. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0084-4

Siebel, C., & Lendahl, U. (2017). Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiological Reviews*, *97*(4), 1235–1294. https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2017

Silverthorn, D. U., Johnson, B. R., Ober, W. C., Ober, C. E., Impagliazzo, A., & Silverthorn, A. C. (2019). *Human physiology: An integrated approach* (Eighth edition). Pearson Education, Inc.

Sinicrope, F. A. (2018). Lynch Syndrome–Associated Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMcp1714533

Snippert, H. J., van der Flier, L. G., Sato, T., van Es, J. H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A. M., van Rheenen, J., Simons, B. D., & Clevers, H. (2010). Intestinal Crypt

Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell*, *143*(1), 134–144. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.016

Sottoriva, A., Kang, H., Ma, Z., Graham, T. A., Salomon, M. P., Zhao, J., Marjoram, P., Siegmund, K., Press, M. F., Shibata, D., & Curtis, C. (2015). A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nature Genetics*, *47*(3), 209–216. https://doi.org/10.1038/ng.3214

Sottoriva, A., Verhoeff, J. J. C., Borovski, T., McWeeney, S. K., Naumov, L., Medema, J. P., Sloot, P. M. A., & Vermeulen, L. (2010). Cancer Stem Cell Tumor Model Reveals Invasive Morphology and Increased Phenotypical Heterogeneity. *Cancer Research*, *70*(1), 46–56. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3663

Steinhart, Z., & Angers, S. (2018). Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development (Cambridge, England)*, *145*(11), dev146589. https://doi.org/10.1242/dev.146589

Stracker, T., Roig, I., Knobel, P., & Marjanovic, M. (2013). The ATM signaling network in development and disease. *Frontiers in Genetics*, *4*, 37. https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00037

Suzuki, A., Sekiya, S., Gunshima, E., Fujii, S., & Taniguchi, H. (2010). EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Laboratory Investigation*, *90*(10), 1425–1436. https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.150

Tabernero, J., Yoshino, T., Cohn, A. L., Obermannova, R., Bodoky, G., Garcia-Carbonero, R., Ciuleanu, T.-E., Portnoy, D. C., Van Cutsem, E., Grothey, A., Prausová, J., Garcia-Alfonso, P., Yamazaki, K., Clingan, P. R., Lonardi, S., Kim, T. W., Simms, L., Chang, S.-C., Nasroulah, F., & RAISE Study Investigators. (2015). Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): A randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, *16*(5), 499–508. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70127-0

Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H., & Niitsu, Y. (1998). Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *The New England Journal of Medicine*, *339*(18), 1277–1284. https://doi.org/10.1056/NEJM199810293391803

Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S., & Niitsu, Y. (2001). Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, *121*(3), 599–611. https://doi.org/10.1053/gast.2001.27203

Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6061), 1420–1424. https://doi.org/10.1126/science.1213214

Talbot, J., & Maves, L. (2016). Skeletal muscle fiber type: Using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *5*(4), 518–534. https://doi.org/10.1002/wdev.230

Tetteh, P. W., Basak, O., Farin, H. F., Wiebrands, K., Kretzschmar, K., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., de Sauvage, F., van Es, J. H., van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2016). Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Cell Stem Cell*, *18*(2), 203–213. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.001

Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F., Cavailles, V., & Chalbos, D. (2003). Receptor-interacting protein 140 binds c-Jun and inhibits estradiol-induced activator protein-1 activity by reversing glucocorticoid receptor-interacting protein 1 effect. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *17*(2), 287–299. https://doi.org/10.1210/me.2002-0324

Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, *11*(1), 164. https://doi.org/10.3390/nu11010164

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, *478*(7368), 255–259. https://doi.org/10.1038/nature10408

Triki, M., Ben Ayed-Guerfali, D., Saguem, I., Charfi, S., Ayedi, L., Sellami-Boudawara, T., Cavailles, V., & Mokdad-Gargouri, R. (2017). RIP140 and LCoR expression in gastrointestinal cancers. *Oncotarget*, *8*(67), 111161–111175. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22686

Tsurutani, J., Nitta, T., Hirashima, T., Komiya, T., Uejima, H., Tada, H., Syunichi, N., Tohda, A., Fukuoka, M., & Nakagawa, K. (2002). Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Lung Cancer*, *35*(3), 299–304. https://doi.org/10.1016/S0169-5002(01)00425-1

Tullet, J. M. A., Pocock, V., Steel, J. H., White, R., Milligan, S., & Parker, M. G. (2005). Multiple Signaling Defects in the Absence of RIP140 Impair Both Cumulus Expansion and Follicle Rupture. *Endocrinology*, *146*(9), 4127–4137. https://doi.org/10.1210/en.2005-0348

Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., Chapelle, A. de la, Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, S. R., Hiatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H. T., Peltomaki, P., Ramsey, S. D., Rodriguez-Bigas, M. A., Vasen, H. F. A., … Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *96*(4), 261–268. https://doi.org/10.1093/jnci/djh034

Uramoto, H., Iwata, T., Onitsuka, T., Shimokawa, H., Hanagiri, T., & Oyama, T. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Research*, *30*(7), 2513–2517.

Valentini, V., van Stiphout, R. G. P. M., Lammering, G., Gambacorta, M. A., Barba, M. C., Bebenek, M., Bonnetain, F., Bosset, J.-F., Bujko, K., Cionini, L., Gerard, J.-P., Rödel, C., Sainato, A., Sauer, R., Minsky, B. D., Collette, L., & Lambin, P. (2011). Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the

basis of European randomized clinical trials. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(23), 3163–3172. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.1595

Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., Schlichting, M., Zubel, A., Celik, I., Rougier, P., & Ciardiello, F. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(15), 2011–2019. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091

Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausová, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G. A., Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., & Allegra, C. (2012). Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *30*(28), 3499–3506. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.8201

van den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Hardwick, J. C. H., Schepman, B. L., Offerhaus, G. J., Keller, J. J., Nielsen, C., Gaffield, W., van Deventer, S. J. H., Roberts, D. J., & Peppelenbosch, M. P. (2004). Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nature Genetics*, *36*(3), 277–282. https://doi.org/10.1038/ng1304

Van der Flier, L. G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M. E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G., & Clevers, H. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, *132*(2), 628–632. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.039

van Es, J. H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M. E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M. M., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling induces

maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nature Cell Biology*, *7*(4), 381–386. https://doi.org/10.1038/ncb1240

van Es, J. H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A. N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., Martens, A. C. M., Barker, N., van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2012). Dll1 + secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nature Cell Biology*, *14*(10), 1099–1104. https://doi.org/10.1038/ncb2581

van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., & Clevers, H. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, *435*(7044), 959–963. https://doi.org/10.1038/nature03659

VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., Tran, I. T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, Å., Grosse, A. S., Gumucio, D. L., Ernst, S. A., Tsai, Y.-H., Dempsey, P. J., & Samuelson, L. C. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development (Cambridge, England)*, *139*(3), 488–497. https://doi.org/10.1242/dev.070763

Vanuytsel, T., Senger, S., Fasano, A., & Shea-Donohue, T. (2013). Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1830*(2), 2410–2426. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.006

Vargas, A. J., & Thompson, P. A. (2012). Diet and Nutrient Factors in Colorectal Cancer Risk. *Nutrition in Clinical Practice*, *27*(5), 613–623. https://doi.org/10.1177/0884533612454885

Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., Tuynman, J. B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., Sprick, M. R., Kemper, K., Richel, D. J., Stassi, G., & Medema, J. P. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology*, *12*(5), 468–476. https://doi.org/10.1038/ncb2048

Vermeulen, L., & Snippert, H. J. (2014). Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nature Reviews. Cancer*, *14*(7), 468–480. https://doi.org/10.1038/nrc3744

Vermeulen, L., Todaro, M., Mello, F. de S., Sprick, M. R., Kemper, K., Alea, M. P., Richel, D. J., Stassi, G., & Medema, J. P. (2008). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(36), 13427–13432. https://doi.org/10.1073/pnas.0805706105

Vilar, E., & Gruber, S. B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer—The stable evidence. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *7*(3), 153–162. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.237

Vishnubalaji, R., Manikandan, M., Fahad, M., Hamam, R., Alfayez, M., Kassem, M., Aldahmash, A., & Alajez, N. M. (2018). Molecular profiling of ALDH1+ colorectal cancer stem cells reveals preferential activation of MAPK, FAK, and oxidative stress pro-survival signalling pathways. *Oncotarget*, *9*(17), 13551–13564. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24420

Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, *469*(7330), 314–322. https://doi.org/10.1038/nature09781

Visvader, J. E., & Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: Current status and perspectives. *Genes & Development*, *28*(11), 1143–1158. https://doi.org/10.1101/gad.242511.114

Vo, N., Fjeld, C., & Goodman, R. H. (2001). Acetylation of nuclear hormone receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(18), 6181–6188. https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6181-6188.2001

Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, *137*(3), 413–431. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037

Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, *9*(7), 489–499. https://doi.org/10.1038/nrc2645

Wang, C., Wang, Y., Hughes, K. S., Parmigiani, G., & Braun, D. (2020). Penetrance of Colorectal Cancer Among Mismatch Repair Gene Mutation Carriers: A Meta-Analysis. *JNCI Cancer Spectrum*, *4*(5). https://doi.org/10.1093/jncics/pkaa027

Watanabe, H. (1978). Experimentally induced intestinal metaplasia in Wistar rats by X-ray irradiation. *Gastroenterology*, *75*(5), 796–799.

Weber, H. O., Samuel, T., Rauch, P., & Funk, J. O. (2002). Human p14ARF-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways. *Oncogene*, *21*(20), 3207–3212. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205429

Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, *9*(5), 52. https://doi.org/10.3390/cancers9050052

Wei, L.-N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., & Farooqui, M. (2000). Receptor-interacting Protein 140 Directly Recruits Histone Deacetylases for Gene Silencing*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(52), 40782–40787. https://doi.org/10.1074/jbc.M004821200

Weidenfeld, K., & Barkan, D. (2018). EMT and Stemness in Tumor Dormancy and Outgrowth: Are They Intertwined Processes? *Frontiers in Oncology*, *8*, 381. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00381

Weiser, M. R., & Garcia-Aguilar, J. (2019). Chapter 166—Basic Principles of the Operative Treatment of Colorectal Cancer. In C. J. Yeo (Ed.), *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)* (pp. 1981–1991). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00166-7

Westphalen, C. B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D. J., Nuber, A. H., Brandtner, A., Setlik, W., Remotti, H., Muley, A., Chen, X., May, R., Houchen, C. W., Fox, J. G., Gershon, M. D., Quante, M., & Wang, T. C. (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(3), 1283–1295. https://doi.org/10.1172/JCI73434

White, R., Leonardsson, G., Rosewell, I., Ann Jacobs, M., Milligan, S., & Parker, M. (2000). The nuclear receptor co-repressor nrip1 (RIP140) is essential for female fertility. *Nature Medicine*, *6*(12), 1368–1374. https://doi.org/10.1038/82183

Whitehall, V. L. J., Wynter, C. V. A., Walsh, M. D., Simms, L. A., Purdie, D., Pandeya, N., Young, J., Meltzer, S. J., Leggett, B. A., & Jass, J. R. (2002). Morphological and Molecular Heterogeneity within Nonmicrosatellite Instability-High Colorectal Cancer. *Cancer Research*, *62*(21), 6011–6014.

Wielenga, V. J. M., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., & Pals, S. T. (1999). Expression of CD44 in Apc and TcfMutant Mice Implies Regulation by the WNT Pathway. *The American Journal of Pathology*, *154*(2), 515–523. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65297-2

Winer, E., Gralow, J., Diller, L., Karlan, B., Loehrer, P., Pierce, L., Demetri, G., Ganz, P., Kramer, B., Kris, M., Markman, M., Mayer, R., Pfister, D., Raghavan, D., Ramsey, S., Reaman, G., Sandler, H., Sawaya, R., Schuchter, L., … American Society of Clinical Oncology. (2009). Clinical cancer advances 2008: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(5), 812–826. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.2134

Wong, S. C. C., Lo, E. S. F., Lee, K. C., Chan, J. K. C., & Hsiao, W. L. W. (2004). Prognostic and Diagnostic Significance of β-Catenin Nuclear Immunostaining in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, *10*(4), 1401–1408. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0157-03

Wong, V. W. Y., Stange, D. E., Page, M. E., Buczacki, S., Wabik, A., Itami, S., van de Wetering, M., Poulsom, R., Wright, N. A., Trotter, M. W. B., Watt, F. M., Winton, D. J., Clevers, H., & Jensen, K. B. (2012). Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nature Cell Biology*, *14*(4), 401–408. https://doi.org/10.1038/ncb2464

Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J., Shen, D., Boca, S. M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P. A., Kaminker, J. S., … Vogelstein, B. (2007). The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, *318*(5853), 1108–1113. https://doi.org/10.1126/science.1145720

Xia, K., Zhang, P., Hu, J., Hou, H., Xiong, M., Xiong, J., & Yan, N. (2018). Synergistic effect of receptor-interacting protein 140 and simvastatin on the inhibition of proliferation and survival of hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters*, *15*(4), 4344–4350. https://doi.org/10.3892/ol.2018.7831

Xie, M., Zhang, L., He, C., Xu, F., Liu, J., Hu, Z., Zhao, L., & Tian, Y. (2012). Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(5), 1501–1513. https://doi.org/10.1002/jcb.24019

Xu, Z., Zhou, Z., Zhang, J., Xuan, F., Fan, M., Zhou, D., Liuyang, Z., Ma, X., Hong, Y., Wang, Y., Sharma, S., Dong, Q., & Wang, G. (2021). Targeting BMI-1-mediated epithelial–mesenchymal transition to inhibit colorectal cancer liver metastasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *11*(5), 1274–1285. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.018

Xue, X., & Shah, Y. M. (2013). In vitro Organoid Culture of Primary Mouse Colon Tumors. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *75*, 50210. https://doi.org/10.3791/50210

Yan, K. S., Chia, L. A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S. C., Amieva, M. R., Sangiorgi, E., Capecchi, M. R., & Kuo, C. J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(2), 466–471. https://doi.org/10.1073/pnas.1118857109

Yan, K. S., Gevaert, O., Zheng, G. X. Y., Anchang, B., Probert, C. S., Larkin, K. A., Davies, P. S., Cheng, Z., Kaddis, J. S., Han, A., Roelf, K., Calderon, R. I., Cynn, E., Hu, X., Mandleywala, K., Wilhelmy, J., Grimes, S. M., Corney, D. C., Boutet, S. C., … Kuo, C. J. (2017). Intestinal Enteroendocrine

Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell Stem Cell*, *21*(1), 78-90.e6. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.014

Yan, K. S., Gevaert, O., Zheng, G. X. Y., Anchang, B., Probert, C. S., Larkin, K. A., Davies, P. S., Cheng, Z., Kaddis, J. S., Han, A., Roelf, K., Calderon, R. I., Cynn, E., Hu, X., Mandleywala, K., Wilhelmy, J., Grimes, S. M., Corney, D. C., Boutet, S. C., … Kuo, C. J. (2017). Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell Stem Cell*, *21*(1), 78-90.e6. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.014

Yan, K. S., Janda, C. Y., Chang, J., Zheng, G. X. Y., Larkin, K. A., Luca, V. C., Chia, L. A., Mah, A. T., Han, A., Terry, J. M., Ootani, A., Roelf, K., Lee, M., Yuan, J., Li, X., Bolen, C. R., Wilhelmy, J., Davies, P. S., Ueno, H., … Kuo, C. J. (2017). Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem-cell self-renewal. *Nature*, *545*(7653), 238–242. https://doi.org/10.1038/nature22313

Yang, K., Kurihara, N., Fan, K., Newmark, H., Rigas, B., Bancroft, L., Corner, G., Livote, E., Lesser, M., Edelmann, W., Velcich, A., Lipkin, M., & Augenlicht, L. (2008). Dietary induction of colonic tumors in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Research*, *68*(19), 7803–7810. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1209

Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, *5*(3), 412–424. https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412

Yilmaz, Ö. H., Katajisto, P., Lamming, D. W., Gültekin, Y., Bauer-Rowe, K. E., Sengupta, S., Birsoy, K., Dursun, A., Yilmaz, V. O., Selig, M., Nielsen, G. P., Mino-Kenudson, M., Zukerberg, L. R., Bhan, A. K., Deshpande, V., & Sabatini, D. M. (2012). MTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*, *486*(7404), 490–495. https://doi.org/10.1038/nature11163

Yothers, G., Sargent, D. J., Wolmark, N., Goldberg, R. M., O'Connell, M. J., Benedetti, J. K., Saltz, L. B., Dignam, J. J., Blackstock, A. W., & ACCENT Collaborative Group. (2011). Outcomes among

black patients with stage II and III colon cancer receiving chemotherapy: An analysis of ACCENT adjuvant trials. *Journal of the National Cancer Institute*, *103*(20), 1498–1506. https://doi.org/10.1093/jnci/djr310

Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., & He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, *16*(5), 284–287. https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118

Zenonos, K., & Kyprianou, K. (2013). RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, *5*(5), 97–101. https://doi.org/10.4251/wjgo.v5.i5.97

Zhang, B., Halder, S. K., Zhang, S., & Datta, P. K. (2009). Targeting transforming growth factor-β signaling in liver metastasis of colon cancer. *Cancer Letters*, *277*(1), 114–120. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.11.035

Zhang, D., Wang, Y., Dai, Y., Wang, J., Suo, T., Pan, H., Liu, H., Shen, S., & Liu, H. (2015). Downregulation of RIP140 in hepatocellular carcinoma promoted the growth and migration of the cancer cells. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *36*(3), 2077–2085. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2815-y

Zhang, S., Lovejoy, K. S., Shima, J. E., Lagpacan, L. L., Shu, Y., Lapuk, A., Chen, Y., Komori, T., Gray, J. W., Chen, X., Lippard, S. J., & Giacomini, K. M. (2006). Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity. *Cancer Research*, *66*(17), 8847–8857. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0769

Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, *12*(1), 9–18. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105

Zhang, Y., Dubé, P. E., Washington, M. K., Yan, F., & Polk, D. B. (2012). ErbB2 and ErbB3 regulate recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis by promoting mouse colon epithelial cell survival. *Laboratory Investigation*, *92*(3), 437–450. https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.192

Zhao, J., Li, W., Zhu, D., Yu, Q., Zhang, Z., Sun, M., Cai, S., & Zhang, W. (2014). Association of single nucleotide polymorphisms in MTHFR and ABCG2 with the different efficacy of first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, *31*(1), 802. https://doi.org/10.1007/s12032-013-0802-6

Zhao, L., & Vogt, P. K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, *27*(41), 5486–5496. https://doi.org/10.1038/onc.2008.244

Zhao, M., Zhao, H., Lin, L., Wang, Y., Chen, M., & Wu, B. (2020). Nuclear receptor co-repressor RIP140 regulates diurnal expression of cytochrome P450 2b10 in mouse liver. *Xenobiotica*, *50*(10), 1139–1148. https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1751342

Zheng, L., Wang, L., Ajani, J., & Xie, K. (2004). Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, *7*(2), 61–77. https://doi.org/10.1007/s10120-004-0277-4

Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., Dawson, D., Willis, J. E., Markowitz, S. D., Camargo, F. D., & Avruch, J. (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(49), E1312-1320. https://doi.org/10.1073/pnas.1110428108

Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., Lin, J., Tan, S., Tian, Y., Liao, Q., & Cao, D. (2017). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*, *9*(70), 33403–33415. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607

Zhu, L., Gibson, P., Currle, D. S., Tong, Y., Richardson, R. J., Bayazitov, I. T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D. W., & Gilbertson, R. J. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature*, *457*(7229), 603–607. https://doi.org/10.1038/nature07589

Zilliacus, J., Holter, E., Wakui, H., Tazawa, H., Treuter, E., & Gustafsson, J.-Å. (2001). Regulation of Glucocorticoid Receptor Activity by 14–3-3-Dependent Intracellular Relocalization of the Corepressor RIP140. *Molecular Endocrinology*, *15*(4), 501–511. https://doi.org/10.1210/mend.15.4.0624

Zschiedrich, I., Hardeland, U., Krones-Herzig, A., Berriel Diaz, M., Vegiopoulos, A., Müggenburg, J., Sombroek, D., Hofmann, T. G., Zawatzky, R., Yu, X., Gretz, N., Christian, M., White, R., Parker, M. G., & Herzig, S. (2008). Coactivator function of RIP140 for NFkappaB/RelA-dependent cytokine gene expression. *Blood*, *112*(2), 264–276. https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-121699

Rôle du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la biologie des cellules souches intestinales normales et cancéreuses et leurs propriétés de chimiorésistance

Le taux d'incidence et de mortalité des cancers colorectaux (CCR) font de cette maladie un problème de santé publique majeur à travers le monde. La compréhension des mécanismes d'initiation des processus oncogéniques ainsi que la séquence d'évènements qui soutient le développement tumoral a permis d'identifier des instabilités génomiques associées à la progression des cancers ainsi que de nombreuses mutations activatrices d'oncogènes ou inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs, améliorant ainsi le diagnostic et la prise en charge clinique des patients. Ces évènements favorisent le phénotype cancéreux des cellules intestinales et notamment l'apparition d'une population cellulaire bien particulière, les cellules souches cancéreuses (CSC). Les CSC sont notamment décrites par leurs capacités à soutenir la croissance tumorale et à régénérer la tumeur. De plus, ces cellules présentent une exacerbation des mécanismes de tolérance aux thérapies ainsi que des propriétés favorisant l'échappement à ces traitements. Dans ce contexte, notre équipe a pu mettre un évidence le rôle protecteur du co-régulateur transcriptionnel RIP140 dans la tumorigenèse intestinale. Le but de mon doctorat a consisté à caractériser les fonctions de cette protéine dans la physiologie intestinale afin de comprendre par quels mécanismes elle influence la biologie des cellules épithéliales intestinales et les mécanismes associés à l'oncogenèse intestinale. En premier lieu, j'ai finalisé l'identification de la régulation négative de la différenciation des cellules de Paneth, population clé dans la régulation de la physiologie intestinale, par RIP140 au travers du contrôle négatif du facteur de transcription SOX9. Par ailleurs, j'ai pu observer que la perte d'expression de RIP140 dans les cellules épithéliales intestinales est associée à une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs ainsi qu'à une perte d'efficacité du traitement au FOLFIRI dans nos modèles pré-cliniques murins. Enfin, mes résultats montrent un rôle inhibiteur de RIP140 sur la biologie des CS et CSC. En effet, RIP140 inhibe la prolifération en culture 2D ainsi que la croissance de sphéroïdes en culture 3D de lignées cellulaires de CCR pour lesquelles l'expression de RIP140 est modulée. De même, RIP140 diminue la croissance des colosphères après ensemencement en cellule unique (propriété propre des CSCs), associée à l'inhibition de l'expression de certains marqueurs souches. Mon projet de recherche permettra à terme d'améliorer l'approche thérapeutique des patients atteints de CCR notamment à travers l'utilisation de RIP140 comme marqueur prédictif de la réponse aux chimiothérapies.

Mots clés : Cancer coloréctal, cellules souches, RIP140, chimiorésistance

Role of the transcriptional co-regulator RIP140 in the biology of normal and tumoral intestinal stem cells and their chemoresistance properties

The incidence and mortality rate of colorectal cancers (CRC) remain a major health issue worldwide. The understanding of the mechanisms underlying the initiation of oncogenic processes as well as the sequence of event sustaining tumoral development notably highlighted by genomic instabilities associated to tumor progression and identification of mutations activating oncogenes or inactivating tumor suppressor genes allowed the improvement of diagnostic and patient care in clinic. These events favour a cancerous phenotype in intestinal cells and notably promote the appearance of a particular population, the cancer stem cells (CSC), described for their ability to sustain tumor growth and regeneration after treatment for instance. Among other features, CSC possess exacerbated tolerance mechanisms to therapeutic compounds and present phenotypic properties allowing treatment escape. In this context, our team shown a protective effect of the transcriptional co-regulator RI1P40 on intestinal tumorigenesis. My research project during my PhD relied on the characterization of its involment in the intestinal stemness and in intestinal oncogenic. First, I finalized the identification of the negative regulation on Paneth cell differentiation by RIP140, a cellular population considered as the keystone of the epithelial physiology, through the repression of the transcription factor SOX9. In addition, in our pre-clinic transgenic mice model, the loss of expression of *Rip140* in the intestinal epithelium was associated with an increase in tumor number and size as well as an impairment of the efficiency of FOLFIRI treatment. Finally, my results showed a repressive effect of RIP140 on the biology of SC and CSC. This transcriptional co-regulator inhibits the proliferation of colorectal cancer cells in 2D and the growth of spheroids in a 3D culture model. Similarly, the ectopic expression of RIP140 represses the growth of colospheres after single-cell seeding (property of CSC), associated with the inhibition of the expression of some SC markers. My research project will ultimately improve the therapeutic approach for CRC patients, in particular through the use of RIP140 as a predictive marker of the response to chemotherapy.

Key words : Colorectal cancer, stem cells, RIP140, chemoresistance