

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

UMR Inserm U1308 – Contrôle de l'Activation cellulaire, Prolifération Tumorale et Résistance thérapeutique

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Biologie-Santé – Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par
Clément AUGER

Le 13 juillet 2022

Altérations de l'autophagie et de la sécrétion de vésicules extracellulaires : conséquences sur l'agressivité des cellules de cancer colique

Thèse dirigée par **Dr Mireille Verdier** et **Dr Niki Christou**

Rapporteurs

Dr Abdel-Majid Khatib, DR, UMR Inserm 1029, Laboratoire de l'Angiogenèse et du Microenvironnement des Cancers, Université de Bordeaux

Dr Frédéric André, MCU-HDR, Equipe « Cancer pancréatique », groupe « Réseaux adhésifs et invasion », CRCM, Université d'Aix-Marseille

Examineurs

Pr Muriel Mathonnet, PU-PH, UMR Inserm U1308 CAPTuR, CHU de Limoges

Pr Christine Varon, PU, UMR Inserm 1053, BaRITON, Equipe « Helicobacter Infection: Inflammation and Cancer », Université de Bordeaux

Dr Mireille Verdier, MCU-HDR, UMR Inserm U1308 CAPTuR, Université de Limoges

Dr Niki Christou, MD-HDR, UMR Inserm U1308 CAPTuR, CHU de Limoges

Invités

Dr Barbara Bessette, MCU, UMR Inserm 1308 CAPTuR, Université de Limoges



A mes grands-pères,

« Il n'y a rien de noble à être supérieur à vos semblables. La vraie noblesse est d'être supérieur à celui que vous avez été auparavant. »

Ernest Hemingway

« L'Homme a toujours eu besoin de se confronter à des choses qui le dépassent. C'est en sortant de sa zone de confort qu'on apprend. »

Thomas Pesquet

« Ecrire seul, cela aboutit à un truc certainement bourré de défauts, mais très signé. »

Alexandre Astier

« Victoriae mundis et mundis lacrima.

Bon, ça ne veut absolument rien dire, mais je trouve que c'est assez dans le ton. »

Roi Loth d'Orcanie, Kaamelott

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes plus sincères remerciements aux personnes ayant jugé ce travail de thèse.

A **Madame le professeur Muriel Mathonnet**, PU-PH au sein du service de chirurgie digestive générale et endocrinienne du CHU de Limoges et de l'UMR Inserm 1308, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. J'en profite pour vous exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect.

A **Messieurs Abdel-Majid Khatib**, Directeur de Recherche au sein de l'UMR Inserm 1209 de l'Université de Bordeaux, et **Frédéric André**, Maître de Conférences de l'Université de Marseille, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur. Merci pour le temps consacré à l'évaluation de mon manuscrit et pour votre disponibilité. Monsieur André, merci pour vos précieux conseils et les conversations enrichissantes lors des congrès du CECED.

A **Madame le professeur Christine Varon**, Professeur de l'Université de Bordeaux au sein de l'UMR Inserm 1053. Je vous remercie chaleureusement pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et de juger mes travaux.

A **Mesdames Mireille Verdier**, Maître de Conférences de l'Université de Limoges, et **Niki Christou**, Docteur en chirurgie digestive et endocrinienne au CHU de Limoges, pour votre participation à ce jury de thèse et bien plus encore.

A **Madame Barbara Bessette**, Maître de Conférences de l'Université de Limoges, pour ta présence et ton implication dans l'aboutissement et le jugement de mes travaux.

J'adresse également mes remerciements à la Région Nouvelle-Aquitaine et aux organismes ayant contribué au financement de ce projet de thèse.

Je remercie chaleureusement l'ensemble de l'unité Inserm 1308 CAPTuR, pour m'avoir accueilli et accompagné dans ce projet de thèse, mais je commencerais par remercier plus particulièrement mes (trois) encadrantes.

Mireille, nos chemins se sont croisés pour la première fois alors que je n'étais qu'étudiant en licence. Tu étais encore à cette époque la « maman » du parcours BCP, et dès les premiers instants j'avoue avoir été captivé par ta façon d'enseigner (bien que ce fut de la signalisation cellulaire majoritairement ...), et bien entendu, par ton franc-parler légendaire ! C'est probablement en partie pour cette raison que j'ai candidaté au sujet que vous proposiez avec Aurélie il y a maintenant trois ans et demi. Le temps est vite passé malgré tout, et j'ai beaucoup appris, j'ai mûri. Je sais que je le laisse peu transparaître mais je me suis beaucoup remis en question, j'ai beaucoup « cogité ». Quoiqu'il en soit, je te remercie d'une part pour ton engagement auprès des étudiants qui a sûrement suscité des vocations comme cela a été mon cas, et plus personnellement pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce projet de thèse, car je sais que ça n'a pas forcément été toujours simple. Merci bien évidemment pour tes conseils et ton écoute. Ce congrès du CFATG à tes côtés est venu clôturer d'une belle façon ces quelques années sous ton encadrement. Tes « Salut la compagnie ! » et autres « Coucou les p'tits loups ! » vont très certainement me manquer.

Niki, c'est avec beaucoup de reconnaissance et d'admiration que je t'adresse mes remerciements. On ne se connaissait pas et pourtant tu as pris la relève sans hésiter une seconde à mi-parcours de ma thèse. Je te remercie pour ta bienveillance sans faille, ton écoute, et ton dévouement de tous les instants. Je suis encore aujourd'hui fasciné par ton calme olympien en toute circonstance, toutefois indissociable de ta ténacité parfois déconcertante quand il s'agit de parler d'E-cadhérine. J'en profite également pour te féliciter pour tous les accomplissements réalisés ces derniers mois, qui témoignent évidemment de ta pugnacité et de ton engagement. Mais par-dessus toute chose, merci pour ta gentillesse et ton humilité qui te caractérisent si bien, je suis fier d'avoir parcouru un peu de chemin à tes côtés.

Aurélie, je ne pouvais pas ne pas te remercier, et pour plein de raisons. Merci pour ta présence et ton implication à tous les instants au début de ce projet. J'ai beaucoup appris à tes côtés, il faut dire que j'avais beaucoup à apprendre ! Merci pour m'avoir montré tant de choses à propos de la vie du labo, de la culture cellulaire, et des manips en général. Malgré la situation particulière qui t'a fait prendre un chemin différent, je n'oublierai jamais et ne serai jamais assez reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour ce projet de thèse et pour moi. Merci pour ton écoute et ta bienveillance, je te souhaite le meilleur pour la suite.

A vous trois, merci pour tout.

Un grand merci à tous les doctorants que j'ai pu croiser durant ces années.

Aude, merci pour cette collaboration. J'ai le sentiment que notre duo a plutôt bien fonctionné malgré nos caractères diamétralement opposés. Merci pour m'avoir montré beaucoup de nouvelles choses dès mon arrivée. Bien évidemment je n'oublierai pas tes (longs et nombreux) soupirs en western blot ou tes sursauts quand on rentre dans la pièce de la G-box. Je te souhaite le meilleur pour ton futur, aussi bien personnel que professionnel, et te remercie pour ton aide durant ces trois ans et demi.

Céline, je ne peux que te remercier pour avoir été une partenaire de bureau formidable. Nos craquages dès le lundi vont très certainement me manquer. Merci également pour tous les conseils, les discussions sur tout un tas de sujets, les rigolades. Je te souhaite tout le meilleur pour l'après-thèse, tu le mérites. Ta ténacité et ton sérieux sont des qualités admirables qui te porteront là où tu le souhaites. Merci pour tout Cécé, « c'est ça qu'est-ce que je dis ».

Camille, je n'aurais sûrement pas assez de place pour te dire toute la reconnaissance que j'ai envers toi. Tu es l'une des personnes qui m'a le plus soutenu durant ces trois années, à ta façon certes, mais rien que pour ça, je t'adresse un grand merci. J'avoue avoir mis du temps à te cerner (c'est sûrement ton côté mystérieux), mais je suis fier de t'avoir comme amie. Tu es une personne formidable, engagée dans tout ce que tu fais, et surtout très à l'écoute (bien plus que moi, mais promis je ferai des efforts). Ton goût pour les débats m'impressionnera toujours, mais pas autant que ta culture sur beaucoup de sujets. A mon tour de te soutenir pour tes projets très prometteurs, qui je te le souhaite sincèrement, te mèneront là où tu le désires.

Merci **Éric** pour les débriefings rugby et F1 du week-end, les rigolades et les bons moments, les #CPT de Vilebrequin que, je crois, nous sommes les seuls à comprendre dans le labo. Je te souhaite bon courage et plein de réussite pour ton nouveau départ qui semble bien engagé. « Salut mon pote ! ».

Axel, comment aurais-je pu passer à côté de toi. Tu es quelqu'un de très attachant, cultivé et profondément gentil. C'est pourquoi je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi, mais également pour le labo. Merci pour les échanges toujours intéressants sur tout un tas de sujets. J'espère que tu t'épanouis dans tes nouveaux projets, je te souhaite le meilleur.

Elodie, merci pour les bons moments, les rigolades, les références au Palmashow. Merci pour ta bienveillance et ta gentillesse à mon égard et bon courage pour la fin. « Ciao ciao ! ».

Léa, May, merci pour votre bonne humeur et tous les bons moments passés dans l'open space et pas que. Je sais que ce n'est pas facile tous les jours, mais accrochez-vous, gardez espoir. J'associe également **Héloïse** et **Boutaina** qui sont arrivées en cours de route. Un sacré quatuor qui m'a bien fait rire et qui, je l'espère, continuera à amener de la fraîcheur et de la bonne humeur au labo. Je vous souhaite à toutes plein de réussite.

Charlotte, nous n'avons pas réellement eu le temps d'apprendre à nous connaître mais je souhaitais t'adresser tout mon courage pour la suite.

Mention spéciale pour **Marie** même si tu n'es pas (encore) doctorante. On a bien rigolé, et je pense que j'ai beaucoup appris en te coachant (de loin). Je te souhaite le meilleur, tu le mérites amplement.

Et je remercie pour finir les deux anciens **Hugo** et **Sabrina** pour leurs conseils et la bienveillance à mon égard. Et surtout merci pour m'avoir laissé ton bureau Sabrina !

A tous les membres et anciens de l'unité CAPTuR, un grand merci.

Barbara, un grand merci pour les nombreuses discussions sur tout un tas de sujets, pour la remise en question permanente, et pour les bons moments passés au labo et en congrès. Comme d'autres dans ce labo, tu as fait partie des enseignants m'ayant beaucoup inspiré quand j'étais étudiant, je t'en remercie également. Merci pour ton soutien indéfectible et pour ton engagement auprès des étudiants.

François, tu m'as aussi beaucoup captivé en cours à la fac et je t'en suis très reconnaissant. Merci pour les nombreux cafés quand on était seuls (et tranquilles) au labo « tôt » le matin, tes conseils en bio-mol, et les discussions plus ou moins sérieuses qu'on a pu avoir. Je n'oublierai pas tes blagues entrecoupées de grognements quand quelque chose n'est pas à sa place. Vous formez avec **Thomas** un sacré duo que je ne suis pas près d'oublier.

Thomas, Tom, merci pour tout. J'ai très vite été impressionné par tes connaissances et ta culture scientifique en général. Merci pour ton aide sur tous les aspects techniques et bidouillages informatiques, tes journal club hors des sentiers battus. Mais surtout merci pour ta bonne humeur à chaque instant, tes anecdotes toujours plus folles et tes blagues à tour de bras. Merci pour tout. A fond les ballons !

Je tiens à vous remercier également **Danielle** pour votre bienveillance et vos conseils, scientifiques et professionnels, ainsi que pour avoir fait partie des enseignants m'ayant donné goût à la recherche scientifique. Merci à toi **Hussein** pour tes conseils précieux et ton aide notamment sur les manip « EVs ». Je te remercie pour ta gentillesse et le temps que tu prends avec chaque personne qui te sollicite. Je n'oublie pas non plus **Sofiane**. Merci pour ton aide précieuse sur les manip et tous les conseils techniques. Merci également pour ton humour et toutes les discussions enrichissantes qu'on a pu avoir. Je remercie également **Amandine** notamment pour ton expertise ImageJ et sur l'autophagie. Merci pour ta sympathie et ton aide de chaque instant. Un grand merci à Stéphanie également pour ton aide sur la bioinfo et ta disponibilité. Merci **Serge** pour tes conseils avisés sur tout un tas de sujet, et surtout sur l'ordre de visionnage des films Star Wars. Je te remercie également **Gaëlle** pour ton aide précieuse à la réalisation de l'article sur le NanoSight et pour tous tes conseils et tes participations aux réunions. Merci **Philippe** pour ta sympathie et ton humour, ainsi que pour ta disponibilité quand ton aide est requise. Merci à toi aussi **François-Xavier** pour les discussions sympa autour d'un café.

Je tiens enfin bien évidemment à vous remercier, **Marie-Odile** et **Fabrice**, pour votre engagement dans la direction de cette équipe et le soutien à vos doctorants. Merci pour votre accueil et pour m'avoir permis de réaliser ce projet au sein de l'unité CAPTuR. Plus personnellement, merci Fabrice pour avoir fait partie des figures enseignantes inspirantes lors de mon parcours universitaire et pour la passion qui émane dans la transmission de votre savoir aux étudiants.

Je tiens à remercier également les stagiaires qui sont passés par l'unité CAPTuR, notamment **Éric**, **Tiffany**, **Nina**, **Florence** (floflodu94), **Rémy**, **Anaëlle** pour votre gentillesse et la curiosité dont vous avez fait preuve, et pour tous les bons moments passés à échanger. De même, je remercie tous les doctorants que j'ai pu rencontrer par le biais d'ADPLim. Lylian, Audrey, Sylvain, Cédric, Stécy, Léa, Hichem, Azra, Clotilde, Amin et tous les autres. Merci pour les bons moments de partage. Je remercie aussi le personnel de la plateforme BISCEm, notamment Claire et Cathy pour votre aide, vos conseils et votre disponibilité.

Ces remerciements ne sauraient être exhaustifs si les personnes suivantes n'y figuraient pas. Parce que « la vie c'est avant tout des rencontres », je tiens à remercier ceux sans qui mon parcours aurait sans nul doute eu moins de saveur. A vous, les garants de mon intégrité (enfin presque) mentale et surtout de ma cirrhose depuis toutes ces années, et à ceux qui sont arrivés en cours de route : **mes amis**. La liste est longue (si, si) mais je remercie chacun d'entre vous, pour être restés les mêmes, pour continuer à me chambrer quand je regarde trop les étoiles, pour les saints pèlerinages entre Chez Bernard, l'Arkange et le Lord, pour tous les bons moments passés et futurs, pour les soirées jeux en ligne et pour le reste, merci d'être là tout simplement. A Geogeo, Baba, Titi, Krab, Jam, Cucu, Kath, Fionfion, Lisou, Hugo, Fafa, Jo L, Jo F, Momo, Flo le BG dit « la peinture », Marie, Dédé s't'affaire, Andrea, Morgane, Quentin, Bidu, mon Ju, Aurélien, Cam', François, Virgile, Audrey, Thibault, mon p'tit Valou, et à tous ceux que j'ai probablement oublié de citer. Une mention spéciale à Titi et Krab pour le café quasi-quotidien du midi qui ne fait pas avancer la thèse mais qui fait toujours plaisir.

Je souhaite également vous remercier, **Laurence** et **Olivier**, entre autres pour les deux mois de confinement passés en Corrèze et qui m'ont valu le surnom de « champion » ! Merci plus généralement pour tout, pour les bons repas en famille dont vous avez le secret, pour me faire sentir chez moi à vos côtés, pour les matchs endiablés du CAB. Je remercie de manière plus générale toute ma belle-famille qui m'a si bien accueilli.

Enfin, ces remerciements n'auraient aucun sens sans les adresser à ceux qui, bien que parfois loin, ont toujours été là, dans les bons comme les mauvais moments : **ma famille**. Une pensée particulière à toi **Hélène** pour ta force et ton courage. Tu as toute mon admiration et je te dédie également ce travail. **Les cousins, Tata, Tonton**, on ne se voit pas souvent, mais merci pour tous les bons moments.

Estelle, merci d'être là, à chaque instant. Cela fait maintenant 6 ans que l'on se supporte, mais je me dois de te remercier et te tirer mon chapeau pour m'avoir subi aussi longtemps. Je sais que la tâche est rude, je connais mes défauts, mais tu as toujours été là, à l'écoute (quand tu ne dors pas), avec les bons mots. Tu as su apaiser mes appréhensions, calmer mes nerfs. Je dois dire que même si tu râles beaucoup, j'admire ton engagement au quotidien dans tout ce que tu entreprends, ta loyauté envers tes amis et ceux qui comptent pour toi. Je suis fier de partager ma vie avec toi. Ne change rien. Je t'aime.

Je remercie évidemment ceux sans qui je ne serais pas là. **Maman**, les mots me manquent pour te remercier. Je voudrais simplement te dire merci pour ta présence à chaque instant, ton soutien, et l'abnégation et le courage dont tu as toujours su faire preuve pour me mener vers la réussite. Je sais que ça n'a pas toujours été facile, que je t'en ai parfois fait voir de toutes les couleurs, mais je sais que tu ne m'en veux pas. J'espère simplement qu'aujourd'hui tu es fière, car c'est en bonne partie grâce à toi que j'en suis arrivé là. Je te souhaite simplement d'être heureuse, et surtout de souffler, j'y veillerai personnellement. Et je compte sur toi **Michel** pour y veiller également.

Papa, je sais que beaucoup de choses t'ont échappé et t'échappent encore concernant mon cursus et mon avenir. Mais je sais aussi que tu m'as toujours soutenu, à ta façon parfois. Je te remercie pour les valeurs que tu m'as transmises : le travail (« fais toujours plus que l'on ne te demande »), l'anticipation (« anticipe ! », un de tes mots favoris), la prudence (« fais attention ! »), la valeur des choses, l'amour de la nature, l'humour (un peu bancal) ... bon tu as donné les maths à Antoine, je ne pouvais pas tout avoir ! Et même si on se voit moins souvent, assure-toi que si j'en suis là c'est évidemment aussi grâce à toi. Merci **Christelle** pour être là à ses côtés et veiller sur lui, ta douceur et ta patience sont salutaires.

Antoine, Toinou, p'tit frère, je voudrais simplement te dire que je suis très fier de toi. Je sais que tout n'a pas été facile, que j'ai parfois été dur avec toi, mais merci d'être là, de continuer à me faire rire juste en me fixant, à faire l'andouille, à être toi, tout simplement. Ne laisse personne te dire que tu es « trop » ceci, ou « pas assez » cela. Crois en toi, accroche-toi, je serai toujours là pour te soutenir. Ecoute quand même les conseils même si ce n'est pas toujours facile. Par contre, laisse-moi être « joueur 1 » au moins une fois pour que je voie ce que ça fait. Ah, et bon courage pour supporter **Laurine**, ça ne va pas être facile tous les jours !

Je remercie avec tout mon amour **mes grands-mères**, pour les innombrables bons moments et notre enfance heureuse. Je mesure la chance que nous avons de vous avoir.

Et enfin, avec beaucoup d'émotion, je remercie ceux qui me manquent terriblement et à qui je pense si souvent, **mes grands-pères**. Vous avez été et resterez mes modèles. J'espère que vous êtes fiers, de là où vous êtes. Ce travail vous est dédié.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	7
Préambule.....	25
Chapitre I. Le cancer colique	27
I.1. Le côlon.....	27
I.1.1. Anatomie et organisation fonctionnelle	27
I.1.2. Histologie et cellules souches intestinales	28
I.1.2.1. La paroi colique.....	28
I.1.2.2. Les glandes ou cryptes de Lieberkühn : niche des cellules souches intestinales.....	30
I.1.2.2.1. La voie Wnt	30
I.1.2.2.2. La voie Notch	31
I.1.2.2.3. La voie PI3K-Akt.....	31
I.1.2.2.4. La voie Hedgehog (Hh).....	31
I.1.2.2.5. La voie BMP	32
I.2. Le cancer colique.....	34
I.2.1. Généralités et données épidémiologiques	34
I.2.2. Transformation cancéreuse et évolution du cancer colique	37
I.2.2.1. La voie de l'instabilité chromosomique (CIN).....	39
I.2.2.2. La voie de l'instabilité micro-satellitaire (MSI).....	39
I.2.2.3. La voie de l'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP)	40
I.2.2.4. Développement métastatique.....	40
I.2.3. Classifications des cancers coliques	41
I.2.3.1. La classification pTNM	41
I.2.3.2. La classification CMS.....	41
I.2.4. Prise en charge thérapeutique du cancer colique	43
I.2.4.1. Bases thérapeutiques	43
I.2.4.1.1. Chimiothérapies.....	44
I.2.4.1.2. Thérapies ciblées	45
I.2.4.1.2.1. Voie du VEGF	45
I.2.4.1.2.2. Anti-EGFR.....	45
I.2.4.1.2.3. Nouvelles thérapies.....	46
I.2.4.1.3. Résistances thérapeutiques.....	47
I.2.5. Cellules souches cancéreuses	48
I.2.6. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	51
I.2.7. Cellules hybrides E/M et agressivité tumorale	53
Chapitre II. Autophagie, vésicules extracellulaires et cancer	55
II.1. L'autophagie	55
II.1.1. Généralités sur l'autophagie	55
II.1.2. Mécanistique de l'autophagie	57
II.1.2.1. L'initiation	57
II.1.2.2. La nucléation.....	57
II.1.2.3. L'élongation.....	58
II.1.2.4. La fusion autophagolysosomale	59
II.1.3. Autophagie et cancer.....	60
II.1.4. Autophagie sécrétoire.....	61

II.2. Sécrétion de vésicules extracellulaires.....	62
II.2.1. Les corps apoptotiques	62
II.2.2. Les microvésicules	63
II.2.3. Les exosomes	64
II.2.3.1. Biogenèse des exosomes	65
II.2.3.1.1. De l'endosome au corps multivésiculaire	65
II.2.3.1.1.1. Voie ESCRT-dépendante.....	65
II.2.3.1.1.2. Voie ESCRT-indépendante	66
II.2.3.1.2. Sécrétion des exosomes	67
II.2.3.2. Leur rôle dans le cancer.....	69
II.3. Revue : Autophagie et vésicules extracellulaires dans le cancer colorectal : interactions et acteurs communs ?.....	70
Chapitre III. Matériels et méthodes.....	73
III.1. Développement des modèles cellulaires	73
III.1.1. Lignées cellulaires	73
III.1.2. Altérations de l'autophagie et de la sécrétion vésiculaire	74
III.1.2.1. Inhibition d'ATG5 et RAB27A par shRNA.....	74
III.1.2.1.1. Vecteurs plasmidiques.....	74
III.1.2.1.2. Transfection des HEK-293T et production de particules virales	75
III.1.2.1.3. Infection des HCT116 et des Colo205, et sélection.....	76
III.1.2.2. Traitements chimiques	76
III.1.2.3. Inhibition de RAB27A par siRNA	76
III.2. Etude de l'expression transcriptomique des gènes associés à l'autophagie, la sécrétion vésiculaire, la transition épithélio-mésenchymateuse, et au compartiment souche	77
III.2.1. RT-qPCR.....	77
III.2.2. Séquençage ARN.....	78
III.3. Analyse de l'expression protéique.....	78
III.3.1. Western Blot.....	78
III.3.2. Immunofluorescence indirecte	79
III.4. Evaluation de la sécrétion vésiculaire	80
III.4.1. Isolement des EVs par ultracentrifugations différentielles	80
III.4.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	81
III.4.3. Quantification des EVs par cytométrie en flux.....	82
III.4.3.1. Isolement des EVs CD63+	83
III.4.3.2. Marquage des billes et cytométrie en flux	83
III.5. Etude fonctionnelle des cellules cancéreuses coliques	83
III.5.1. Tests de migration par « scratch test »	83
III.5.2. Xénogreffes sur poissons zèbres.....	84
III.5.3. Evaluation de la prolifération par incorporation du BrdU	84
III.5.4. Evaluation de la mort cellulaire par ELISA Cell-Death	84
III.6. Analyses statistiques.....	85
Chapitre IV. Résultats.....	87
IV.1. Inhibition de Rab-27A et évaluation de la sécrétion d'EVs dans les cellules de cancer colique	87
IV.1.1. Article : Appréciation différente de l'augmentation et de la diminution de la sécrétion de vésicules extracellulaires par nanoparticle tracking analysis	87

IV.1.2. Résultats complémentaires	89
IV.1.2.1. Autres aspects étudiés sur le modèle HCT116 shRAB27A	89
IV.1.2.2. Etude de la sécrétion d'EVs dans le modèle Colo205 shRAB27A.....	92
IV.2. Conséquences de l'altération de l'autophagie dans les cellules de cancer colique ...	94
IV.2.1. Validation de l'extinction d'ATG5 et de l'altération de l'autophagie	94
IV.2.2. Effets des altérations de l'autophagie sur la fonctionnalité des cellules de cancer colique.....	96
IV.2.3. Effets des altérations de l'autophagie sur l'agressivité des cellules de cancer colique.....	98
IV.2.4. Effets de l'altération de l'autophagie sur la sécrétion d'EVs.....	101
IV.2.5. Transfert d'agressivité par le biais de la sécrétion d'EVs dans les modèles shATG5.....	102
IV.2.6. Transfert de surnageants des shATG5 et effets sur l'agressivité des cellules de cancer colique	104
IV.2.7. Identification des processus cellulaires affectés par l'altération de l'autophagie dans les cellules de cancer colique	105
Chapitre V. Discussion générale et perspectives.....	107
Conclusion	115
Références bibliographiques	117
Annexes	139

Table des illustrations

Figure 1 - Schéma représentatif de l'organisation anatomique du gros intestin – Adapté de BioRender.com.....	27
Figure 2 - Schéma représentatif de l'histologie du côlon humain. – Source : https://doc-pedagogie.umontpellier.fr/	29
Figure 3 - Représentation schématique des principales voies de signalisation des cellules souches intestinales coliques, adapté depuis Biorender.com	32
Figure 4 – Organisation fonctionnelle de la crypte de Lieberkühn, adapté de Barker <i>et al.</i> 2014	33
Figure 5 - Représentation graphique de la répartition des cancers dans le monde en termes d'incidence et de mortalité – Source : GLOBOCAN (OMS), 2020.....	34
Figure 6 - Représentation graphique des taux d'incidence et de mortalité des dix cancers les plus fréquents dans le monde – Source : GLOBOCAN (OMS), 2020	35
Figure 7 - Représentation planisphérique de la répartition mondiale du cancer du côlon en termes d'incidence – Source : GLOBOCAN (OMS), 2020	35
Figure 8 - Estimations de l'incidence de la mortalité de l'âge médian au diagnostic et de la survie à 5 ans du cancer colique en France – D'après Santé Publique France, 2018.....	36
Figure 9 - Représentation schématique des voies de carcinogenèse colique selon l'origine tumorale, le type d'instabilité subi et les mutations observées – Adapté depuis Biorender.com	38
Figure 10 - Pronostics de survie des patients de cancer colorectal en fonction du statut CMS, d'après Guinney <i>et al.</i> , 2015.....	42
Figure 11 - Localisation anatomique des cancers coliques en fonction de leur statut mutationnel et de leur classification moléculaire, d'après Dekker <i>et al.</i> 2019.	43
Figure 12 - Survie sans progression de patients atteints de CCR métastatique MSI-high après traitement au pembrolizumab en première ligne comparée à celle de patients traités par chimiothérapie en première ligne, d'après André <i>et al.</i> 2020	47
Figure 13 - "Hallmarks" du cancer et thérapies proposées pour contrer les différentes aptitudes acquises par les cellules tumorales – Adapté de Hanahan & Weinberg, 2011	48
Figure 14 - Comparaison des modèles stochastique et hiérarchique, et introduction du concept de cellules souches cancéreuses (CSC), adapté de Biorender.com	49
Figure 15 - Représentation schématiques du processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et du processus inverse de transition mésenchymo-épithéliale (TME), adapté de Dongre & Weinberg, 2018.....	52
Figure 16 - Les différentes voies de l'autophagie, d'après Kaushik & Cuervo, 2018	56
Figure 17 - Schéma représentatif du processus de macroautophagie, d'après Dikic & Elazar, 2018	59
Figure 18 - Représentation schématique de l'évolution du rôle de l'autophagie dans la transformation maligne, d'après Galluzzi <i>et al.</i> 2015.....	60

Figure 19 - Représentation schématique des voies de biogenèse des microvésicules et des exosomes, d'après Van Niel <i>et al.</i> 2018.....	64
Figure 20 - Représentation schématique des acteurs majeurs de la biogenèse des EVs, adapté de Van Niel <i>et al.</i> 2018	68
Figure 21 - Carte du vecteur pLKO.1 utilisé lors des infections lentivirales – source : addgene (#8453).....	75
Figure 22 - Protocole de purification des EVs par ultracentrifugations différentielles, adapté de Théry <i>et al.</i> 2006.	81
Figure 23 - Représentation schématique du principe de diffusion dynamique de la lumière sur laquelle repose la NTA, adapté de https://azonano.com	82
Figure 24 - Evaluation de la quantité d'EVs CD63+ sécrétées, par analyse de cytométrie en flux.	89
Figure 25 - Evaluation des aspects fonctionnels des modèles HCT116 shRAB27A.	90
Figure 26 - Evaluation de l'expression des marqueurs « souches » par RT-qPCR.	91
Figure 27 – Evaluation de l'expression d'ATG5 dans les modèles shRA27A par western blot	91
Figure 28 - Validation de l'inhibition de Rab-27A dans la lignée Colo205	92
Figure 29 - Evaluation de la sécrétion vésiculaire dans les Colo205 shRAB27A.	93
Figure 30 - Evaluation de l'expression d'ATG5 dans les Colo205 shRAB27A.....	93
Figure 31 - Validation de l'altération de l'autophagie dans les cellules de cancer colique shATG5.....	95
Figure 32 - Evaluation de la prolifération cellulaire par tests d'incorporation du BrdU dans les HCT116 et les Colo205 à 24, 48 et 72h après ensemencement.....	96
Figure 33 - Analyse de l'expression de <i>LGR5</i> (gauche) et d' <i>Oct4</i> (droite) par RT-qPCR dans les HCT116 et les Colo205.....	96
Figure 34 - Evaluation de la chimiosensibilité vis-à-vis du 5-FU à 8µM des HCT116 et des Colo205 par ELISA cell-death.	97
Figure 35 - Effets de l'altération de l'autophagie sur la migration cellulaire et la TEM	100
Figure 36 - Evaluation de la sécrétion d'EVs et de l'expression des protéines associées dans les modèles shATG5	102
Figure 37 - Evaluation de la migration cellulaire par scratch tests après traitement avec des EVs issues de shATG5.....	103
Figure 38 - Evaluation de la migration cellulaire par scratch tests après traitements avec les surnageants de culture des shATG5	105
Figure 39 - Etude d'expression génique différentielle entre les shATG5 et les pLKO dans les cellules de cancer colique	106

Table des tableaux

Tableau 1 – Classement des sous-types de cancers colorectaux selon la classification CMS, d'après Guinney <i>et al.</i> (2015)	42
Tableau 2 – Caractéristiques anatomiques et mutationnelles des lignées cellulaires utilisées	73
Tableau 3 – Références et caractéristiques des vecteurs plasmidiques shRNA	74
Tableau 4 – Références des amorces utilisées pour la RT-qPCR	77
Tableau 5 – Liste des anticorps utilisés pour les analyses d'expression protéique par western blot et immunofluorescence.....	79

Liste des abréviations

5-FU : 5-Fluorouracile	Hes : Hairy enhancer of split
ADN : Acide désoxyribonucléique	Hh : Hedgehog
AFS : Adénome festonné sessile	HNPCC : Cancer colorectal héréditaire sans polypose
AFT : Adénome festonné traditionnel	HSC70 : Heat Shock Cognate 71 kDa protein
AMBRA1 : Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	IHh : Indian hedgehog
AMC : Autophagie Médiée par les Chaperonnes	IL-18 : Interleukine 18
AMP : Adénosine monophosphate	IL-1β : Interleukine 1 β
AMPK : Adénosine monophosphate protéine kinase	IRI : Irinotécan
APC : Adenomatous polyposis coli	kDa : kiloDalton
ATG : Autophagy-related gene	KFERQ : Lysine-Phénylalanine-Glutamate-Arginine-Glutamine
BMP : Bone morphogenetic protein	LGR5 : Leucin-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
BMPR : Bone morphogenetic protein receptor	LIR : LC3-interacting regions
CCR : Cancer colorectal	LOH : Pertes d'hétérozygotie
CIMP : Phénotype de méthylation des îlots CpG	MAP1LC3 : Microtubule-associated protein 1 light chain 3
CIN : Instabilité chromosomique	MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
CMS : Consensus Molecular Subtype	MMP : Métalloprotéase
CQ : chloroquine	MMR : Mismatch repair
CSC : Cellule souche cancéreuse	MP : Membrane plasmique
CSI : Cellule souche intestinale	MSI : Microsatellites instables
DHh : Desert hedgehog	MSS : Microsatellites stables
EGFR : Facteur de croissance épidermique	mTOR : mammalian target of rapamycin
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse	mTORC1 : mTOR complexe 1
EphB2 : Ephrin type-b receptor 2	MVB : Corps multivésiculaire
EVs : Vésicules extracellulaires	NICD : domaine intracellulaire de Notch
FIP200 : 200 kDa FAK Family Kinase-Interacting Protein	OX : Oxaliplatine
FOL : Acide folinique	PAF : Polypose adénomateuse familiale
GSK-3β : Glycogen synthase kinase 3 β	PAS : Structure pré-autophagosomale ou Site d'assemblage du phagophore

PKD1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1

pH : potentiel hydrogène

PI : Phosphatidylinositol

PI3K : Phosphoinositide-3 kinase

PI3KC3 : Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3

PI3-P : Phosphatidylinositol 3-phosphate

PIK3CA : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate

PTCH : Patched

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

pTNM : pathology Tumor Node Metastasis

RE : Réticulum endoplasmique

RNase A : Ribonucléase A

RTK : Récepteur à tyrosine kinase

Rubicon : RUN domain protein as Beclin 1 interacting and cysteine-rich containing

SHh : Sonic hedgehog

SMO : Smoothened

SNAP : Synaptosomal-associated protein

SNARE : soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor

STX : Syntaxine

SUFU : Suppressor of fused homolog

TA : Transit amplifying

TCF4 : Transcription factor 4

TGFβ : Transforming Growth Factor β

TGFβ-R2 : Récepteur 2 au TGFβ

TP53 : Tumor Protein 53

TRIM16 : Tripartite motif-containing protein 16

ULK : Unc-51-like kinase

UVRAG : UV-radiation resistance-associated gene

VAMP : Vesicle-associated membrane protein

Vps34 : Vacuolar protein sorting 34

Wnt : Wingless-related integration site

Préambule

Le cancer colorectal, affectant le côlon et le rectum, est le troisième cancer le plus incident à travers le monde et correspond à la deuxième cause de décès lié à un cancer tous sexes confondus. Plus précisément, le cancer du côlon est le cancer digestif le plus représenté, notamment dans les pays où les populations suivent un mode de vie « occidental » et sont de ce fait plus exposées aux différents facteurs de risque. Le cancer du côlon se développe au niveau de la muqueuse colique sous le joug d'une accumulation de mutations de gènes, entraînant une suractivation de la survie et de la prolifération des cellules, conduisant alors à leur transformation en cellules cancéreuses. Selon le type d'instabilité rencontré, le profil moléculaire ou la localisation de la tumeur, les cancers coliques sont répertoriés en différentes classifications complémentaires permettant de les caractériser.

Malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique du cancer colique, de nombreuses rechutes post-traitements sont observées. D'une part, ces occurrences peuvent s'expliquer par une détection encore trop tardive aujourd'hui du cancer colique, en dépit du nombre croissant de campagnes de dépistage, notamment en France et en Nouvelle-Aquitaine. D'autre part, les rechutes observées sont dues à la présence de cellules particulières pouvant donner naissance à une tumeur : les cellules souches cancéreuses (CSC). Celles-ci sont caractérisées par leurs capacités d'auto-renouvellement les rendant quasiment immortelles, mais également par leur plasticité et leur multipotentialité, leur conférant le pouvoir de donner naissance à des cellules différenciées. En outre, les CSCs sont difficiles à identifier et donc à cibler, d'où la nécessité de caractériser de nouveaux marqueurs spécifiques de ces cellules.

Les CSCs constituent le support de l'agressivité tumorale et sont entretenues par un contexte environnemental particulier : la niche tumorale. En particulier, le contexte inflammatoire au sein de cette niche favorise le maintien des CSCs ainsi que la dégradation de la matrice extracellulaire. Ces événements sont primordiaux dans l'invasion tumorale, et notamment la formation de métastases. L'invasion métastatique consiste en la formation de tumeurs à distance du site de la tumeur primaire, et résulte d'un processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) par lequel les cellules tumorales épithéliales rompent leurs jonctions intercellulaires et migrent vers un autre site. De plus, la TEM est favorisée par le raccordement de la tumeur à la circulation sanguine systémique grâce à la sécrétion de facteurs de croissance des vaisseaux sanguins donnant lieu à l'angiogenèse. Toutefois, cette agressivité tumorale serait plus importante chez des cellules adoptant un statut intermédiaire entre caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses : les cellules hybrides E/M.

Enfin, des phénomènes à l'échelle vésiculaire, au sein de la cellule, interviennent également dans le support de l'agressivité tumorale par les CSC. Notamment, l'autophagie, processus de recyclage des composants cellulaires, est connue pour favoriser l'agressivité tumorale en améliorant la survie des cellules. Ce processus requiert la formation de vésicules particulières appelées autophagosomes qui peuvent fusionner avec un lysosome pour la dégradation de leur contenu, ou avec un endosome multivésiculaire (MVE ou MVB). Ces endosomes particuliers constituent également l'origine de la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs) spécifiques : les exosomes, connus pour leur implication dans la communication intercellulaire, notamment dans le développement cancéreux.

Dès lors, ce travail s'est articulé autour de l'induction d'altérations de l'autophagie et de la sécrétion d'EVs dans des cellules de cancer colique afin d'en étudier leurs effets sur les fonctionnalités et l'agressivité de ces cellules. N'ayant pu conclure à une interaction avérée entre les processus autophagique et sécrétoire dans nos modèles cellulaires, les altérations de l'autophagie chez les cellules de stade précoce de cancer colique semblent néanmoins entraîner une agressivité plus importante que dans les cellules de stade tardif. En particulier, la migration cellulaire semble favorisée *in vitro* dans des conditions d'autophagie défectueuse chez les stades précoces contrairement aux stades tardifs, concordant avec les données de la littérature. Les phénomènes alors observés ne seraient toutefois pas associés à une activation de l'EMT, laissant supposer que d'autres mécanismes sont sollicités.

Chapitre I. Le cancer colique

Le cancer colique se développe au niveau de la muqueuse intestinale du côlon. Cet organe constitue, avec le rectum et le canal anal, la partie terminale du tractus digestif le long duquel les aliments ont préalablement été digérés et les nutriments absorbés au niveau de l'intestin grêle. Les éléments indigestes doivent alors être éliminés.

I.1. Le côlon

I.1.1. Anatomie et organisation fonctionnelle

Le côlon correspond à un tube au sein de la cavité péritonéale d'environ 1 à 1,5 mètres de long et de 6 cm de diamètre en moyenne, qui prend naissance à la fin de l'iléon, segment terminal de l'intestin grêle. Il se présente en cadre fixe autour de l'intestin grêle. Il se compose de quatre segments principaux : le côlon ascendant (droit), le côlon transverse, le côlon descendant (gauche), et le côlon sigmoïde débouchant sur le rectum. Au niveau de la liaison avec l'iléon, le cæcum constitue la partie proximale du côlon à laquelle est appendu l'appendice iléo-cæcal (ou vermiforme), et se poursuit par le côlon ascendant. Ce dernier rejoint le côlon transverse au niveau de l'angle colique droit, situé sous le lobe hépatique droit. Le côlon descendant poursuit le côlon transverse en formant l'angle colique gauche, sous la rate. Enfin, le côlon sigmoïde fait suite au côlon descendant et constitue le segment terminal du côlon, continué par le rectum, lui-même débouchant sur l'anus ([Figure 1](#) (Beifuss 2018; Perlemuter et Danielou 2019; « VIDAL, L'intelligence médicale au service du soin » 2019; Drake *et al.* 2020)).

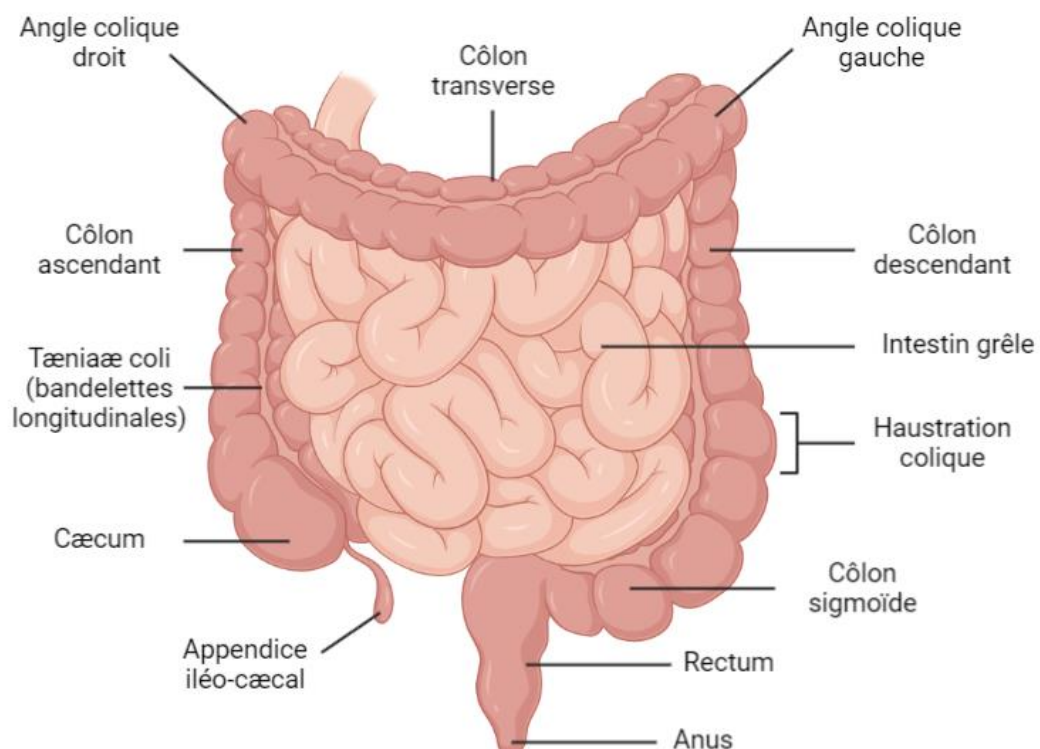


Figure 1 - Schéma représentatif de l'organisation anatomique du gros intestin – Adapté de BioRender.com

La fonction première du côlon est le transport des éléments indigestes, qui n'ont pas été absorbés par l'intestin grêle, vers le rectum puis l'anus pour la défécation, c'est-à-dire l'élimination des matières fécales. En effet, tous les nutriments ont préalablement été absorbés au niveau de l'intestin grêle, ne restent alors que les déchets qui doivent être éliminés, ainsi que de l'eau et des électrolytes qui, eux, peuvent encore être réabsorbés au niveau du côlon ascendant. Le produit de la digestion intestinale est alors déshydraté par absorption de l'eau résiduelle dans le but de former les selles, ou fèces, plus ou moins solides. Le côlon a également une fonction d'absorption de certaines vitamines, notamment les vitamines B5, B8, B12 et K qui sont produites par la flore intestinale, caractéristique importante du côlon. En effet, la flore colique est plus importante que la flore de l'intestin grêle et présente plusieurs fonctions, notamment la protection contre d'éventuels pathogènes et le renforcement du système immunitaire. Toutefois, le principal rôle de la flore intestinale est la décomposition des éléments non digérés, notamment les fibres contenues dans les aliments et qui ne sont pas absorbées dans l'intestin grêle (Beifuss 2018; Drake *et al.* 2020).

Une fois les selles formées, celles-ci sont transportées vers le rectum (« proctum », en latin, signifiant « réservoir ») où elles sont stockées en attente de la défécation. Ce transport est facilité par la sécrétion de mucus, ainsi que par les contractions des parois musculaires lisses du côlon, responsables du péristaltisme.

I.1.2. Histologie et cellules souches intestinales

I.1.2.1. La paroi colique

Le côlon, de la même manière que l'ensemble du tube digestif, présente une paroi composée de quatre couches successives : une muqueuse, une sous-muqueuse, une musculuse et une séreuse (Figure 2).

La muqueuse est la couche la plus interne de la paroi colique et est en contact direct avec la lumière du côlon. Elle présente un épithélium muqueux, une *lamina propria* ou « chorion » et des fibres musculaires formant la muqueuse musculaire. Ses rôles sont l'absorption de l'eau et des électrolytes, et principalement la sécrétion de mucus par le biais des cellules caliciformes présentes au sein de son épithélium. Ce mucus permet de faciliter le transport des selles vers le rectum par son action lubrifiante. L'épithélium de la muqueuse colique comporte également des colonocytes présentant une bordure en brosse, mais ne forme pas de villosités comme l'intestin grêle, la fonction d'absorption étant moins importante au niveau du côlon. Toutefois, on note la présence d'invaginations caractéristiques du côlon : les cryptes ou glandes de Lieberkühn, permettant le renouvellement de l'épithélium (Beifuss 2018).

La sous-muqueuse est composée d'un tissu conjonctif permettant le soutien de la muqueuse, et au travers duquel on retrouve de nombreux vaisseaux sanguins et le plexus de Meissner, composant du système nerveux autonome entérique.

La musculuse est composée de deux types de fibres musculaires lisses : circulaires internes et longitudinales externes. Ces-dernières sont également appelées « *tæniæ coli* ». On y retrouve également un plexus du système nerveux autonome : le plexus d'Auerbach, qui permet le contrôle nerveux du péristaltisme intestinal.

La séreuse représente la couche la plus externe de la paroi colique et correspond au feuillet viscéral du péritoine. On y retrouve également du tissu adipeux ainsi que des vaisseaux sanguins.

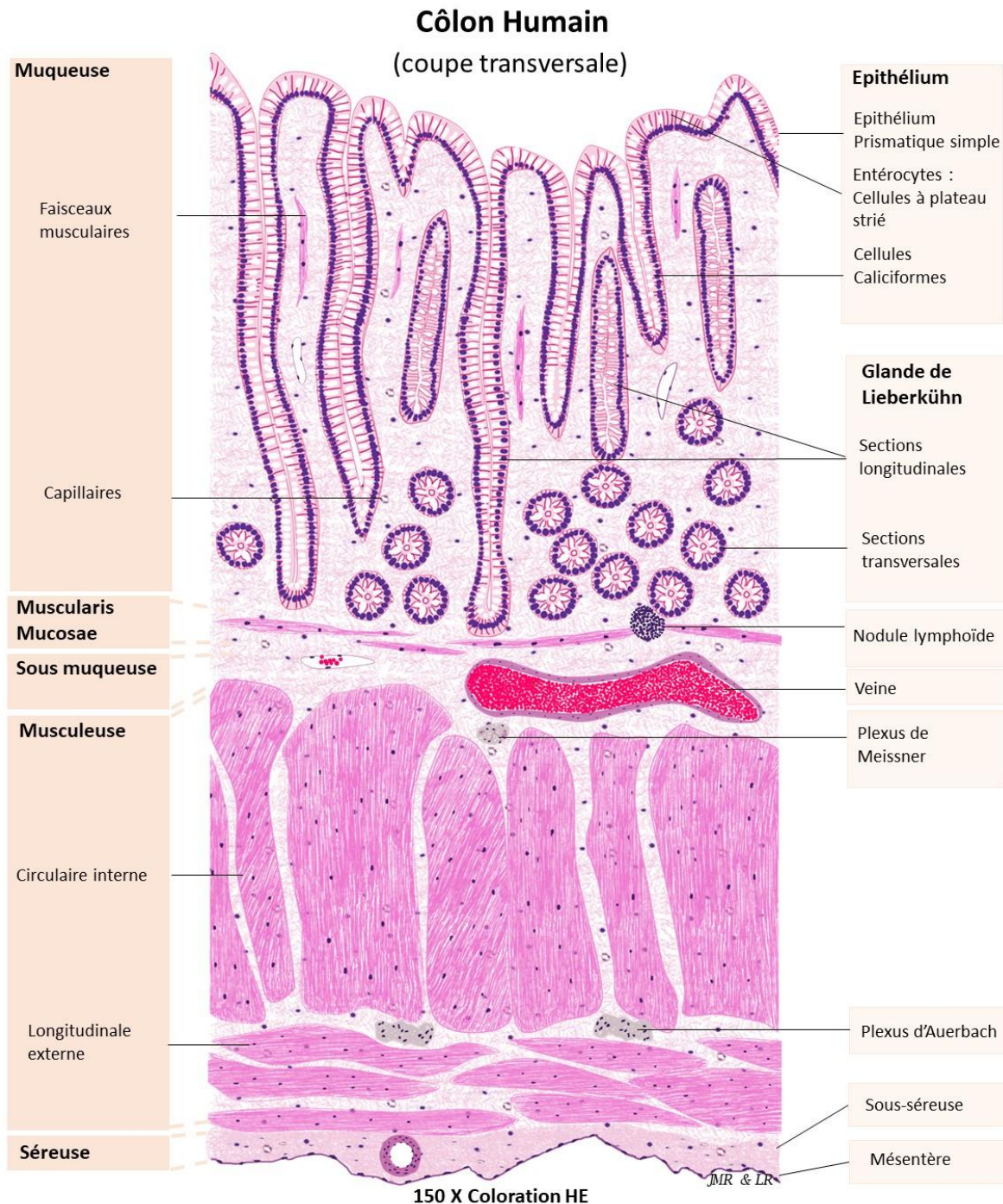


Figure 2 - Schéma représentatif de l'histologie du côlon humain. – Source : <https://doc-pedagogie.umontpellier.fr/>

I.1.2.2. Les glandes ou cryptes de Lieberkühn : niche des cellules souches intestinales

L'épithélium colique ne forme pas de villosités comme l'intestin grêle, et les cryptes du côlon sont de ce fait différentes de celles de l'intestin grêle, notamment en termes de structure et de composition cellulaire (Zeuner *et al.* 2014). Les cryptes de Lieberkühn constituent l'unité fonctionnelle de l'épithélium colique qui est régénéré et renouvelé à ce niveau (tous les 5 jours environ). On peut dès lors distinguer différents types cellulaires composant ces cryptes, permettant le renouvellement de l'épithélium.

Tout d'abord, à la base des cryptes coliques, c'est-à-dire la partie la plus éloignée de la lumière et du microbiote, on trouve la niche des cellules souches intestinales (CSI). Celles-ci constituent le point de départ du renouvellement de l'épithélium, notamment par leur capacité de division, qu'elle soit asymétrique (c'est-à-dire donnant naissance à des cellules filles différentes), ou symétrique (c'est-à-dire donnant lieu à un auto-renouvellement). Les CSI coliques sont identifiables par l'expression de marqueurs souches, notamment LGR5 (« Leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 »), marqueur qu'elles partagent avec les cellules souches de l'intestin grêle, ou encore EphB2 (« ephrin type-B receptor 2 » ; Barker *et al.* 2007 ; Zeuner *et al.* 2014). De plus, ces cellules LGR5+ sont caractérisées par une forte activation de la prolifération cellulaire, régulée par plusieurs voies : la voie Wnt/ β -caténine, la voie Notch, la voie PI3K, la voie Hedgehog et la voie BMP (« bone morphogenetic proteins » ; [Figure 3](#)).

I.1.2.2.1. La voie Wnt

La voie Wnt (« wingless-related integration site ») est indispensable pour le renouvellement de l'épithélium colique (Hirata *et al.* 2013). Elle est activée par liaison du ligand Wnt sur un récepteur Frizzled, prévenant ainsi la capture de la β -caténine par le complexe APC/axine/GSK-3 β (« Adenomatous polyposis coli/axine/Glycogen synthase kinase 3 β ») et sa dégradation par le protéasome. La β -caténine est alors transloquée au noyau où elle agit comme un facteur de transcription en coordination avec TCF4 (« transcription factor 4 » ; (Reya et Clevers 2005; Brabletz, Schmalhofer, et Brabletz 2009). Il est important de noter que le gène codant APC est un gène suppresseur de tumeur, dont l'inactivation (mutation ou délétion) peut entraîner une transformation cancéreuse au sein du côlon par activation constitutive de la voie Wnt notamment (Korinek *et al.* 1997). Cette activation de la voie Wnt entraîne alors l'activation de gènes tels que *LGR5* et *EphB2*, ainsi que des métalloprotéinases (MMP 3 et 7), ou encore des facteurs impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM ou « EMT »), décrite plus loin. La β -caténine peut par ailleurs se lier avec les cadhérines, notamment l'E-cadhérine, protéines intervenant dans l'adhérence des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire, et dont la perte d'expression est associée au processus de TEM. Il est à noter que l'E-cadhérine peut intervenir dans la séquestration de la β -caténine dans le cas de mutations de cette-dernière, afin de prévenir la transformation cancéreuse (Huels *et al.* 2015). La voie Wnt apparaît donc comme essentielle à la régulation du compartiment souche intestinal.

I.1.2.2.2. La voie Notch

La voie Notch est également une voie importante de la régulation des CSI. Celle-ci est activée lorsqu'un ligand (Delta ou Jagged) se fixe sur le récepteur Notch, entraînant la translocation nucléaire de son domaine intracellulaire (NICD). A ce niveau, il active le facteur de transcription Hes (hairy/enhancer of split) qui a pour effet d'activer à son tour des facteurs intervenant dans la prolifération et la différenciation cellulaire (S. J. Bray 2006; Brabletz, Schmalhofer, et Brabletz 2009). En coordination avec la voie Wnt, la voie Notch permet de réguler la prolifération au sein du compartiment souche intestinal (Hirata *et al.* 2013).

I.1.2.2.3. La voie PI3K-Akt

La voie PI3K (Phosphoinositide-3 kinase), est activée par liaison d'un ligand (souvent un facteur de croissance) sur un récepteur à tyrosine kinase (RTK) auquel la PI3K est capable de se lier. En effet, la PI3K est composée de deux sous-unités, p85 et p110, la première permettant la liaison au RTK, et la seconde détectant la liaison d'un ligand sur le récepteur en question. L'activation de p110 entraîne alors une conversion de PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate) en PIP3 ((3,4,5)-triphosphate), réaction qui peut être inhibée et inversée par l'action de PTEN (« phosphatase and tensin homolog »). Cette conversion est responsable du recrutement et de l'activation d'une kinase AKT par PDK1 (« 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 »), entraînant notamment l'activation de mTOR (« mammalian target of rapamycin »), impliqué dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire. Il est important de noter qu'AKT peut également phosphoryler et donc activer la β -caténine pour accentuer la prolifération cellulaire (Brabletz, Schmalhofer, et Brabletz 2009). La voie PI3K est étroitement liée à celle des MAP-kinases (« mitogen-associated protein kinases ») qui est également activée par la signalisation des RTK, et notamment le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR). De plus, la voie des MAP-kinases implique des protéines RAS et RAF, dont les gènes responsables de leur expression sont des oncogènes, souvent retrouvés mutés dans les cancers coliques. Ces mécanismes seront détaillés dans la partie I.2.2.

I.1.2.2.4. La voie Hedgehog (Hh)

La voie Hedgehog est activée par la liaison des ligands Hh à leur récepteur Patched. On distingue alors trois homologues de cette protéine chez les vertébrés : Sonic Hedgehog (SHh), Indian Hedgehog, IHh, et Desert Hedgehog (DHh). Leur liaison au récepteur Patched (PTCH) entraîne un arrêt de l'inhibition de Smoothed (SMO) récepteur transmembranaire, inhibé par Patched en l'absence des ligands Hh. SMO, quant à lui, régule l'expression d'un complexe de dégradation (SUFU, « Suppressor of fused homolog ») séquestrant le facteur de transcription GLI1/2 (protéine en doigt de zinc). Ainsi, la liaison des ligands Hh avec Patched entraîne une activation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (NANOG, SOX-2, OCT4 notamment).

I.1.2.2.5. La voie BMP

La voie BMP (Bone Morphogenic protein) est activée par la liaison de BMPs sur leur récepteur (BMPR I ou II), entraînant alors la phosphorylation de SMAD1, 5 ou 8 (Sma Mother Against Dpp). Cette phosphorylation est suivie d'une association avec SMAD4, le tout étant transloqué au noyau pour agir comme facteur de transcription. Toutefois, cette voie nécessite d'être inhibée dans les CSI. En effet, une inhibition de la voie BMP permet la formation de nouvelles cryptes, suggérant un rôle de régulation de la prolifération des CSI par cette voie (He *et al.* 2004 ; Brabletz, Schmalhofer, et Brabletz 2009). L'inhibition de la voie BMP peut également potentialiser les effets des voies Wnt et PI3K. De plus, la phosphorylation des SMADs, témoin de l'activation de la voie BMP, est majoritairement retrouvée dans des cellules différenciées, et non pas souches.

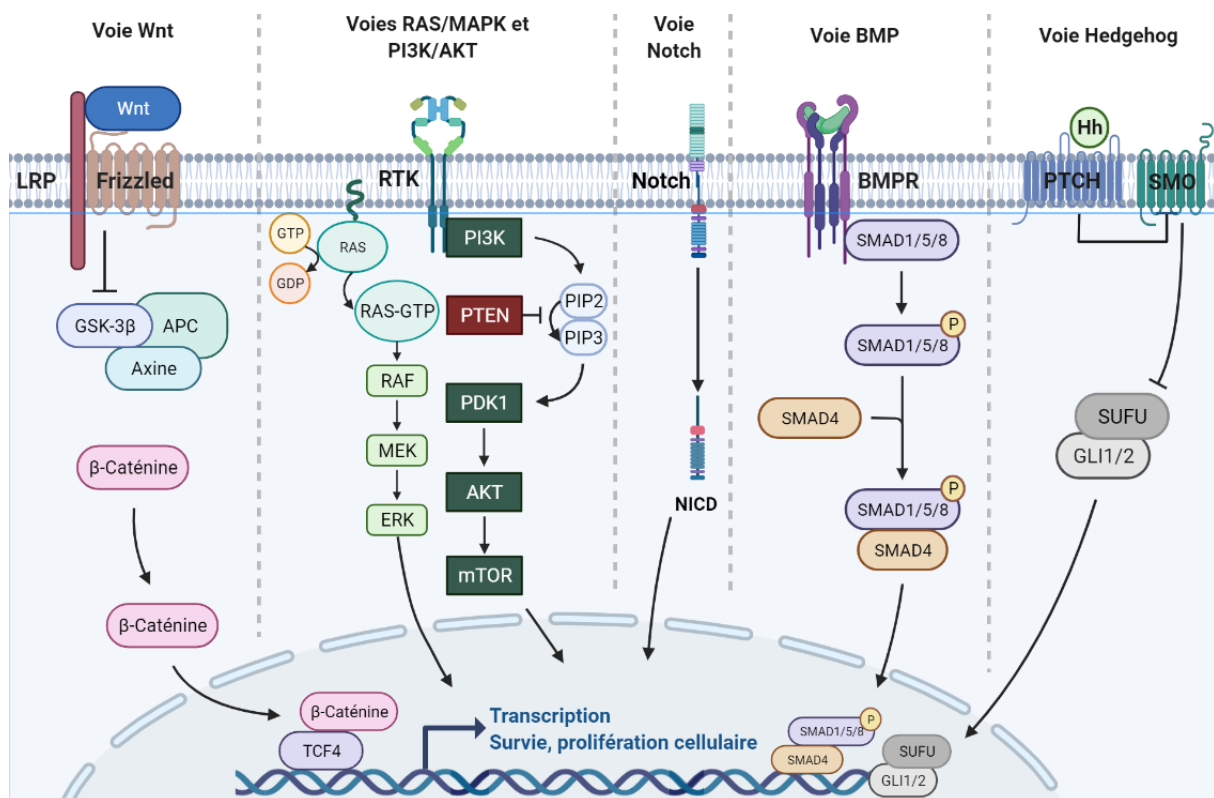


Figure 3 - Représentation schématique des principales voies de signalisation des cellules souches intestinales coliques, adapté depuis Biorender.com

LRP : Lipoprotein receptor-related protein ; Wnt : Wingless-related integration site ; GSK-3β : Glycogen synthase kinase-3β ; APC : Adenomatous polyposis coli ; TCF4 : Transcription factor 4 ; MAPK : Mitogen-associated protein kinase ; RTK : récepteur à tyrosine kinase ; GDP : Guanosine diphosphate ; GTP : Guanosine triphosphate ; PI3K : Phosphoinositide-3 kinase ; PTEN : Phosphatase and tensin homolog ; PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate ; PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate ; PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; NICD : Notch intracellular domain ; BMP : Bone morphogenic proteins ; BMPR : Bone morphogenic proteins receptor ; Hh : Hedgehog ; PTCH : Patched ; SMO : Smoothened ; SUFU : Suppressor of fused homolog ; SMAD : Sma mother against dpp

Les CSI, sous l'action des différentes voies de signalisation, donnent alors naissance à des cellules progénitrices hautement proliférantes (cellules TA pour « transit-amplifying »), qui remontent le long des cryptes et se différencient, générant ainsi les différents types cellulaires retrouvés à la surface de l'épithélium colique : les cellules caliciformes ou « cellules en gobelet », responsables de la sécrétion de mucus au niveau de l'épithélium colique afin de faciliter l'acheminement des selles ; les colonocytes, équivalents des entérocytes dans l'intestin grêle et responsables de l'absorption au niveau du côlon ; les cellules entéro-endocrines, responsables de la sécrétion d'hormones au sein de l'épithélium colique ; des cellules « tuft » jouant un rôle dans la protection immunitaire contre certains parasites notamment (Barker 2014; Howitt *et al.* 2016; Gerbe *et al.* 2016; Schneider, O'Leary, et Locksley 2019 ; Figure 4).

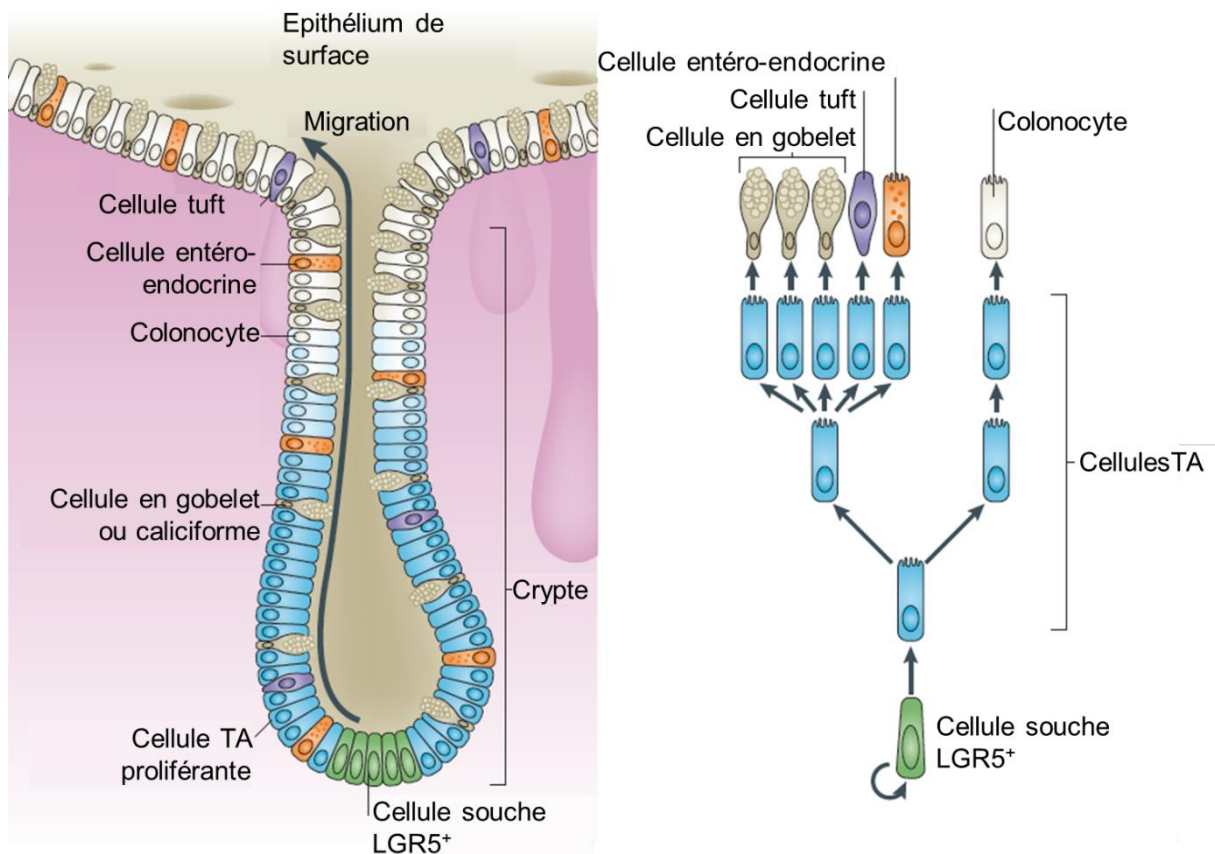


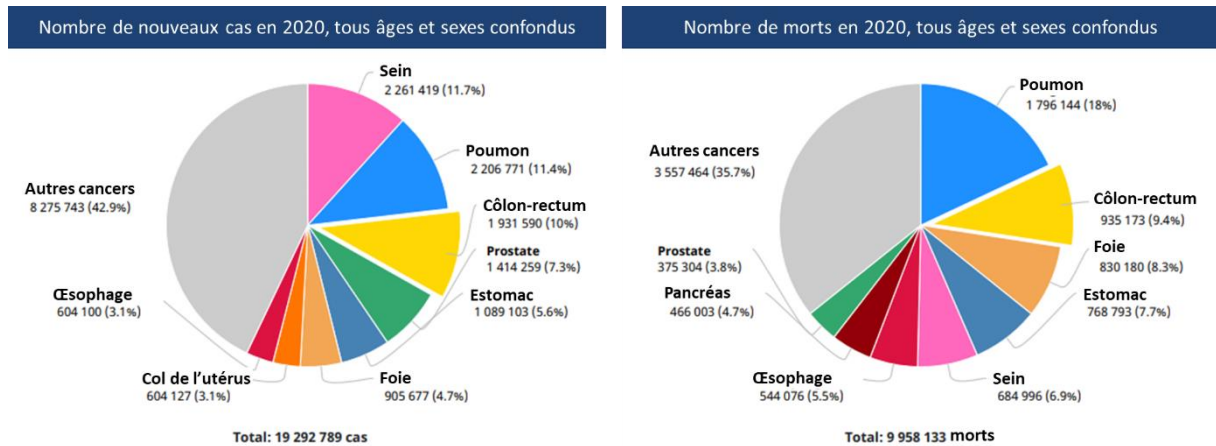
Figure 4 – Organisation fonctionnelle de la crypte de Lieberkühn, adapté de Barker *et al.* 2014

Le nombre important de cellules différentes au sein des cryptes de Lieberkühn ainsi que les voies de signalisation régissant leur formation et leur hiérarchisation en font un système fragile, sujet aux altérations pouvant conduire à différentes pathologies, bénignes ou malignes. La plus fréquente des pathologies malignes est le cancer du côlon.

I.2. Le cancer colique

I.2.1. Généralités et données épidémiologiques

Le cancer colique, très souvent associé aux cancers du rectum et du canal anal sous le terme de « cancer colorectal » (CCR), est un problème majeur de santé publique. En effet, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer colorectal est le troisième plus fréquent à travers le monde tous sexes confondus, et représente la deuxième cause de mort par cancer (WHO 2020 ; [Figure 5](#)). L'âge médian au diagnostic est assez élevé aux alentours de 70 ans.



[Figure 5](#) - Représentation graphique de la répartition des cancers dans le monde en termes d'incidence et de mortalité – Source : GLOBOCAN (OMS), 2020

Quant au cancer colique en particulier, il correspond au premier cancer digestif en termes d'incidence ([Figure 6](#)). A l'échelle mondiale, le cancer colique présente l'incidence la plus importante dans les pays adoptant un mode de vie « occidental », c'est-à-dire des populations très exposées aux différents facteurs de risques. Ceux-ci peuvent relever de l'alimentation (viandes rouges, charcuteries, graisses), mais aussi du stress, de l'âge, de la sédentarité ou encore de la pollution (O'Keefe 2016; Bhatt, Redinbo, et Bultman 2017; F. Bray *et al.* 2018; WHO 2020). Ainsi, l'Océanie, l'Amérique du Nord, une partie de l'Amérique latine, l'Europe et l'Asie orientale sont les zones géographiques où l'incidence est la plus élevée ([Figure 7](#)). L'amélioration de la prise en charge thérapeutique et l'apparition de campagnes de dépistage dans les pays comprenant un indice de développement humain élevé (IDH) tend à diminuer la mortalité au cours des années malgré la forte incidence. En revanche, ce sont les pays avec une incidence importante, mais un indice de développement humain plus faible, dans lesquels la mortalité est la plus élevée (Europe centrale et orientale, et Amérique latine notamment (WHO 2020)).

A noter que des études épidémiologiques récentes ont mis en évidence une augmentation de l'incidence de ces cancers dans les pays « développés » pour des sujets plus jeunes, à savoir de moins de 50 ans (Wong *et al.* 2021; Akimoto *et al.* 2021).

Estimation des taux d'incidence et de mortalité standardisés selon l'âge dans le monde en 2020, tous sexes et âges confondus

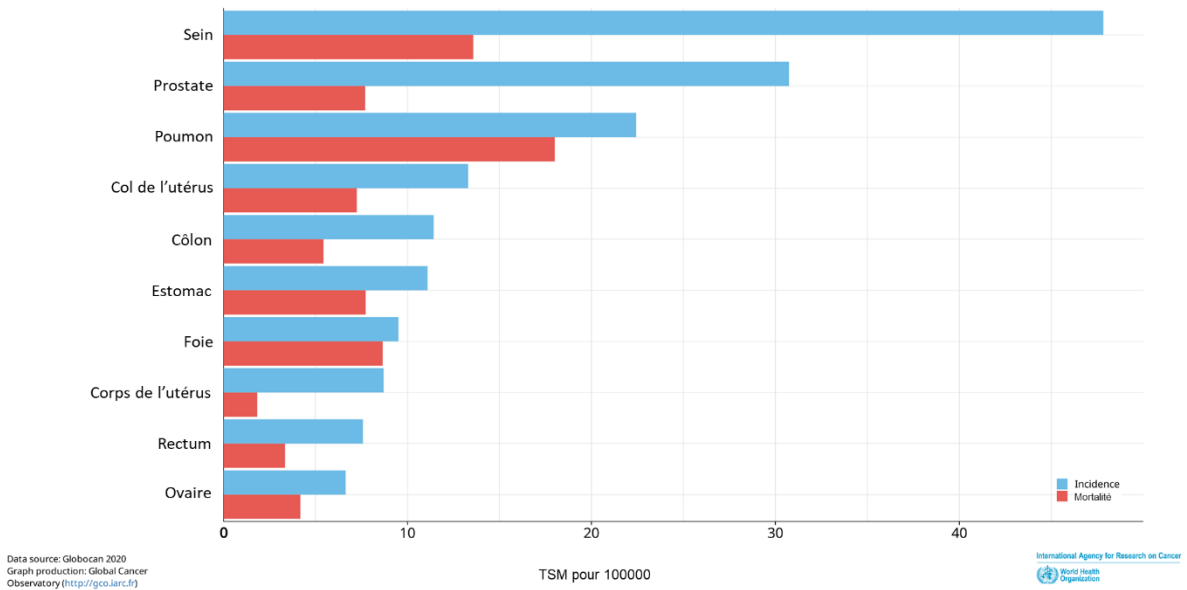


Figure 6 - Représentation graphique des taux d'incidence et de mortalité des dix cancers les plus fréquents dans le monde – Source : GLOBOCAN (OMS), 2020

Estimation des taux d'incidence standardisés sur l'âge du cancer du côlon dans le monde en 2020, tous sexes et âges confondus

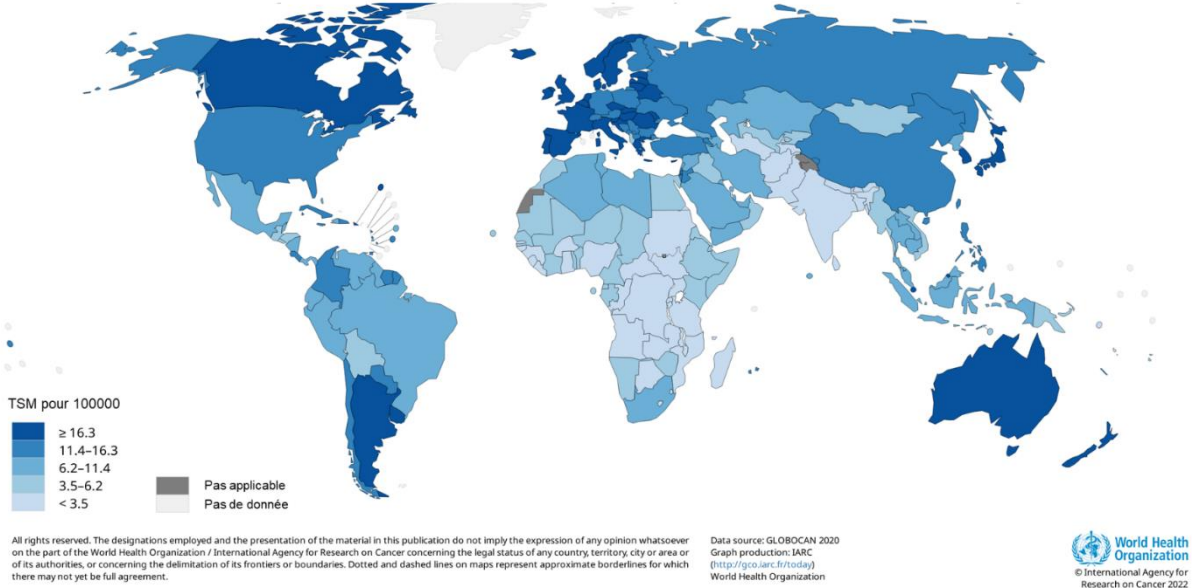


Figure 7 - Représentation planisphérique de la répartition mondiale du cancer du côlon en termes d'incidence – Source : GLOBOCAN (OMS), 2020

En France, le CCR présente une incidence de plus de 43000 nouveaux cas chaque année, et se place au deuxième rang des décès par cancer chez l'homme derrière le cancer du poumon, et au troisième rang chez la femme, derrière les cancers du poumon et du sein (Santé Publique France 2022). Le CCR est alors responsable de près de 18000 décès chaque année en France.

Plus précisément, près de 28000 nouveaux cas en 2018 concernaient le cancer du côlon seul (Figure 8).

TABLE 1. Descriptif des données analysées (tous registres) – Côlon

	Hommes	Femmes	Ensemble
Nombre de cas	20 534	18 651	39 185
Nombre de décès à 5 ans	9 921	8 632	18 553
Age médian au diagnostic (percentiles 5 et 95), en années	73 (51-89)	77 (49-91)	75 (50-90)

TABLE 2. Survies observée, nette, nette standardisée et nette par âge à 1 et 5 ans (en %) et intervalle de confiance à 95 % – Côlon

	1 an			5 ans		
	Hommes	Femmes	Ensemble	Hommes	Femmes	Ensemble
Survie observée	77 [77 ; 78]	76 [75 ; 76]	77 [76 ; 77]	49 [48 ; 49]	51 [50 ; 51]	50 [49 ; 50]
Survie nette	80 [80 ; 81]	78 [78 ; 79]	79 [79 ; 80]	60 [59 ; 61]	61 [60 ; 62]	60 [60 ; 61]
Survie nette standardisée	83 [83 ; 84]	84 [83 ; 84]	83 [83 ; 84]	62 [62 ; 63]	65 [64 ; 66]	64 [63 ; 64]
Survie nette par âge						
50 ans	91 [90 ; 92]	92 [91 ; 93]	91 [91 ; 92]	71 [69 ; 72]	73 [72 ; 75]	72 [71 ; 73]
60 ans	89 [88 ; 90]	90 [90 ; 91]	89 [89 ; 90]	68 [67 ; 69]	70 [68 ; 71]	68 [68 ; 69]
70 ans	85 [84 ; 86]	86 [86 ; 87]	86 [85 ; 86]	63 [62 ; 64]	66 [65 ; 67]	65 [64 ; 65]
80 ans	77 [76 ; 78]	77 [76 ; 78]	77 [76 ; 78]	56 [54 ; 57]	60 [58 ; 61]	58 [57 ; 59]

Figure 8 - Estimations de l'incidence de la mortalité de l'âge médian au diagnostic et de la survie à 5 ans du cancer colique en France – D'après Santé Publique France, 2018

Ces chiffres alarmants s'expliquent en partie par un taux de participation au dépistage encore trop faible en France, bien qu'augmentant au cours des années, de l'ordre de 35% en moyenne tous sexes confondus. On note une participation globale plus importante chez les femmes que chez les hommes, une augmentation avec l'âge et une variation selon la localisation sur le territoire.

La Nouvelle-Aquitaine est dans la moyenne mondiale en termes d'incidence et de mortalité du CCR, mais certains départements présentent une mortalité supérieure à la moyenne nationale chez les hommes notamment : les Deux-Sèvres (12%), les Landes (15%), la Creuse (15%), la Haute-Vienne (16%) et la Vienne (22%). Cette tendance ne semble en revanche pas retrouvée chez les femmes, ce qui peut en partie s'expliquer par une plus forte participation aux tests de dépistage (Santé Publique France 2018). Dès lors, le CCR représente une problématique régionale de santé publique, notamment chez les hommes.

Il paraît de ce fait important de sensibiliser les populations face au dépistage du cancer colorectal, que ce soit à travers le monde ou à une échelle plus locale. En effet, s'il est détecté précocement et pris en charge au plus tôt, le CCR est guéri dans 90% des cas. Ce dépistage est proposé aux personnes de 50 à 74 ans et est basé sur la recherche de sang occulte dans les selles par un test immunologique. Celui-ci peut être complété par une coloscopie sur prescription du médecin en fonction des résultats obtenus (Santé Publique France 2022; INCa 2022). Ainsi, ces tests de dépistage permettent de diagnostiquer la présence d'un CCR de stade précoce ou de lésions de type polypes ou adénomes, potentiels précurseurs d'une transformation cancéreuse colique.

1.2.2. Transformation cancéreuse et évolution du cancer colique

Dans la grande majorité des cas, les cancers coliques se développent de manière sporadique, c'est-à-dire sans aucun antécédent familial ou terrain génétique particulier.

Les facteurs de risque mentionnés précédemment tels que surpoids, inactivité physique, consommation d'alcool ou de tabac, consommation excessive de viande rouge, sont des facteurs environnementaux qui activent des événements génétiques et épigénétiques facilitant ainsi la formation sporadique des cancers coliques (Bardou, Barkun, et Martel 2013; Figueiredo *et al.* 2014; Baena et Salinas 2015; Keum et Giovannucci 2019; Schulpen et van den Brandt 2020).

Il existe toutefois des formes plus rares qui dépendent du terrain génétique, notamment la polypose adénomateuse familiale (PAF) ou le syndrome de Lynch, aussi appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose (« hereditary non polyposis colorectal cancer » ou HNPCC). Ces formes familiales ne représentent qu'une faible proportion des cancers coliques recensés (de 1 à 5%). De plus, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la rectocolite ulcéreuse hémorragique (affectant spécifiquement les côlon et rectum) ou la maladie de Crohn (affectant l'intégralité du tractus digestif) sont des facteurs pouvant mener à une transformation cancéreuse colique après une moyenne de 10 années d'activité inflammatoire chronique (Itzkowitz et Yio 2004; Keller *et al.* 2019; Clarke et Feuerstein 2019).

Il existe alors différents types de lésions menant à la carcinogenèse colique. Le cancer colique se développe au niveau de la muqueuse du côlon à la suite de dérèglements de l'épithélium muqueux (dysplasies), généralement au niveau des cryptes de Lieberkühn. La grande majorité (environ 95%) des cancers coliques sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire des cancers de l'épithélium glandulaire, provenant de la transformation d'adénomes (tumeurs bénignes). Ces adénomes se développent au niveau de polypes, excroissance de la muqueuse. On distingue alors les polypes adénomateux et les polypes festonnés (« serrated polyps »), ces-derniers étant subdivisés en adénomes festonnés traditionnels (AFT), sessiles (AFS), et polypes hyperplasiques (Snover et Batts 2010; Palazzo 2018).

Le dénominateur commun de ces différentes formes est l'apparition de mutations qui s'additionnent les unes aux autres, activant des oncogènes ou inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs, dont le plus connu est le gène *APC*, ou encore entraînant des dérégulations du système de réparation des mésappariements des bases de l'ADN (système « mismatch repair » en anglais, MMR).

On distingue alors trois mécanismes menant à ces altérations :

- La voie de l'instabilité chromosomique (« chromosomal instability », CIN), majoritairement suivie par les polypes adénomateux ;
- La voie de l'instabilité micro-satellitaire (« microsatellite instability », MSI), suivie par les polypes festonnés ;
- La voie d'hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs géniques (« CpG island methylator phenotype », CIMP).

Ainsi, l'un ou l'autre type de polype suit généralement une voie différente de carcinogénèse (Figure 9). On notera également qu'en fonction de la localisation de la tumeur (côlon gauche ou droit), le pronostic sera différent, dépendant du type d'instabilité rencontré, du stade de développement et/ou du sous-type moléculaire. En règle générale, les tumeurs situées dans le côlon droit seront de moins bon pronostic que celles localisées dans le côlon gauche (Dekker *et al.* 2019).

Progression du cancer colique

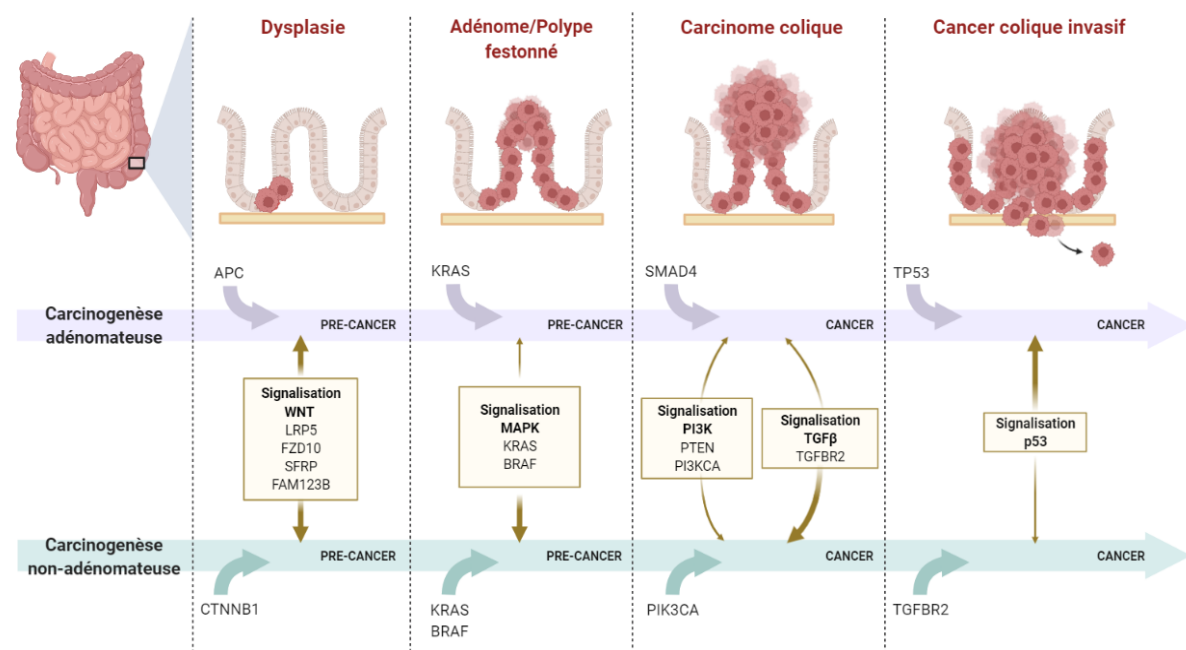


Figure 9 - Représentation schématique des voies de carcinogénèse colique selon l'origine tumorale, le type d'instabilité subi et les mutations observées – Adapté depuis Biorender.com

APC : Adenomatous polyposis coli ; WNT : Wingless-related integration site ; LRP5 : Lipoprotein receptor-related protein 5 ; FZD10 : Frizzled class receptor 10 ; SFRP : Secreted frizzled related protein ; FAM123B : Family with sequence similarity 123B ; CTNNB1 : Catenin Beta 1 ; MAPK : Microtubule-associated protein kinase ; SMAD4 : Sma mother against dpp 4 ; PI3K : Phosphoinositide-3 kinase ; PIK3CA : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha ; PTEN : Phosphatase and tensin homolog ; TGFβ : Transforming growth factor β ; TGFβR2 : Transforming growth factor β receptor 2 ; TP53 : Tumor protein 53

I.2.2.1. La voie de l'instabilité chromosomique (CIN)

La voie CIN est l'instabilité la plus retrouvée au sein des cancers coliques et du CCR en général (entre 70 et 80% des formes sporadiques) et est caractéristique de la polypose adénomateuse familiale (PAF ; (Pino et Chung 2010; Laurent-Puig, Agostini, et Maley 2010)). Elle se caractérise par un désordre général du caryotype, allant d'une perte d'hétérozygotie (« Loss of heterozygosity », LOH), à une aneuploïdie, c'est-à-dire un déséquilibre du nombre de chromosomes, ou encore des amplifications géniques. Ces déséquilibres sont responsables de mutations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *APC*, associé à la voie Wnt/ β -caténine, ou *TP53* (Tumor protein 53), facteur de transcription impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, et l'autophagie. Une mutation ou délétion conduisant à l'inactivation d'*APC* entraîne l'initiation de la transformation cancéreuse au niveau du côlon notamment. En effet, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine par inhibition d'*APC*, entraîne une hyperprolifération des cellules épithéliales coliques. Quant à *TP53*, sa mutation, plus tardive au cours de l'oncogénèse colique, entraîne des dérégulations du cycle cellulaire et une survie améliorée. Ces phénomènes sont notamment expliqués par la localisation chromosomique de ces deux gènes. En effet, *APC* est situé sur le chromosome 5, et *TP53* sur le chromosome 17, tous deux concernés par les CIN. Des mutations inhibitrices d'autres suppresseurs de tumeur tels que *SMAD2* ou *SMAD4* sont également des conséquences des CIN (Pino et Chung 2010; Laurent-Puig, Agostini, et Maley 2010).

D'autre part, ces CIN peuvent entraîner l'activation d'oncogènes tels que *KRAS*, muté dans environ 40% des CCR, ou *BRAF*, muté dans 80% des cas (Lièvre, Blons, et Laurent-Puig 2010; Makrodouli *et al.* 2011). *KRAS* est un activateur de différentes voies de prolifération cellulaire telles que la voie des MAP-kinases (MAPK) dont *BRAF* fait partie. Dès lors, une activation de *KRAS* ou de *BRAF* couplée à une inhibition d'*APC* et/ou *TP53* est responsable de phénomènes d'hyperprolifération et de la transformation des cellules épithéliales coliques en adénomes pouvant à leur tour se transformer en adénocarcinomes. On retrouve également dans environ 20% des cas de CCR, une mutation activatrice, plus tardive, du *PIK3-CA* (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), acteur de la voie de prolifération PI3K/Akt (Lièvre, Blons, et Laurent-Puig 2010; Mao *et al.* 2012; Liao *et al.* 2012).

I.2.2.2. La voie de l'instabilité micro-satellitaire (MSI)

Cette instabilité concerne un nombre moins important de cas de CCR, mais est caractéristique du syndrome de Lynch. Contrairement aux instabilités de type CIN, aucune affection de l'intégrité chromosomique n'est observée. En revanche, apparaissent des défauts de réparation des brins d'ADN mésappariés : les MMR introduits précédemment. Ces instabilités sont dues à des mutations ou des méthylations au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans ces réparations, entraînant dès lors l'apparition d'une accumulation de mutations suite aux dommages non réparés. Ce contexte facilite alors la survenue de mutations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que le *TGF- β 2* (récepteur de type II au TGF- β , « transforming growth factor β »), par exemple. On distingue alors les phénotypes MSS (stable) et MSI (instable). Les MSI sont généralement localisés dans le côlon droit, contrairement à la majorité des CCR que l'on retrouve en grande majorité au niveau du côlon distal (gauche, sigmoïde et rectum ; (Dekker *et al.* 2019)).

I.2.2.3. La voie de l'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP)

La voie CIMP se caractérise par des phénomènes d'hyperméthylation de régions particulières de l'ADN : les îlots CpG des régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *hMLH1* et 2. Ce phénomène épigénétique est alors responsable de la perte d'expression de ces gènes, favorisant la carcinogenèse. Ainsi, les tumeurs présentant un phénotype CIMP-high sont associées à un mauvais pronostic. Il a été montré dans un modèle murin que l'apparition du phénotype CIMP suite au vieillissement ou à une mutation de *BRAF* peut faciliter la transformation des cancers coliques proximaux en activant la voie Wnt notamment (**Tao 2018 ; Ushijima & Suzuki 2019**). Les phénotypes CIMP et MSI peuvent être concomitants et ainsi favoriser l'apparition de certaines mutations et/ou l'activation des voies de prolifération et de survie.

I.2.2.4. Développement métastatique

Le cancer colique est un cancer hautement métastatique, impliquant une perte d'adhérence des cellules cancéreuses et leur migration vers d'autres sites de l'organisme par le biais des réseaux lymphatique et sanguin. La plupart du temps, dans le cas du cancer colique, les métastases sont retrouvées au niveau du foie ou des poumons (Cejas *et al.* 2009; Nash *et al.* 2010; H. S. Kim *et al.* 2016; Nguyen et Duong 2018). A noter que le processus métastatique peut toucher le péritoine et conduire à des métastases péritonéales (MP) regroupées sous l'entité « carcinose péritonéale ». En général, les MP sont sous-diagnostiquées car leur détection avec les protocoles d'imagerie de routine est difficile, en raison de leur petite taille et de leur résolution de contraste limitée dans les tissus mous. Ce stade de carcinose correspond au pire pronostic (Koppe *et al.* 2006; Oudheusden *et al.* 2015).

Le processus métastatique en lui-même, qu'il soit régional ou à distance de la tumeur colique primitive, nécessite le raccordement de la tumeur à la circulation systémique par la construction de nouveaux vaisseaux sanguins : c'est le processus d'angiogenèse (Talmadge et Fidler 2010; Cao *et al.* 2015). D'autre part, les cellules épithéliales étant connues pour leur forte capacité d'adhérence entre elles et avec la matrice extracellulaire, leur migration requiert une perte d'adhérence, rendue possible lors du processus de TEM (voir partie I.2.6). Brièvement, ce processus se traduit, entre autres, par une perte d'expression de la E-cadhérine, protéine impliquée dans les jonctions cellulaires.

Ainsi, d'après les différentes voies de carcinogenèse décrites et selon le caractère invasif des cancers coliques, ceux-ci peuvent être répartis selon différentes classifications.

I.2.3. Classifications des cancers coliques

I.2.3.1. La classification pTNM

Une des classifications les plus couramment utilisées en clinique est la classification pTNM (« pathology Tumor Node Metastasis »), qui repose sur l'analyse histologique. Celle-ci se base sur l'évolution anatomique du cancer colique en prenant en compte le degré d'envahissement au niveau de la tumeur primaire (T), de l'invasion ou non des ganglions périphériques locaux (N) et de la formation ou non de métastases (M). Dans le cas du cancer colorectal, elle fait son apparition à la suite d'une étude de 1979 proposant une classification uniforme des cancers coliques et rectaux en utilisant la classification pTNM (Wood *et al.* 1979). Cinq stades sont alors déterminés (de 0 à IV ; Annexe 1) :

- 0 : présence de cellules cancéreuses localisées qui n'ont pas envahi leur environnement
- I : invasion locale et confinée
- II : invasion étendue mais absence d'invasion ganglionnaire
- III : invasion ganglionnaire régionale avérée
- IV : présence de métastases distantes

Dès lors, cette classification évolue régulièrement selon différentes éditions permettant d'améliorer le détail de l'information correspondant à chaque stade. La dernière édition (8^{ième}) en date est celle de 2017 publiée par l'UICC (« Union for International Cancer Control » ; (Brierley, Gospodarowicz, et Wittekind 2016)).

Une proposition de classification basée sur la différenciation des cellules au sein des tumeurs a été faite par l'OMS en 2000 proposant quatre grades. La 5^{ième} et dernière édition datant de 2019 classe alors les cancers coliques en bas grade (moyennement différencié) et haut grade (peu différencié). En effet, moins les cellules composant la tumeur sont différenciées, plus elles présentent des caractéristiques « souches », piliers de l'agressivité tumorale. Dès lors, les tumeurs de haut grade sont de mauvais pronostic. Néanmoins, la classification CMS présentée ci-après semble présenter des atouts majeurs par rapport aux méthodes clinico-anatomopathologiques (stades pTNM et grades de différenciation) d'un point de vue pronostique et d'adaptation thérapeutique.

I.2.3.2. La classification CMS

La classification moléculaire CMS (« consensus molecular subtypes ») a été proposée en 2015 par *Guinney et al.* (Guinney *et al.* 2015). Elle vient compléter les classifications basées sur l'envahissement histologique en se basant sur l'étude des sous-types moléculaires, permettant de différencier les tumeurs entre elles, leur potentiel agressif et leur réponse aux thérapies. Ainsi, quatre sous-types ont été identifiés selon le profil des tumeurs analysées par les études du consortium ayant abouti à la création de cette classification et sont répertoriés dans le Tableau 1.

Tableau 1 – Classement des sous-types de cancers colorectaux selon la classification CMS, d'après Guinney *et al.* (2015)

CMS1 MSI Immunitaire	CMS2 Canonique	CMS3 Métabolique	CMS4 Mésenchymateux
14%	37%	13%	23%
MSI CIMP-high Hypermuté	Proportion importante d'altérations du nombre de copies somatiques de l'ADN	Mélange MSI/MSS Peu de variations du nombre de copies somatiques de l'ADN CIMP-low	Proportion importante d'altérations du nombre de copies somatiques de l'ADN
Mutations <i>BRAF</i>		Mutations <i>KRAS</i>	
Infiltration immunitaire & Activation	Activation des voies Wnt et MYC	Dérégulations métaboliques	Infiltration stromale, activation de la voie TGF- β , angiogenèse
Survie très faible post-rechute			Survie globale très faible

De manière générale, les cancers de type CMS1 dérivent de polypes festonnés sessiles et présentent un phénotype MSI. Les CMS2 sont issus d'adénomes empruntant la voie canonique de carcinogenèse des cancers coliques et représentent la proportion la plus importante en termes de prévalence. Les CMS3 rassemblent des paramètres des CMS1 et 2 et sont caractérisés par une hypermutation de *KRAS*. Enfin, les CMS4 sont caractérisés par une TEM importante du fait de la forte signalisation TGF- β notamment, couplée à une forte inflammation et angiogenèse, et sont de fait souvent de mauvais pronostic (Figure 10).

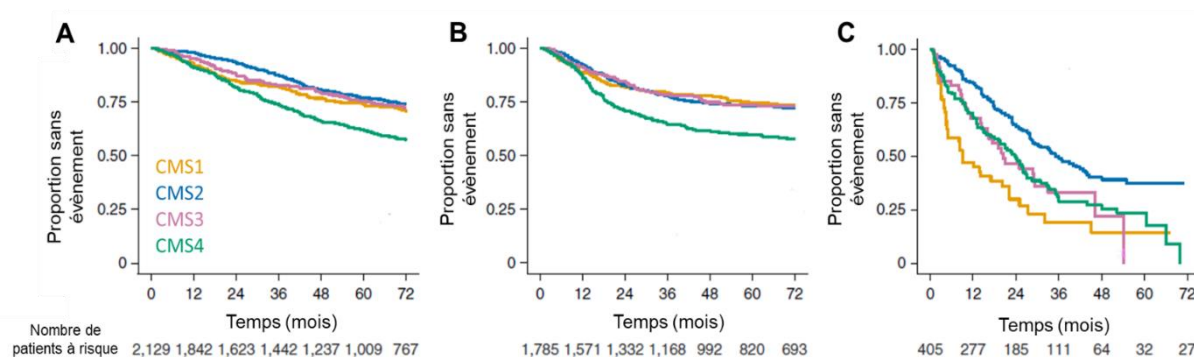


Figure 10 - Pronostics de survie des patients de cancer colorectal en fonction du statut CMS, d'après Guinney *et al.*, 2015.

A : survie globale ; **B** : survie sans rechute post-traitement ; **C** : survie après rechute post-traitement

Au même titre que l'on observe des différences cliniques entre le côlon droit et le côlon gauche (tumeurs coliques gauches : prépondérantes chez les hommes, mais également volumineuses, et se diagnostiquant le plus souvent chez les personnes âgées à un stade d'occlusion), ceux-ci ne sont pas égaux non plus en termes de statut mutationnel ou de classification moléculaire ((Dekker *et al.* 2019) ; Figure 11).

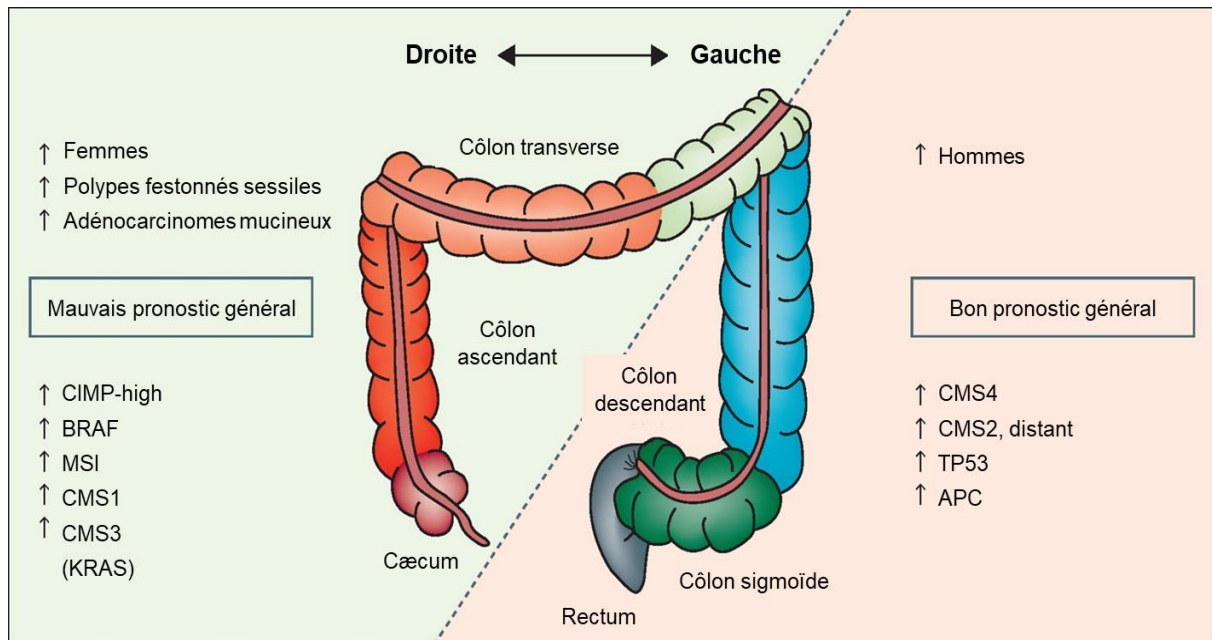


Figure 11 - Localisation anatomique des cancers coliques en fonction de leur statut mutationnel et de leur classification moléculaire, d'après Dekker *et al.* 2019.

Devant la diversité de cancers coliques, il est aujourd'hui encore impossible de contrer tous les cancers de la même façon. Toutefois, différentes stratégies thérapeutiques ont permis d'endiguer les taux de mortalité dans les pays disposant de moyens de santé avancés. A l'heure actuelle, grâce à l'arsenal thérapeutique que nous allons présenter ci-après, tous stades confondus, la survie à 5 ans du cancer du côlon est d'environ 63 % (Santé Publique France 2018).

1.2.4. Prise en charge thérapeutique du cancer colique

1.2.4.1. Bases thérapeutiques

Le moyen le plus efficace de traiter et guérir un cancer colique reste aujourd'hui l'exérèse chirurgicale, appelée colectomie, consistant à opérer le patient pour enlever la tumeur, associée à un curage ganglionnaire. Un minimum de 12 ganglions doit être emporté avec la tumeur afin de savoir s'il existe un envahissement de la tumeur au sein de ces ganglions et ainsi adapter les traitements ultérieurs (Société canadienne du cancer 2022). Cependant, malgré l'augmentation du nombre de campagnes de dépistage et l'amélioration des tests diagnostiques, les diagnostics de cancer du côlon se font encore trop tardivement dans la majorité des cas. Dès lors, d'autres stratégies sont employées en fonction de la localisation, du stade de la tumeur, et/ou de l'état de santé du patient afin d'améliorer leur survie. Malgré ces stratégies, il n'est pas rare d'observer des rechutes post-traitement, conséquences de résistances thérapeutiques.

I.2.4.1.1. Chimiothérapies

Dans le cas des cancers coliques, la radiothérapie est généralement non recommandée en raison de difficultés de ciblage, d'invasion tumorale éloignée et de la proximité de structures critiques environnantes telles que l'intestin grêle, ce qui limiterait l'administration d'une dose tumoricide.

La chimiothérapie constitue donc le moyen de lutte le plus efficace entourant le geste de la chirurgie dans le cadre de la prise en charge des tumeurs coliques. Historiquement, trois molécules sont principalement utilisées : le 5-fluorouracile (5-FU), l'oxaliplatine (Eloxatine™ ; OX) et l'irinotécan (Campto™ ; IRI). Celles-ci peuvent être administrées avant ou après l'exérèse chirurgicale et on parle alors de chimiothérapie néoadjuvante et adjuvante, respectivement. Dans le premier cas, la chimiothérapie est administrée dans le but d'induire une réduction de la taille tumorale, on parle également de chimiothérapie inductive ou d'induction. Cette méthode est en cours d'évaluation car elle n'est pas dans les recommandations actuelles ; le « Thésaurus National de Cancérologie Digestive 2021 » émet seulement un avis d'expert pour la discuter en préopératoire de tumeur volumineuse T4 (Annexe 1). Cependant, les premiers résultats d'essais cliniques semblent prometteurs (études FOxTROT 1 et Prodigé 22, Karoui *et al.* 2020; Body *et al.* 2021). La chimiothérapie adjuvante, quant à elle, est administrée en post-opératoire dans le but de cibler les éventuelles cellules cancéreuses résiduelles, s'il existe des facteurs péjoratifs tels qu'un envahissement ganglionnaire, un statut MSS, des embols vasculaires ou nerveux, en particulier (Thésaurus National de Cancérologie Digestive [TNCD], Cancer du côlon, non métastatique, Mai 2021 ; <https://www.snfge.org/tncd> et <http://www.tncd.org>).

Le 5-FU est la chimiothérapie de référence dans la prise en charge du cancer colique. Cette molécule a pour effet d'interférer avec le renouvellement des bases des acides nucléiques. Le 5-FU, par définition, a une structure proche de l'uracile, précurseur de la thymine (via une méthylation par la thymidilate-synthase), et est également l'une des bases pyrimidiques composant l'ARN. Le 5-FU est alors métabolisé en 5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate (5-FdUMP), et interfère avec la méthylation de l'uracile par association avec de l'acide folinique (ou leucovorine, Lederfoline™ ; FOL). Dès lors, un traitement au 5-FU entraînera un ralentissement de la prolifération cellulaire par altération de la synthèse d'ADN, par induction d'erreurs dans les séquences d'ARN, et sera responsable *in fine* de dommages à l'ADN importants menant à l'apoptose. De plus, il apparaît que l'acide folinique potentialise l'effet du 5-FU. Il est important de noter que la capécitabine, molécule de la famille des fluoropyrimidines agissant comme un précurseur du 5-FU, peut également être utilisée (médicament Xeloda®), avec une efficacité similaire au couple 5-FU et FOL (Twelves *et al.* 2005). De plus, les patients présentant un défaut de l'enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) sont exposés à des toxicités élevées par non-élimination des métabolites du 5-FU, critère à prendre en compte lors de l'examen clinique dans le cadre de la résistance à cette molécule.

L'oxaliplatine est un sel de platine induisant des altérations de la synthèse d'ADN en formant des liaisons intra- et inter-brins. Un traitement à l'oxaliplatine entraînera donc également une inhibition de la prolifération cellulaire et une mort par apoptose du fait des dommages à l'ADN créés.

L'irinotécan est un dérivé de la camptothécine, alcaloïde inhibant la topoisomérase I. Ce type de molécule induit dès lors des dommages à l'ADN simple brin par blocage de la fourche de réplication. Ainsi, la synthèse d'ADN sera également perturbée et des lésions trop importantes entraîneront la mort cellulaire par apoptose.

Ces différentes chimiothérapies ont pour point commun d'affecter l'ADN et/ou sa synthèse, menant à l'apoptose cellulaire. Des combinaisons de ces molécules peuvent alors être administrées pour potentialiser les effets antitumoraux. Comme introduit précédemment, le 5-FU est très généralement associé à l'acide folinique qui potentialise ses effets. Dès lors, on parle de FOLFOX pour la combinaison 5-FU/FOL/Oxaliplatine, et de FOLFIRI pour la combinaison 5-FU/FOL/Irinotécan (Hervieu *et al.* 2021). Cependant, malgré ces combinaisons et l'amélioration globale de la prise en charge thérapeutique des cancers coliques ayant permis d'améliorer la survie des patients, des récurrences post-traitement sont recensées, d'où la nécessité d'associer ces traitements avec des thérapies ciblées.

I.2.4.1.2. Thérapies ciblées

Ces thérapies reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant essentiellement des acteurs de l'angiogenèse ou des voies de signalisation activées lors du développement cancéreux. Notamment, on retrouve des anticorps anti-VEGF et anti-EGFR (récepteur au facteur de croissance épidermique).

I.2.4.1.2.1. Voie du VEGF

Le VEGF étant le facteur de croissance des vaisseaux sanguins, celui-ci est sécrété par les cellules tumorales (ou celles du micro-environnement) afin de favoriser la croissance vasculaire et, de ce fait, l'angiogenèse. C'est pourquoi sa signalisation constitue une cible de choix pour endiguer le processus angiogénique et *in fine* la propagation métastatique. Le principal anticorps commercial développé dans ce cadre est le bevacizumab (Avastin™), qui reconnaît spécifiquement le VEGF sous forme soluble. Celui-ci est alors proposé en complément d'une chimiothérapie pour améliorer ses effets dans le cadre du cancer colique métastatique notamment, malgré des effets secondaires importants (You *et al.* 2020; Garcia *et al.* 2020; Galfrascoli *et al.* 2011).

I.2.4.1.2.2. Anti-EGFR

De la même manière que pour le VEGF, des anticorps monoclonaux ont été développés pour bloquer la signalisation de l'EGFR. Ce récepteur à tyrosine kinase est activé par liaison d'un ligand, principalement l'EGF (« epidermal growth factor »), ce qui entraîne l'activation des voies de signalisation des MAP-kinases (RAS, RAF) ou des PI3K/AKT, impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires. Cette voie est de ce fait une cible de choix dans le cadre du traitement des cancers coliques. De plus, cette signalisation est connue pour être impliquée dans l'agressivité tumorale, et notamment le processus métastatique, ce-dernier étant très retrouvé dans les cancers coliques. Les anti-EGFR principaux sont le cetuximab (Erbix™) et le panitumumab (Vectibix™). Cependant, des résistances sont fréquemment observées et ces anticorps ne sont indiqués que chez les patients ne présentant pas de mutation de *KRAS*.

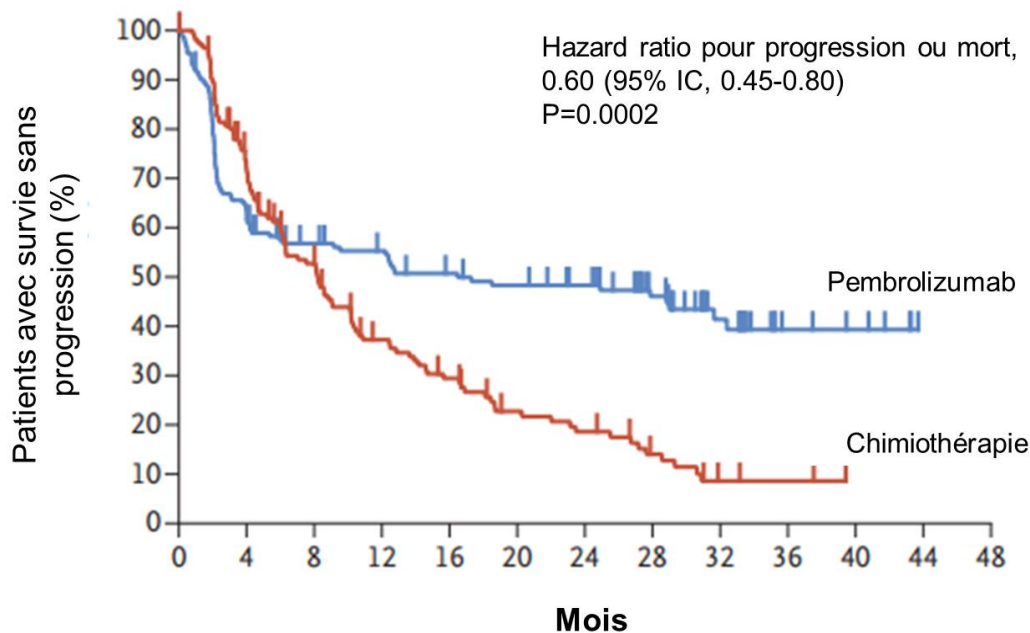
Les anticorps monoclonaux ne sont pas les seules stratégies thérapeutiques mises en place pour lutter contre l'activation de la voie du VEGF ou de l'EGFR. En effet, des inhibiteurs des récepteurs à tyrosine kinase (« tyrosine kinase inhibitors » ou TKI) peuvent être proposés en tant que thérapies ciblées.

I.2.4.1.2.3. Nouvelles thérapies

Malgré l'évolution importante de la thérapeutique dans la lutte contre le cancer du côlon, de nouvelles thérapies sont aujourd'hui à l'essai et doivent encore faire leurs preuves.

Dans le cadre du traitement des cancers coliques métastatiques, la chimiothérapie intrapéritonéale peut être proposée (Christou *et al.* 2021). En effet, une partie des métastases générées par les cancers coliques peut être localisée dans la cavité péritonéale sous la dénomination de carcinose péritonéale. La chimiothérapie intrapéritonéale (CHIP) consiste en une perfusion d'agents chimiothérapeutiques, principalement de la mitomycine C ou de l'oxaliplatine, au sein du péritoine. On distingue alors l'HIPEC (en conditions hyperthermiques), et la PIPAC (pressurisée par aérosols). Dans la première condition, la plus courante, l'augmentation de la température (environ 40°C) favorise la pénétration des agents chimiothérapeutiques dans les tissus. L'HIPEC peut être réalisée à ventre ouvert ou à ventre fermé, auquel cas il est nécessaire de la réaliser directement après le geste de « cytoréduction » (résection d'un ou de plusieurs organes atteints par le cancer) pour faire en sorte que les cellules cancéreuses résiduelles soient toujours atteignables. Dans le cas de la PIPAC, c'est l'augmentation de la pression au sein du péritoine qui va favoriser la pénétration des drogues. Ces deux techniques alternatives ont d'ores et déjà permis d'améliorer la survie des patients et sont encore aujourd'hui en amélioration.

D'autre part, les immunothérapies sont à l'étude dans le cadre du traitement des cancers coliques. Ce genre de thérapie est basé sur la restauration du contrôle immunitaire au sein des tumeurs. En effet, les tumeurs agressives ont la capacité d'outrepasser ce contrôle : c'est l'échappement immunitaire. Ce contrôle procède, en conditions physiologiques, par l'expression de points de contrôles (« checkpoints ») immunitaires à la surface des lymphocytes T (LT), molécules inhibitrices permettant de réguler la réponse immunitaire (Granier *et al.* 2017). Deux exemples majeurs de ces checkpoints sont CTLA-4 (« cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 ») et PD-1 (« programmed cell death 1 »), qui sont exprimées à la surface des LT en cas de contact prolongé avec un antigène, comme au cours des processus inflammatoires chroniques ou des cancers. Ainsi, lorsque ces molécules persistent à la surface des LT, et qu'elles reconnaissent leur ligand (CD80/CD86, ou PD-L1/PD-L2, respectivement), elles ont pour effet d'inhiber leur activité. Dès lors, l'utilisation d'anticorps ciblant CTLA-4 ou PD-1 (anti-CTLA-4 ou anti PD-1) a été introduite dans le but de rétablir la réponse immune au sein des tumeurs afin de faciliter leur élimination. Le premier anti-CTLA-4 à avoir été mis sur le marché est l'ipilimumab (Yervoy[®]), bloquant l'interaction de CTLA-4 avec ses ligands ; il est utilisé en combinaison avec l'anti-PD1 nivolumab (Opdivo[®]) dans le cadre de l'essai clinique « CheckMate 142 » aux États-Unis pour le traitement des cancers coliques métastatiques MSI-high (Overman *et al.* 2018; Lenz *et al.* 2022). De la même manière, le pembrolizumab (Keytruda[®]) fait l'objet d'un essai clinique en phase III (étude KEYNOTE-177) et semble montrer une survie sans progression (« progression-free survival », PFS) plus importante comparée aux chimiothérapies chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique MSI-high (André *et al.* 2020; [Figure 12](#)).



Nb de patients à risque

Pembrolizumab	153	96	77	72	64	60	55	37	20	7	5	0	0
Chemiothérapie	154	100	68	43	33	22	18	11	4	3	0	0	0

Figure 12 - Survie sans progression de patients atteints de CCR métastatique MSI-high après traitement au pembrolizumab en première ligne comparée à celle de patients traités par chimiothérapie en première ligne, d'après André *et al.* 2020

I.2.4.1.3. Résistances thérapeutiques

Cependant, malgré toutes les thérapies développées et mises en œuvre dans la lutte contre le cancer colique, on constate encore aujourd'hui l'apparition de récives post-traitements, dues à la mise en place de mécanismes de résistances thérapeutiques au sein des tumeurs (Gorlick et Banerjee 2002). Celle-ci peut être innée, c'est-à-dire due à un contexte tumoral prévenant l'efficacité des traitements utilisés, ou acquise, c'est-à-dire due à une sélection de cellules ayant acquis une résistance suite à l'exposition aux thérapies. Dans les deux cas, ces phénomènes de résistance peuvent être expliqués par une hétérogénéité cellulaire importante au sein des tumeurs, par la présence de cellules possédant des caractéristiques leur permettant d'outrepasser les différents traitements, que cela soit de manière innée ou par l'activation de signalisations cellulaires déclenchant la résistance. Ces conditions correspondent au modèle proposé par Hanahan et Weinberg en 2000 et révisé en 2011 indiquant l'acquisition de capacités (« hallmarks ») par les cellules cancéreuses, et notamment les cellules souches cancéreuses ((Hanahan et Weinberg 2000; 2011); [Figure 13](#)).

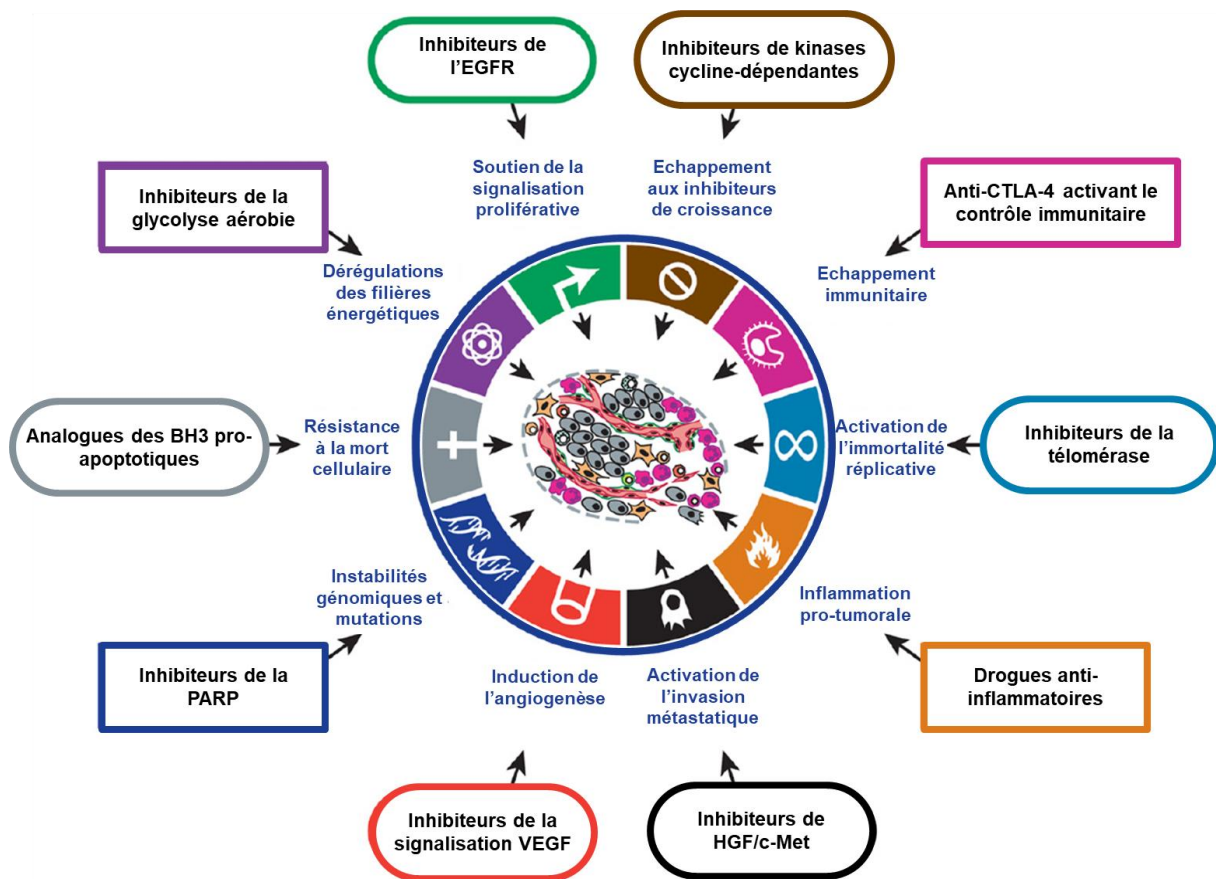


Figure 13 - "Hallmarks" du cancer et thérapies proposées pour contrer les différentes aptitudes acquises par les cellules tumorales – Adapté de Hanahan & Weinberg, 2011

I.2.5. Cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSCs), aussi appelées parfois « cellules initiatrices de cancer » ou « de tumeur » (CIC ou CIT), représentent un concept apparu dans les années 1970 et dont l'étude a pris de l'importance au début des années 2000 avec la mise en évidence de leur existence dans les cancers du sein et du cerveau notamment (Pierce et Wallace 1971; Al-Hajj *et al.* 2003; S. K. Singh *et al.* 2003; Clevers 2011; Nguyen et Duong 2018). Ces découvertes font suite à un intérêt tout particulier de la communauté scientifique sur le sujet des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) notamment par des essais de xénotransferts sur des souris ayant permis de régénérer des tissus. En effet, des similitudes avec les propriétés de régénération de ces HSCs ont également été observées dans le cadre de xénotransferts de tumeurs chez des souris (Al-Hajj *et al.* 2003; S. K. Singh *et al.* 2003). Notamment, les CSCs présentent un caractère multipotent et une capacité d'auto-renouvellement quasiment infini. Toutefois, elles présentent le plus souvent un cycle cellulaire lent, proche de la quiescence, caractéristique leur conférant d'emblée une certaine chimiorésistance. En effet, comme énoncé précédemment, les chimiothérapies utilisées ciblent la réplication de l'ADN, et de ce fait, la plupart des CSCs échappent à la toxicité induite par les traitements chimiothérapeutiques par leur caractère quasi-quiescent.

Son intérêt grandissant, le concept de CSC a alors soulevé la question de l'hétérogénéité tumorale : quelle est la place de telles cellules dans la génération des différents types cellulaires composant une tumeur ? En effet, l'idée initiale d'une tumeur homogène a laissé place à l'observation d'une hétérogénéité cellulaire au sein des tumeurs. Dès lors, deux modèles ont été proposés par Dick en 2008 : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (Dick 2008). D'après ses observations, le modèle stochastique défend le fait qu'une relative homogénéité tumorale vient à être perturbée par la réception de signaux internes ou externes à la tumeur (facteurs de transcription, addition de mutations, signaux du microenvironnement tumoral), entraînant la génération de cellules différentes, ayant toutes une capacité de division et de différenciation importante. A l'inverse, selon le modèle hiérarchique, une tumeur présente, à l'image d'un tissu, une hiérarchie entre les cellules souches permettant le renouvellement et la génération des différents types cellulaires la composant ((Clevers 2011); Figure 14).



Figure 14 - Comparaison des modèles stochastique et hiérarchique, et introduction du concept de cellules souches cancéreuses (CSC), adapté de Biorender.com

Au vu de ces théories, cibler les CSCs dans le cadre du traitement cancéreux constituerait une solution de choix. Cependant, cette population de CSC est peu représentée au sein des tumeurs (de l'ordre de 1% ; (Pisco et Huang 2015)) et est de ce fait difficilement identifiable. Associé à leur faible représentation, le manque de marqueur spécifique de cette population rend leur ciblage quasiment impossible encore aujourd'hui. Certains marqueurs ont tout de même pu être identifiés dans différents cancers comme étant associés au phénotype CSC.

Par exemple, la prominine-1 ou CD133 a été la première protéine de surface à être identifiée comme marqueur de cellules initiant des tumeurs dans le cancer cérébral (S. K. Singh *et al.* 2003), avant d'être étendu à d'autres tumeurs. En effet, l'isolement de cellules présentant cette glycoprotéine de surface (CD133⁺) semble coïncider avec la formation de tumeurs coliques dans des souris immunodéficientes (Ricci-Vitiani *et al.* 2007). Ce marqueur a été depuis sujet à la controverse, suite à la mise en évidence de la formation de tumeurs coliques par des cellules CD133⁻ (Shmelkov *et al.* 2008). Cette découverte a alors précipité la recherche d'autres marqueurs des CSCs.

Le CD44, également une glycoprotéine de surface, et notamment son exon CD44v6, a été mis en évidence dans la migration tumorale et la génération de métastases dans le cadre du cancer du côlon (Todaro *et al.* 2014). De plus, il est généralement retrouvé surexprimé en association avec CD133 (Zhou *et al.* 2016), CD166 (Manhas *et al.* 2016) ou encore EpCAM (« Epithelial cell adhesion molecule ») (Satar *et al.* 2018; Leng *et al.* 2018)). Ce-dernier a été également identifié comme étant impliqué dans le phénotype CSC, entre autres dans le cancer colique. Le CD166 (glycoprotéine de surface), serait alors lui aussi associé à ce phénotype souche, en association avec CD44 et EpCAM, dans les tumeurs solides (Walcher *et al.* 2020).

Enfin, un des marqueurs les plus étudiés dans le cadre des cellules souches cancéreuses coliques est LGR5 (Leng *et al.* 2018). Cependant, comme vu précédemment, celui-ci est exprimé également par les cellules souches intestinales. De ce fait, il paraît difficile d'identifier les CSC seules à l'aide de ce marqueur uniquement. C'est pourquoi les études portant sur les CSC se focalisent sur l'isolement de cellules présentant au moins deux, voire trois marqueurs différents afin d'attester de la présence de CSC dans les échantillons cellulaires (Leng *et al.* 2018; Walcher *et al.* 2020)

La recherche de CSC peut également se faire par l'étude de l'expression de facteurs de transcription tels que *OCT4* (*POU5F1*), *NANOG*, *KLF4* (« Kruppel-like factor »), *MYC* ou encore *SOX2* (« SRY-box transcription factor 2 »), impliqués dans la pluripotence ou encore le maintien de la dédifférenciation cellulaire (Yang *et al.* 2020; Walcher *et al.* 2020). De même, certains facteurs de transcription dont l'activation est associée à la TEM peuvent être étudiés : *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST* et *ZEB1*, agissant notamment en réprimant l'expression d'une protéine d'adhésion cellulaire : l'E-cadhérine.

Si le concept de CSC est aujourd'hui relativement admis dans la communauté scientifique, il n'en demeure pas moins que leur origine reste indéterminée. Ainsi, deux hypothèses sont proposées : soit les CSCs dérivent exclusivement des cellules souches tissulaires, soit elles proviennent de la dédifférenciation de cellules tumorales différenciées acquérant des propriétés souches. Toutefois, ces deux modèles ne sont pas à opposer puisqu'ils semblent cohabiter, caractère relevant de la plasticité et de l'hétérogénéité des CSCs au sein des tumeurs (Mélin *et al.* 2015).

Par exemple, d'une part, la signalisation Wnt, très sollicitée dans les cryptes de Lieberkühn pour le maintien des cellules souches intestinales (CSI), est également activée constitutivement à la suite d'altérations génétiques dans le cadre du cancer colique, indiquant que des CSCs peuvent dériver de CSI ou de cellules progénitrices (van de Wetering *et al.* 2002; Barker *et al.* 2009). La présence du marqueur LGR5 à la surface des cellules peut également indiquer une origine souche intestinale.

D'autre part, sous l'exposition à différents stimuli provenant du microenvironnement tumoral, des cellules différenciées peuvent entrer en dédifférenciation et entraîner la tumorigénèse, comme observé dans le cancer colorectal dans un contexte inflammatoire accompagné de l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Schwitalla *et al.* 2013).

Cette dernière notion fait appel au rôle de la niche tumorale, environnement permettant de maintenir le potentiel « souche » dans les CSCs, et ainsi maintenir l'agressivité tumorale. En effet, les contraintes physico-chimiques (hypoxie, stress oxydant) au sein de cet environnement favorisent la quiescence des CSCs, et de ce fait potentialisent leur échappement aux chimiothérapies ciblant les cellules proliférantes. De plus, au sein de cette niche, se trouve un type cellulaire particulier : les fibroblastes associés au cancer (« cancer-associated fibroblasts », CAF). Ces CAFs sont issus soit de fibroblastes initialement présents dans le tissu où s'est formée la tumeur, soit de cellules mésenchymateuses, et sont activés par la sécrétion de cytokines et en particulier le TGF- β , par les cellules cancéreuses. Ainsi, une fois activés, ils permettent la promotion de l'inflammation au sein de la tumeur, le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) notamment par la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP) dégradant la MEC, l'activation des voies de survie et de prolifération (Wnt, PI3K etc.), et la sécrétion de facteurs de croissance promouvant l'invasion tumorale ainsi que l'angiogénèse (VEGF (Albregues, Meneguzzi, et Gaggioli 2014)). Tous ces événements contribuent alors au maintien de la population CSC au sein des tumeurs.

Parmi ces événements, le remodelage de la MMP et l'angiogénèse constituent des étapes importantes pour le développement métastatique. En effet, la fabrication de nouveaux vaisseaux sanguins et le raccordement à la circulation systémique permettent à certaines cellules épithéliales cancéreuses de se détacher pour migrer vers un site différent et y former des métastases. Ce détachement est possible grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse.

1.2.6. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Le processus métastatique consiste en l'invasion de sites distants de la tumeur primaire, et est responsable de 90% des morts associées au cancer (Gupta et Massagué 2006). Particulièrement, le cancer colique est un cancer hautement métastatique, produisant généralement des métastases au niveau du foie, des poumons, ou encore de la cavité péritonéale. Ce phénomène requiert alors que certaines cellules épithéliales cancéreuses se dissocient de leurs voisines et de la MEC. En se dissociant, les caractéristiques épithéliales (polarité, jonctions cellulaires) sont alors perdues au profit de caractéristiques mésenchymateuses (expression de vimentine, fibronectine), conférant aux cellules des aptitudes migratoires notamment. Ce processus appelé « transition épithélio-mésenchymateuse » ou TEM est alors activé pour permettre à certaines cellules cancéreuses de migrer. Ce processus est alors généralement caractérisé par une perte d'expression de marqueurs épithéliaux, et notamment l'E-cadhérine, protéine transmembranaire impliquée dans les jonctions adhérentes.

Concomitamment, on observe une augmentation de la sécrétion de MMP par ces cellules, dont le rôle est de dégrader la MEC pour faciliter l'invasion et l'accès aux vaisseaux sanguins. Ainsi, les cellules procédant à la TEM pénètrent les vaisseaux sanguins (intravasation), dans lesquels elles sont communément appelées « cellules tumorales circulantes » (CTC), puis en ressortent (extravasation) pour réaliser le processus inverse : la transition mésenchymo-épithéliale (TME), par laquelle on observe une réacquisition de caractéristiques épithéliales et la formation de métastases distantes ((Lamouille, Xu, et Derynck 2014) Figure 15).

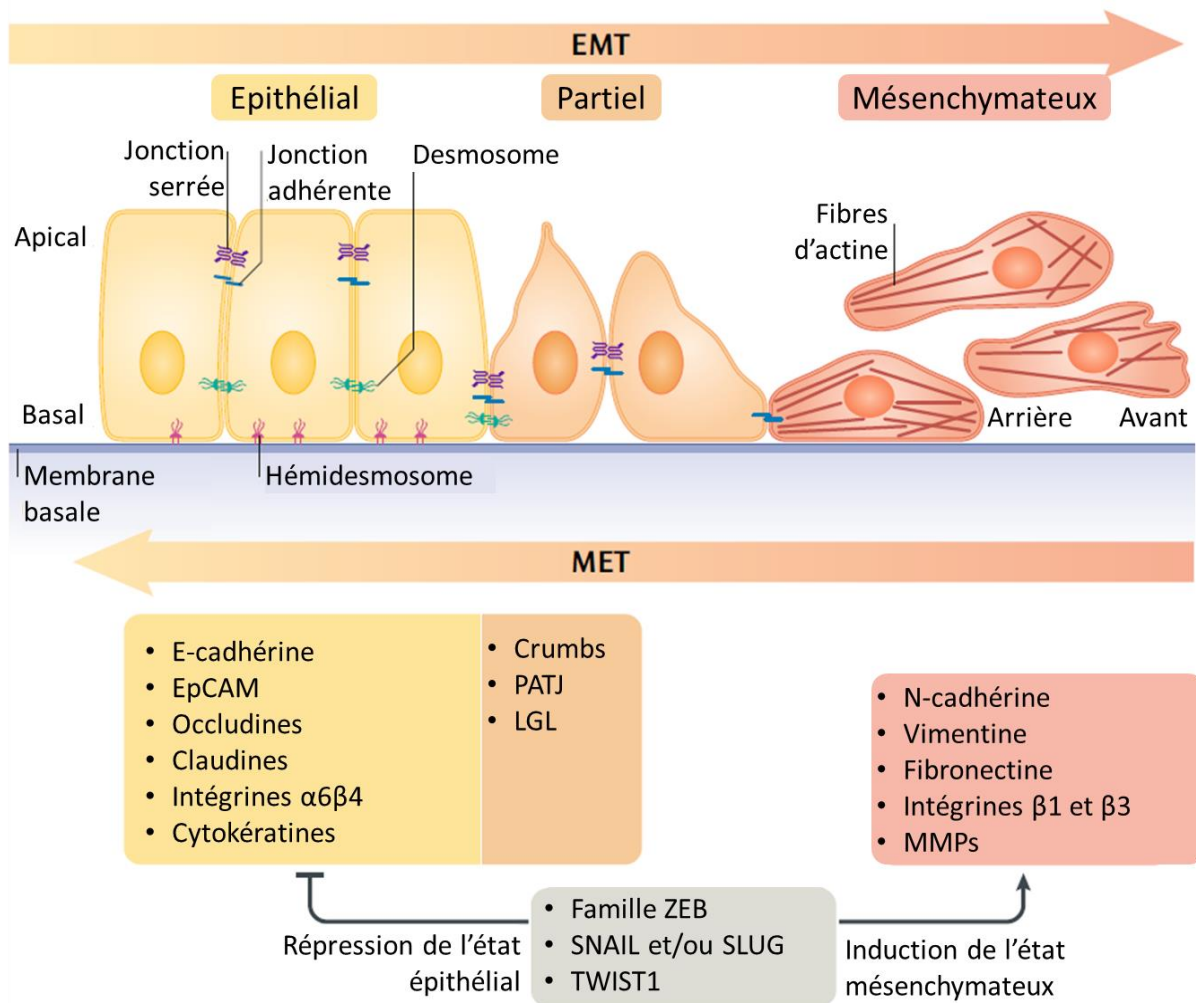


Figure 15 - Représentation schématiques du processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et du processus inverse de transition mésenchymo-épithéliale (TME), adapté de Dongre & Weinberg, 2018.

EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; MET : transition mésenchymo-épithéliale ; EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule ; PATJ : PALS1-associated tight junction protein ; LGL : lethal giant larvae ; MMPs : métalloprotéases matricielles

Ce processus de TEM est étroitement lié à l'acquisition par les cellules cancéreuses d'un phénotype CSC. En effet, la TEM est favorisée par l'expression de facteurs de transcription notamment impliqués dans l'inhibition de l'expression de l'E-cadhérine (SNAIL1, SNAIL2, TWIST, ZEB1 etc.), également exprimés par les CSCs. De même, on remarque que certaines voies de signalisation, caractéristiquement activées dans les CSCs, le sont également dans les cellules procédant à la TEM. Notamment, on observe une augmentation de la signalisation TGF- β et des voies Wnt et Notch dans ces cellules, en particulier dans le cancer colique (Shipitsin *et al.* 2007; Vermeulen *et al.* 2010).

En se fixant sur son récepteur, le TGF- β permet de déclencher une activation des protéines SMAD2 et 3 (voie parallèle à celle des BMPs), activant *in fine* des facteurs de transcriptions, tels que SNAIL, associés à la TEM (Peinado, Olmeda, et Cano 2007; Lamouille, Xu, et Derynck 2014). De même, l'activation constitutive de la voie Wnt associée au développement du cancer colique entraîne une accumulation de β -caténine au niveau nucléaire, ce qui déclenche l'activation des facteurs de transcriptions régulant l'expression de l'E-cadhérine. Ces deux voies TGF- β et Wnt semblent alors coopérer dans la régulation des gènes impliqués dans la TEM (Thiery et Sleeman 2006). La voie TGF- β semble également être impliquée dans l'activation de la voie Notch dans le processus de TEM, renforçant l'implication des facteurs de transcription associés (Zavadil *et al.* 2004). D'autre part, les voies de signalisation activées par le biais des facteurs de croissance (EGF, VEGF, PDGF : « platelet-derived growth factor ») sont également impliquées dans l'activation des facteurs de transcription SNAIL1, SNAIL2, TWIST et ZEB1. En effet, la voie RAS-MAPK jouerait un rôle dans la régulation de la migration et de l'invasion cellulaire par l'intermédiaire des Rho-GTPases, et également en activant le facteur TWIST ou ZEB1 (Makrodouli *et al.* 2011). La voie PI3K/AKT quant à elle peut être activée par une signalisation dite « non-canonique » du TGF- β : une inhibition de la PI3K entraîne un arrêt de la TEM si celle-ci est induite par la signalisation TGF- β (Bakin *et al.* 2000; Cao *et al.* 2015).

Ainsi, l'agressivité tumorale est supportée par une activation de la transition épithélio-mésenchymateuse chez des cellules cancéreuses présentant des caractéristiques de type CSC, favorisant alors l'invasion métastatique. Toutefois, de nouvelles perspectives semblent voir le jour avec un concept relativement récent : les cellules hybrides épithéliales/mésenchymateuses, ou E/M. Ces observations semblent aller dans le sens de récentes controverses au sujet de la TEM et de sa réelle importance dans le processus métastatique (Diepenbruck et Christofori 2016).

1.2.7. Cellules hybrides E/M et agressivité tumorale

L'agressivité tumorale est avant tout due à la plasticité des cellules cancéreuses composant la tumeur. Cette plasticité peut présenter différents aspects selon si l'on s'adresse au caractère souche, au caractère épithélial ou mésenchymateux, ou au métabolisme, entre autres (Pasani, Sahoo, et Jolly 2020; Bornes, Belthier, et van Rheenen 2021). Ainsi, si l'on s'intéresse à la plasticité épithéliale/mésenchymateuse (PEM), la TEM, telle que présentée précédemment, semble s'inscrire pleinement dans ce cadre. Cependant, rien n'est réellement binaire. En effet, la TEM totale, c'est-à-dire l'acquisition d'un phénotype entièrement mésenchymateux par une cellule épithéliale, ne semble pas correspondre à l'agressivité la plus importante, et ne serait pas essentielle dans le processus métastatique, voire serait même parfois contre-productive (Celià-Terrassa *et al.* 2012; Liu *et al.* 2014).

A l'inverse, une TEM dite « partielle », c'est-à-dire présentant différents stades intermédiaires entre les phénotypes épithélial et mésenchymateux, semble plus réaliste et plus caractéristique des CSCs (Grosse-Wilde *et al.* 2015; Kröger *et al.* 2019). On parle alors de cellules possédant un phénotype hybride épithélial/mésenchymateux (E/M). En effet, il a été démontré que des cellules tumorales présentant un phénotype E/M sont plus agressives, pénètrent plus rapidement et plus efficacement les vaisseaux sanguins et envahissent plus facilement les tissus distants (Pastushenko *et al.* 2018). De plus, ce phénotype hybride E/M permettrait également d'activer les CAFs et de contribuer au remodelage de la MEC dans les cellules de cancer colique (Druzhkova *et al.* 2020).

Les cellules hybrides E/M présentent alors des caractéristiques à la fois de cellules épithéliales et de cellules mésenchymateuses, que cela soit du point de vue de l'expression de marqueurs phénotypiques, ou de la morphologie des cellules. En effet, des cellules hybrides E/M ont tendance à présenter une forme plus allongée caractéristique des cellules mésenchymateuses, sans toutefois perdre totalement l'expression de l'E-cadhérine (Jolly *et al.* 2019). Ces récentes perspectives mettent en évidence que l'étude seule des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux n'est pas suffisante, et que selon le contexte tumoral ou le tissu concerné, les cellules procédant à la TEM n'ont pas nécessairement le même destin. La TEM ne serait alors pas essentielle pour le développement métastatique, qui serait davantage potentialisé par la migration collective de cellules formant des clusters (Jolly *et al.* 2015; Cheung et Ewald 2016; Jolly *et al.* 2019).

De surcroît, l'agressivité tumorale peut être supportée par la plasticité des cellules souches cancéreuses, comme évoqué plus haut. Dans le cadre du développement de cette propriété, ces cellules ont recourt à deux mécanismes faisant intervenir le trafic vésiculaire : l'autophagie et la sécrétion de vésicules extracellulaires.

Chapitre II. Autophagie, vésicules extracellulaires et cancer

Dans le cadre du maintien de l'homéostasie cellulaire, les cellules eucaryotes disposent de mécanismes faisant appel à l'intervention de vésicules intra- et extracellulaires, que cela soit pour le recyclage d'éléments cytoplasmiques, le transport de déchets cellulaires, ou encore à des fins de communication. Parmi ces processus, l'autophagie a pour rôle principal la dégradation lysosomale de composés « défaillants », en complément du protéasome.

II.1. L'autophagie

II.1.1. Généralités sur l'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique de recyclage très conservé au cours de l'évolution se mettant en place au sein des cellules dans le cadre du maintien de l'homéostasie cellulaire. Son nom provient du grec « αυτο » (« soi-même ») et « φαγειν » (« manger »), traduisant le fait que la cellule se « mange elle-même ». Plus précisément, ce sont les éléments défectueux, surnuméraires au sein de la cellule, aussi bien organites que protéines ou lipides, qui sont recyclés, permettant l'utilisation du produit de dégradation pour reconstituer des éléments fonctionnels et récupérer ainsi de l'énergie. Il s'agit d'un mécanisme basal que n'importe quelle cellule utilise pour recycler des composants endommagés. Toutefois, l'autophagie peut être suractivée en conditions de stress tels que le stress nutritif en cas de jeûne (Alirezai *et al.* 2010; Kaushik *et al.* 2011), l'hypoxie ou encore lors de dommages causés à l'ADN (Kroemer, Mariño, et Levine 2010; Ravanan, Srikumar, et Talwar 2017).

Un tel mécanisme requiert la formation d'une vésicule à double membrane, spécifique de l'autophagie, appelée autophagosome, qui a pour rôle d'envelopper et d'acheminer le fragment cytoplasmique à recycler vers le lysosome. La fusion des deux éléments résulte alors en la formation d'un autophagolysosome ou autolysosome dans lequel le pH acide et la présence d'hydrolases permettent la dégradation du cargo (D. J. Klionsky 2000; Daniel J. Klionsky 2007; Mizushima 2007).

Le terme autophagie regroupe trois types selon la façon dont le contenu est sélectionné et acheminé vers le lysosome (Figure 16). On distingue alors la microautophagie de la macroautophagie (le terme « autophagie » sera utilisé pour faire référence à cette forme dans la suite de cet écrit), et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (« chaperone-mediated autophagy » en anglais, ou AMC).

Cette-dernière est une voie spécifique qui nécessite l'activité de la protéine HSC70 (Heat Shock Cognate 71 kDa protein), exerçant une sélection d'un substrat à dégrader par reconnaissance d'un motif de cinq acides aminés KFERQ ((Dice *et al.* 1985; Kaushik et Cuervo 2018). L'AMC est alors une voie exclusivement sélective qui permet la dégradation de protéines spécifiques comme la ribonucléase A (RNase A), et qui serait impliquée dans la prévention contre le vieillissement (Cuervo 2008).

La microautophagie, quant à elle, peut être à la fois être sélective ou non. Elle repose sur l'internalisation de contenus à dégrader, le plus souvent directement par invagination de la membrane lysosomale, mais elle peut également faire appel à la HSC70 lorsqu'un cargo spécifique doit être dégradé (Uttenweiler et Mayer 2008; Kaushik *et al.* 2011; Uytterhoeven *et al.* 2015).

Enfin, la macroautophagie, processus sur lequel ce travail s'est concentré, a longtemps été considérée comme non-sélective, par encerclement du contenu cytosolique dans un autophagosome à destination du lysosome, mais sa sélectivité est de plus en plus mise en avant. Elle intervient alors par reconnaissance de composés ubiquitylés (en complément du protéasome) ou d'organites, comme les mitochondries spécifiquement (mitophagie (Kaushik *et al.* 2011; Lazarou *et al.* 2015).

Il est également à noter que différents termes peuvent être employés selon le cargo ou le compartiment cytoplasmique concerné par une dégradation lysosomale par autophagie. On parlera par exemple de mitophagie dans le cadre de la dégradation autophagique de mitochondries, ou encore de xénophagie concernant la dégradation d'agents pathogènes comme les bactéries (Levine, Mizushima, et Virgin 2011; Randow 2011; Shahnazari et Brumell 2011; Mizushima, Yoshimori, et Ohsumi 2011; Lorenzo Galluzzi *et al.* 2017).

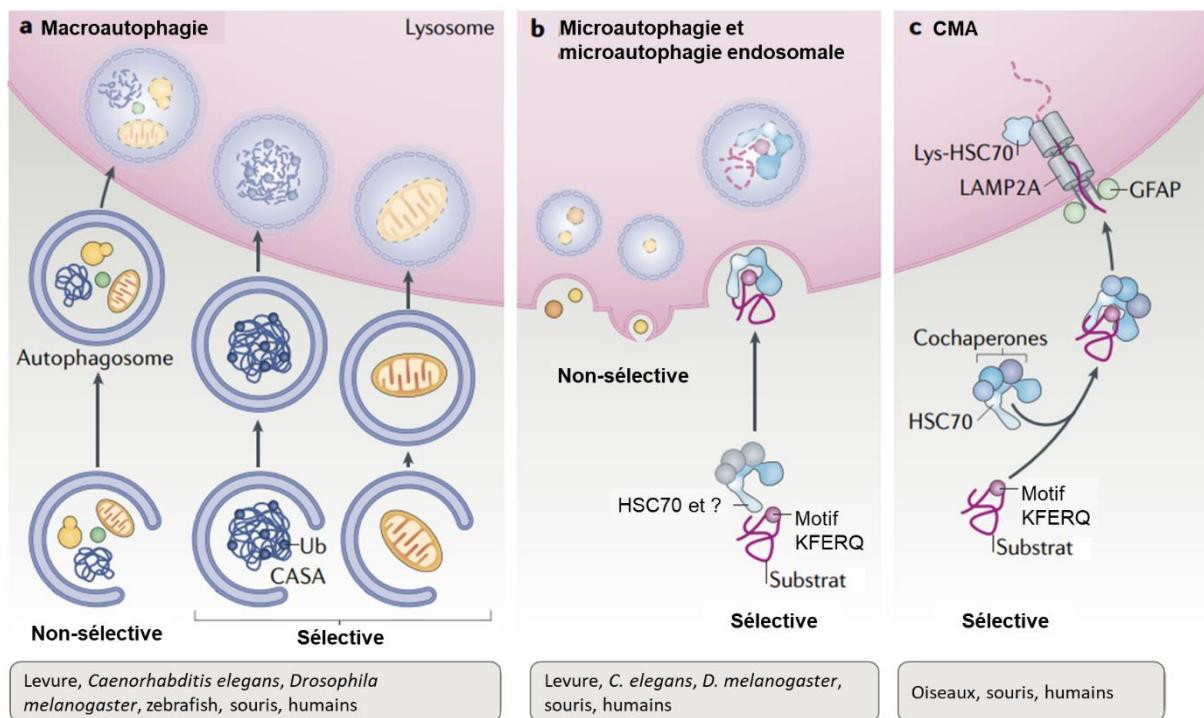


Figure 16 - Les différentes voies de l'autophagie, d'après Kaushik & Cuervo, 2018

CASA : chaperone-assisted selective autophagy ; HSC70 : heat shock cognate 71 kDa protein ; LAMP2A : lysosome-associated membrane protein 2A ; Ub : ubiquitine ; GFAP : glial fibrillary acidic protein

II.1.2. Mécanistique de l'autophagie

L'autophagie se divise en plusieurs étapes distinctes allant de l'initiation du processus par la formation du phagophore, à la dégradation du cargo, qui s'opère après fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Figure 17).

II.1.2.1. L'initiation

Tout d'abord, le complexe ULK (Unc-51-like kinase 1) initie la formation d'une membrane appelée phagophore ou membrane d'isolation. Chez la levure, cet évènement se déroule au niveau d'un site particulier appelé « structure pré-autophagosomale » (ou « site d'assemblage du phagophore », PAS). L'existence d'une telle structure n'ayant pas été démontrée chez les mammifères, il est *a priori* admis que l'initiation ait lieu au niveau des omégasomes, sous-domaines du RE riches en phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3-P (Axe *et al.* 2008; Hayashi-Nishino *et al.* 2009)).

Le complexe ULK est composé des protéines ULK1/2, FIP200 (200 kDa FAK Family Kinase-Interacting Protein), ATG13 et ATG101 (Hara *et al.* 2008; Hosokawa, Sasaki, *et al.* 2009; Jung *et al.* 2009; Ganley *et al.* 2009). Sa phosphorylation est la clé de sa régulation. En effet, en fonction des résidus phosphorylés, il peut être activé ou inhibé. La phosphorylation par l'adénosine monophosphate protéine kinase (AMPK), senseur du niveau énergétique, ou par autophosphorylation des différentes sous-unités du complexe conduit à l'activation ((J. Kim et Guan 2011; Alers *et al.* 2012). ULK1/2 joue alors un rôle prépondérant dans la phosphorylation d'ATG13 et FIP200, entraînant leur activation (Hara *et al.* 2008; Hosokawa, Sasaki, *et al.* 2009; Jung *et al.* 2009; Ganley *et al.* 2009). En revanche, dans des conditions nutritives physiologiques, mTOR (mammalian target of rapamycin), véritable senseur des variations en nutriments au sein de la cellule, vient inhiber l'activité du complexe ULK par phosphorylation de ULK1/2 et ATG13 par le biais du complexe mTORC1 (mTOR complexe 1 (Hosokawa, Hara, *et al.* 2009; Ganley *et al.* 2009; Sengupta, Peterson, et Sabatini 2010)). Dès lors, la dissociation de mTORC1 du complexe d'initiation, notamment suite à une déprivation nutritive, entraîne son activation (Alers *et al.* 2012; Nazio *et al.* 2013).

II.1.2.2. La nucléation

Une fois le complexe ULK activé et recruté au niveau de l'omégasome, celui-ci permet le recrutement et l'activation du complexe Vps34/PI3KC3 (Vacuolar protein sorting 34/phosphatidylinositol 3-kinase de classe 3), par phosphorylation de Beclin-1, une sous-unité de ce complexe. Beclin-1 est un membre la famille BCL-2 (régulateurs de l'apoptose) qui permet le recrutement d'ATG14L, ce qui va faciliter l'intervention d'autres protéines de l'autophagie au niveau du site de nucléation. Elle forme alors un complexe avec la PI3K Vps34, également composé de Vps15et ATG14L/Barkor (Russell *et al.* 2013). En conséquence, ce deuxième complexe, également appelé « complexe de nucléation », produit du PI3-P, nécessaire à la nucléation du phagophore, c'est-à-dire à son développement (Suzuki et Ohsumi 2007; Cecconi et Levine 2008; Itakura *et al.* 2008; Levine et Kroemer 2008; Sun *et al.* 2008; Matsunaga *et al.* 2009; Zhong *et al.* 2009).

D'autres protéines peuvent, selon les modèles, réguler l'activité de ce complexe. Sa stimulation est par exemple médiée par l'intervention d'AMBRA1 (Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1), qui, par ubiquitinylation de Beclin-1 au niveau de sa lysine 63, promeut son interaction avec Vps34 (Bartolomeo *et al.* 2010; Russell *et al.* 2013). De façon similaire, UVRAG (UV-radiation resistance-associated gene) favorise l'activation du complexe de nucléation et ainsi la formation de l'autophagosome ainsi que sa maturation (Liang *et al.* 2008). A l'inverse, Rubicon (RUN domain protein as Beclin 1-interacting and cysteine-rich containing) inhibe l'activité du complexe Vps34/Beclin-1 et de ce fait la nucléation du phagophore (Kang *et al.* 2011).

II.1.2.3. L'élongation

Le phagophore nécessite alors de s'allonger et de s'incurver autour du fragment cytoplasmique à dégrader, puis de se refermer en formant une vésicule à double membrane appelée autophagosome.

Un premier complexe d'élongation se forme d'abord par la conjugaison d'ATG5 avec ATG12, à l'aide de l'activité ubiquitine-ligase d'ATG7 et ATG10, puis l'association de ce conjugué avec ATG16L1. Ce complexe est recruté au phagophore par le biais de WIPI2 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting 2 (Dikic et Elazar 2018)). Dans le même temps, et sous l'influence du premier complexe, intervient un deuxième complexe d'élongation : celui de la protéine MAP1LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, abrégée « LC3 »), chargée de la reconnaissance du cargo par le biais de ses domaines LIR (LC3-interacting regions). Cette protéine est initialement présente sous une forme immature « proLC3 » alors clivée en LC3-I par ATG4, puis convertie en LC3-II par liaison avec un phosphatidyléthanolamine (PE) grâce à ATG3 (Dikic et Elazar 2018). Il est à noter que plusieurs isoformes de LC3 coexistent dans la cellule (LC3-A, -B ou -C), et qu'elles ne sont pas obligatoirement localisées sur les mêmes autophagosomes, indiquant un rôle différent pour chacune d'entre elles (Koukourakis *et al.* 2015; Baeken *et al.* 2020). La conjugaison de la protéine LC3 par le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 permet alors l'élongation du phagophore et sa fermeture, résultant en un autophagosome (Tanida, Ueno, et Kominami 2004; Fujita *et al.* 2008; Mizushima, Yoshimori, et Ohsumi 2011). Une fois l'autophagosome formé, le complexe de conjugaison se détache et se dissocie, tandis que LC3-II reste ancrée au niveau des membranes interne et externe de l'autophagosome et finit par être dégradée lors de la fusion avec le lysosome. Cette protéine constitue donc un véritable marqueur du processus autophagique. Son accumulation témoignera, de ce fait, d'un arrêt du flux autophagique en aval, pouvant être causé par un traitement à la chloroquine (CQ) ou à la bafilomycine A1, par exemple (Sasaki *et al.* 2010; Pasquier 2016).

D'autre part, la protéine SQSTM1/p62 (Sequestosome-1/ubiquitin-binding protein 62) est capable de reconnaître et de recruter spécifiquement un cargo à dégrader par le biais de sites d'ubiquitination (Bjørkøy *et al.* 2005). En effet, la p62 dispose d'un domaine de reconnaissance des ubiquitines, et un site de liaison à la LC3, le tout lui permettant d'adresser le contenu à l'autophagosome. De plus, la p62 est également dégradée lors de la dernière étape de l'autophagie. L'accumulation de la p62 témoigne donc d'un arrêt du flux autophagique résultant en l'absence de dégradation du cargo, et donc de p62 et/ou LC3.

II.1.2.4. La fusion autophagolysosomale

Une fois formé et refermé, l'autophagosome est conduit vers un lysosome pour la dégradation de son contenu. Cette dernière étape est guidée par des protéines majeures du trafic vésiculaire telles que les Rab-GTPases, notamment Rab-7, et les SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) SNAP29 (Synaptosomal-associated protein 29), VAMP8 (Vesicle-associated membrane protein 8) et STX17 (Syntaxin 17 (Itakura, Kishi-Itakura, et Mizushima 2012)). La fusion de l'autophagosome et du lysosome conduit à la formation d'un autophagolysosome ou autolysosome, dans lequel l'acidité et l'activité d'hydrolases lysosomales contribuent à la dégradation du contenu vésiculaire.

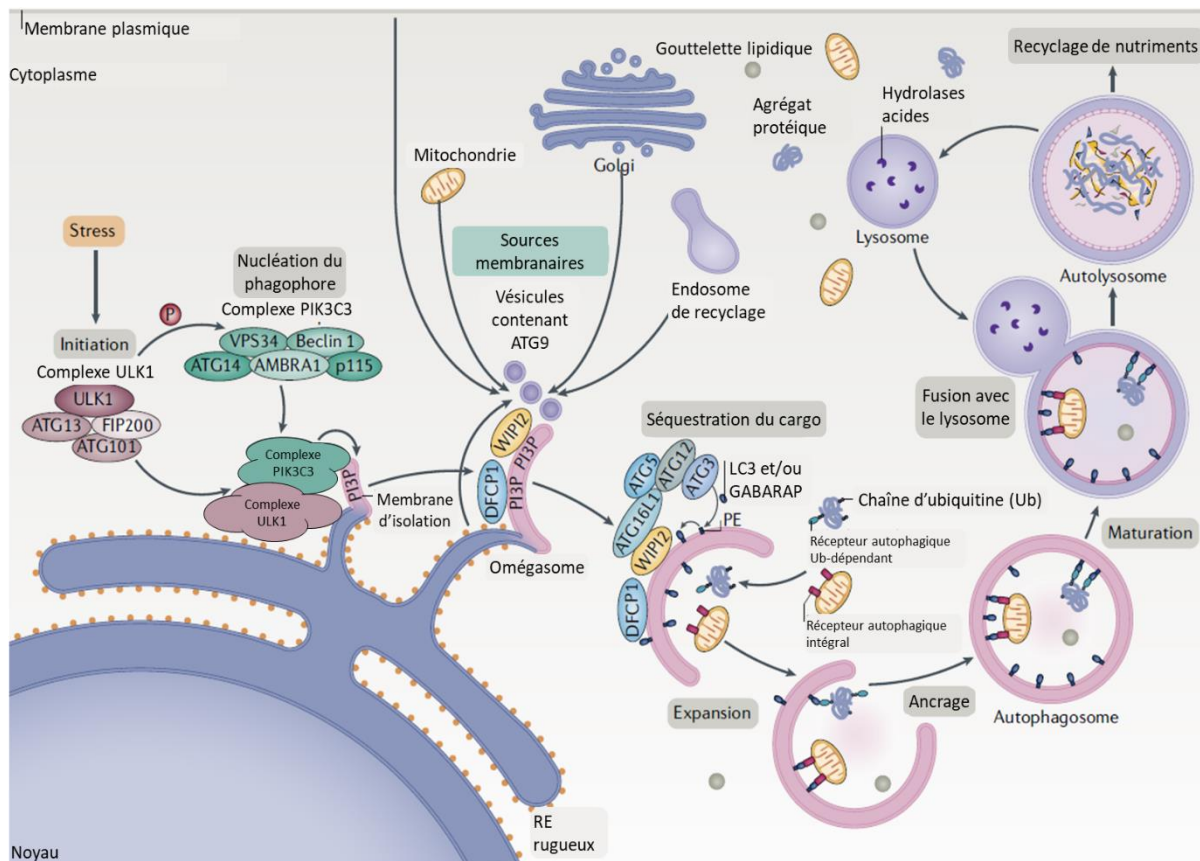


Figure 17 - Schéma représentatif du processus de macroautophagie, d'après Dikic & Elazar, 2018

ULK : Unc-51-like kinase ; PIK3C3 : Phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit type 3 ; FIP200 : 200 kDa FAK Family Kinase-Interacting Protein ; AMBRA1 : Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 ; PI3P : Phosphatidylinositol 3-phosphate ; WIPI2 : WD repeat domain phosphoinositide-interacting 2 ; DFCP1 : Double FYVE-Containing Protein 1 ; LC3 : Light Chain 3 ; GABARAP : GABA Type A Receptor-Associated Protein ; RE : Réticulum endoplasmique ; Ub : Ubiquitine

II.1.3. Autophagie et cancer

L'autophagie montre un double visage lorsqu'il s'agit du développement cancéreux, notamment en fonction du stade de développement et/ou des conditions dans lesquelles se trouvent les cellules cancéreuses ((Robin Mathew, Karantza-Wadsworth, et White 2007; L. Galluzzi *et al.* 2015) Figure 18)

L'autophagie étant connue comme intervenant dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, il semblerait évident qu'elle joue un rôle de protection au cours des toutes premières étapes du développement cancéreux. En effet elle contribue à l'élimination des éléments cellulaires défectueux et sert de véritable contrôle qualité de la cellule. Pour rappel, une condition de stress suffit à activer l'autophagie de manière plus importante, de sorte à conférer aux cellules une indépendance vis-à-vis de l'environnement. Une inhibition de l'autophagie dans des cellules saines peut dès lors conduire à des dommages en leur sein, tels que des altérations de l'ADN allant jusqu'à entraîner un développement cancéreux (Levine et Kroemer 2008; R. Mathew *et al.* 2007; X. Li, He, et Ma 2020; S. S. Singh *et al.* 2018).

En revanche, lorsque les cellules sont devenues cancéreuses, l'autophagie devient pro-tumorale. En effet, elle peut être activée en fonction des conditions de stress subies par les cellules cancéreuses. Or, il est connu que celles-ci sont confrontées à des stress nutritifs importants, de même que des conditions d'hypoxie, face auxquelles une cellule saine a peu de chances de survivre. Les CSC sont particulièrement connues pour exacerber ce processus, ce qui leur permet de faire face au stress, mais qui contribue aussi à leur indépendance nutritive, accompagnant leur « quiescence ». Ainsi l'autophagie contribue à leur survie et au maintien de la progression tumorale. En effet, des travaux ont montré qu'un défaut d'expression de certaines protéines de l'autophagie, comme ATG4A, peut conduire à une diminution du phénotype CSC au sein de cultures de mammosphères, suggérant un rôle prépondérant dans le maintien et la survie des CSC (Wolf *et al.* 2013). D'autres processus associés au développement cancéreux semblent être favorisés par l'activité autophagique, notamment la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) tel que montré dans des cellules de carcinome hépatique (Jun Li *et al.* 2013). Or, ce détachement de cellules épithéliales peut entraîner un phénomène de mort cellulaire particulier, l'anoïkis, dont les cellules sont protégées, dans le cas de la TEM, le plus souvent par une augmentation de l'activité autophagique (Fung *et al.* 2007; Kenific, Thorburn, et Debnath 2010; Mowers, Sharifi, et Macleod 2017; 2018). L'autophagie, dans certaines conditions, favoriserait donc la dissémination cancéreuse par TEM et donc la formation de métastases.

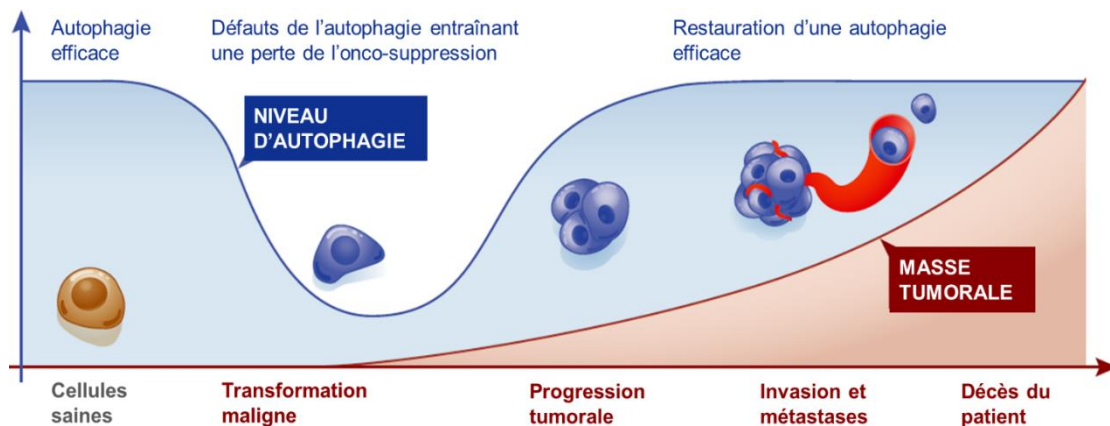


Figure 18 - Représentation schématique de l'évolution du rôle de l'autophagie dans la transformation maligne, d'après Galluzzi *et al.* 2015

Elle joue également un rôle dans la résistance thérapeutique observée dans les cancers et dans le cancer colorectal en particulier. En effet, l'utilisation de chloroquine (CQ) pour inhiber l'autophagie en combinaison avec du 5-FU entraîne une mort cellulaire accrue dans des cellules de cancer colorectal, témoignant de l'importance du processus dans la résistance à ce type de chimiothérapie (Sasaki *et al.* 2010). De même, une étude portant sur la bactérie *Fusobacterium nucleatum*, impliquée notamment dans les infections coliques et connue pour potentialiser la formation de cancers colorectaux, montre son rôle dans la chimiorésistance par modulation de l'autophagie (Yu *et al.* 2017). D'autre part, certains mécanismes de réparations des dommages à l'ADN semblent également impliqués en coordination avec l'autophagie dans la mise en place de chimiorésistances (Zhang *et al.* 2015; X. Li, He, et Ma 2020). Dès lors, le ciblage de l'autophagie et son inhibition dans un cadre thérapeutique semble être une solution encourageante pour potentialiser les effets des chimiothérapies dans le traitement des cancers en général (Levy, Towers, et Thorburn 2017; Onorati *et al.* 2018; Kocaturk *et al.* 2019; Amaravadi, Kimmelman, et Debnath 2019).

Les effets de l'autophagie sur la carcinogenèse ayant été majoritairement étudiés en se focalisant sur la macroautophagie canonique, il existerait toutefois une autre voie autophagique présentant un intérêt dans ce domaine : l'autophagie sécrétoire.

II.1.4. Autophagie sécrétoire

L'activité autophagique conduisant à la dégradation lysosomale est la plus décrite et la mieux connue. Cependant, un autre concept est apparu relativement récemment, proposant une activité sécrétoire médiée par l'autophagie, du moins par le biais de protéines associées. Ce processus, présenté dans la revue présente à la fin de ce chapitre, a été pour la première fois énoncé en 2011 par Dupont *et al.* dans le cadre de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 β (IL-1 β) ou l'interleukine 18 (IL-18 (Dupont *et al.* 2011)). Cette découverte a alors entraîné une augmentation de l'intérêt porté à ce phénomène, que cela soit dans le cadre de la réponse inflammatoire ou de la pathogenèse en général. En effet, l'autophagie sécrétoire a été montrée comme étant impliquée dans la sécrétion de lysozyme par les cellules de Paneth pour lutter contre les infections intestinales, par exemple, ou de facteurs promouvant l'invasion cancéreuse dans un modèle de cancer du sein (Lock *et al.* 2014; Bel *et al.* 2017). De plus, ce processus autophagique non-conventionnel semble associé au développement de maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson (Nilsson *et al.* 2013; Son *et al.* 2016; Ejlerskov *et al.* 2013; Urano *et al.* 2018), ou activé en réponse au stress, tout comme l'autophagie conventionnelle (Martinelli *et al.* 2021).

D'un point de vue mécanistique, l'autophagie sécrétoire se caractérise par la fusion de l'autophagosome avec la membrane plasmique, et non pas avec un lysosome. Ainsi, d'autres protéines interviennent dans cette redirection de l'autophagosome, notamment TRIM16 (Tripartite motif-containing protein 16), la SNARE SEC22B et Rab-8A (Ao, Zou, et Wu 2014; Ponpuak *et al.* 2015; Kimura *et al.* 2017)). Par la suite, d'autres SNAREs permettent la fusion avec la membrane plasmique, notamment SNAP23, SNAP29, STX3 et STX4 (Kimura *et al.* 2017).

D'autre part, l'autophagosome peut fusionner avec un corps multivésiculaire (MVB), structures dérivées d'endosomes tardifs et impliquées dans la biogenèse des exosomes (voir chapitre suivant), pour former une structure appelée « amphisome ». L'amphisome peut également intervenir dans l'autophagie conventionnelle en fusionnant avec un lysosome dans le but d'empêcher une sécrétion exosomale par exemple (Villarroya-Beltri *et al.* 2016; J. Xu, Camfield, et Gorski 2018). Suivant d'autres conditions, l'amphisome peut être amené à fusionner avec la membrane plasmique dans le cadre de processus sécrétoires associés à l'autophagie, mais également à la sécrétion d'exosomes (Y.-D. Chen *et al.* 2017; J. Xu, Camfield, et Gorski 2018).

Ainsi, de plus en plus d'évidences sont apportées à propos de l'entrecroisement de l'autophagie et de la sécrétion de vésicules extracellulaires, d'où l'intérêt grandissant concernant l'étude de ces interrelations (Ponpuak *et al.* 2015; J. Xu, Camfield, et Gorski 2018; Gudbergsson et Johnsen 2019; Levine et Kroemer 2019; Brunel, Bégau, *et al.* 2021).

II.2. Sécrétion de vésicules extracellulaires

Selon les conditions environnementales et/ou le contexte cellulaire dans lesquels les cellules se trouvent, elles ont la capacité de sécréter des vésicules extracellulaires (EVs). Particulièrement, ces EVs peuvent être sécrétées à des fins de communication, et représentent de ce fait un intérêt majeur dans le domaine des interactions intercellulaires. Bien que toutes les cellules eucaryotes aient recours à ce mode de communication, il est d'autant plus favorisé dans les processus de développement cancéreux.

Parmi la famille des EVs impliquées dans la communication entre les cellules, on distingue trois formes majeures : les microvésicules (MVs), les corps apoptotiques, et les exosomes. Les principaux éléments permettant de les différencier reposent sur leur taille, mais surtout leur origine. En effet, chaque type de vésicule joue un rôle particulier, notamment du fait de leurs différentes origines et voies de biogenèse.

II.2.1. Les corps apoptotiques

Les corps apoptotiques ont été décrits pour la première fois en 1972 par Kerr *et al.* (Kerr, Wyllie, et Currie 1972) et sont les EVs les plus importantes en termes de taille (de 1 à 4 μm (Hristov *et al.* 2004)). Souvent classées parmi les microvésicules, elles se forment par bourgeonnement de la membrane plasmique. Cependant, comme leur nom l'indique, ces vésicules particulières sont émises lors de conditions de mort cellulaire par apoptose. En effet, l'apoptose se caractérise par une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, une altération du noyau, tout en conservant des organites et la membrane plasmique relativement intègres tout au long du processus. Cela conduit au bourgeonnement de corps apoptotiques contenant des fragments de cytoplasme de la cellule mourante. La sécrétion de ces vésicules intervient généralement à la fin du processus d'apoptose, et permettrait de faciliter leur élimination par les cellules phagocytaires (Bellone *et al.* 1997; Beyer et Pisetsky 2010; György *et al.* 2011). Cependant, il a été montré que les corps apoptotiques pouvaient également être internalisés dans des cellules réceptrices et être à l'origine de transferts horizontaux d'ADN, et particulièrement d'oncogènes dans les processus de carcinogenèse (Holmgren *et al.* 1999; Bergsmedh *et al.* 2001; Waterhouse *et al.* 2011).

Les corps apoptotiques jouent donc un rôle important dans la communication intercellulaire, aussi bien de l'ordre physiologique que pathologique.

II.2.2. Les microvésicules

Les microvésicules regroupent un nombre important de vésicules jouant des rôles différents, mais de même origine. Ces vésicules mesurent entre 50 et 500 nm de diamètre et sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique, si bien qu'on les a longtemps considérées comme des débris cellulaires ([Figure 19](#) (Cocucci, Racchetti, et Meldolesi 2009; Colombo, Raposo, et Théry 2014; van Niel, D'Angelo, et Raposo 2018)). Le bourgeonnement des microvésicules s'opère au niveau de microdomaines particuliers de la membrane plasmique, au niveau desquels la concentration en céramides et cholestérol est importante (Trajkovic *et al.* 2008). La présence de ces lipides ne serait alors pas étrangère au recrutement de composés tels que des ARN ou des protéines cytoplasmiques pour leur chargement dans des microvésicules (van Niel, D'Angelo, et Raposo 2018).

De ce fait, leur membrane est constituée de fragments de la membrane plasmique et il n'existe pas à proprement parler de marqueurs de cette catégorie de vésicules, même si parfois la petite protéine ARF6 leur est associée (Muralidharan-Chari *et al.* 2009).

Celles-ci sont très variées, et généralement un nom spécifique leur est donné selon leur cellule d'origine, ou le contexte dans lequel elles sont sécrétées. Ainsi, sont appelées oncosomes, des microvésicules sécrétées par des cellules cancéreuses et impliquées dans la communication cellulaire, par exemple (Al-Nedawi *et al.* 2008). De même, le rôle des microvésicules dans le développement cancéreux a été observé à plusieurs reprises (Wang *et al.* 2014; Minciacchi, Freeman, et Di Vizio 2015). Toutefois, le processus auquel les microvésicules sont le plus associées dans la littérature semble être l'inflammation ((Melki *et al.* 2017; Akuthota *et al.* 2016). Par exemple, certaines microvésicules sont impliquées dans le transport de toxines entre des cellules sanguines vers des cellules rénales dans le syndrome hémolytique et urémique (SHU (Ståhl *et al.* 2015)), ou encore dans le transfert de récepteurs à la kinine B1 dans le processus inflammatoire de la vasculite (Kahn *et al.* 2017). De même, elles seraient responsables de l'activation des macrophages lors de processus inflammatoires et du transfert de miRNA, renforçant l'hypothèse selon laquelle elles participent à la communication intercellulaire (Ismail *et al.* 2013). Ces transferts d'ARN ont également été observés dans le cas de l'insuffisance rénale aigüe par Ju *et al.* (Ju *et al.* 2015). En effet, cette étude a montré que des microvésicules permettaient le transport de l'ARNm du facteur de croissance hépatocytaire (HGF), favorisant la différenciation cellulaire et la régénération des tubules rénaux (Ju *et al.* 2015). Ainsi, selon le contexte dans lequel elles sont sécrétées, et selon le type cellulaire qui émet ou reçoit les microvésicules, celles-ci jouent des rôles très divers à l'échelle de la communication entre les cellules.

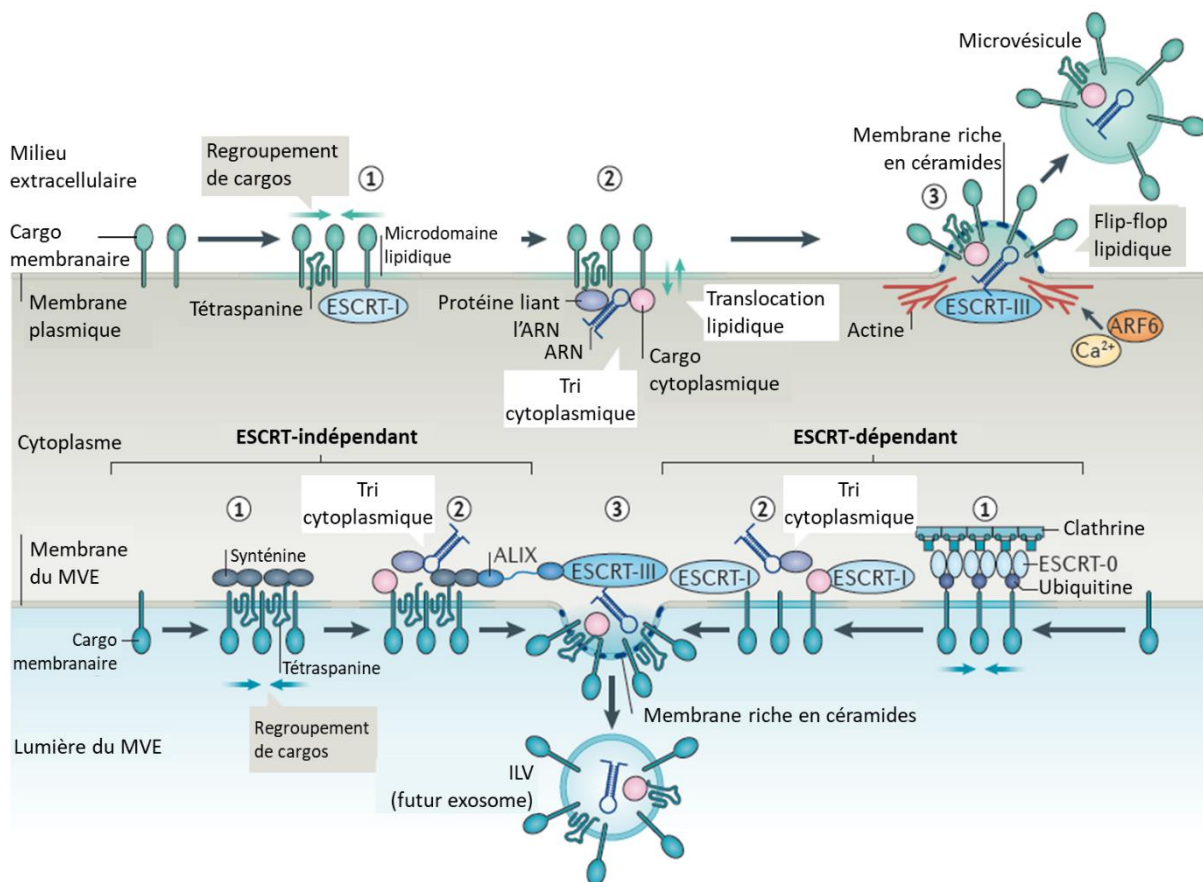


Figure 19 - Représentation schématique des voies de biogenèse des microvésicules et des exosomes, d'après Van Niel *et al.* 2018.

ESCRT : Endosomal sorting complex required for transport ; ARN : Acide ribonucléique ; ALIX : Apoptotic-linked gene 2-interacting protein X ; ILV : Intraluminal vesicle ; MVE : Multivesicular endosome ; ARF6 : ADP-ribosylation factor 6

II.2.3. Les exosomes

La plus petite forme de vésicule extracellulaire sont les exosomes, mesurant entre 50 et 150 nm environ. Ces petites EVs sont des vésicules très spécifiques dont le nom a longtemps été employé à tort pour désigner les EVs en général. En effet, elles suivent une biogenèse particulière, qui ne relève pas du « simple » bourgeonnement de la membrane plasmique (van Niel, D'Angelo, et Raposo 2018). Au même titre que les microvésicules et les corps apoptotiques, les exosomes sont impliqués dans la communication intercellulaire. En effet, ils sont capables de transporter de l'information telle que des ARN, protéines ou lipides d'une cellule émettrice vers une autre. En revanche, les exosomes diffèrent des microvésicules et corps apoptotiques par leur origine : les endosomes.

II.2.3.1. Biogenèse des exosomes

II.2.3.1.1. De l'endosome au corps multivésiculaire

Les endosomes sont des structures associées à l'endocytose, processus par lequel la cellule internalise des éléments en provenance de son environnement de manière spécifique tels que des nutriments ou encore des hormones. Ainsi, durant ce processus, les endosomes précoces reçoivent et trient les cargos endocytés pour les adresser aux différents compartiments cellulaires. Ces endosomes sont des structures complexes présentant à leur surface des domaines riches en petites protéines G de la famille des Rab-GTPases, impliquées dans le trafic vésiculaire, et notamment Rab-5, Rab-11 et Rab-4. Les endosomes précoces présentent également des vésicules intraluminales (intraluminal vesicles ILVs), créées par invagination de leur membrane, et qui contiennent des éléments endocytés. Les endosomes précoces procèdent alors à une maturation donnant lieu à la formation d'endosomes tardifs, multivésiculaires (présence d'ILVs) sous le joug du remplacement de Rab-5 par Rab-7, définissant alors Rab-5 et Rab-7 comme marqueurs des endosomes précoces et tardifs, respectivement (Huotari et Helenius 2011; Scott, Vacca, et Gruenberg 2014; Gruenberg 2020). Ces endosomes tardifs, ou corps multivésiculaires (« multivesicular bodies », MVBs), peuvent alors suivre différents destins : le transport des cargos vers le lysosome pour leur dégradation, ou leur fusion avec la membrane plasmique pour la sécrétion des ILVs sous forme d'exosomes (Figure 19).

Les structures particulières que sont les MVBs peuvent être formées de manière dépendante ou non de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Si tel est le cas, quatre complexes différents vont se succéder pour procéder à la biogenèse des MVBs.

II.2.3.1.1.1. Voie ESCRT-dépendante

Tout d'abord, ESCRT-0 initie le processus par reconnaissance du cargo ubiquitinylé dans les vésicules d'endocytose, par ses domaines de liaison aux ubiquitines (Ubiquitine-binding domains, UBD). Ce complexe est composé de deux sous-unités : STAM 1/2 (signal transducing adaptator molecule 1/2) et HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine substrate). Ce sont ces sous-unités qui confèrent le pouvoir de liaison aux ubiquitines au complexe ESCRT-0. De plus, il recrute du PI3P qui servira de support d'ancrage aux autres complexes recrutés au niveau de la membrane endosomale.

ESCRT-I reconnaît également le cargo tout en favorisant son tri et le bourgeonnement de la membrane endosomale. TSG101 (Tumor susceptibility gene 101 protein), l'une des quatre protéines constituant le complexe avec VPS28, VPS37 et MVB12, dispose également de domaines UBD lui permettant d'interagir avec le cargo et ESCRT-0. TSG101 est essentielle au bon fonctionnement de la machinerie ESCRT, si bien que son absence entraîne des défauts de formation des ILVs notamment, et donc une diminution de la sécrétion exosomale (Doyotte *et al.* 2005; Raiborg et Stenmark 2009). ESCRT-I permet le recrutement d'ESCRT-II par une interaction directe avec VPS28.

ESCRT-II permet essentiellement le recrutement du complexe ESCRT-III. Le complexe ESCRT-II est composé d'EAP30, EAP45 et deux sous-unités EAP20 comportant des domaines WH (winged-helix), supposés faciliter l'assemblage des sous-unités d'ESCRT-II entre elles. On note également la présence d'un domaine GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45), permettant la liaison à l'ubiquitine. Ce complexe s'associe alors avec ESCRT-III par le biais de ses sous-unités EAP20 (Teo, Perisic, et Williams 2004).

Le dernier complexe ESCRT-III est quant à lui constitué de quatre sous-unités appartenant à la famille CHMP (charged multivesicular body protein) : CHMP2(A, B), 3, 4 (A, B, C) et 6. Son activation fait également intervenir la protéine ALIX (apoptotic-linked gene 2-interacting protein X), recrutée par CHMP4 par reconnaissance de son domaine Bro1 (Bck-like resistance to osmotic shock protein-1). CHMP4 est aussi responsable du recrutement de Doa4 (degradation of alpha-4), entraînant alors la déubiquitination du cargo. Une fois le cargo dé-ubiquitiné, l'AAA-ATPase VPS4 est recrutée, permettant ainsi la dissociation des complexes ESCRT de la membrane endosomale, et de ce fait, la scission des ILVs et leur relargage dans le lumen des MVBs (McCullough, Frost, et Sundquist 2018; Larios *et al.* 2020).

Il est important de noter que les protéines TSG101 et ALIX, aidant à la formation des MVBs, sont retrouvées dans les exosomes, et peuvent dès lors servir de marqueurs spécifiques de ces vésicules (L. Chen *et al.* 2018).

II.2.3.1.1.2. Voie ESCRT-indépendante

Si la machinerie ESCRT est importante dans la formation des MVBs, celle-ci n'est pas essentielle, notamment lorsque le cargo n'est pas ubiquitylé. En effet, d'autres molécules, notamment les tétraspanines, certaines heat-shock proteins (HSP) ou encore les céramides, peuvent intervenir pour mener à bien la biogenèse des MVBs et *in fine* la sécrétion d'exosomes (Stuffers *et al.* 2009).

Par exemple, la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2), responsable de la production de céramides, interviendrait dans la sécrétion d'exosomes spécifiques contenant des protéolipides, *a priori* indépendamment d'ESCRT (Trajkovic *et al.* 2008). De la même manière, la phospholipase D2 (PLD2) est activée par ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) dans le cadre de la formation d'ILVs en coordination avec l'association ALIX-synténine-syndécane pour la sécrétion d'exosomes (Baietti *et al.* 2012; Ghossoub *et al.* 2014; Friand, David, et Zimmermann 2015). Il n'est toutefois pas exclu, du fait de l'interaction d'ALIX avec la machinerie ESCRT, que ce phénomène ne soit pas totalement indépendant d'ESCRT. D'autre part, l'inhibition du transporteur de lipides ABCA3 (ATP-binding cassette A3) par traitement à l'indométacine entraîne une altération de la sécrétion exosomale, prouvant son implication dans ce processus (Koch *et al.* 2016). Le métabolisme des lipides est donc très impliqué dans ces phénomènes, ce qui semble cohérent du fait de la nature lipidique des membranes cellulaires.

Également, certaines protéines interviennent dans des mécanismes ESCRT-indépendants. C'est le cas notamment des tétraspanines, glycoprotéines à quatre domaines transmembranaires impliquées dans le tri de cargos et la déformation membranaire, retrouvées dans les ILVs et les exosomes malgré une inhibition de la machinerie ESCRT (Stuffers *et al.* 2009; Perez-Hernandez *et al.* 2013; Colombo, Raposo, et Théry 2014). Principalement, CD63 et CD81 sembleraient pouvoir être utilisées en tant que marqueurs des exosomes. En plus des tétraspanines, certaines protéines chaperonnes de choc thermique telles que HSC70 (heat shock chaperonne 70) joueraient un rôle dans la sécrétion exosomale ESCRT-indépendante, notamment par leur aptitude à déformer les membranes (Colombo, Raposo, et Théry 2014; Uytterhoeven *et al.* 2015).

Ainsi, bien que la biogénèse des exosomes puisse emprunter des voies différentes, dépendantes ou non de la machinerie ESCRT, ces particules constituent une population vésiculaire bien particulière, notamment par la spécificité du contenu exosomal.

II.2.3.1.2. Sécrétion des exosomes

Le transport des MVBs nouvellement formés vers la membrane plasmique pour la sécrétion des ILVs sous forme d'exosomes requiert l'intervention de Rab-GTPases et de SNAREs, protéines connues pour leur implication dans le trafic vésiculaire (Figure 20). Chacune de ces protéines joue alors un rôle différent selon le contexte cellulaire ou l'étape du transport. Par exemple, Rab-7 est requise dans la régulation de la sécrétion d'exosomes contenant de la synténine et des syndécans dans le cancer du sein, mais pas dans les cellules HeLa (Ostrowski *et al.* 2010; Baietti *et al.* 2012). Rab-11, quant à elle connue pour intervenir dans les processus de recyclage endosomaux avec Rab-35, jouerait un rôle dans la fusion de MVBs entre eux (fusion homotypique (Savina *et al.* 2005; Blanc et Vidal 2018)). Toutefois, il est à noter que l'inhibition de Rab-11 et Rab-35 se traduit par une accumulation d'ILVs au sein des MVBs, suggérant l'importance de ces deux protéines dans l'ancrage des MVBs et leur fusion avec la membrane plasmique (Théry, Ostrowski, et Segura 2009; Hsu *et al.* 2010; Kowal, Tkach, et Théry 2014).

En outre, les Rab-GTPases les plus souvent associées à la sécrétion d'exosomes dans la littérature, notamment par leur capacité à adresser et acheminer les MVBs à la membrane plasmique, sont les isoformes A et B de Rab-27 (Ostrowski *et al.* 2010; Kowal, Tkach, et Théry 2014). Ainsi, d'après Ostrowski et ses collaborateurs, une extinction de l'expression de Rab-27A dans des cellules HeLa entraîne une augmentation de la taille des MVBs due à un arrêt de leur transport vers la membrane plasmique. En revanche, d'après cette même étude, l'extinction de Rab-27B n'engendre pas nécessairement le même phénotype : bien qu'une diminution de la sécrétion exosomale soit constatée, la taille des MVBs n'augmente pas, suggérant un rôle différent de cette isoforme dans ces mêmes cellules HeLa. Les deux formes de Rab-27 peuvent alors jouer des rôles complémentaires ou différents selon le type cellulaire ou la voie sécrétoire dans laquelle elles sont impliquées (Ostrowski *et al.* 2010; Hessvik et Llorente 2018).

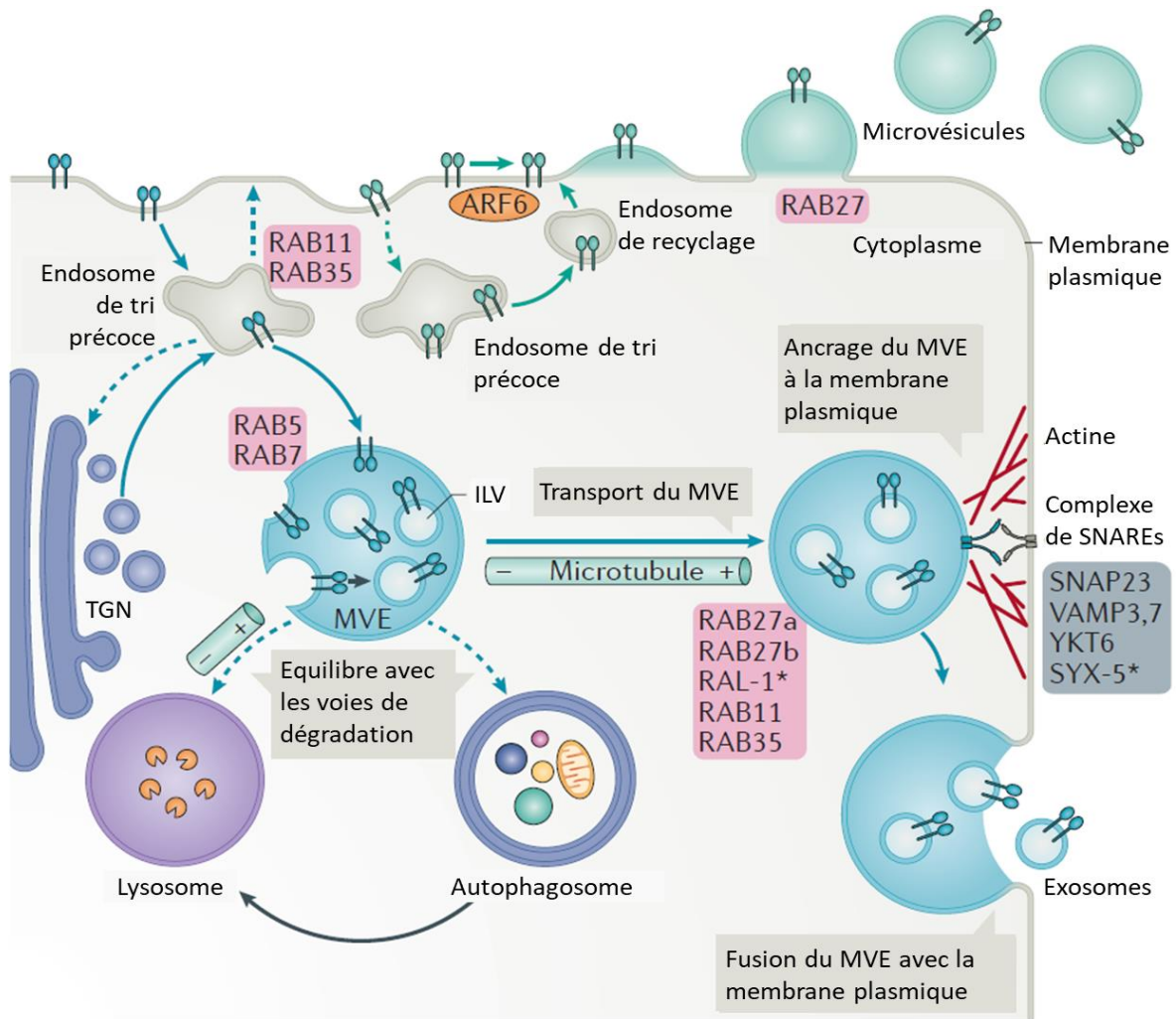


Figure 20 - Représentation schématique des acteurs majeurs de la biogenèse des EVs, adapté de Van Niel *et al.* 2018

TGN : Trans Golgi network ; ILV : intraluminal vesicle ; MVE : multivesicular endosome ; ARF6 : ADP-ribosylation factor 6 ; RAL-1 : RAL (Ras-related GTPase) homolog ; SNAP23 : synaptosomal-associated protein 23 ; SYX-5 : syntaxin 5 ; VAMP3 : vesicle-associated membrane protein 3 ; * : dénomination chez *C. elegans*

Une fois le transport effectué, les MVBs doivent fusionner avec la membrane plasmique pour procéder au relargage des exosomes. Ce sont notamment les SNAREs VAMP7 et YKT6 qui se chargent de ce processus, comme montré dans la leucémie ou la sécrétion de protéines de la voie Wnt (Fader *et al.* 2008; Gross *et al.* 2012; Hessvik et Llorente 2018; Gudbergsson et Johnsen 2019). Les exosomes sont alors libérés dans le milieu extracellulaire à destination de cellules voisines auxquelles ils peuvent transmettre de l'information, leur contenu reflétant celui de la cellule émettrice. Que leur biogenèse soit ESCRT-dépendante ou non, des mécanismes très spécifiques vont rentrer en jeu pour trier le contenu des exosomes, en fonction du type cellulaire et également des conditions dans lesquelles la cellule se trouve. Cela explique les multiples fonctions que peuvent exercer ces vésicules sur leur environnement immédiat.

II.2.3.2. Leur rôle dans le cancer

Ce rôle de communication attribué aux exosomes prend tout son sens dans les processus de développement cancéreux. En effet, les cellules cancéreuses sont connues pour leur forte capacité à communiquer avec leur environnement pour mieux s'y adapter, et cette communication passe en partie par la sécrétion d'exosomes. Par exemple, il a préalablement été montré au sein de notre laboratoire, que des exosomes contenant le récepteur aux neurotrophines TrkB étaient impliqués dans le transfert d'agressivité de cellules de glioblastomes vers des cellules non activées (Pinet *et al.* 2016). Ce transfert de TrkB avait alors induit une réactivation des voies de prolifération au sein des cellules traitées avec les exosomes. De la même manière, il avait également été montré dans le glioblastome que les exosomes pouvaient assurer le transfert de l'oncogène EGFRvIII entre les cellules tumorales (Al-Nedawi *et al.* 2008).

Dès lors, les exosomes sont capables de transférer des facteurs permettant d'activer des voies de survie au sein de cellules non cancéreuses dans le but de promouvoir l'invasion tumorale, et parfois en activant l'angiogenèse (Webber, Yeung, et Clayton 2015). D'une autre manière, les exosomes peuvent favoriser une interaction avec la matrice extracellulaire pouvant promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM (Tauro *et al.* 2013; Sung *et al.* 2015; Becker *et al.* 2016)). Il est également connu que la réponse au stress, comme notamment des conditions hypoxiques telles que l'on peut en observer au sein des tumeurs solides, peut entraîner une augmentation de la sécrétion d'exosomes. Ce phénomène est également observable en conséquence de certains traitements pharmacologiques. Par exemple, la roténone, molécule ayant pour cible le complexe respiratoire-I de la mitochondrie, a pour effet de mimer un stress hypoxique, et de ce fait d'augmenter la sécrétion exosomale comme par exemple dans le cancer du sein (D. Kumar *et al.* 2015). Ces observations indiquent donc que la sécrétion exosomale est, au même titre que l'autophagie, partie intégrante de la réponse aux stress cellulaires.

Le cancer colorectal ne déroge pas à la règle puisque les exosomes sont capables par exemple de transférer KRAS muté vers des cellules non mutées pour KRAS, conduisant à une augmentation de l'agressivité des cellules cancéreuses (Demory Beckler *et al.* 2013)). D'autre part, une mutation d'APC serait responsable d'une augmentation de la sécrétion exosomale dans des organoïdes de CCR (Szvicsek *et al.* 2019). Plus généralement, les exosomes sont utilisés par les cellules de cancer colorectal pour induire la transformation cancéreuse de cellules saines (Lugini *et al.* 2016). Il est intéressant de noter que le stade de différenciation des cellules de CCR semble affecter leur sécrétion exosomale (Lucchetti *et al.* 2017).

Toutes ces observations concernant le rôle des exosomes sécrétés par des cellules cancéreuses dans l'agressivité tumorale sont des éléments à prendre en compte pour l'étude du développement cancéreux dans son ensemble. En effet, l'utilisation des exosomes comme biomarqueurs est déjà à l'étude dans beaucoup de cancers. Plus précisément, c'est leur contenu qui constituerait une valeur diagnostique importante, notamment par la présence ou non de certains micro-ARN. Ainsi, dans une optique d'améliorer le diagnostic du cancer, et particulièrement dans le cas du cancer du côlon, la sécrétion d'exosomes représente un enjeu qu'il est important d'étudier pour mieux le comprendre.

II.3. Revue : Autophagie et vésicules extracellulaires dans le cancer colorectal : interactions et acteurs communs ?



Les données bibliographiques concernant les possibles interactions entre autophagie et sécrétion de vésicules extracellulaires dans le cancer colorectal ont constitué le socle des travaux de cette thèse. Elles ont donné lieu à l'écriture d'une revue publiée en mars 2021 dans le journal « *Cancers* », intitulée : « *Autophagy and Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer: Interactions and Common Actors?* ».

Résumé :

L'autophagie est un processus homéostatique impliqué dans la dégradation de protéines ou d'organites endommagés par le biais de lysosomes. Ce mécanisme requiert le recrutement de protéines spécialisées dans le trafic vésiculaire, et qui sont également impliquées dans d'autres processus tels que la biogenèse et la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs), et particulièrement de petites EVs appelées exosomes. Parmi ces protéines, les Rab-GTPases semblent intervenir aussi bien dans le cadre de l'autophagie et que de la sécrétion d'EVs, d'où l'intérêt grandissant concernant l'étude d'interconnexions entre ces deux mécanismes. Ces deux processus sont également impliqués dans le développement du cancer colique, et notamment dans la survie et la communication des cellules souches cancéreuses (CSC). Ce contexte souligne dès lors l'importance d'étudier les interactions entre autophagie et sécrétion d'EVs.

Review

Autophagy and Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer: Interactions and Common Actors?

Clément Auger ¹, Niki Christou ^{1,2,*}, Aude Brunel ¹, Aurélie Perraud ^{1,2} and Mireille Verdier ¹

¹ EA 3842, CAPTuR, GEIST, Faculty of Medicine, University of Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France; clement.auger@unilim.fr (C.A.); aude.brunel@unilim.fr (A.B.); aurelie.perraud@unilim.fr (A.P.); mireille.verdier@unilim.fr (M.V.)

² Endocrine, General and Digestive Surgery Department, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges CEDEX, France

* Correspondence: christou.niki19@gmail.com; Tel.: +33-36-8456-9392

Simple Summary: Cancer stem cells (CSCs) are known for their ability to survive under stressful conditions. To this aim, they use autophagy to recycle their altered organelles and proteins by addressing them toward a lysosome for their degradation. CSCs can also communicate with their environment using the secretion of extracellular vesicles (EVs) which carry information, strengthening their ability to survive under such conditions. Both mechanisms are known for using common actors and have been described as implicated in colorectal cancer (CRC). However, CSCs remain difficult to target due to the lack of specific markers identified, especially in colorectal cancer. Then, the study of the crosstalk between autophagy and the secretion of EVs seems crucial regarding a better targeting of CSCs.

Abstract: Autophagy is a homeostatic process involved in the degradation of disabled proteins and organelles using lysosomes. This mechanism requires the recruitment of specialized proteins for vesicle trafficking, that may also be involved in other types of machinery such as the biogenesis and secretion of extracellular vesicles (EVs), and particularly small EVs called exosomes. Among these proteins, Rab-GTPases may operate in both pathways, thus representing an interesting avenue for further study regarding the interaction between autophagy and extracellular vesicle machinery. Both mechanisms are involved in the development of colorectal cancer (CRC), particularly in cancer stem cell (CSC) survival and communication, although they are not specific to CRC or CSCs. This highlights the importance of studying the crosstalk between autophagy and EVs biogenesis and release.

Keywords: autophagy; extracellular vesicles; secretory autophagy; rab-GTPases; colorectal cancer



Citation: Auger, C.; Christou, N.; Brunel, A.; Perraud, A.; Verdier, M. Autophagy and Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer: Interactions and Common Actors? *Cancers* **2021**, *13*, 1039. <https://doi.org/10.3390/cancers13051039>

Academic Editor: Anna Kakehashi

Received: 4 February 2021

Accepted: 25 February 2021

Published: 2 March 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

Macroautophagy, mostly known as autophagy, is a highly conserved process by which damaged proteins and organelles are recycled by a lysosome-dependent degradation, contributing to the maintenance of cell homeostasis [1]. Although cells have a basal autophagy level that maintains their equilibrium, stress conditions such as hypoxia, starvation or DNA damage are known to increase the levels of autophagy in cells [2,3]. However, this equilibrium remains fragile, and defects in autophagy machinery can contribute to malignant transformation [4]. This process is of growing interest in cancer research, with more than 15,000 publications related to autophagy in cancer published over the past ten years. As an example, autophagy helps cancer stem cells (CSCs) to survive under drastic conditions [5] and is also involved in metastasis development [6–8]. Among cancers, autophagy has been shown to be implicated in the development of colorectal cancer (CRC) [9–11]. An emerging role of autophagy in secretory mechanisms has been reported as suggesting overlaps with vesicular trafficking [12,13].

Among the mechanisms involving vesicular trafficking, the secretion of extracellular vesicles (EVs) seems to partly overlap with autophagosome formation and fate [12,13]. EVs are used by cells to communicate with their environment and the surrounding cells by carrying information such as lipids, proteins, or nucleic acids [14–17]. The “EVs” term is currently used to refer to exosomes, microvesicles and apoptotic bodies—the three main kinds of EV notably implicated in cell-to-cell communication, which differ from each other by size and origin [15,18,19]. Exosomes are a unique population due to their endosome-based origin, which is mainly regulated by the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) machinery that generates multi-vesicular bodies (MVBs) that fuse with the plasma membrane to release exosomes [18–27]. MVBs can be generated by other means, and their fusion with the cell membrane involves Rab-GTPases and SNAREs protein families [14,26,28–35]. Furthermore, due to their intercellular communication abilities, EVs are of growing interest in the field of cancer research due to their implication in tumour aggressiveness and metastatic invasion, in particular in the case of CRC [36–42]. As potential common actors in both pathways, Rab-GTPases proteins are known to be involved in vesicular trafficking and transport, as well as autophagy-related processes.

In this review we will describe the roles of autophagy and EVs in colorectal cancer, and how these interact within the framework of cancer stem cell survival and communication, and how these may offer new insights into cancer diagnosis.

2. Macroautophagy

2.1. *Introducing the Process and Its Main Actors*

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a physiological process that helps maintain cell homeostasis by recycling damaged proteins and organelles, and older or misfolded proteins, using a lysosomal degradation [1]. Autophagy thus represents a complementary mechanism of the ubiquitin-proteasome degradative machinery that specifically recognizes ubiquitin-tagged structures [43].

Autophagy initiation consists in the formation of a phagophore (nascent isolation membrane), which is engaged by the activation of the Unc-51-like kinase (ULK) complex, composed of ULK1/2, FIP200, ATG13 and ATG101. A second complex then erupts to maintain the phagophore nucleation: the class III PI3K complex, composed of Beclin-1, ATG14L and the VPS34 PI3K, which enhances the production of phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) recruited to the phagophore, with the help of ATG9 [5,44]. Once the phagophore starts to expand, the ATG12-ATG5-ATG16L1 complex is recruited to pursue its maturation to become a double-membrane enclosed organelle called autophagosome. More precisely, this complex contributes to the recruitment of the microtubule-associated protein light chain B-phosphatidylethanolamine (LC3B-PE) to the autophagosomal membrane. Pro-LC3B is previously converted into LC3B-I by action of ATG4, then into LC3B-II after lipidation (PE addition) by coupled intervention of ATG3 and ATG7, mandatory for the autophagosome elongation and closure [45,46]. Furthermore, thanks to its LC3B-Interacting Regions (LIR; [47]), LC3B recognizes autophagy substrates and cargos to be loaded into the phagophore. Because it is a main actor in this process, being located in autophagosomes and on their membrane, LC3B-I/II conversion is often used as an autophagosome-closure marker.

The final step of the canonical autophagy mechanism requires the fusion of the newly formed autophagosome with a lysosome, giving rise to an autophagolysosome (or autolysosome). This step notably involves Rab-GTPases-family proteins such as Rab7, and SNARE-family proteins such as syntaxin 17 (STX17), VAMP8 and SNAP29, that help the autophagosome-lysosome encounter and fusion [48]. The cargo is then degraded following a typical lysosomal lysis.

In physiological conditions, the ULK complex is regulated by the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) that phosphorylates ULK1/2 and ATG13, leading to their inactivation. Under stress conditions such as hypoxia, starvation or DNA damage, mTORC1 activity is decreased as a result of the PI3K/AKT pathway mitigation, and the

activation of the ULK complex [2,3,49]. The drop in mTORC1 activity is usually associated with increased AMP-activated protein kinase (AMPK) activity, which also activates ULK1 and the following autophagy machinery [50,51].

2.2. Autophagy's Double-Faceted Role in Carcinogenesis

As described above, autophagy is mandatory for maintaining cell integrity by its basal recycling activity and by promoting resistance to various stress conditions. Autophagy was initially believed to play an exclusively protective role, since defects led to genome instability [52] and led to the development of disease processes such as cancer [53,54]. Additionally, in early tumorigenesis stages, autophagy seems to play a tumour-suppressing role, since it prevents hypoxia-induced necrosis and inflammation, thus decreasing tumour cell proliferation [55].

Although autophagy can prevent tumour cell proliferation in early tumorigenesis steps [55], it seems to act as a pro-tumour player in later stages of tumour formation [4]. Moreover, CSCs represent a particular cell population that has higher basal autophagy levels than other cancer cells, as they use it as a way to proceed to quiescence in order to survive under drastic conditions within the tumour core [56,57]. Wolf et al. [57] thus showed that inhibiting ATG4A expression led to a decrease of the CSC-like phenotype in breast cancer tumours *in vivo*, suggesting its importance in maintenance of CSCs. In keeping with the promotion of CSC behaviour, autophagy was also shown to enhance epithelial to mesenchymal transition (EMT) during hepatic carcinogenesis, a process by which tumour cells (and particularly CSCs) are able to migrate and then colonize other tissues by forming metastases [58]. To further survive after their detachment from their initial extracellular matrix (ECM), EMT-proceeding cells need to resist a particular kind of detachment-induced apoptosis called anoikis [59]. To this aim, autophagy promotes cell survival towards anoikis during EMT, thus potentiating tumour invasion and metastasis, in which it seems to play a context-dependant role [5–7,60]. Also, as angiogenesis is crucial for tumoral development and dissemination by providing nutrient intake within the tumour, autophagy seems to help cancer cells to survive apoptosis after anti-angiogenic treatment in glioblastoma, suggesting that the use of coupled anti-autophagic treatments may restore its efficacy [54,61]. Hence, autophagy is of great interest in cancer research as a potential target [62–64].

As in other cancers, autophagy displays a context-dependent role in the development of CRC following the tumour type, its stage or the actual metabolic background such as energy requirement in the early stages, or a stress response by providing cell survival in later stages [10,65]. Consistent with these observations, autophagy is induced under stress conditions such as DNA damages in CRC cells, helped by p53 with simultaneous inhibition of mTOR pathway [66]. Autophagy not only triggers cell survival and metabolism modifications in tumour cells, but also in other cells within the microenvironment such as cancer-associated fibroblasts (CAFs), which are known to be involved in cell migration during metastasis development [11,67]. Thus, targeting autophagy in CRC is of growing interest in this research field. Our group reported that its inhibition concomitantly with BDNF/TrkB signalling axis blocking constitutes a potential new therapeutic approach for CRC [9]. It was shown that the use of chloroquine diphosphate as an autophagic flux inhibitor triggered CRC cell death when combined with the chemotherapy agent 5-fluorouracil (5-FU) suggesting that autophagy also potentiates chemoresistance in CRC [68]. Thus, studying the ability of CRC cells to enhance autophagy under stress conditions may help to predict how they respond to autophagy inhibition, thus providing information on their sensitivity and the relevance of targeting autophagy [69].

2.3. Secretory Autophagy and Its Potential Link with Vesicular Trafficking and Secretion

As described earlier, autophagy is known to involve vesicular trafficking, leading to lysosomal degradation. However, autophagosomes may have an alternative fate to fusing with a lysosome. The relatively new concept of secretory autophagy (SA) [70]

has been studied extensively over the past decade. As it was first described as a means to unconventionally secrete inflammatory cytokines such as Interleukin-1- β (IL-1 β) or Interleukin-18 (IL-18), SA was then thought as being involved in inflammatory-associated processes in general [71,72]. Subsequently, further roles have been described for SA, including lysozyme secretion by Paneth cells to counter intestinal bacterial infection [73], or insulin-degrading secretion by astrocytes in Alzheimer disease [74], as well as the secretion of proteins implicated in neurodegenerative processes such as Alzheimer's or Parkinson's diseases [75,76]. Although SA seems to be implicated in several different mechanisms, their common factor is the secretion of cytosolic proteins which lack a signal peptide, then resulting in their incapacity to enter the conventional ER-associated secretory pathway, thereby using an unconventional secretory mechanism [70].

As summarised in Figure 1, this secretory pathway involves several vesicle trafficking-related proteins such as Rab-GTPases (Rab8A) [77], and SNAREs (SEC22B) [78], that mediate SA by avoiding classical autophagosome-lysosome fusion and drive the autophagosome to fuse with the cell membrane. Indeed, unlike classical autophagy degradation, the SA pathway does not involve STX17 and its complex to guide autophagosome towards the lysosome for their fusion. Instead, the cargo receptor TRIM16 is recruited and interacts with SEC22B, thus forming a complex which drives the autophagosome towards the plasma membrane where other SNAREs (SNAP23, SNAP29, STX3 and STX4) proceed to their fusion [78].

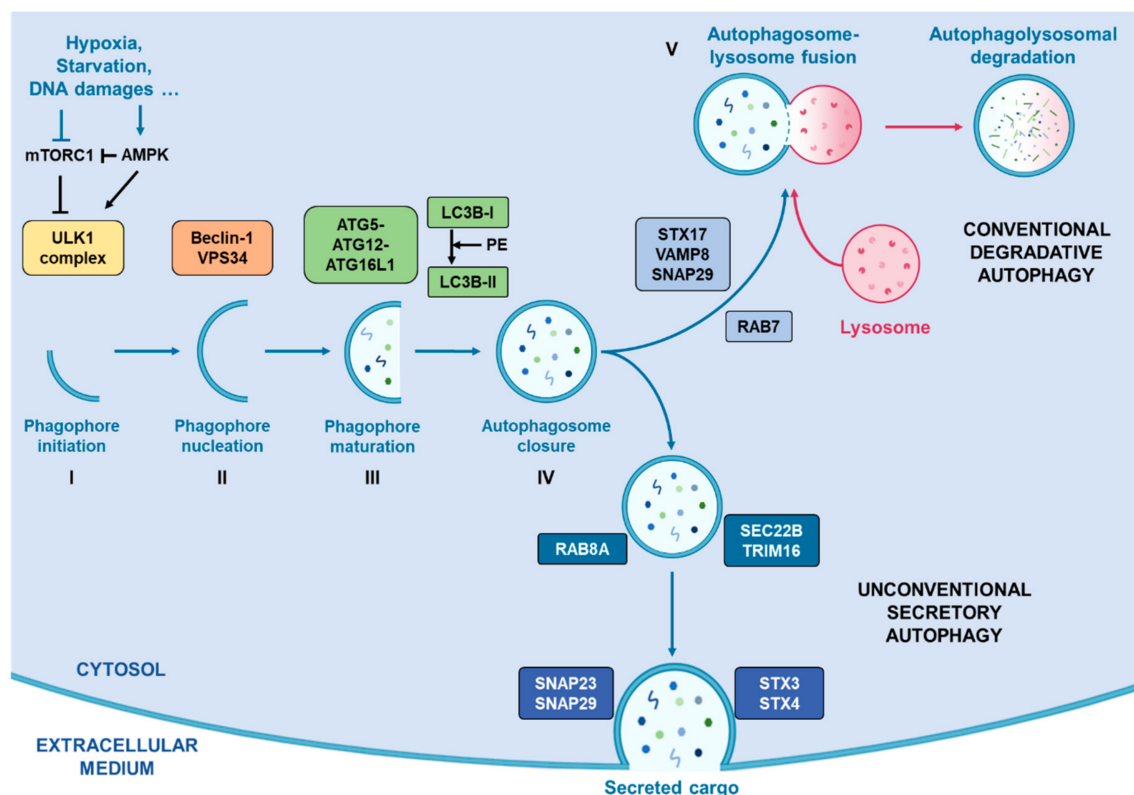


Figure 1. Representation of conventional degradative autophagy and unconventional secretory autophagy. Stress conditions such as hypoxia, starvation or DNA damages drive the activation of autophagic flux by inhibiting mTORC1 activity, correlating with an increased activity of AMPK, which activates the successive complexes that operate in order to initiate and complete the formation of autophagosomes. Once the autophagosome closed with the help of LC3B, two pathways exist. First, they can fuse with a lysosome with the help of RAB7, STX17, VAMP8 and SNAP29 in order to degrade its cargo. Alternatively, they can take the direction of the plasma membrane helped by RAB8A, SEC22B and TRIM16 for their transport and by SNAP23, SNAP29, SXT3 and STX4 for their fusion with the cell membrane.0.

Autophagosomes can also fuse with MVBs to form amphisomes which, along with autophagy, can follow a context-dependent fate. Indeed, amphisomes were described as being part of a classical autophagic degradation pathway in which they could fuse with a lysosome to recycle MVBs in order to avoid EVs releasing [13,79]. However, other functions have also been attributed to amphisomes, since they were shown to fuse with the plasma membrane in secretory processes in which ATG and Rab-GTPases proteins were involved, suggesting a potential overlap between SA, amphisomes and EVs releasing [12,13].

Thus, secretory autophagy is of growing interest in the study of intracellular vesicular trafficking interactions, with a number of recent studies addressing this possibility [13,14,28,70,80]. Despite its increasing significance, the role of secretory autophagy in cancer remains obscure and needs to be further explored.

3. Extracellular Vesicles

3.1. EVs Biogenesis and Secretion Mechanisms

Extracellular vesicles (EVs) represent a great interest in the field of cell-cell communication. Indeed, several populations of EVs are secreted by cells under various conditions [15,18,19]. As so, apoptotic cells secrete apoptotic bodies of about 1 to 5 μm wide, which contain information from the dying cells [18]. On the other hand, microvesicles (MVs) have a smaller size range (100 nm to 1 μm) and are secreted by plasma membrane budding [18]. The smallest population of secreted EVs are exosomes (50 to 150 nm in diameter), which are also known for being involved in cell-cell communication by carrying lipids, proteins or RNA as pieces of information towards towards the neighbouring cells [14–17]. Unlike apoptotic bodies and MVs, exosomes have an endosomal origin. During their maturation, endosomes form intra-luminal vesicles (ILVs) by invagination of their membrane, generating multi-vesicular bodies (MVBs) which fuse with the plasma membrane to release exosomes in the extracellular compartment [20,28].

The formation of MVBs for exosomes biogenesis can be dependent or independent on the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery. The ESCRT-dependent pathway involves four successively operating protein complexes (ESCRT-0, I, II and III), and their associated complex Vps4 [20,28]. ESCRT-0 first recognizes and catches ubiquitinated cargo in clathrin-coated domains through its ubiquitin-binding domains (UBDs), and binds PI3P on the endosomal membrane, thus initiating the ESCRT machinery for cargo sorting and MVB formation [21]. ESCRT-0 is also able to bind the ESCRT-I complex, notably composed of TSG101, that also recognizes ubiquitinated cargo, thus pursuing its sorting and providing membrane budding. ESCRT-I recruits ESCRT-II on the membrane of future MVBs to help budding as well as recruiting and activating ESCRT-III. This last complex needs the help of accessory proteins such as Alix to make it functional. Concomitantly, ESCRT-III interacts with the AAA ATPase Vps4 which is mandatory for the final step of MVB formation, by providing de-ubiquitination of the cargo and ESCRT-III detachment, thus inducing the whole ESCRT complex to unbind the endosomal membrane [21–26,28]. As proof of their implication in exosomes biogenesis, some ESCRT-associated proteins such as Tsg101 (ESCRT-I member) or Alix are found in exosomes after their release [27].

Although deletions in the ESCRT pathway impair cargo recognition and sorting, they do not completely inhibit the formation of MVBs in mammals, suggesting that ESCRT machinery works in coordination with other processes, notably involving tetraspanin proteins (CD63, CD81), lipids such as ceramide, or heat shock proteins [23,81–84]. Indeed, Stuffers et al. [81] reported that deleting some ESCRT actors impaired the morphology and size of the ILVs within MVBs, suggesting that ESCRTs remain important for their formation. However, a recent model suggests that the ESCRT machinery is particularly important for a specific cargo sorting before entering ILVs [23]. Thus, a complementary mechanism for membrane deformation to englobe the ESCRT-recruited cargo is needed, and this role may be played by the presence of particular lipid domains on the endosomal membrane, notably containing ceramide [23,81,85]. It was indeed shown that inhibition of the ceramide

formation process led to defects in releasing proteolipid protein-containing exosomes, whereas ESCRT inhibition did not affect such a release, suggesting that their secretion was ESCRT-independent [81]. Tetraspanins, of which some are considered exosome markers (such as CD63 or CD81), also seem to be involved in specific ESCRT-independent exosome release [83,85]. Finally, it is supposed that heat-shock proteins such as Hsc70 can play a role in such ESCRT-independent processes by their ability to deform membranes [84,85]. These findings may suggest that the ESCRT machinery is not mandatory in the formation of MVBs and that some ESCRT-independent actors operate in the releasing of EVs, and particularly exosomes, based on their specific content, as well as the fact that cells may secrete different types of EVs regarding their structure and content based on the different ways MVBs may be formed [26].

Once MVBs are formed, they require transport toward the cell membrane in order to release exosomes in the case of secretory vesicles, or toward the lysosome for the degradation of their cargo. Such transport involves the small Rab-GTPases family which is known to be implicated in vesicular trafficking processes, here notably represented by Rab7, 11, 27A/B and 35, which both play a different role in exosome fate [14,28–30]. For example, Rab7, which is known for transport toward the lysosome in autophagy machinery, also operates in the regulation of the secretion of exosomes containing syndecan and syntenin in breast cancer cells but not in HeLa cells [29,31]. Rab11 was shown to promote the fusion of MVBs with each other (homotypic fusion) and is often associated with Rab35 in early endosomal recycling processes [30,32]. Rab27A and Rab27B, which are known for their late endosomal recycling ability, have also been shown to play both common and different roles by providing MVB docking to the cell membrane depending on the cell type [29,33]. After the transport of MVBs to the cell membrane, they fuse with each other through the action of SNARE proteins such as VAMP7, shown as implicated in this process in leukemic cells, or YKT6 which operates in the secretion of Wnt proteins-containing exosomes [14,28,34,35]. Since those many actors play different roles in different steps of the exosomal secretion process, which seem to be specific according to the cell type, this may partly explain the variation of their content [26]. This machinery is summarised in Figure 2.

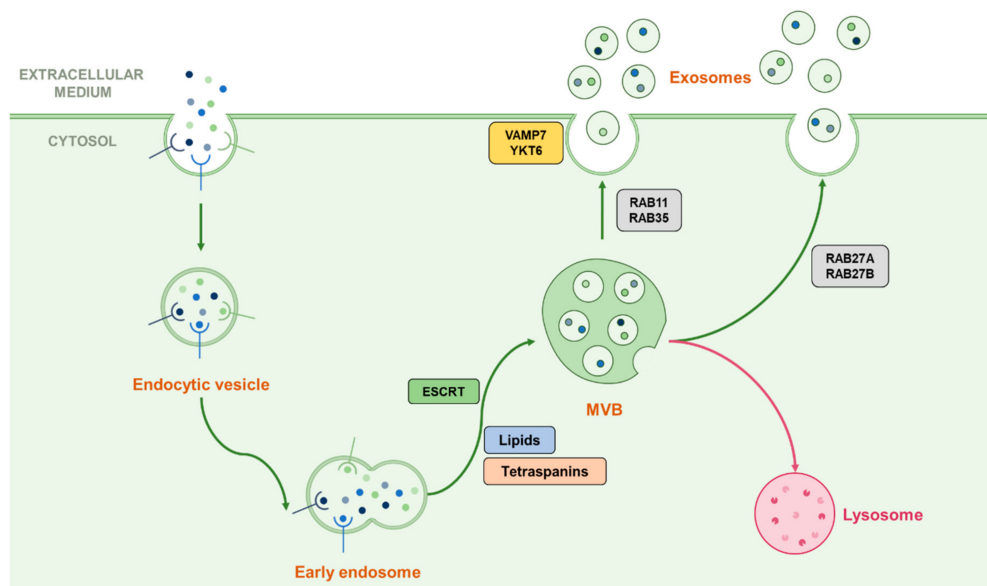


Figure 2. Representation of the classical biogenesis and secretion machinery of exosomes. Early endosomes can follow their maturation by forming ILVs contained in MVBs by using multiple ways dependent or not from the ESCRT machinery. Once the MVB formed, it can be addressed to the lysosome in order to degrade its cargo or ILVs can be released in the extracellular medium as exosomes. The transport toward the cell membrane is proceeded by Rab-GTPases than can vary following the cell type or the cellular conditions, and the fusion with the plasma membrane can be driven by the SNAREs VAMP7 and YKT6.

3.2. Implications in Cancer Development: Increasing Interest in This Field

Initially described as “trash”, the view on these vesicles (especially exosomes) has been modified. EVs are implicated in intercellular communication by carrying information from the sending cells [14–17,86]. Thus, such a process constitutes an obvious means by which cancer cells might communicate with their environment. As such, exosomes are able to deliver their cargo in recipient cells by activating various signalling pathways that include stem cell maintenance and renewal [87]. Hence, the study of EVs secretion in the field of cancer research has aroused a great interest in recent years, especially with regards to their roles in cancer development.

EVs and particularly exosomes have been notably shown to play various roles in many cancer-associated mechanisms. First, EVs are used as transmitters of the oncogenic receptor EGFRvIII between tumour cells in glioblastoma [88]. Our team has reported that TrkB-containing exosomes are implicated in the transfer of aggressiveness in glioblastoma cells [89]. On the other hand, tumour cells are able to communicate with surrounding non-tumour cells by sending EVs containing miRNAs, proteins and oncogenic factors, thus promoting tumour invasion and angiogenesis [90–93]. In order to promote tumour invasion, EVs can also play a role in extracellular matrix remodelling and epithelial/mesenchymal transition (EMT) that represents the first step towards metastatic migration [36–38]. Moreover, EVs are involved in cancer therapy resistance by controlling the tumour microenvironment integrity towards drugs and promoting CSC-like behaviour such as quiescence and EMT [94,95].

In CRC, it was notably demonstrated that exosomes were implicated in the transfer of mutant KRAS from mutant cells towards non-mutant KRAS cells, thus providing an increase in tumour growth in vitro [39]. Similarly, *Apc* mutation was shown to enhance EVs secretion by CRC tumour cells within 3D organoids [40]. As with other cancers, EVs are used as messengers between tumour cells and stromal cells to promote tumour invasion [41]. It is noteworthy that cell differentiation seems to impact EV secretion and their contents, suggesting that their role may vary according to the differentiation state of the sending cells [42]. Since there is a lack of specific CSC markers, it is interesting to consider the machinery for secretion of EVs as a marker of cancer development. However, this process is also used by stromal cells and thus cannot be considered as a therapeutic target. Since vesicular trafficking seems to be closely related to the secretory autophagy process, and considering that these processes are both implicated in cancer development-associated mechanisms, this potential overlap may nevertheless be considered a potential pathway for further investigation.

4. Autophagy and EVs Trafficking Cooperation: Which Actors

4.1. Common Proteins and Pathways

Although the crosstalk between autophagy and vesicular trafficking remains obscure, some clues may point towards the role of common proteins in such an interaction. Among those, as previously described, Rab-GTPases are known to be implicated in both processes. For instance, Rab7 was notably found as operating both in the autophagy pathway and EV trafficking according to a database comparison, as well as Rab11A [14]. In the same way, Rab8A, which is known for its implication in unconventional secretory autophagy by promoting the guiding of autophagosomes toward the cell membrane, was also shown to be involved in the exosomal secretion of Annexin A2 in coordination with Rab11 and Rab27A by enhancing amphisome/plasma membrane fusion [12,71]. Furthermore, in the same study, autophagy-related proteins were also shown to play their part in the secretion of Annexin A2-containing exosomes, such as ATG5 and LC3B, further supporting the hypothesis of an autophagy/EV-trafficking overlap [12,13].

LC3B was recently found to be implicated in the secretion of specific RNA-binding proteins (RBPs) and small nucleolar RNAs (sno-RNAs) within EVs [96]. This mechanism seems to involve an ATG7-dependent pathway and represents an unconventional route for ATG-dependent EVs secretion. This process, called “LC3B-dependent EV loading

and secretion" (LDELS), requires the interaction between LC3B and FAN (neutral sphingomyelinase activation associated factor) that acts as a regulator of nSMase2, which produces ceramides required for the inward budding of vesicles from the MVB [96]. Curiously, autophagy-related proteins may also play autophagy-independent roles in other processes, as demonstrated for ATG5. Indeed, a loss in the expression of ATG5 or its complex partner ATG16L1 led to a decrease in exosome secretion, which was not found after deleting *Atg7* [97,98]. It was further suggested that ATG5 was involved in regulating the pH within MVBs by recruiting LC3B that associates with the proton pump V_1V_0 -ATPase, which controls MVBs acidification, thus preventing their lysosomal degradation. Furthermore, the ATG5-ATG16L1 complex seems to be implicated in promoting metastases and migration in breast cancer cells by releasing exosomes [97,98]. Another example of ATG protein involvement in EV biogenesis mechanisms may be ATG9, which was shown to be required for the formation of ILVs since loss of its expression reduced autophagic flux and ILVs production in *Drosophila melanogaster* [99]. Similarly, ATG3 and ATG12, known for their role in autophagosome maturation and LC3B lipidation respectively, were shown to interact with the ESCRT-associated protein Alix, thus suggesting their implication in many related processes such as autophagic flux, endosomal trafficking and exosomes biogenesis [100]. The autophagy-initiating class III PI3K complex has also been suggested as playing a part in exosome biogenesis and release, since the inhibition of Beclin-1 expression led to a decrease of chronic myeloid leukaemia cells-secreted exosomes [101]. However, the role of this complex in exosome biogenesis requires further investigation, since it is supposed to play various roles following its regulation by many proteins, as reviewed by Xu et al. [13]. On the other hand, other proteins such as HSPA8, HSP90 and VCP, introduced as key autophagy-associated proteins by Galluzzi et al. [102], were identified in EV-related experiments, although further information is needed concerning their role in vesicular trafficking and release [14]. As SNAREs such as SEC22B are implicated in vesicular transport and fusion with the cell membrane, they can be supposed to be part of the autophagy/EV-trafficking crosstalk, though more information is needed [103]. Since different proteins, complexes and or pathways seem to be commonly used in autophagy-associated and EV-associated mechanisms, it seems fair to think that these actors operate around common organelles, as elaborated below.

4.2. An Important Common Organelle: The Versatile and Misunderstood Amphisome

Among the different organelles and structures that intervene in each pathway, amphisomes appear as real crossroads between autophagy (more particularly secretory autophagy) and EV biogenesis and release. Amphisomes were initially considered as exclusive degradative organelles. For instance, increased autophagy under stress conditions or Bafilomycin A treatment, leading to increased autophagosome-MVBs fusion, was associated with fewer secreted exosomes in erythroleukemic cells, suggesting an autophagic recycling of MVBs instead of their release, thus supporting the close relationship between autophagy and exosome release via amphisomes [13,104]. Also, alteration in exosome biogenesis could be restored after autophagy inhibition, supporting the hypothesis that MVBs can be recycled in a lysosome-dependent manner rather than giving rise to exosomes release [79]. However, amphisomes were also shown to participate in non-degradative mechanisms as the previously described intervention of the autophagy proteins LC3B and ATG5 in the secretion of Annexin A2-containing exosomes requires the fusion of amphisomes with the plasma membrane [12]. Similarly, amphisomes were shown to be involved in a secretory pathway for mucin-containing vesicles in murine intestinal cells, requiring the intervention of LC3B, RAB7 and RAB11, thus supporting a potential secretory role for amphisomes fate [105]. Some points remain uncertain regarding the fate of autophagosomes toward a fusion with lysosomes or MVBs. Indeed, the secretion of IL-1 β requires the fusion of autophagosomes with MVBs, supporting the unconventional autophagy-dependent secretory pathway model proposed by Dupont et al. [71] (while it was not determined if such a fusion led to the formation of an amphisome) [105].

The roles of amphisomes seem to vary according to the different conditions a cell can undergo, which correlates with the way autophagy and the secretion of small EVs such as exosomes are modulated following these conditions. Further information is required to better understand this potential hub that amphisomes may represent between autophagy and exosome biogenesis and release, and to enlighten how autophagy and exosomes really interact. An overview of the known roles of amphisomes in such an interaction are presented in Figure 3.

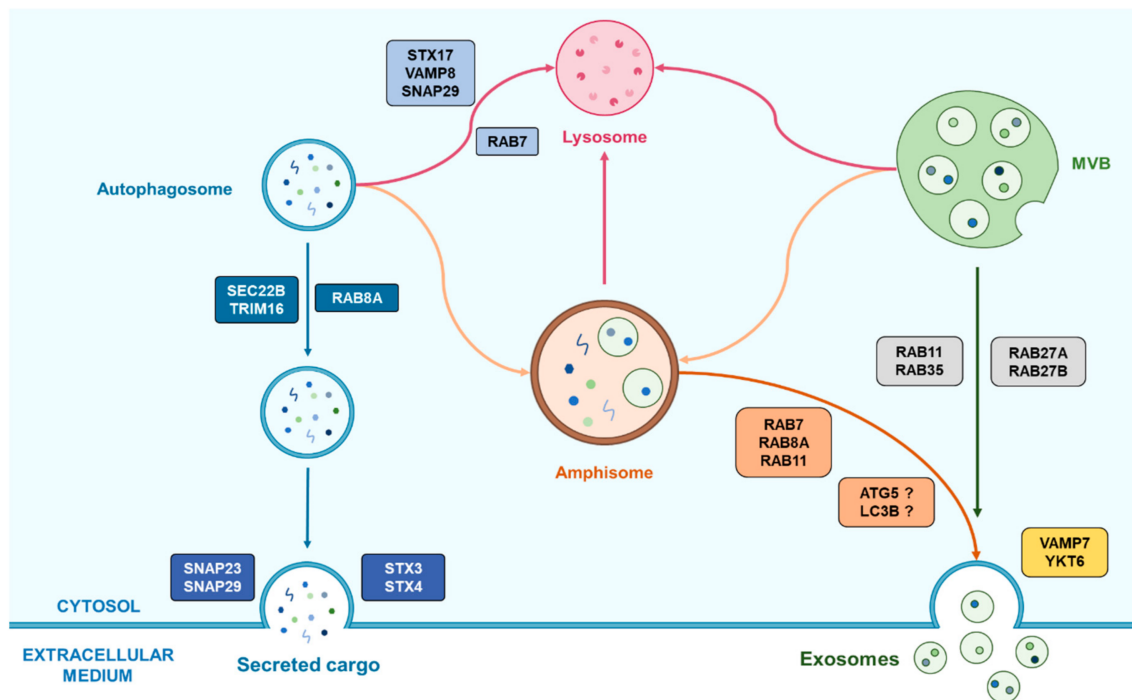


Figure 3. Representation of the emerging cooperation between autophagy and exosomes biogenesis helped by the amphisome. Autophagosomes can fuse with MVBs in order to form amphisome which have two possible fates following the cell conditions. First, the amphisome is able to fuse with a lysosome for the degradation of its cargo and its recycling. Alternatively, amphisomes can also be implicated in secretory processes by the means of Rab proteins that can vary according to the cell type. This last process may also require autophagy-related proteins which role remains unclear.

Since cells must survive in stress conditions by using autophagy and/or EVs secretion as discussed earlier, it seems interesting to investigate whether their cooperation may occur in cancer development. Even though little is known about this, some studies have already focused their attention on such an eventual interaction. For example, the application of rotenone in breast and prostate cancer stem cells, which imitates a respiratory stress by altering mitochondrial activity, resulted in increased autophagy and exosome release, suggesting a collaboration of these processes in the stress response [106,107]. The hypothesis concerning their cooperation in responding to cellular stress is supported by an observation of increased autophagy and EVs secretion after drug treatments and in chemo-resistant cancer cells, although there is no clear confirmation of their cooperation [108–110]. These stress response mechanisms remain unclear and need further investigation, because it is not known yet if such observations are the result of a real coordination between autophagy and EVs biogenesis and release, or whether it only represents a way cells respond to stress conditions.

5. Conclusions

Autophagy and the secretion of small EVs, and particularly exosomes, seem to be closely related. Indeed, the discovery of a secretory pathway for autophagy tends to support the hypothesis of a link between these two processes. Moreover, common actors

such as the Rab-GTPases and SNARE protein families were already shown to operate in both mechanisms. Since they are implicated in cancer development in different ways, studying the interactions between autophagy and the secretion of EVs, and especially exosomes, may be of great interest in the pursuit of a better understanding of some of the more obscure parts of cancer development that remain elusive.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, C.A.; writing—review and editing, N.C., A.B., A.P. and M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank to David N Naumann, Honorary Clinical Lecturer, University of Birmingham and General surgeon, University Hospital Birmingham, for his assistance with English language editing.

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

References

1. Klionsky, D.J. Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science* **2000**, *290*, 1717–1721. [[CrossRef](#)]
2. Kroemer, G.; Mariño, G.; Levine, B. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 280–293. [[CrossRef](#)]
3. Ravanan, P.; Srikumar, I.F.; Talwar, P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci.* **2017**, *188*, 53–67. [[CrossRef](#)]
4. Galluzzi, L.; Pietrocola, F.; Pedro, J.M.B.-S.; Amaravadi, R.K.; Baehrecke, E.H.; Cecconi, F.; Codogno, P.; Debnath, J.; Gewirtz, D.A.; Karantza, V.; et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* **2015**, *34*, 856–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mowers, E.E.; Sharifi, M.N.; MacLeod, K.F. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *FEBS J.* **2018**, *285*, 1751–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kenific, C.M.; Thorburn, A.; Debnath, J. Autophagy and metastasis: Another double-edged sword. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 241–245. [[CrossRef](#)]
7. Mowers, E.; Sharifi, M.N.; MacLeod, K.F. Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene* **2017**, *36*, 1619–1630. [[CrossRef](#)]
8. Yun, C.W.; Lee, S.H. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3466. [[CrossRef](#)]
9. Mazouffre, C.; Geyl, S.; Perraud, A.; Blondy, S.; Jauberteau, M.-O.; Mathonnet, M.; Verdier, M. Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: A promising therapeutic approach for colorectal cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 2610–2622. [[CrossRef](#)]
10. Mokarram, P.; Albokashy, M.; Zarghooni, M.; Moosavi, M.A.; Sepehri, Z.; Chen, Q.M.; Hudecki, A.; Sargazi, A.; Alizadeh, J.; Moghadam, A.R.; et al. New frontiers in the treatment of colorectal cancer: Autophagy and the unfolded protein response as promising targets. *Autophagy* **2017**, *13*, 781–819. [[CrossRef](#)]
11. Koustas, E.; Sarantis, P.; Kyriakopoulou, G.; Papavassiliou, A.G.; Karamouzis, M.V. The Interplay of Autophagy and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer—Ways of Enhancing Immunotherapy Action. *Cancers* **2019**, *11*, 533. [[CrossRef](#)]
12. Chen, Y.-D.; Fang, Y.-T.; Cheng, Y.-L.; Lin, C.-F.; Hsu, L.-J.; Wang, S.-Y.; Anderson, R.; Chang, C.-P.; Lin, Y.-S. Exophagy of annexin A2 via RAB11, RAB8A and RAB27A in IFN- γ -stimulated lung epithelial cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13. [[CrossRef](#)]
13. Xu, J.; Camfield, R.; Gorski, S.M. The interplay between exosomes and autophagy—Partners in crime. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, jcs215210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gudbergsson, J.M.; Johnsen, K.B. Exosomes and autophagy: Rekindling the vesicular waste hypothesis. *J. Cell Commun. Signal.* **2019**, *13*, 443–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Théry, C. Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* **2011**, *3*, 15. [[CrossRef](#)]
16. Record, M.; Carayon, K.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841*, 108–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tkach, M.; Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **2016**, *164*, 1226–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. György, B.; Szabó, T.G.; Pásztói, M.; Pál, Z.; Misják, P.; Aradi, B.; László, V.; Pállinger, É.; Pap, E.; Kittel, Á.; et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2667–2688. [[CrossRef](#)]
19. Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 373–383. [[CrossRef](#)]
20. Huotari, J.; Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J.* **2011**, *30*, 3481–3500. [[CrossRef](#)]
21. Hurley, J.H. ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* **2015**, *34*, 2398–2407. [[CrossRef](#)]
22. Raiborg, C.; Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **2009**, *458*, 445–452. [[CrossRef](#)]
23. Babst, M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2011**, *23*, 452–457. [[CrossRef](#)]
24. Henne, W.M.; Buchkovich, N.J.; Emr, S.D. The ESCRT Pathway. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 77–91. [[CrossRef](#)]

25. Henne, W.M.; Stenmark, H.; Emr, S.D. Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a016766. [[CrossRef](#)]
26. Colombo, M.; Moita, C.; Van Niel, G.; Kowal, J.; Vigneron, J.; Benaroch, P.; Manel, N.; Moita, L.F.; Théry, C.; Raposo, G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 5553–5565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chen, L.; Chen, R.; Kemper, S.; Brigstock, D.R. Pathways of production and delivery of hepatocyte exosomes. *J. Cell Commun. Signal.* **2017**, *12*, 343–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hessvik, N.P.; Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 193–208. [[CrossRef](#)]
29. Ostrowski, M.; Carmo, N.B.; Krumeich, S.; Fanget, I.; Raposo, G.; Savina, A.; Moita, C.F.; Schauer, K.; Hume, A.N.; Freitas, R.P.; et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *12*, 19–30. [[CrossRef](#)]
30. Blanc, L.; Vidal, M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases* **2018**, *9*, 95–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Baietti, M.F.; Zhang, Z.; Mortier, E.; Melchior, A.; DeGeest, G.; Geeraerts, A.; Ivarsson, Y.; Depoortere, F.; Coomans, C.; Vermeiren, E.; et al. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 677–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Savina, A.; Fader, C.M.; Damiani, M.T.; Colombo, M.I. Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner. *Traffic* **2004**, *6*, 131–143. [[CrossRef](#)]
33. Kowal, J.; Tkach, M.; Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *29*, 116–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Fader, C.M.; Sánchez, D.G.; Mestre, M.B.; Colombo, M.I. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: Two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergy* **2009**, *1793*, 1901–1916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gross, J.C.; Chaudhary, V.; Bartscherer, K.; Boutros, M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 1036–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tauro, B.J.; Mathias, R.A.; Greening, D.W.; Gopal, S.K.; Ji, H.; Kapp, E.A.; Coleman, B.M.; Hill, A.F.; Kusebauch, U.; Hallows, J.L.; et al. Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell. Proteom.* **2013**, *12*, 2148–2159. [[CrossRef](#)]
37. Sung, B.H.; Ketova, T.; Hoshino, D.; Zijlstra, A.; Weaver, A.M. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7164. [[CrossRef](#)]
38. Becker, A.; Thakur, B.K.; Weiss, J.M.; Kim, H.S.; Peinado, H.; Lyden, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 836–848. [[CrossRef](#)]
39. Beckler, M.D.; Higginbotham, J.N.; Franklin, J.L.; Ham, A.-J.; Halvey, P.J.; Imasuen, I.E.; Whitwell, C.; Li, M.; Liebler, D.C.; Coffey, R.J. Proteomic Analysis of Exosomes from Mutant KRAS Colon Cancer Cells Identifies Intercellular Transfer of Mutant KRAS. *Mol. Cell. Proteom.* **2013**, *12*, 343–355. [[CrossRef](#)]
40. Szvicsek, Z.; Oszvald, Á.; Szabó, L.; Sándor, G.O.; Kelemen, A.; Soós, A.Á.; Pálóczi, K.; Harsányi, L.; Tölgyes, T.; DeDe, K.; et al. Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 2463–2476. [[CrossRef](#)]
41. Lugini, L.; Valtieri, M.; Federici, C.; Cecchetti, S.; Meschini, S.; Condello, M.; Signore, M.; Fais, S. Exosomes from human colorectal cancer induce a tumor-like behavior in colonic mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 50086–50098. [[CrossRef](#)]
42. Lucchetti, D.; Calapà, F.; Palmieri, V.; Fanali, C.; Carbone, F.; Papa, A.; De Maria, R.; De Spirito, M.; Sgambato, A. Differentiation Affects the Release of Exosomes from Colon Cancer Cells and Their Ability to Modulate the Behavior of Recipient Cells. *Am. J. Pathol.* **2017**, *187*, 1633–1647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mizushima, N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2861–2873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 107–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2503–2518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Fujita, N.; Hayashi-Nishino, M.; Fukumoto, H.; Omori, H.; Yamamoto, A.; Noda, T.; Yoshimori, T. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 4651–4659. [[CrossRef](#)]
47. Weidberg, H.; Shvets, E.; Elazar, Z. Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 125–156. [[CrossRef](#)]
48. Itakura, E.; Kishi-Itakura, C.; Mizushima, N. The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell* **2012**, *151*, 1256–1269. [[CrossRef](#)]
49. Huang, T.; Song, X.; Yang, Y.; Wan, X.; Alvarez, A.A.; Sastry, N.; Feng, H.; Hu, B.; Cheng, S.-Y. Autophagy and Hallmarks of Cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **2018**, *23*, 247–267. [[CrossRef](#)]
50. Alers, S.; Löffler, A.S.; Wesselborg, S.; Stork, B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *32*, 2–11. [[CrossRef](#)]
51. Torii, S.; Yoshida, T.; Arakawa, S.; Honda, S.; Nakanishi, A.; Shimizu, S. Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1552–1564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Mathew, R.; Kongara, S.; Beaudoin, B.; Karp, C.M.; Bray, K.; Degenhardt, K.; Chen, G.; Jin, S.; White, E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1367–1381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **2008**, *132*, 27–42. [[CrossRef](#)]
54. Singh, S.S.; Vats, S.; Chia, A.Y.-Q.; Tan, T.Z.; Deng, S.; Ong, M.S.; Arfuso, F.; Yap, C.T.; Goh, B.C.; Sethi, G.; et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* **2018**, *37*, 1142–1158. [[CrossRef](#)]
55. Mathew, R.; Karantza-Wadsworth, V.; White, E. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 961–967. [[CrossRef](#)]
56. Gong, C.; Bauvy, C.; Tonelli, G.; Yue, W.; Delomenie, C.; Nicolas, V.; Zhu, Y.; Domergue, V.; Marinesteban, V.; Tharinger, H.; et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* **2012**, *32*, 2261–2272. [[CrossRef](#)]
57. Wolf, J.; Dewi, D.L.; Fredebohm, J.; Müller-Decker, K.; Flechtenmacher, C.; Hoheisel, J.D.; Boettcher, M. A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R109. [[CrossRef](#)]
58. Li, J.; Yang, B.; Zhou, Q.; Wu, Y.; Shang, D.; Guo, Y.; Song, Z.; Zheng, Q.; Xiong, J. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial–mesenchymal transition. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 1343–1351. [[CrossRef](#)]
59. Chiarugi, P.; Giannoni, E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1352–1364. [[CrossRef](#)]
60. Fung, C.; Lock, R.; Gao, S.; Salas, E.; Debnath, J. Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 797–806. [[CrossRef](#)]
61. Hu, Y.-L.; DeLay, M.; Jahangiri, A.; Molinaro, A.M.; Rose, S.D.; Carbonell, W.S.; Aghi, M.K. Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1773–1783. [[CrossRef](#)]
62. White, E.; Mehnert, J.M.; Chan, C.S. Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 5037–5046. [[CrossRef](#)]
63. Levy, J.M.M.; Towers, C.G.; Thorburn, A. Targeting autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 528–542. [[CrossRef](#)]
64. Onorati, A.V.; Dyczynski, M.; Ojha, R.; Amaravadi, R.K. Targeting autophagy in cancer. *Cancer* **2018**, *124*, 3307–3318. [[CrossRef](#)]
65. Devenport, S.N.; Shah, Y.M. Functions and Implications of Autophagy in Colon Cancer. *Cells* **2019**, *8*, 1349. [[CrossRef](#)]
66. Seiwert, N.; Neitzel, C.; Stroh, S.; Frisan, T.; Audebert, M.; Toulany, M.; Kaina, B.; Fahrner, J. AKT2 suppresses pro-survival autophagy triggered by DNA double-strand breaks in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e3019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Yang, X.; Xu, X.; Zhu, J.; Zhang, S.; Wu, Y.; Wu, Y.; Zhao, K.; Xing, C.; Cao, J.; Zhu, H.; et al. miR-31 affects colorectal cancer cells by inhibiting autophagy in cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget* **2016**, *7*, 79617–79628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Sasaki, K.; Tsuno, N.H.; Sunami, E.; Tsurita, G.; Kawai, K.; Okaji, Y.; Nishikawa, T.; Shuno, Y.; Hongo, K.; Hiyoshi, M.; et al. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 370. [[CrossRef](#)]
69. Lauzier, A.; Normandeau-Guimond, J.; Vaillancourt-Lavigne, V.; Boivin, V.; Charbonneau, M.; Rivard, N.; Scott, M.S.; Dubois, C.M.; Jean, S. Colorectal cancer cells respond differentially to autophagy inhibition in vivo. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ponpuak, M.; Mandell, M.A.; Kimura, T.; Chauhan, S.; Cleyrat, C.; Deretic, V. Secretory autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *35*, 106–116. [[CrossRef](#)]
71. Dupont, N.; Jiang, S.; Pilli, M.; Ornatowski, W.; Bhattacharya, D.; Deretic, V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* **2011**, *30*, 4701–4711. [[CrossRef](#)]
72. Migneault, F.; Hébert, M.-J. Autophagy, tissue repair, and fibrosis: A delicate balance. *Matrix Biol.* **2021**. [[CrossRef](#)]
73. Bel, S.; Pendse, M.; Wang, Y.; Li, Y.; Ruhn, K.A.; Hassell, B.; Leal, T.; Winter, S.E.; Xavier, R.J.; Hooper, L.V. Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science* **2017**, *357*, 1047–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Son, S.M.; Cha, M.-Y.; Choi, H.; Kang, S.; Choi, H.; Lee, M.-S.; Park, S.A.; Mook-Jung, I. Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease. *Autophagy* **2016**, *12*, 784–800. [[CrossRef](#)]
75. Nilsson, P.; Loganathan, K.; Sekiguchi, M.; Matsuba, Y.; Hui, K.; Tsubuki, S.; Tanaka, M.; Iwata, N.; Saito, T.; Saido, T.C. A β Secretion and Plaque Formation Depend on Autophagy. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 61–69. [[CrossRef](#)]
76. Ejlerskov, P.; Rasmussen, I.; Nielsen, T.T.; Bergström, A.-L.; Tohyama, Y.; Jensen, P.H.; Vilhardt, F. Tubulin Polymerization-promoting Protein (TPPP/p25 α) Promotes Unconventional Secretion of α -Synuclein through Exophagy by Impairing Autophagosome-Lysosome Fusion. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17313–17335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Ao, X.; Zou, L.; Wu, Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 348–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Kimura, T.; Jia, J.; Kumar, S.; Choi, S.W.; Gu, Y.; Mudd, M.; Dupont, N.; Jiang, S.; Peters, R.; Farzam, F.; et al. Dedicated SNARE s and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *EMBO J.* **2017**, *36*, 42–60. [[CrossRef](#)]
79. Villarroya-Beltri, C.; Baixauli, F.; Mittelbrunn, M.; Delgado, I.F.; Torralba, D.; Moreno-Gonzalo, O.; Baldanta, S.; Enrich, C.; Guerra, S.; Sánchez-Madrid, F. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13588. [[CrossRef](#)]
80. Levine, B.; Kroemer, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* **2019**, *176*, 11–42. [[CrossRef](#)]
81. Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F.; Schwille, P.; Brügger, B.; Simons, M. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **2008**, *319*, 1244–1247. [[CrossRef](#)]

82. Stuffers, S.; Wegner, C.S.; Stenmark, H.; Brech, A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* **2009**, *10*, 925–937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Perez-Hernandez, D.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Jorge, I.; López-Martín, S.; Ursa, A.; Sánchez-Madrid, F.; Vázquez, J.; Yáñez-Mó, M. The Intracellular Interactome of Tetraspanin-enriched Microdomains Reveals Their Function as Sorting Machineries toward Exosomes. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 11649–11661. [[CrossRef](#)]
84. Uytterhoeven, V.; Lauwers, E.; Maes, I.; Miskiewicz, K.; Melo, M.N.; Swerts, J.; Kuenen, S.; Wittcox, R.; Corthout, N.; Marrink, S.-J.; et al. Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron* **2015**, *88*, 735–748. [[CrossRef](#)]
85. Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 255–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Quaglia, M.; Dellepiane, S.; Guglielmetti, G.; Merlotti, G.; Castellano, G.; Cantaluppi, V. Extracellular Vesicles as Mediators of Cellular Crosstalk Between Immune System and Kidney Graft. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Lindoso, R.S.; Collino, F.; Vieyra, A. Extracellular vesicles as regulators of tumor fate: Crosstalk among cancer stem cells, tumor cells and mesenchymal stem cells. *Stem Cell Investig.* **2017**, *4*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Al-Nedawi, K.; Meehan, B.; Micallef, J.; Lhotak, V.; May, L.; Guha, A.; Rak, J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 619–624. [[CrossRef](#)]
89. Pinet, S.; Bessette, B.; Vedrenne, N.; Lacroix, A.; Richard, L.; Jauberteau, M.-O.; Battu, S.; Lalloué, F. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 50349–50364. [[CrossRef](#)]
90. Skog, J.; Würdinger, T.; Van Rijn, S.; Meijer, D.H.; Gainche, L.; Curry, W.T.J.; Carter, B.S.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1470–1476. [[CrossRef](#)]
91. Webber, J.; Steadman, R.; Mason, M.D.; Tabi, Z.; Clayton, A. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9621–9630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Lee, K.W.; Cho, J.A.; Park, H.; Lim, E.H. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int. J. Oncol.* **2011**, *40*, 130–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Webber, J.; Spary, L.K.; Sanders, A.J.; Chowdhury, R.; Jiang, W.G.; Steadman, R.; Wymant, J.M.; Jones, A.T.; Kynaston, H.G.; Mason, M.D.; et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* **2015**, *34*, 290–302. [[CrossRef](#)]
94. Wilson, C.M.; Naves, T.; Vincent, F.; Melloni, B.; Bonnaud, F.; Lalloué, F.; Jauberteau, M.-O. Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 3983–3997. [[CrossRef](#)]
95. Steinbichler, T.B.; Dudás, J.; Skvortsov, S.; Ganswindt, U.; Riechelmann, H.; Skvortsova, I.-I. Therapy resistance mediated by exosomes. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Leidal, A.M.; Huang, H.H.; Marsh, T.; Solvik, T.; Zhang, D.; Ye, J.; Kai, F.; Goldsmith, J.; Liu, J.Y.; Huang, Y.-H.; et al. The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 187–199. [[CrossRef](#)]
97. Guo, H.; Chitiprolu, M.; Roncevic, L.; Javalet, C.; Hemming, F.J.; Trung, M.T.; Meng, L.; Latreille, E.; De Souza, C.T.; McCulloch, D.; et al. Atg5 Disassociates the V1V0-ATPase to Promote Exosome Production and Tumor Metastasis Independent of Canonical Macroautophagy. *Dev. Cell* **2017**, *43*, 716–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Guo, H.; Sadoul, R.; Gibbins, D. Autophagy-independent effects of autophagy-related-5 (Atg5) on exosome production and metastasis. *Mol. Cell. Oncol.* **2018**, *5*, e1445941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Bader, C.A.; Shandala, T.; Ng, Y.S.; Johnson, I.R.D.; Brooks, D.A. Atg9 is required for intraluminal vesicles in amphisomes and autolysosomes. *Biol. Open* **2015**, *4*, 1345–1355. [[CrossRef](#)]
100. Murrow, L.; Malhotra, R.; Debnath, J. ATG12–ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 300–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Liu, J.; Zhang, Y.; Liu, A.; Wang, J.; Li, L.; Chen, X.; Gao, X.; Xue, Y.; Zhang, X.; Liu, Y. Distinct Dasatinib-Induced Mechanisms of Apoptotic Response and Exosome Release in Imatinib-Resistant Human Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Galluzzi, L.; Baehrecke, E.H.; Ballabio, A.; Boya, P.; Pedro, J.M.B.-S.; Cecconi, F.; Choi, A.M.; Chu, C.T.; Codogno, P.; Colombo, M.I.; et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1811–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Adnan, M.; Islam, W.; Zhang, J.; Zheng, W.; Lu, G.-D. Diverse Role of SNARE Protein Sec22 in Vesicle Trafficking, Membrane Fusion, and Autophagy. *Cells* **2019**, *8*, 337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Fader, C.M.; Sánchez, D.; Furlán, M.; Colombo, M.I. Induction of Autophagy Promotes Fusion of Multivesicular Bodies with Autophagic Vacuoles in K562 Cells. *Traffic* **2007**, *9*, 230–250. [[CrossRef](#)]
105. Patel, K.K.; Miyoshi, H.; Beatty, W.L.; Head, R.D.; Malvin, N.P.; Cadwell, K.; Guan, J.-L.; Saitoh, T.; Akira, S.; Seglen, P.O.; et al. Autophagy proteins control goblet cell function by potentiating reactive oxygen species production. *EMBO J.* **2013**, *32*, 3130–3144. [[CrossRef](#)]
106. Zhang, M.; Kenny, S.J.; Ge, L.; Xu, K.; Schekman, R. Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *eLife* **2015**, *4*, e11205. [[CrossRef](#)]

107. Kumar, D.; Gupta, D.; Shankar, S.; Srivastava, R.K. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3280–3291. [[CrossRef](#)]
108. Sun, W.-L.; Chen, J.; Wang, Y.-P.; Zheng, H. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy* **2011**, *7*, 1035–1044. [[CrossRef](#)]
109. Yang, Z.J.; Chee, C.E.; Huang, S.; Sinicrope, F.A. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1533–1541. [[CrossRef](#)]
110. Yu, D.; Wu, Y.; Shen, H.; Lv, M.-M.; Chen, W.; Zhang, X.; Zhong, S.; Tang, J.; Zhao, J. Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer. *Cancer Sci.* **2015**, *106*, 959–964. [[CrossRef](#)]

Objectifs

Le cancer colique est un problème majeur de santé publique de nos jours avec une forte incidence, notamment en Nouvelle-Aquitaine, et une forte mortalité malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique. Il s'agit d'un cancer hautement métastatique et des résistances aux différents traitements sont observées, notamment du fait de la présence de cellules souches cancéreuses, supports de l'agressivité tumorale. Du fait de la faible représentation de ces cellules ainsi que du manque de marqueur spécifique les identifiant, il est difficile encore aujourd'hui de les détecter et de les cibler. De plus, elles sont en partie responsables de l'invasion métastatique en activant l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ces cellules utilisent l'autophagie et la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs), respectivement à des fins de survie et de communication intercellulaire, promouvant l'invasion tumorale et la résistance thérapeutique. Ces deux processus conduisent à la formation de vésicules intracellulaires en impliquant la famille des petites protéines G Rab. Ces vésicules peuvent avoir une destination commune : le lysosome et, depuis la mise en évidence d'une autophagie sécrétoire, pourraient aussi partager un devenir sécrétoire. Le laboratoire CAPTuR, travaille depuis des années sur l'un et l'autre de ces processus, séparément. Il a notamment contribué à montrer que les 2 jouent un rôle important dans l'agressivité et la plasticité des CSCs (Pinet *et al.* 2016; Brunel, Hombourger, *et al.* 2021). Ces travaux ont conduit à nous intéresser à leurs connexions éventuelles dans deux modèles, celui du glioblastome et celui du cancer colique, qui fait l'objet de cette thèse.

Le travail présenté ci-après s'est alors articulé autour de l'étude des effets d'altérations de l'autophagie et de la sécrétion d'EVs sur l'agressivité des cellules de cancer colique de stades différents, et des éventuelles interactions entre les deux processus.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'altération de la sécrétion d'EVs. Pour cela, nous avons choisi d'inhiber un gène codant une protéine essentielle à la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique : Rab-27A. Cette protéine intervenant dans le processus de fusion des MVBs avec la MP, son inhibition entraînerait dès lors une altération de la sécrétion des exosomes en particulier, comme cela a précédemment été publié (van Solinge *et al.* 2020). Une fois l'expression de cette protéine altérée, nous avons alors procédé à l'évaluation de la sécrétion d'EVs dans les modèles cellulaires par l'utilisation du NanoSight. N'ayant pu observer de diminution de la sécrétion vésiculaire, nous avons émis plusieurs hypothèses :

- L'inhibition de Rab-27A seule suffit-elle à altérer de manière conséquente et observable la sécrétion d'EVs ?
- D'autres moyens d'inhibition permettent-ils d'observer une diminution de la sécrétion d'EVs au NanoSight ?
- Le NanoSight est-il un outil adéquat pour évaluer la sécrétion d'EVs dans nos conditions expérimentales ?
- Une augmentation de la sécrétion d'EVs peut-elle être détectée par le NanoSight ?

Ces travaux ont alors fait l'objet d'un article publié dans « International Journal of Molecular Science », présentant les difficultés rencontrées dans l'évaluation de la sécrétion de vésicules extracellulaires dans les modèles cellulaires. Ce travail de thèse ayant été réalisé en collaboration avec une autre doctorante au sein du laboratoire CAPTuR travaillant sur un modèle de glioblastome, l'article publié s'est focalisé sur l'étude d'une lignée cellulaire par type de cancer, les HCT116 pour le cancer colique et les U87-MG pour le glioblastome. Des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article seront également exposés dans le but de répondre à certaines hypothèses soulevées suite aux précédents résultats. La répercussion de l'inhibition de Rab-27A sur le processus autophagique a été également exploré.

Dans un second temps, seront présentés les résultats concernant les altérations de l'autophagie dans deux modèles cellulaires de cancer colique. L'objectif principal a été ici de comparer les effets de telles altérations entre deux stades différents de cancer colique, ainsi que les conséquences potentielles sur la sécrétion d'EVs. Dès lors, selon la même approche que précédemment, l'expression d'un gène en particulier a été inhibée : *ATG5*. La protéine *ATG5* intervenant dans l'élongation de l'autophagosome, l'inhibition de son expression entraîne dès lors des altérations dans la maturation de la vésicule de recyclage. Le but de l'élaboration de ces modèles a été d'abord de déterminer les effets d'altérations de l'autophagie sur la fonctionnalité des cellules en rapport avec l'agressivité, notamment la prolifération, le compartiment souche, et la chimiosensibilité. D'autre part, la capacité des cellules à migrer *in vitro* et *in vivo* a été évaluée, ainsi que l'expression des différents acteurs de la TEM. Les résultats de ces travaux ont soulevé les questions suivantes :

- Quel lien direct existe entre altération de l'autophagie et augmentation de l'agressivité dans les stades précoces ?
- Quel rôle l'inhibition de l'autophagie peut-elle jouer dans les stades avancés de cancer colique ?
- La sécrétion d'EVs, en particulier d'exosomes, est-elle modifiée ?

Chapitre III. Matériels et méthodes

III.1. Développement des modèles cellulaires

III.1.1. Lignées cellulaires

Deux lignées de cancer colique ont été utilisées dans ces travaux : HCT116 et Colo205, chacune représentant un stade, un sous-type moléculaire et un statut mutationnel différent ([Tableau 2](#)).

Les HCT116, cellules de carcinome isolées d'un colon d'homme adulte, ont été fournies par l'ATCC (CCL-247™), et cultivées dans du milieu McCoy's 5A contenant de la L-glutamine (#BE12-688EF, Lonza™), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; H2B, Limoges, France), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco™, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Elles représentent un stade précoce de carcinogenèse colique (stade I-II), correspondant au sous-type CMS1 (Fichtner *et al.* 2020) et présentent une mutation pour *KRAS* et la *PIK3CA*, et un statut MSI.

Les Colo205, cellules isolées d'ascites chez un homme de 70 ans atteint d'un adénocarcinome colique, ont été fournies par l'ATCC (CCL-222™), et cultivées dans du milieu RPMI 1640 GlutaMAX™ (61870036, Gibco™, Thermofisher Scientific, MA, USA) supplémenté avec 10% de SVF, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco™, Thermofisher Scientific, MA, USA). Elles représentent un stade métastatique de cancer colique (stade IV), correspondant au sous-type CMS2, présentent une mutation de *BRAF*, *TP53* et *APC*, et un statut MSS.

Dans le cadre de l'étude de la sécrétion vésiculaire, les cellules ont systématiquement étéensemencées dans du milieu « EVs-free » ci-après appelé « EFM ». Ces milieux EFM ont été préparés par adjonction de 10% de SVF préalablement ultracentrifugé à 120000 x g durant 18h, dans les milieux correspondants, selon la lignée cellulaire utilisée.

[Tableau 2](#) – Caractéristiques anatomiques et mutationnelles des lignées cellulaires utilisées

HCT116	Colo205
Adénocarcinome colique	Adénocarcinome colique
Stade précoce	Stade métastatique : ascite
CMS1	CMS2
MSI	MSS
<i>KRAS</i> ^{G13D}	<i>KRAS</i> ^{wt}
<i>BRAF</i> ^{wt}	<i>BRAF</i> ^{V600E}
<i>PIK3CA</i> ^{H1047R}	<i>PIK3CA</i> ^{wt}
<i>TP53</i> ^{wt}	<i>TP53</i> ^{Y107*}
<i>APC</i> ^{wt}	<i>APC</i> ^{T1554N}

Les deux lignées cellulaires ont été ensemencées à hauteur de 20.000 cellules/cm² dans toutes les conditions *in vitro*. Les cellules ont été cultivées en « normoxie » (5% CO₂ et 21% O₂) ou en hypoxie (5% CO₂ et 1 % O₂). Leur numération a été réalisée par test d'exclusion au bleu de trypan sur cellule de Malassez.

La culture en hypoxie dans le cadre de l'étude de la sécrétion vésiculaire a été réalisée à l'aide d'une station d'hypoxie InvivoO2 (Baker, Sanford, ME, USA) durant 48 ou 72h en EFM.

III.1.2. Altérations de l'autophagie et de la sécrétion vésiculaire

III.1.2.1. Inhibition d'ATG5 et RAB27A par shRNA

III.1.2.1.1. Vecteurs plasmidiques

Des modèles d'altérations de l'autophagie et de la sécrétion vésiculaire ont été développés à partir des deux lignées de cancer colique HCT116 et Colo205. Pour cela, les cellules ont été infectées par des lentivirus contenant des vecteurs shRNA (short hairpin RNA) ciblant *ATG5* (autophagie) ou *RAB27A* (sécrétion vésiculaire) spécifiquement, ou le vecteur vide (pLKO). Le vecteur pLKO.1 utilisé ((Stewart *et al.* 2003; Moffat *et al.* 2006) [Figure 21](#)) présente un gène de résistance à la puromycine permettant de réaliser la sélection des cellules (30 µg/mL).

Cinq shRNA différents ont été testés pour *ATG5* et trois pour *RAB27A*. Les séquences et références des shRNA sont répertoriées dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3 – Références et caractéristiques des vecteurs plasmidiques shRNA

Numéro	Identifiant	Référence	Séquence	Résistance
163	pLKO.1 shATG5 TRCN0000150940	NM_004849. 1-420s1c1	GCAGAACCATACTATTTGCTT	Puromycine
164	pLKO.1 shATG5 TRCN0000150645	NM_004849. 1-1043s1c1	GATTCATGGAATTGAGCCAAT	Puromycine
165	pLKO.1 shATG5 TRCN0000151474	NM_004849. 1-915s1c1	CCTTTCATTCAGAAGCTGTTT	Puromycine
166	pLKO.1 shATG5 TRCN0000151963	NM_004849. 1-1170s1c1	CCTGAACAGAATCATCCTTAA	Puromycine
167	pLKO.1 shATG5 TRCN0000150976	NM_004849. 1-2567s1c1	CCAGATATTCTGGAATGGAAA	Puromycine
sh1	pLKO.1 shRAB27A TRCN0000005295	NM_004580. 3-313s1c1	CCAGTGTACTTTACCAATATA	Puromycine
sh2	pLKO.1 shRAB27A TRCN0000005296	NM_004580. 3-865s1c1	CGGATCAGTTAAGTGAAGAAA	Puromycine
sh3	pLKO.1 shRAB27A TRCN0000005297	NM_004580. 3-735s1c1	GCTGCCAATGGGACAAACATA	Puromycine

III.1.2.1.2. Transfection des HEK-293T et production de particules virales

Des cellules HEK-293 (« Human Embryonic Kidney », ATCC) exprimant l'antigène SV40 T (« Simian vacuolating virus 40 T ») ont été utilisées dans le but de produire des particules lentivirales contenant le plasmide d'intérêt en grande quantité. Dans ce but, les HEK ont été ensemencées le premier jour (J1) à hauteur de 5×10^5 cellules par flasque T75 (Sarstedt SA, Marnay, France) dans 10 mL de milieu MEM sans antibiotique (Gibco™, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplémenté avec 10% de SVF. Le lendemain (J2), la transfection des HEK a été réalisée à l'aide de l'agent transfectant jetPEI® (Polyplus, Vectura, Illkirch, France). Ainsi, 10 µg de plasmide d'intérêt sont mis en contact avec le « packaging » lentiviral, puis dilués dans 250µL de NaCl à 150mM. Concomitamment, 20µL de jetPEI® sont dilués dans 250µL de NaCl à 150mM. Une fois les deux solutions homogénéisées, la solution contenant le jetPEI® est délicatement ajoutée à la solution contenant le plasmide d'intérêt, puis le tout est homogénéisé rapidement au vortex et incubé durant 20 minutes à température ambiante. Enfin, les 500µL finaux sont ajoutés dans la T75 contenant les HEK et le tout est délicatement homogénéisé, puis incubé durant 12h à 37°C, 5% de CO₂. Le milieu est remplacé suite à cette incubation (J3) par du milieu complet frais. A J4, le surnageant de culture est récupéré et centrifugé à 1250 rpm pendant 5 minutes afin de culotter les cellules résiduelles et ne récolter que les particules virales contenues dans le surnageant. Celles-ci sont alors stockées à -80°C sur le long terme.

Created with SnapGene®

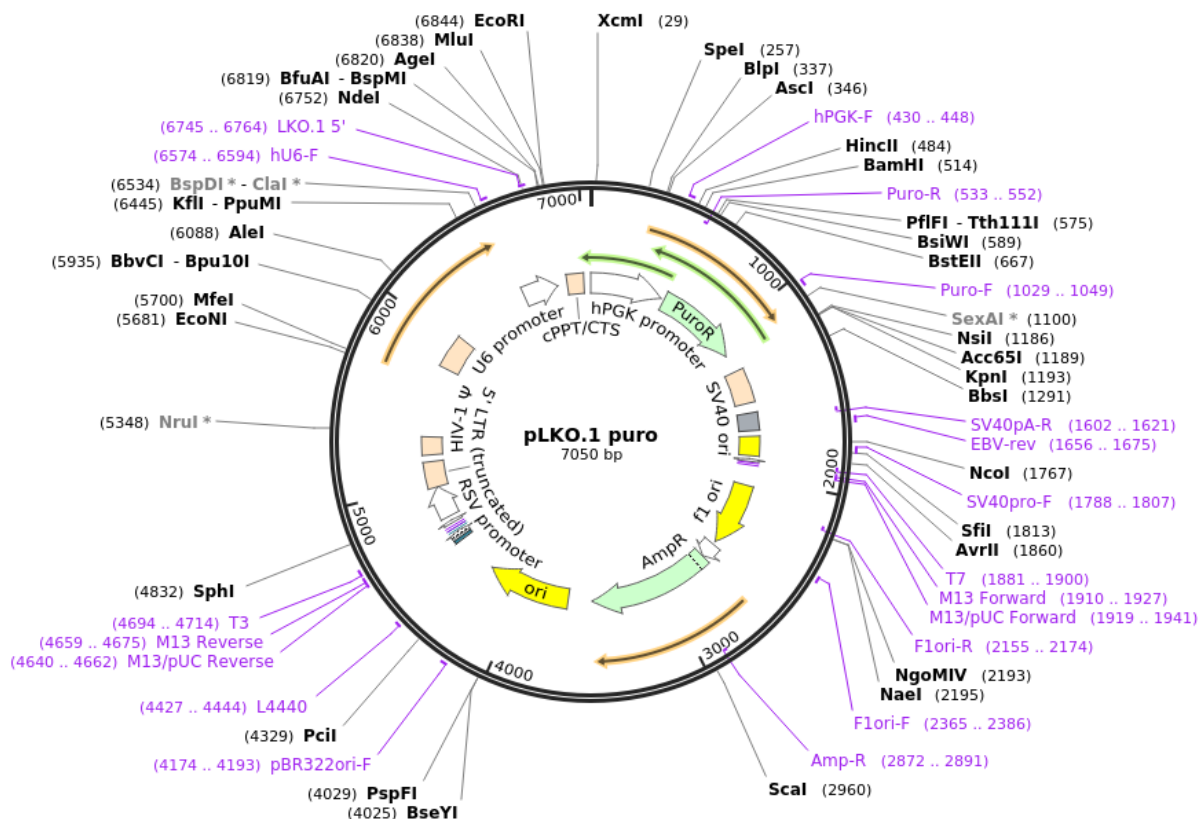


Figure 21 - Carte du vecteur pLKO.1 utilisé lors des infections lentivirales – source : addgene (#8453)

III.1.2.1.3. Infection des HCT116 et des Colo205, et sélection

Les cellules préalablement ensemencées à la densité habituelle en plaques 6 puits dans 2mL de milieu complet ont été infectées à l'aide des particules virales récoltées pour chaque plasmide. Afin de faciliter la pénétration des particules virales dans les cellules, du polybrène concentré à 8 µg/mL finaux a été ajouté au milieu de culture. Ainsi, les particules virales ont été ajoutées dans les puits correspondants, et la sélection à l'aide de la puromycine (30 µg/mL) a été réalisée le lendemain. La comparaison avec des puits contrôles contenant des cellules non infectées et traitées à la puromycine permet d'attester de la sélection des cellules ayant intégré le plasmide. En effet, le gène de résistance à la puromycine contenu dans les plasmides utilisés permet aux cellules infectées de survivre suite au traitement. Les cellules ont alors été maintenues en sélection durant 72h, puis ont pu être utilisées pour les diverses expérimentations.

III.1.2.2. Traitements chimiques

Deux molécules ont été utilisées dans le cadre d'altérations de la sécrétion de vésicules extracellulaires. Tout d'abord, le Nexinhib20 (Nx20 ; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été utilisé à une concentration finale de 5 µM pour 2h de traitement dans le but d'altérer l'interaction entre RAB27A et son effecteur JFC1 (synaptotagmin-like protein 1), et donc la sécrétion d'EVs (Johnson *et al.* 2017). D'autre part, l'indométacine (Indo ; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été utilisée à une concentration de 40 µM durant 48h pour altérer la sécrétion vésiculaire par inhibition du transporteur ABCA3 (Song *et al.* 2008).

A l'inverse, la roténone (Rot ; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), a été utilisée durant 48h à une concentration de 0,5 µM dans le but d'augmenter la sécrétion d'EVs en mimant un stress respiratoire par blocage du premier complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale (Wu *et al.* 2015; D. Kumar *et al.* 2015).

III.1.2.3. Inhibition de RAB27A par siRNA

Un siRNA ciblant RAB27A a également été utilisé dans le but d'inhiber son expression et de comparer ses effets avec l'inhibition stable du shRNA. Un traitement de 48h avec le siRAB27A (MISSION esiRNA targeting human RAB27A, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été réalisé sur les HCT116.

III.2. Etude de l'expression transcriptomique des gènes associés à l'autophagie, la sécrétion vésiculaire, la transition épithélio-mésenchymateuse, et au compartiment souche

III.2.1. RT-qPCR

Les ARN ont été extraits des lysats cellulaires et purifiés à l'aide du RNeasy Mini Kit (#74106 ; QIAGEN, Hilden, Allemagne) en respectant les indications du fournisseur. Après quantification au NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Illkirch, France), 2 µg d'ARN ont été utilisés pour la rétrotranscription à l'aide d'un kit de haute capacité de reverse-transcription d'ADNc (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) selon les recommandations du kit.

Les qPCR, (Réactions en chaîne par polymérase quantitative) ont été réalisées à partir de 100 ng d'ADNc à l'aide d'une Taq polymérase commerciale (Premix ExTaq #RR39WR, TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, France) et d'amorces spécifiques des gènes cibles ([Tableau 4](#)), en plaques 96 puits de 0,1 mL de contenance, insérées dans un appareil QuantStudio™ 3 ou 5 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), en choisissant le protocole « Relative Quantification » (RQ). L'expression génique a été comparée et normalisée par rapport à celle du gène de ménage HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1). La RQ de la condition contrôle est normalisée à 1 pour la comparer aux conditions tests.

Les séquences des amorces/sondes utilisées pour révéler l'expression transcriptomique des gènes étudiés sont répertoriées dans le [Tableau 4](#).

Tableau 4 – Références des amorces utilisées pour la RT-qPCR

Gène cible	Fournisseur	Référence
<i>HPRT1</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs02800695_m1
<i>RAB27A</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs00608302_m1
<i>RAB27B</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs00188156_m1
<i>RAB35</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs00199284_m1
<i>ATG5</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs00355494_m1
<i>LGR5</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs00969422_m1
<i>OCT4 (POU5F1)</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs04260367_gH
<i>SNAI1</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs00195591_m1
<i>SNAI2</i>	ThermoFisher Scientific	4331182 Hs00161904_m1

III.2.2. Séquençage ARN

Dans les modèles shATG5 des HCT116 et Colo205, l'ARN extrait selon la même méthode que précédemment (kit Qiagen) a été envoyé au Beggs Lab (Birmingham, UK) dans le cadre d'une collaboration en vue d'effectuer un séquençage ARN ou RNAseq. Les échantillons ont été envoyés en triplicats biologiques. La qualité des échantillons ayant été vérifiée, des analyses de différences d'expression génique (DEG) ont été effectuées par leurs soins, ainsi que les analyses statistiques associées.

III.3. Analyse de l'expression protéique

III.3.1. Western Blot

Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay) non commercial (50 mM Tris HCl pH8 ; 150 mM NaCl ; 0,1% Triton X-100 ; 0,5% Sodium Deoxycholate ; 0,1% SDS), supplémenté avec du PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) à 1mM final en tant qu'inhibiteur de protéases. Après incubation sur glace pendant 20 minutes, les lysats ont été sonifiés pendant 20 secondes (1 pulse toutes les 2 secondes), puis centrifugés à 18000 x g pendant 30 minutes. Les surnageants correspondant aux protéines purifiées ont été prélevés et dosés par la méthode de Bradford (Quick Start™ Bradford 1X Dye Reagent, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). La séparation des protéines (30 µg pour les lysats cellulaires, 10 µg pour les exosomes purifiés) a été effectuée par SDS-PAGE, suivie d'un transfert semi-sec sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF ; GE Healthcare, Tremblay-en-France, France). Les sites de fixation aspécifiques ont été bloqués par saturation durant 1h dans une solution d'albumine sérique bovine (BSA) concentrée à 5% dans du Tris-buffered saline (TBS)-0,1% Tween 20 (TBST), puis les anticorps primaires spécifiques des protéines d'intérêt ont été ajoutés à la solution de saturation pour incubation durant la nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés pour les analyses par Western Blot sont répertoriés dans le [Tableau 5](#). Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois en TBST, puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP, reconnaissant l'anticorps primaire (Dako Cytomation, Les Ulis, France). Après deux lavages en TBST et un dernier lavage en TBS seul, les membranes ont été révélées à l'aide d'un agent révélateur de l'HRP (Immobilon Western Chemoluminescent HRP Substrate, Merck Millipore, Guyancourt, France) dans une G-Box (Syngene, Fisher Scientific, Illkirch, France), dirigée par la suite logicielle du fournisseur (GeneSys). L'intensité des bandes obtenues suite à la révélation a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider *et al.* 2012, NIH) pour permettre leur quantification.

III.3.2. Immunofluorescence indirecte

L'expression de l'E-cadhérine a été étudiée par immunofluorescence. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées à raison de 20.000 cellules/cm² en plaque 24 puits, contenant une lamelle de verre traitée à la poly-L Lysine de manière à y faciliter l'adhésion des cellules. Après 48h de culture dans 1 mL de milieu complet (c'est-à-dire contenant du SVF), les cellules ont été délicatement lavées trois fois consécutives au PBS. Puis, elles ont été fixées pendant 10 min à température ambiante en paraformaldéhyde (PFA) concentré à 4% dans du PBS, avant d'être perméabilisées pendant 5 minutes dans une solution de Triton X-100 à 0,2% en PBS. Les cellules ont été lavées en PBS pendant 5 min trois fois consécutives avant de procéder à la saturation en BSA 3% PBS pendant 1h. L'anticorps primaire anti-E-cadhérine (#610182 ; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) à une concentration de 2,5 µg/mL a été incubé avec les cellules sur la nuit à 4°C à l'obscurité. Après trois lavages en PBS, l'anticorps secondaire fluorescent Alexa Fluor 595 (Invitrogen ; 595nm) reconnaissant l'anticorps de souris a été incubé 45 minutes à température ambiante à l'obscurité. Trois derniers lavages en PBS ont été réalisés avant de réaliser le montage sur lame. Les lames ont été réalisées en ajoutant du milieu de montage contenant du DAPI (Fluoroshield™ with DAPI, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) sur lequel les lamelles ont été renversées et apposées. L'observation des lames a été réalisée par microscopie confocale sur un appareil Zeiss LSM880 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Munich, Allemagne) de la plateforme Biscem à l'objectif x40. La méthode du Z-stack a été utilisée afin de réaliser une compilation d'images par tranches permettant d'observer les cellules sur toute leur épaisseur. Les images ont été acquises à l'aide du logiciel Zeiss ZEN puis retraitées et analysées grâce au logiciel ImageJ (C. A. Schneider, Rasband, et Eliceiri 2012).

Tableau 5 – Liste des anticorps utilisés pour les analyses d'expression protéique par western blot et immunofluorescence

Protéine cible	Fournisseur	Origine	Poids moléculaire (kDa)	Référence
E-cadhérine	BD Bioscience	Souris	120	610182
NTSR3	BD Bioscience	Souris	95	612101
HSC70	Santa Cruz	Souris	70	Sc-7298
ATG5	Cell Signaling	Lapin	55	2630
TSG101	Abcam	Souris	47	Ab83
β-actine	Santa Cruz	Souris	42	sc-47778
Rab-27A	Cell Signaling	Lapin	27	95394
Rab-27B	Cell Signaling	Lapin	27	44813
Rab-35	Cell Signaling	Lapin	25	9690
Rab-11	Cell Signaling	Lapin	25	5589
CD81	Santa Cruz	Souris	25	sc-166029
ARF6	Cell Signaling	Lapin	19	5740
LC3-B	Cell Signaling	Lapin	15-18	2775

III.4. Evaluation de la sécrétion vésiculaire

III.4.1. Isolement des EVs par ultracentrifugations différentielles

Les EVs ont été isolées selon un protocole adapté de Théry *et al.* (Théry *et al.* 2006), c'est-à-dire par ultracentrifugations différentielles. Tout d'abord, les surnageants de culture cellulaire ont été récupérés et centrifugés à 300 x g pendant 10 minutes afin de culotter les cellules. Ce surnageant a alors été une nouvelle fois centrifugé à 2000 x g pendant 10 minutes pour « culotter » les cellules mortes. Le surnageant issu de ces deux centrifugations est appelé « crude » et a été utilisé pour les expériences d'évaluation de la sécrétion vésiculaire au NanoSight. Ce surnageant « crude » a ensuite été centrifugé à 10000 x g durant 40 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Une première ultracentrifugation à 120000 x g a été effectuée durant 70 minutes pour « culotter » les EVs (Figure 22). Le culot a alors été lavé dans du PBS, suivi par une deuxième ultracentrifugation à 120000 x g durant 70 minutes. Les ultracentrifugations ont été réalisées sur une Optima XPN-80 ou une Optima MAX-XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) selon la quantité de surnageants récupérés. Les rotors utilisés ont également été adaptés en fonction des volumes centrifugés.

Dans le cadre de la purification pour une analyse de l'expression protéique par Western Blot, 3 T75 de chaque condition ont été cultivées durant 72h, puis les surnageants ont été « poolés » (30 mL finaux) pour procéder aux ultracentrifugations. La centrifugation à 10000 x g et la première ultracentrifugation à 120000 x g ont été réalisées sur Optima XPN-80 dans des tubes de 70 mL (#355622) disposés dans un rotor Type 45 Ti (#339160). La dernière ultracentrifugation a été réalisée dans 1 mL de PBS dans des tubes de 1 mL (#347287) disposés dans un rotor MLA-130 (# 367114) sur Optima MAX-XP afin de permettre la récupération des EVs dans 30 µL de tampon de lyse pour les analyses protéiques par Western Blot, ou 50 µL de PBS pour l'analyse en cytométrie en flux.

Pour les analyses de sécrétion vésiculaire au NanoSight, les ultracentrifugations ont été réalisées sur Optima XPN-80 dans des tubes de 13,5 mL disposés dans un rotor Type 70.1 Ti (#342184). Le culot d'EVs a été récupéré dans 750 µL de PBS afin de procéder aux analyses avec le NanoSight. D'autre part, les surnageants déplétés en EVs (issus de la première ultracentrifugation à 120000 x g) ont été conservés pour des traitements ultérieurs.

Les rotors, tubes et ultracentrifugeuses proviennent de chez Beckman Coulter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

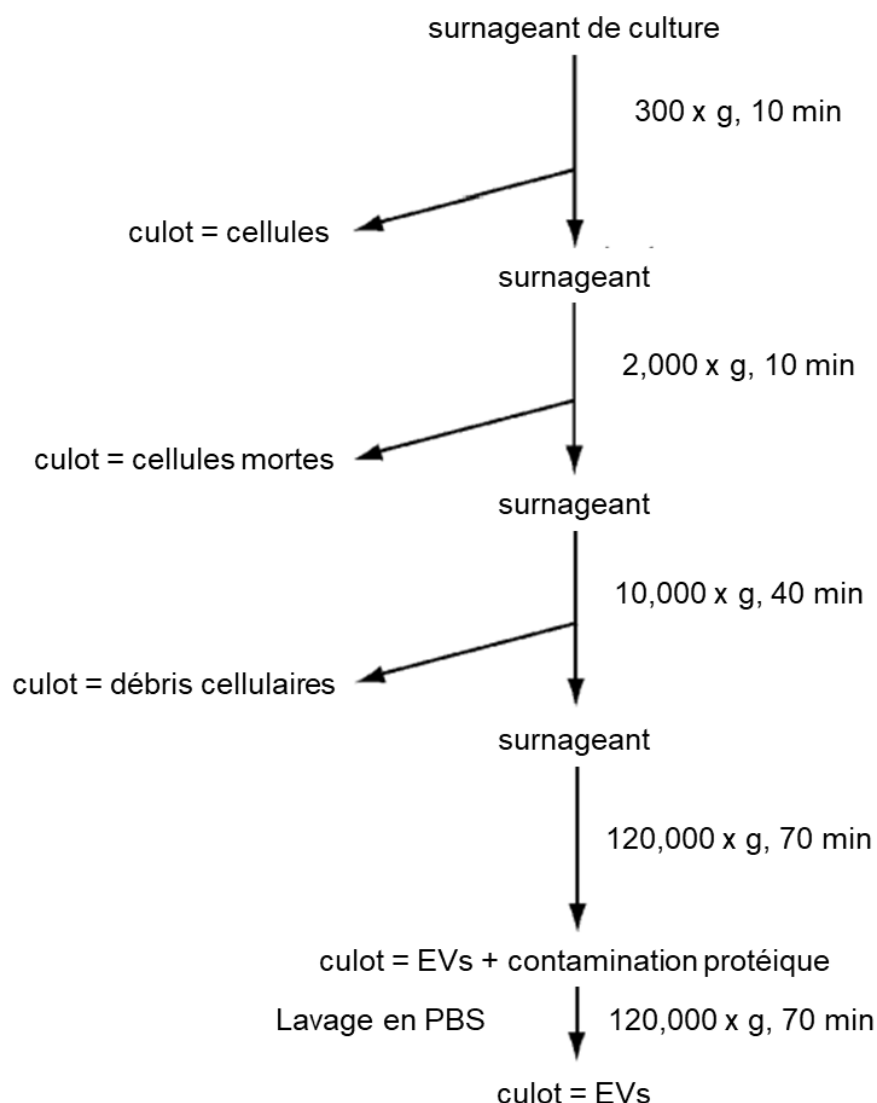


Figure 22 - Protocole de purification des EVs par ultracentrifugations différentielles, adapté de Théry *et al.* 2006.

III.4.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

La technique de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) a été utilisée dans le cadre de l'évaluation de la sécrétion d'EVs issus de nos modèles cellulaires. Pour cela, le NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) a été utilisé. Cette technique se base sur la diffusion dynamique de la lumière (« dynamic light scattering » ou DLS) et du mouvement brownien des particules présentes dans les échantillons, permettant d'estimer notamment leur taille ainsi que leur concentration (Figure 23).

Le NanoSight NS300 est constitué d'une chambre obscure, dans laquelle se trouve un laser (488 nm) venant exciter les particules passant au sein d'une cellule, au-dessus de laquelle est disposé un microscope muni d'une caméra CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor). Les échantillons contenant les EVs dilués dans du PBS sont injectés par le biais d'une seringue dans une tubulure reliée à la cellule exposée au laser. Associé à l'appareil, le logiciel NTA3.3.301 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) a permis de réaliser 5 captures vidéo de 60 secondes chacune. Pour chaque capture, les paramètres de « camera level » (contrôlant l'ouverture de la caméra) ont été réglés à 14, et le seuil de détection a été fixé à 5, le tout permettant d'obtenir une image la plus représentative possible. De plus, tous les échantillons ont été analysés dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, d'après les recommandations du fournisseur, les dilutions des échantillons ont été effectuées afin d'observer en moyenne entre 30 et 100 particules par champ. Les captures vidéo ont été réalisées à 25°C et à un débit de 22 $\mu\text{L/s}$ (syringe speed : 100 u.a.).

Une fois les captures vidéo effectuées, l'analyse est réalisée par le même logiciel, permettant d'obtenir une taille moyenne des EVs (mean size), la taille la plus représentée dans l'échantillon (size mode), et une estimation de la concentration des EVs dans les échantillons. Le facteur de dilution est alors renseigné dans le logiciel et pris en compte dans ce calcul. Cette estimation de concentration a alors été rapportée au nombre de cellules comptées lors de la récupération des surnageants, nous permettant d'obtenir un ratio EVs/cellule et ainsi de comparer les différentes conditions entre elles.

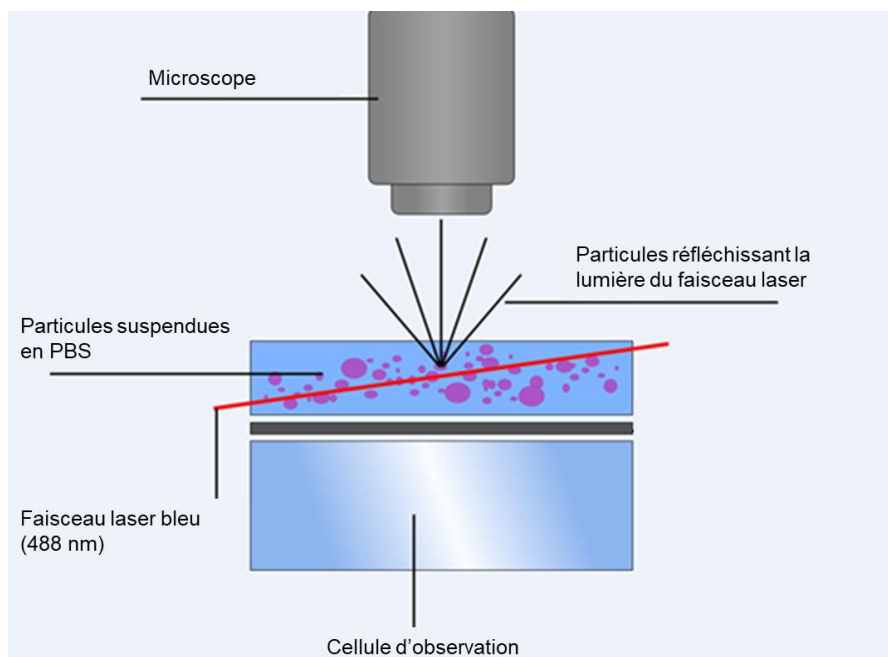


Figure 23 - Représentation schématique du principe de diffusion dynamique de la lumière sur laquelle repose la NTA, adapté de <https://azonano.com>

III.4.3. Quantification des EVs par cytométrie en flux

Pour évaluer la quantité d'EVs par une technique différente de l'évaluation réalisée par le NanoSight NS300, nous avons marqué les EVs (obtenus après ultracentrifugations), et couplés à des billes magnétiques, à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la tétraspanine CD63. Après récupération des EVs marquées, une analyse a été réalisée par cytométrie de flux.

III.4.3.1. Isolement des EVs CD63⁺

A la suite de la purification par ultracentrifugations différentielle, les EVs CD63⁺ ont été isolées à l'aide de billes magnétiques recouvertes de CD63 (Exosome-Human CD63 Isolation/Detection Reagent (from cell culture media), #10606D ; Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Ainsi, 50 µL de tampon d'isolement (PBS, 0,1% BSA filtrée à 0.2 µm) sont ajoutés aux 50 µL des échantillons d'EVs en PBS. Le premier jour (J1), 20 µL de billes magnétiques sont ajoutées dans un tube, le nombre de tubes correspondant au nombre de conditions, et celles-ci sont lavées avec 200 µL de tampon d'isolement puis placées durant 1 min sur un portoir magnétique. Une fois le surnageant jeté, les 100 µL d'échantillon sont ajoutés aux billes dans chaque tube correspondant. Le tout est alors placé sous agitation durant 20 heures à 4°C. Le lendemain (J2), les tubes sont centrifugés brièvement, et les échantillons sont lavés par 300 µL de tampon d'isolement et disposition durant 1 minute sur un portoir magnétique. Cette étape est renouvelée avec 400 µL de tampon d'isolement et 1 minute sur un portoir magnétique. Les échantillons ont alors été resuspendus dans 200 µL de tampon d'isolement avant de procéder au marquage pour la cytométrie.

III.4.3.2. Marquage des billes et cytométrie en flux

Le marquage a été réalisé à partir de 100 µL d'échantillon pour chaque anticorps utilisé. Dès lors, les échantillons ont été marqués soit avec un anticorps isotypique irrelevante de souris (IgG1-BV421, Cat. No. 562438 ; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), soit avec un anticorps anti-CD63-BV421 (Cat. No. 740080 ; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). Chaque anticorps est couplé au fluorochrome Brillant Violet 421. Le marquage a été réalisé par incubation avec chaque anticorps durant 1 heure sous agitation à température ambiante. Deux lavages successifs ont alors été effectués avec du tampon d'isolement à l'aide du portoir magnétique. Les échantillons marqués ont été repris dans 400 µL de tampon d'isolement pour procéder à l'analyse par cytométrie en flux, réalisée sur un appareil CytoFLEX LX (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). L'analyse a été effectuée par sélection de la population d'intérêt par FFC/SSC, puis sélection de la population positive pour CD63. Les données ont été analysées grâce au logiciel Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

III.5. Etude fonctionnelle des cellules cancéreuses coliques

III.5.1. Tests de migration par « scratch test »

L'aptitude des cellules à migrer a été évaluée par des tests de cicatrisation ou « scratch tests ». Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 12 puits où des inserts en silicone (#80209 ; Ibidi, GmbH, Gräfelfing, Allemagne) étaient préalablement placés. Ces inserts forment deux chambres séparées l'une de l'autre par une paroi, ne laissant pas les cellules communiquer. Après adhérence des cellules sur la nuit, les inserts ont été retirés délicatement, laissant une « blessure » entre les deux compartiments de cellules. Celles-ci ont alors été lavées au PBS, et le milieu est renouvelé. Les traitements avec les EVs ou les surnageants déplétés en EVs ont été réalisés au moment du renouvellement du milieu. Les images ont été réalisées dès le retrait des inserts, puis toutes les 24h pendant 72h. Les images ont été acquises à l'aide du microscope Leica DMI8 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne) et du logiciel LAS X.

Pour les HCT116 qui forment un tapis cellulaire, la cicatrisation a été mesurée par diminution de l'aire de la blessure à l'aide du logiciel ImageJ. Pour les Colo205, semi-adhérentes et ne formant pas de tapis cellulaire, la cicatrisation a été mesurée par numération des cellules ayant migré entre les deux compartiments au niveau de la blessure, à l'aide du logiciel ImageJ (C. A. Schneider, Rasband, et Eliceiri 2012).

III.5.2. Xénogreffes sur poissons zèbres

Dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme XenoFish du laboratoire Biothérapie des Maladies Génétiques Inflammatoires et Cancers (BMGIC) de l'Université de Bordeaux, des cellules HCT116 shATG5 et WT ont été envoyées pour injection dans le sac vitellin de poissons zèbres, après marquage fluorescent à la calcéine. Ces poissons ayant la particularité d'être transparents, ils constituent aujourd'hui un modèle *in vivo* intéressant et avantageux en termes de temps et de mise en place par rapport aux modèles murins classiquement utilisés. La croissance tumorale et l'éventuelle migration hors du sac vitellin ont alors été mesurées à 3, 28 et 52 heures post-injection.

III.5.3. Evaluation de la prolifération par incorporation du BrdU

La prolifération des HCT116 et Colo205 shATG5 a été évaluée par un test d'incorporation de la bromodésoxyuridine (BrdU), analogue de la thymidine et agent intercalant de l'ADN. Ces tests ont été réalisés à l'aide du kit « BrdU Cell Proliferation Assay Kit » (#6813 ; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA). Les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits en triplicats techniques. Aux différents temps testés (24h, 48h et 72h), la BrdU a été ajoutée et incubée durant 3h, au bout desquelles la réaction est stoppée par retrait du milieu de culture et fixation selon les recommandations du fournisseur. Avant la fixation, les Colo205 ont été centrifugées selon les recommandations du kit afin de récupérer les cellules non-adhérentes vivantes. A la suite des étapes de fixation, incubation des anticorps, et lavages, l'absorbance à 450 nm a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques Multiskan FC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

III.5.4. Evaluation de la mort cellulaire par ELISA Cell-Death

La chimiosensibilité des HCT116 et Colo205 envers le 5-FU a été évaluée par un test ELISA Cell-Death (kit « Cell Death Detection ELISA, 11544675001, Roche, Bâle, Suisse). Les cellules ont étéensemencées en plaque 96 puits au taux d'ensemencement habituel. Après adhérence des cellules durant la nuit, un traitement au 5-FU a été réalisé à une concentration finale de 8 μ M, comme déterminé préalablement au laboratoire (Christou *et al.* 2017b). 72h d'incubation plus tard, le test ELISA a été réalisé selon les recommandations du fabricant. Les plaques ont été soumises à une lecture d'absorbance à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques Multiskan FC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

III.6. Analyses statistiques

Les tests statistiques effectués dans le cadre de la comparaison des différentes conditions ont été réalisés à l'aide du logiciel Past 3 (Hammer, Harper, et Ryan 2001). Ainsi, le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons multiples des différentes conditions. Pour chaque test, au moins trois réplicas biologiques indépendants ont été réalisés. Les *p-values* inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

Chapitre IV. Résultats

Comme évoqué précédemment, pour aborder les connexions éventuelles entre autophagie et sécrétion d'EVs et les conséquences potentielles sur la fonctionnalité cellulaire, nous avons choisi d'inhiber l'expression de protéines clés de l'un ou l'autre des deux processus à l'aide de shRNA. Nous détaillerons successivement les travaux réalisés avec les shRNA ciblant Rab-27A, impliquée dans la sécrétion exosomale, puis ceux réalisés avec les shRNA dirigés contre ATG5, protéine faisant partie du complexe d'élongation de l'autophagosome.

IV.1. Inhibition de Rab-27A et évaluation de la sécrétion d'EVs dans les cellules de cancer colique

Comme la plupart des cellules eucaryotes, les cellules cancéreuses sont capables de sécréter des vésicules extracellulaires (EVs) à des fins de communication avec leur environnement et les cellules voisines. Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, les EVs sont représentées par les microvésicules, et de plus petites vésicules appelées exosomes, connues pour leur implication dans l'agressivité cancéreuse. La sécrétion de telles vésicules requiert l'intervention de protéines associées au trafic vésiculaire, et notamment la famille des Rab-GTPases. En particulier, Rab-27A est connue pour son rôle dans l'adressage des futures EVs vers la membrane plasmique (Bobrie *et al.* 2012). Dans le but d'induire une altération de la sécrétion d'EVs dans des cellules de cancer colique, une inhibition de l'expression du gène *RAB27A* a été réalisée grâce à l'utilisation de trois shRNA (sh1, sh2 et sh3) ciblant spécifiquement ce gène. En effet, il a été montré dans la littérature qu'une inhibition de l'expression de cette protéine induit une diminution de la sécrétion d'EVs dans le cas du gliome (van Solinge *et al.* 2020). Dès lors, des cellules HCT116 et Colo205, représentant respectivement un stade précoce et un stade tardif de cancer colique, ont été infectées avec des particules lentivirales contenant ces shRAB27A.

IV.1.1. Article : Appréciation différente de l'augmentation et de la diminution de la sécrétion de vésicules extracellulaires par nanoparticle tracking analysis

Pour nous assurer que l'inhibition d'expression de Rab-27A conduisait bien à une inhibition de sécrétion d'EVs, nous l'avons monitorée, dans les surnageants cellulaires et dans des suspensions d'EVs purifiées par ultracentrifugation, par la technique de nanoparticle tracking analysis (NTA) en utilisant le NanoSight NS300. Lors de l'analyse des cellules HCT116, ce dernier ne nous a pas permis de détecter une quelconque diminution de la sécrétion vésiculaire. Nous avons alors tenté par plusieurs autres moyens de la faire diminuer afin de pouvoir l'observer au NanoSight (utilisation de siRNA ciblant *RAB27A*, traitements à l'indométacine ou au Nexinhib20). Des résultats similaires aux shRAB27A ont alors été observés, c'est-à-dire une absence de variation de la concentration d'EVs.

A l'inverse, la NTA nous a permis d'observer une augmentation de la sécrétion d'EVs suite à un traitement à la roténone ou en conditions d'hypoxie. Ce travail a été réalisé en parallèle sur un modèle de glioblastome, grâce à une collaboration avec Aude Brunel, doctorante au laboratoire CAPTuR. Ainsi, les travaux ont été menés de front sur une lignée de chaque modèle : HCT116 pour le cancer colique, et U87-MG pour le glioblastome, et des résultats comparables ont été obtenus. Ils semblent mettre en évidence les faiblesses de l'utilisation d'une seule technique, et en particulier la NTA, dans le cadre de l'évaluation de la sécrétion vésiculaire. Ces travaux ont alors fait l'objet de la publication d'un article dans « International Journal of Molecular Science », présenté ci-après.



Article

Extracellular Vesicle Measurements with Nanoparticle Tracking Analysis: A Different Appreciation of Up and Down Secretion

Clément Auger ^{1,†} , Aude Brunel ^{1,†}, Tiffany Darbas ^{1,2}, Hussein Akil ³ , Aurélie Perraud ^{1,4} , Gaëlle Bégau ^{1,5}, Barbara Bessette ^{1,†} , Niki Christou ^{1,4,†} and Mireille Verdier ^{1,*,†}

- ¹ UMR Inserm 1308, CAPTuR, Faculty of Medicine, University of Limoges, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France; clement.auger@unilim.fr (C.A.); aude.brunel@unilim.fr (A.B.); tiffany.darbas@gmail.com (T.D.); aurelie.perraud@unilim.fr (A.P.); gaelle.begaud@unilim.fr (G.B.); barbara.bessette@unilim.fr (B.B.); christou.niki19@gmail.com (N.C.)
- ² Service d'Oncologie, CHU of Limoges, 2 rue Martin Luther King, 87025 Limoges, France
- ³ UMR CNRS 7276/INSERM U1262, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Martin Luther King, 87025 Limoges, France; hussein.akil@unilim.fr
- ⁴ Endocrine, General and Digestive Surgery Department, CHU of Limoges, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges, France
- ⁵ Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Médecine & Pharmacie, 87025 Limoges, France
- * Correspondence: mireille.verdier@unilim.fr
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Auger, C.; Brunel, A.; Darbas, T.; Akil, H.; Perraud, A.; Bégau, G.; Bessette, B.; Christou, N.; Verdier, M. Extracellular Vesicle Measurements with Nanoparticle Tracking Analysis: A Different Appreciation of Up and Down Secretion. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2310. <https://doi.org/10.3390/ijms23042310>

Academic Editors: Frank Gieseler and Fanny Ender

Received: 21 December 2021

Accepted: 15 February 2022

Published: 19 February 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

Abstract: As is the case with most eucaryotic cells, cancer cells are able to secrete extracellular vesicles (EVs) as a communication means towards their environment and surrounding cells. EVs are represented by microvesicles and smaller vesicles called exosomes, which are known for their involvement in cancer aggressiveness. The release of such EVs requires the intervention of trafficking-associated proteins, mostly represented by the RAB-GTPases family. In particular, RAB27A is known for its role in addressing EVs-to-be secreted towards the plasma membrane. In this study, shRNAs targeting RAB27A were used in colorectal (CRC) and glioblastoma (GB) cell lines in order to alter EVs secretion. To study and monitor EVs secretion in cell lines' supernatants, nanoparticle tracking analysis (NTA) was used through the NanoSight NS300 device. Since it appeared that NanoSight failed to detect the decrease in the EVs secretion, we performed another approach to drop EVs secretion (RAB27A-siRNA, indomethacin, Nexihnib20). Similar results were obtained i.e., no variation in EVs concentration. Conversely, NTA allowed us to monitor EVs up-secretion following rotenone treatment or hypoxia conditions. Therefore, our data seemed to point out the insufficiency of using only this technique for the assessment of EVs secretion decrease.

Keywords: extracellular vesicles; exosomes; nanoparticle tracking analysis (NTA); RAB27A; glioblastoma; colorectal cancer

1. Introduction

Extracellular vesicles consist of heterogenous small vesicles bounded by portions of the plasma membrane and secreted by most eukaryotic cells, being healthy or pathological. They are classically divided into microvesicles, exosomes, and apoptotic bodies, the classification being mainly based on the biogenesis, size, and composition of the vesicle. Whereas microvesicles and apoptotic bodies directly bud from the plasma membranes, exosomes are products of the endosomal pathway and the multivesicular bodies [1]. Due to the variety of origins, the size range is between 30 and 1000 nm, exosomes being known to be the smallest (30–150 nm) [2]. The last ones are responsible for the transport of intracellular molecules, such as proteins, lipids, and nucleic acids, to the cell environment. The content of the vesicles is both the reflection of the donor cell's unsorted composition and the result of a selection, in addition to non-specific exosomal constitutive proteins. Therefore, these

vesicles perform functions in cell signaling, modifying the surrounding cells' behavior. This capacity is particularly important in tumor development, in which exosomes have been described to be implied in cell proliferation regulation, angiogenesis, and metastasis [3]. This explains why there is an ever-increasing number of studies focusing on their role in oncogenesis.

Exosomes' formation starts with the endosomal compartment. Early endosomes, generated by internal budding of the plasma membrane, progressively mature in multivesicular bodies (MVBs). Within these structures, invagination of their inner membrane generates intraluminal vesicles (ILVs), sized between 50 and 90 nm and containing parts of the cytosol. Finally, the MVBs fuse with the plasma membrane and release these vesicles, then called exosomes. All these steps are highly orchestrated and regulated, and the main role is played by the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) machinery. Four different complexes (ESCRT-0 to ESCRT-III) interplay in a sequential manner, along with accessory proteins, in order to drive the selection of participative molecules and the scission of the membrane. Nevertheless, an ESCRT-independent pathway has also been described, especially involving tetraspanins. At the end, depending on the efficiency of cargo sorting, life conditions, and the cells' type, the composition of exosomes may vary.

When formed, these vesicles have to travel into the cell to be secreted. An important family of proteins involved in MVB trafficking is the RAB-GTPases family [1,4,5]. Several Rab proteins (5, 7, 11, and 35) mainly manage the intracellular movement along the microtubules, while RAB27A and RAB27B have been described to be crucial for exosome secretion. Both isoforms are responsible for the docking and fusion of MVBs on the plasma membrane, the last step before exosome release. In addition, it is also suspected that RAB27A endorses a role in controlling either the types of secreted EVs and/or their contents [6].

When working with such EVs, or more strictly with exosomes, one of the difficulties lies in the reproducibility and standardization of used techniques [7]. According to the EVs-studying scientific community, separation is predominantly realized using differential ultracentrifugations, using Théry's protocole [8]. Subsequently, since the number and the content of EVs both reflect the cell of origin and influence the behavior of the receiver cell, these two parameters are crucial to investigate. Mainly Western blot, flow cytometry, electronic microscopy, surface plasma resonance (SPR), and nanoparticle tracking analysis (NTA) are used, all exhibiting advantages and limitations [2,9]. The last one is a light-scattering-based method that tracks the Brownian motion of each particle individually in order to determine the mean square displacement of individual particles [10]. NTA devices differ strongly in their hardware and software, affecting measuring results [11]. Moreover, in order to demonstrate the suitability of each experimental approach to measure the particle size and concentration of complex samples, testing reference materials mimicking the complexity of the biological samples as quality control prior to the measurements is strongly suggested [12]. Unfortunately, a metrology standard reference material that is truly representative of EVs is not yet available for measurements of particle size distribution and concentration [13].

In the present study, our initial aim was to evaluate the effects of exosome secretion inhibition in two tumoral models: glioblastoma and colorectal cancer. Indeed, in these two models, as in most cancers, tumor-derived exosomes act as messengers between tumor cells and the microenvironment and are prone to enhancing aggressiveness through this communication [14]. Our starting hypothesis was to evaluate the effects of an exosomal secretion alteration on cancer stem subpopulation. To reach this goal, we performed stable transfection of two representative glioblastoma and colorectal cancer cell lines with three different shRNAs targeting RAB27A. We chose to silence this protein expression because, among RAB-GTPases members, this one appears to be fundamental in exosome release [15]. Whereas transcriptomic and proteomic analysis confirmed this down-regulation, we were not able to detect any variation with NTA analysis. The same results were obtained using siRNAs targeting RAB27A and pharmacological inhibition of EVs release (Nexhinib20

or indomethacin), whereas when exosome secretion was forced (rotenone, hypoxia), the enhancement of EVs concentration was detected. Our work showed the weakness of using only one characterization method to assess EVs secretion decrease.

2. Results

In order to study the impact of exosomes on cellular behaviors from glioblastoma (U87-MG cell line) or colorectal cancer (HCT-116 cell line), we silenced the expression of RAB27A. This GTPase protein, known to be a major actor in exosome release, was targeted by using stable transfection with three shRNAs against RAB27A (sh1, sh2, and sh3). As shown in Figure 1A,B, the different shRNA-RAB27As tested allowed a significant decrease in RAB27A expression, either at the transcriptomic or the proteomic level in both cancer models, i.e., HCT-116 and U87-MG, cultured in an exosome-free medium. Since we performed RAB27A silencing to decrease exosomes secretion (and thereby extend EVs secretion), we checked the expression of a well-known exosome marker: HSC70 (Figure 1C). As expected, Western blot analysis showed a decrease in the expression of this protein in exosomal extracts from both cell lines, indicating a decrease in exosomal secretion. Furthermore, when checking exosomal secretion in HCT-116 cell lines (pLKO and shRNA) using the on-bead flow cytometry approach, we observed a lower MFI for exosomes from RAB27A-silenced cells than for those from pLKO cells (respectively 3017 and 4963 for sh1 and sh3 and 12499 for pLKO; data not shown).

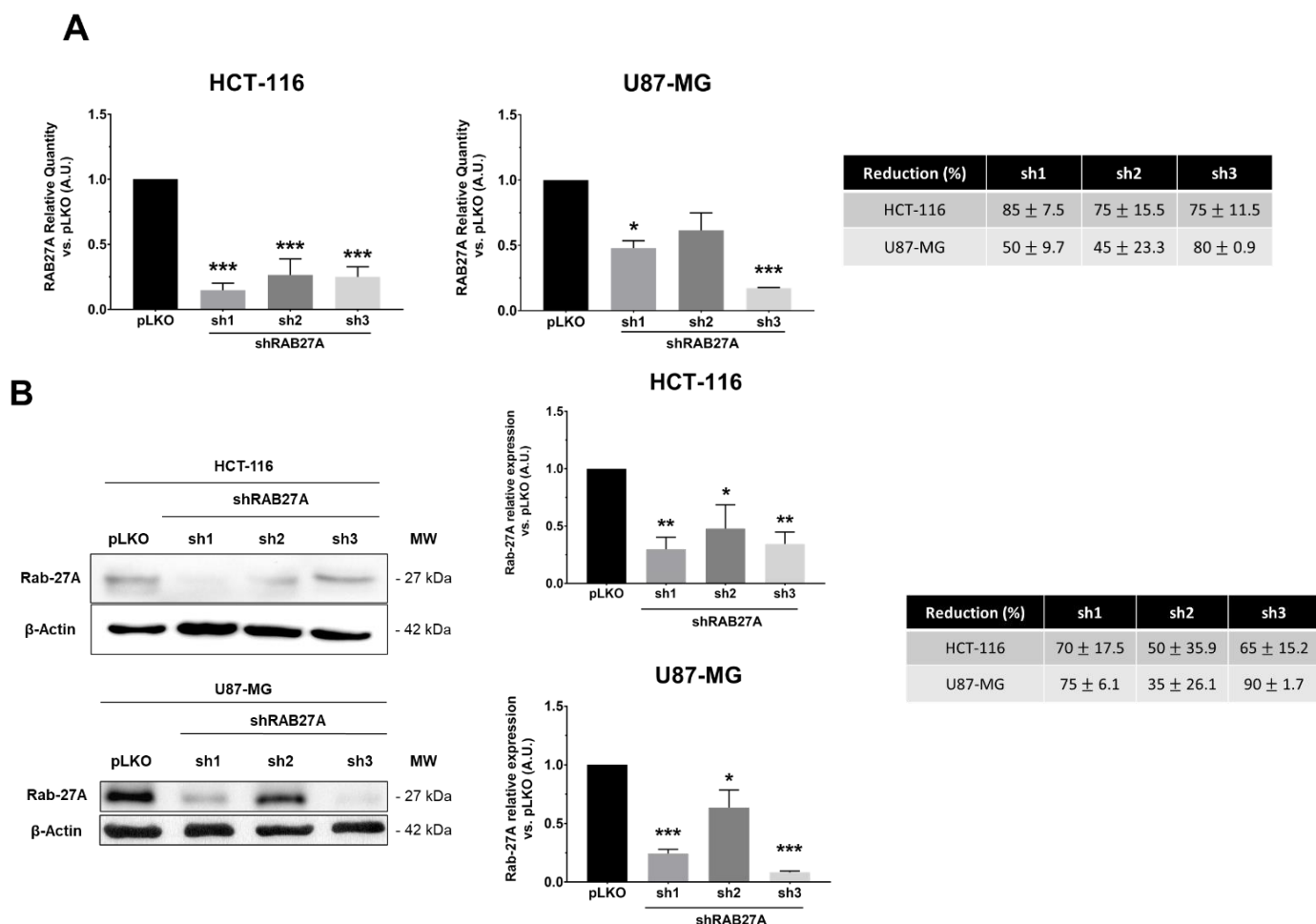


Figure 1. Cont.

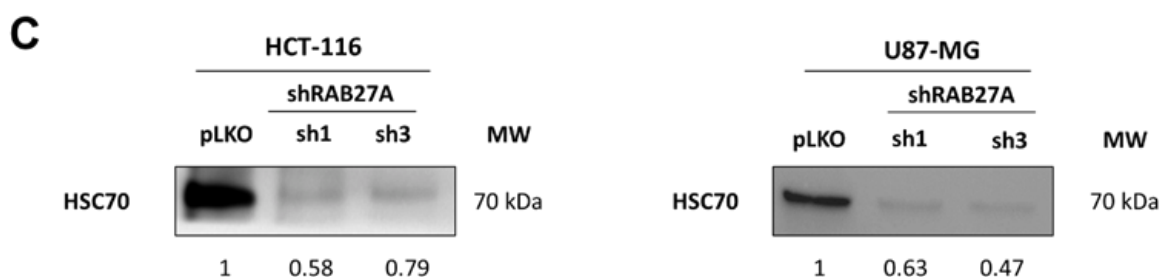


Figure 1. Validation of the shRAB27A models in both HCT-116 and U87-MG cell lines. (A)—Downregulation of RAB27A expression was evaluated by RT-qPCR in both pLKO (control) and shRAB27A cell lines. Whatever the cell line, sh1 and sh3 showed the strongest impairment in RAB27A expression compared to pLKO. The Mann–Whitney test was used for evaluation of the significance; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ $n = 6$. (B)—Downregulation of RAB27A expression was evaluated by Western blot in HCT-116 and U87-MG models (left panels). The quantification of RAB27A expression (right panel) was consistent with RT-qPCR analysis. The Mann–Whitney test was used for evaluation of the significance; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n = 6$. (C)—Western blot analysis showed a decreased expression of HSC-70 in purified exosomes from both cell lines when RAB27A was down regulated; $n = 3$.

Populations sh1 and sh3 lead to the best down expression of RAB27A (over 70% of decreased expression). We chose these two populations for further experiments.

We monitored the EVs characteristics (EVs-per-cell ratio and size) using nanoparticle tracking analysis (NTA), using NanoSight NS300 (Malvern Pananalytical), following recommendations of the manufacturer. We opted to evaluate and compare EVs obtained either from the supernatant (only two centrifugation steps for the elimination of cells and debris), hereafter referred to as the crude supernatant (Figure 2A–D) or following the classical protocol, i.e., differential centrifugations [8] (Figure 2E–H). First, in order to optimize the detection of particles, we varied and tested the calibration settings on EVs suspension obtained after differential centrifugations of pLKO (scramble lentiviral vector) cells: camera level (12, 14, 16), detection threshold, PBS dilution rate (1/5, 1/10 depending on cell lines and exosome extraction methods), and acquisition time (60 s). After several assays, we fixed the following conditions for each sample: camera level 14, detection threshold 5, PBS dilution (1/10 when using crude supernatants, 1/5 when using ultracentrifugated supernatants), and five acquisitions of 60 sec each per sample. According to the manufacturer's recommendations, we set the device to detect 50 to 120 particles/frame. Different experimental culture conditions (cell density; incubation time, i.e., 24 h, 48 h, 72 h) were also tested. Using such settings, we compared pLKO (scramble vector) and shRAB27A cells from the two different origins (HCT-116 and U87-MG) at two different culture times (48 h, Figure 2, and 72 h, Figure S1) and following two different collection techniques, i.e., crude supernatants (just with the first two steps of Théry's protocol, 8) or after differential centrifugations. We did not observe any significant variation either in EVs concentration (particles/mL, Table 1) or in EVs number per cell (Figure 2B,F). The mean size and size mode (most represented size) of EVs also exhibited similar values, matching with classical EVs parameters, whatever the expression of RAB27A (Figure 2C,D,G,H and Figure S1). Furthermore, performing differential centrifugations did not allow us to improve NTA data, i.e., to detect a drop of EVs secretion (Table 1). This lack of difference between the two ways of obtaining EVs led us to continue the study with the analysis of EVs from crude supernatants.

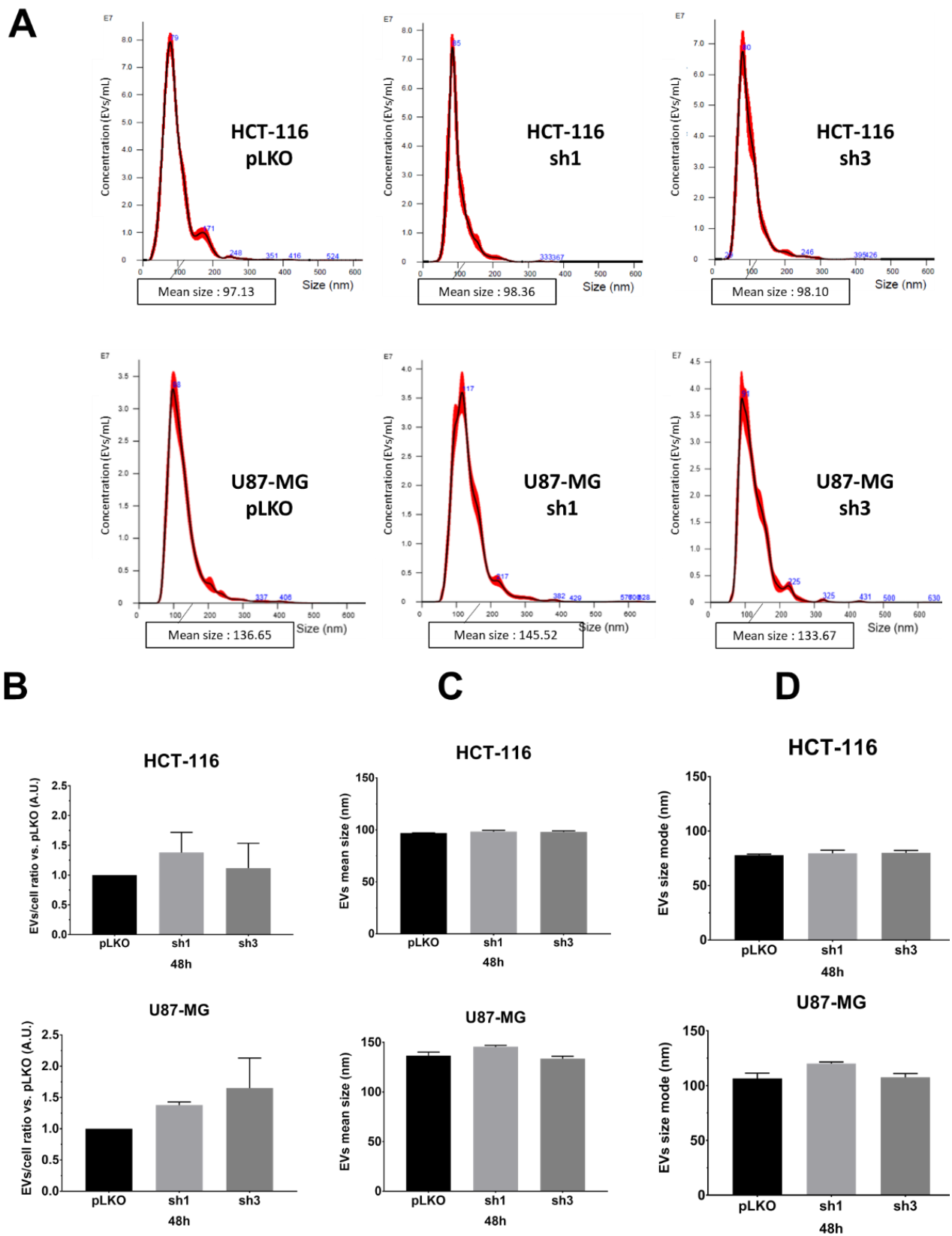


Figure 2. Cont.

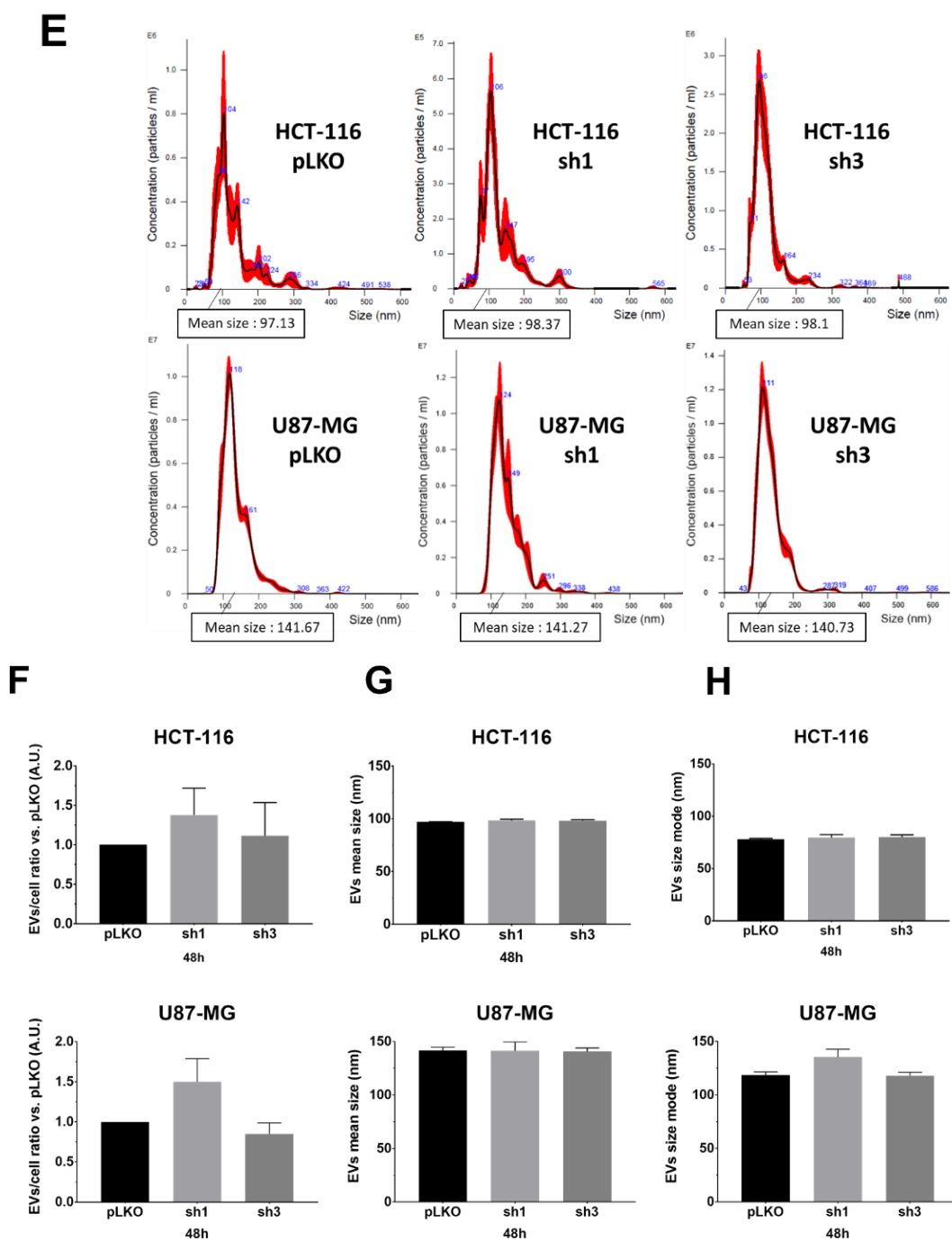


Figure 2. NTA analysis of extracellular vesicles from HCT-116 and U87-MG pLKO vs. shRAB27A. (A)—Evaluation of the size repartition of the EVs secreted by the HCT-116 (upper panel) and U87-MG (lower panel) pLKO and shRAB27A cell lines. The cells were cultured as mentioned in the material and methods, and the supernatants were directly analyzed using the Nanosight300. Most of the EVs population is comprised of between 50 and 180 nm, which is the size range commonly given to exosomes ($n = 3$). (B)—Concomitantly with the supernatant collection, cells were counted, and the EVs/cell ratio was calculated for each cell line. There is no difference concerning this ratio between pLKO and shRAB27A cell lines. (C)—EVs mean size (nm) from each cell line after 48 h of culture in EFM. (D)—EVs size mode (nm) from each cell line after 48 h of culture in EFM. There is no difference between the control and shRAB27A cell lines in both U87-MG and HCT-116, $n = 3$. (E–H)—The same analysis of EVs characteristics was performed at the same time (48 h) after the ultracentrifugation of the supernatant, according to Théry’s protocol ($n = 3$).

Table 1. EVs NTA-estimated concentration for each condition in each cell line according to the different culture times (UC: Ultracentrifugation).

		EVs/mL	pLKO	sh1	sh3
HCT116	48 h	Crude	4.46×10^9	4.01×10^9	4.36×10^9
		UC	4.63×10^7	3.20×10^7	1.41×10^8
	72 h	Crude	1.58×10^9	1.64×10^9	1.85×10^9
		UC 72 h	5.21×10^7	1.26×10^8	6.58×10^7
U87	48 h	Crude	1.96×10^9	2.37×10^9	1.99×10^9
		UC	6.22×10^8	7.25×10^8	7.87×10^8
	72 h	Crude	2.35×10^9	3.01×10^9	2.87×10^9
		UC	7.05×10^8	1.01×10^9	6.49×10^8

Since apoptotic bodies are part of EVs family within the exosome size range (almost 100 nm), such results led us to evaluate cell death. Our hypothesis was that possible enhancement of apoptosis could compensate the impairment of exosomes due to targeting RAB27A. However, we did not detect any variation of cell death in shRNA-RAB27A cell lines either in HCT-116 or in U87-MG, which invalidated our hypothesis (data not shown).

Therefore, in a second step, in order to obtain a significant decrease in EVs secretion, we down-regulated expression of RAB27A by transient transfection with siRNA. After checking its efficiency on RAB27A expression (Figure 3A) and the duration of down expression (Figure S2A), we chose 48 h of siRNA treatment for further analysis because it was the most efficient time to decrease RAB27A expression using the siRNA approach. We thus evaluated EVs parameters in crude supernatants of 48 h cultured pLKO and siRNA cells (Figure 3B–E). Once again, NTA analysis of EVs in both cell lines did not show any significant decrease in EVs concentration per cell (Figure 3C), and the mean size and size mode were unchanged (Figure 3D,E).

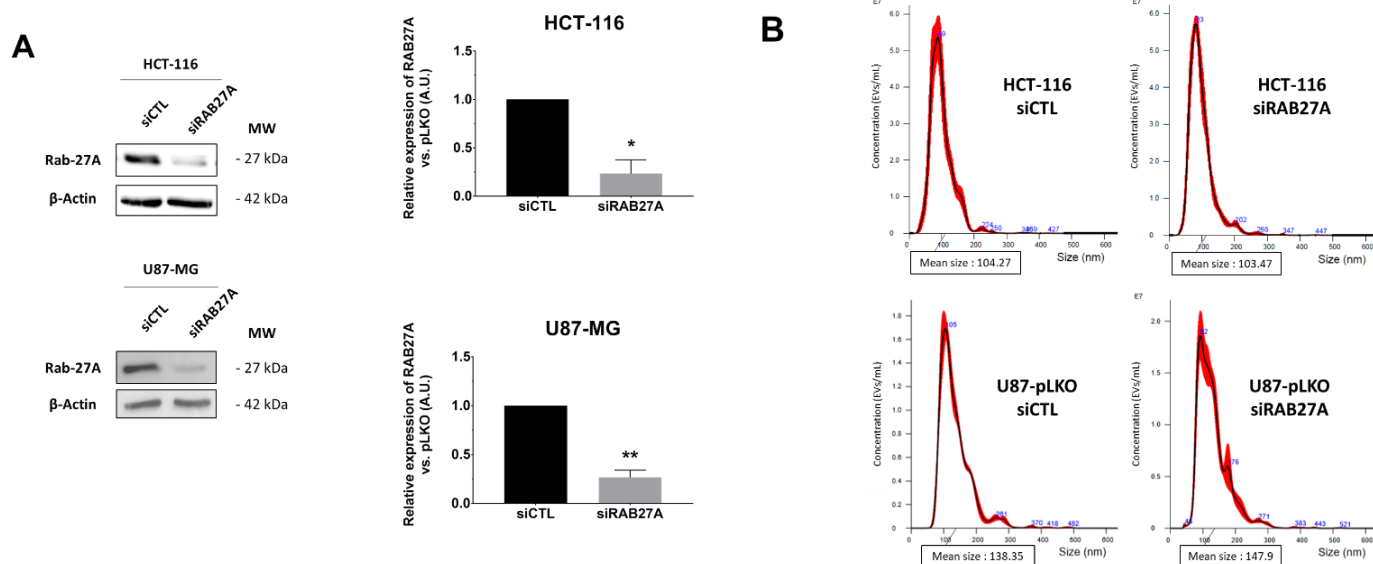


Figure 3. Cont.

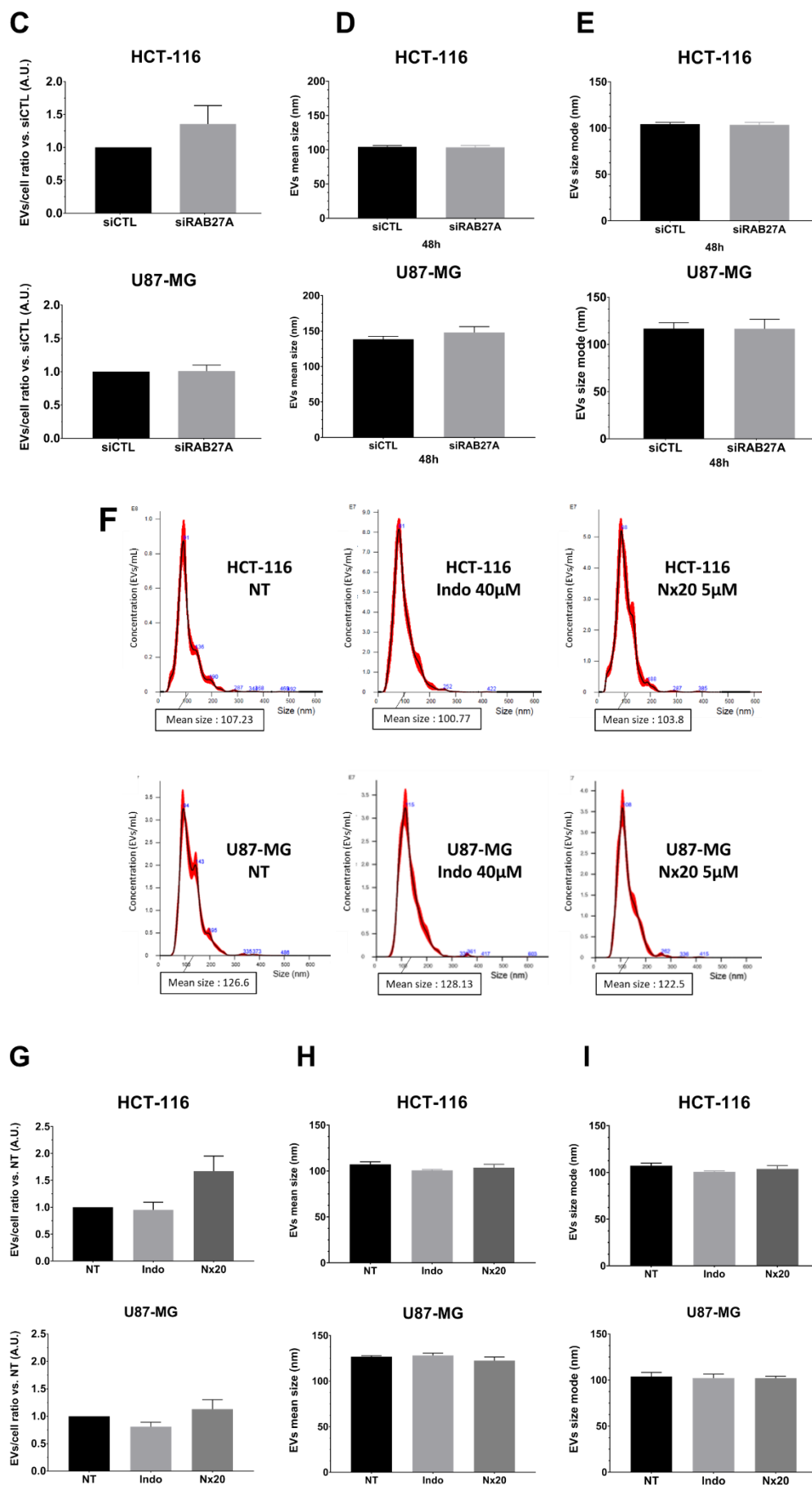


Figure 3. NTA analysis following different attempts for EVs secretion alteration in HCT-116 and U87-MG cell lines. (A)—Downregulation of RAB27A expression using siRAB27A was evaluated by

Western blot (left panels). RAB27A expression quantification (right panels) in siCTL (control) and siRAB27A conditions in both HCT-116 and U87-MG cell lines ($n = 3$, $n = 4$, respectively). The Mann–Whitney test was performed in at least three independent experiments; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (B)—Evaluation of the size repartition of the EVs secreted by the HCT-116 (upper panel) and U87-MG (lower panel) pLKO transfected with siCTL or siRAB27A. (C)—EVs/cell ratio was calculated for each cell line. There is no difference concerning this ratio between pLKO siCTL and siRAB27A cell lines in both HCT-116 and U87-MG models ($n = 3$, $n = 4$, respectively). (D)—EVs mean size (nm) from each cell line after 48 h of culture in EFM. (E)—EVs size mode (nm) from each cell line after 48 h of culture in EFM. (F–I)—HCT-116 and U87-MG cell lines were treated in EFM with either indomethacin ($n = 3$, $n = 4$, respectively) or Nexinhib20 ($n = 3$, $n = 6$, respectively). (G)—EVs/cell ratio was calculated for each condition. There is no difference concerning this ratio between pLKO alone and pLKO treated with either indomethacin or Nx20 in both the HCT-116 and U87-MG models ($n = 3$ each). (H)—EVs mean size (nm) from each cell line after 48 h of culture in EFM. (I)—EVs size mode (nm) from each cell line after 48 h of culture in EFM.

In order to complete the genetic inhibition of RAB27A, we used a pharmacological approach. We chose to treat cells with Nexinhib20 or indomethacin since these two molecules are known to inhibit exosomes release in the range of working concentrations [16,17]. Using similar conditions, we checked that these treatments did not show any effect on RAB27A expression (Figure S2B). As for transfected cells with sh and siRNA targeting RAB27A, we evaluated EVs parameters through NTA analysis in crude supernatants of treated cells with one or another molecule (Figure 3F–I). As with sh- and si-RAB27A-transfected cells, we did not demonstrate any variation either in EVs concentration or in mean size and size mode after 48 h of treatment compared to pLKO untreated cells (Figure 3G–I). To summarize, these overall results, where we theoretically inhibited exosomes secretion by either genetic or pharmacological approach, did not reveal any impairment in EVs secretion when analyzed using NTA.

Considering these data, we wondered if NTA allowed for monitoring EVs secretion's enhancement. For this purpose, we either treated both cell lines with 0.5 μM of rotenone [18] or we cultured them under physiox hypoxia (1% O_2) for 48 h vs. normoxia (20% O_2) conditions [19,20] (Figure 4). The EVs secretion in crude supernatants was significantly enhanced in rotenone-treated pLKO cells for both HCT-116 and U87-MG (Figure 4A,B; *** $p < 0.001$), without modification of the mean size and size mode (Figure S3A,B). Concerning hypoxic conditions, the NTA analysis showed that both cell lines produced significantly more EVs after 48 h of 1% O_2 culture (Figure 4C,D; *** $p < 0.001$). The mean size and the size mode were not affected (Figure S3C,D). Such enhancement of EVs secretion started to appear straight after 24 h of hypoxia, even if it reached significant values only for U87-MG (Figure S4).

Considering these data, i.e., EVs secretion enhancement detectable using NTA, whereas it did not seem to be the case for the decrease, we wondered if the cells were able or not to compensate for the RAB27A deficit. Indeed, this protein is not the only one implicated in the EVs secretion. Several other RAB family members, the foremost being RAB27B, could endorse this role [4,5,15]. Therefore, we evaluated the expression of three RAB members mainly involved in EVs secretion: RAB27B, RAB35, and RAB11 (Figure 5). The two studied cell lines seem to regulate in a divergent way the expression of RAB27B (Figure 5A). Indeed, whereas the CRC cell line HCT-116 exhibited a significant decrease in RAB27B along with shRAB27A transfection, ruling out any compensation by this isoform, in the GB cell line U87-MG, we observed an enhancement of RAB27B expression, especially at transcriptional level in the sh1 population, supporting a possible relay process. On the other hand, neither RAB35 (absent at the transcriptional and protein levels in the GB cell line) nor RAB11 expressions seemed to be affected by shRAB27A (Figure 5B,C).

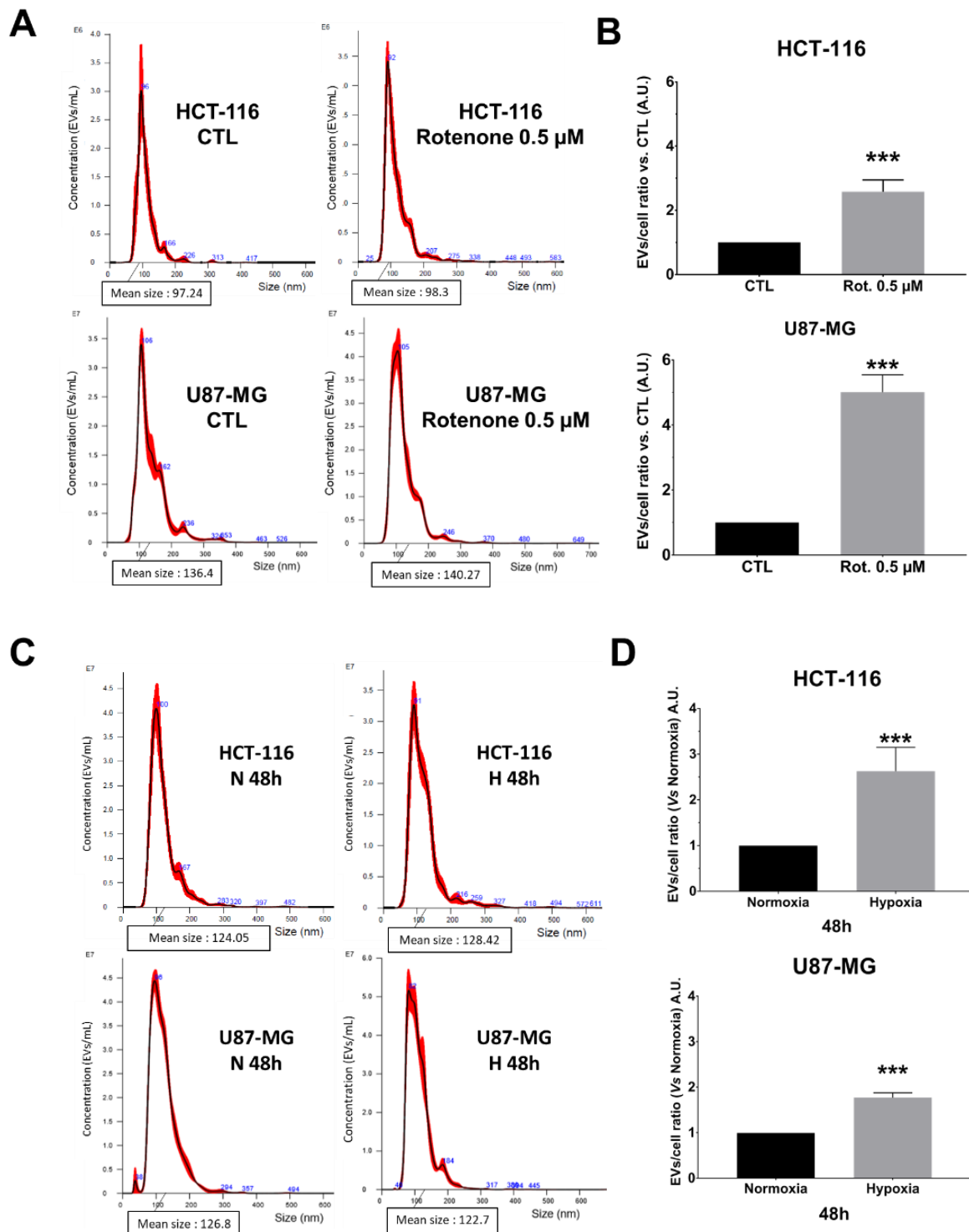


Figure 4. NTA analysis following EVs secretion increase attempts in HCT-116 and U87-MG cell lines. (A)—Evaluation of the size repartition of the EVs secreted by the HCT-116 (upper panel) and U87-MG (lower panel) untreated pLKO (CTL) or treated with 0.5 μ M of rotenone for 48 h. (B)—EVs/cell ratio was calculated for each condition in both HCT-116 and U87-MG cells ($n = 3$ each). The Mann–Whitney test was performed in three independent experiments; $p < 0.05$ was considered significant. (C)—EVs size range after 48 h under normoxia (N) or hypoxia (H) conditions was determined for both HCT-116 and U87-MG cells. (D)—EVs/cell ratio was calculated for each cell line in hypoxia compared to normoxia conditions. The Mann–Whitney test was performed in three independent experiments; *** $p < 0.001$.

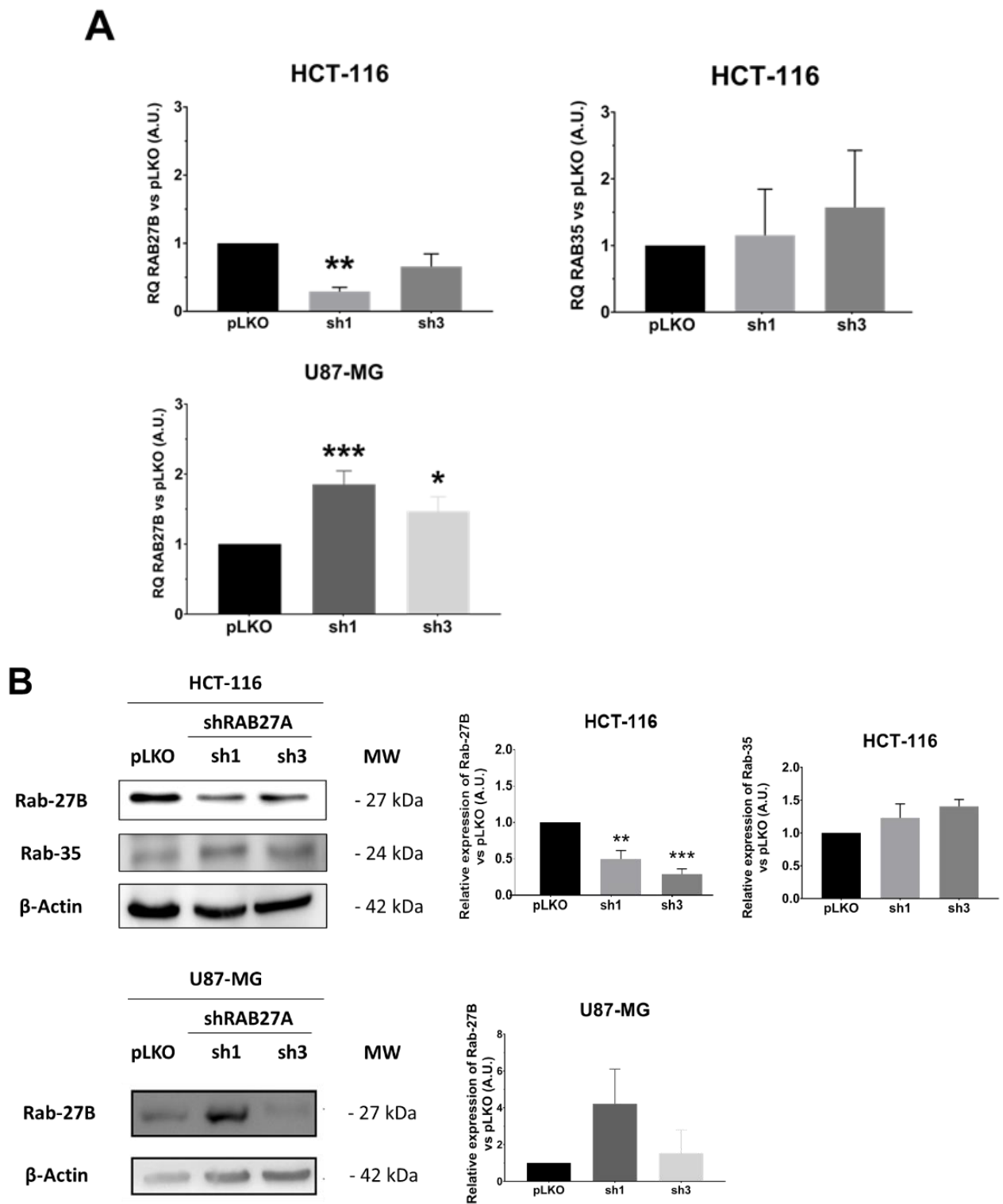


Figure 5. Cont.

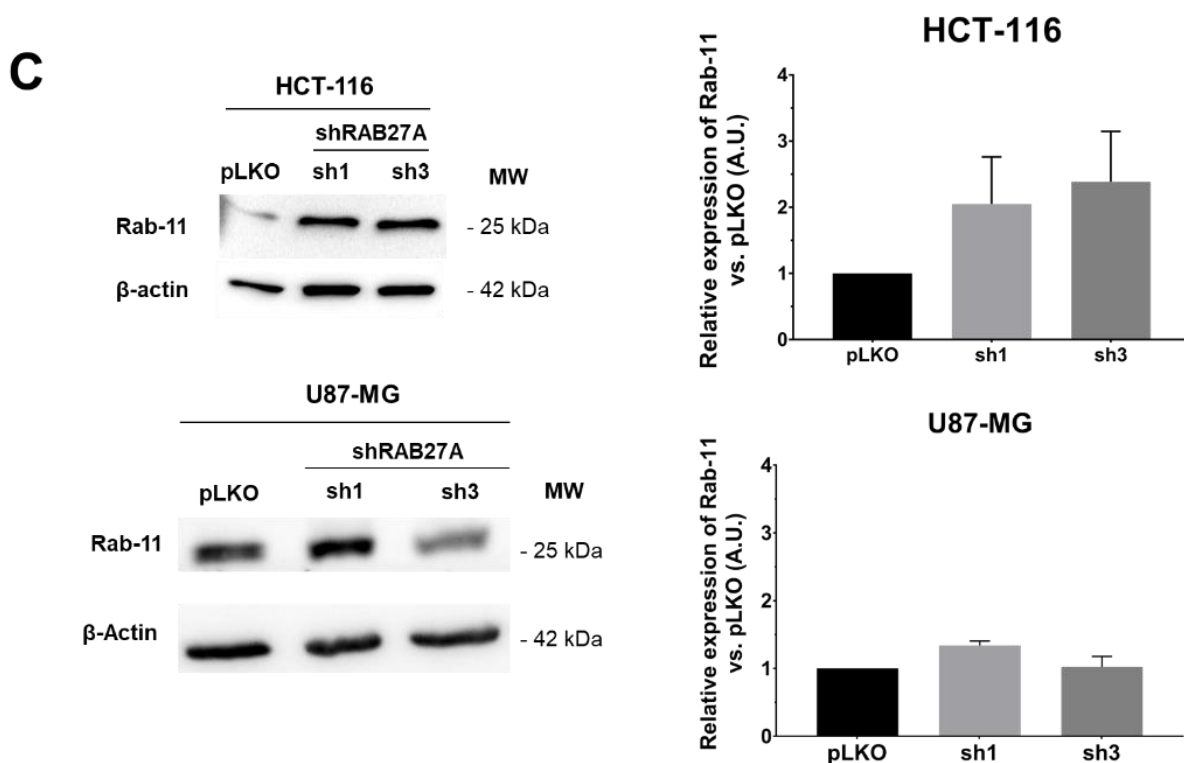


Figure 5. Analysis of the expression of other RAB-GTPases. (A)—RAB27B and RAB35 expressions were analyzed by RT-qPCR assays in both HCT-116 and U87-MG cell lines. RAB35 was not detected in the U87-MG cell line. The Mann–Whitney test was performed on three independent experiments; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (B)—RAB27B and RAB35 expressions were assessed by Western blot in both HCT-116 and U87-MG cell lines. RAB35 failed to be detected in U87-MG. The Mann–Whitney test was performed in three independent experiments; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (C)—RAB11 expression was analyzed by Western blot in both HCT-116 and U87-MG cell lines. The Mann–Whitney test was performed on three independent experiments.

In conclusion, even if results obtained with other RAB proteins seem to point to explanatory tracks, number-weighted concentration measurements with NTA are not convincing when it comes to showing a drop of EVs secretion.

3. Discussion

A main area of our research focusses on parameters of aggressiveness in solid tumors. In the past years, extracellular vesicles and, more precisely, exosomes, have increasingly been shown as important in such processes [3,14,21]. It is now accepted that they act as modulators of tumoral environments, allowing immune-regulation, angiogenesis, or stem cell education [22]. The initial aim of our work was to obtain tumoral cells unable to generate exosomes in order to analyze their behavior, especially concerning aggressiveness properties. We chose to alter RAB27A expression due to its encoded protein that is commonly addressed because of its role in exosomes secretion [6,15], which we checked by HSC-70 Western blot analysis. Indeed, it has been shown that both RAB27 A and B act in exosomes' secretion by docking multivesicular bodies (known as the source of exosomes) to the plasma membrane [23], which is recovered in several cancer cell types [24,25]. The quantification of EVs we performed using nanoparticle tracking analysis, before or after ultracentrifugation, failed to exhibit either reduced number or modified particle size, despite our having implemented several reduction approaches (i.e., genetic or pharmacological) in two different cellular models. Such results led to various questions.

Concerning EVs secretion reduction by the means of sh or si RNA, we cannot doubt that we reached the target, with 80–85% of extinction (as shown by transcriptomic and

protein analysis). With a similar extinction rate, Zheng et al. [26] showed that NTA was performant to detect exosomes secretion decrease. However, the intra-assay variability could be substantially reduced by using an antibody-specific fluorescent label [27]. With the fluorescent filter in place, they were able to visualize a larger concentration of particles sized between 20 and 100 nm compared with the light scatter mode. This may be due to the intense light scatter from larger particles interfering with the accurate and reproducible measurement of smaller particles [27]. In our study, we also chose to reduce EVs secretion using pharmacological drugs (indomethacin and nexinhib20), which do not target RAB27A. Indomethacin is a cyclooxygenase inhibitor belonging to the non-steroidal anti-inflammatory drugs family. It is also known to reduce the expression of ABCA3, a lipid ABC transporter involved in exosome secretion [17,28,29]. Nexinhib20 is commonly used to prevent neutrophils degranulation [16,30], and by extension, it is used to inhibit EVs secretion, which is a related process. However, once again, using either one or the other drug, NTA did not allow us to detect a drop in EVs' secretion, maybe due to the lack of sensitivity of the technique.

We therefore took the opposite approach by forcing the cells to secrete more EVs. A previous study [31] showed that rotenone induces the formation and release of exosomes. Rotenone is a pea plant-derived molecule and is known to inhibit mitochondrial complex-I activity, leading to ROS and oxidative damage. Another way to induce EVs over-secretion was achieved by hypoxia [20,32,33]. Commonly, cells respond to oxygen privation through several mechanisms, such as EVs secretion leading to hypoxia tolerance [19]. This includes angiogenesis, autophagy, and EVs release, allowing specific communication with neighbor cells [34]. In our working conditions (1% O₂ during 48 h; 0.5 μM of rotenone), we effectively detected an enhancement of EVs secretion in both cellular models by using NTA.

Therefore, at this time, the following question is raised: why did NTA allow us to detect an increase in EVs secretion, whereas it did not for a decrease? Basically, such a device was not developed for a quantitative use. According to the manufacturer, NanoSight, which functions according to NTA, was initially designed for the characterization of nanoparticles, not for EVs monitoring. Repeatability, reproducibility, and the particle concentration overestimation issues observed in the work of Vestad et al. [10] may be linked to the subjective choice of some measurement setting that must be carefully fine-tuned, depending on the particle size and on their optical properties. Previously, the best choice to check suitability and experimental performances was to use polydisperse mixtures of polymeric particles, such as polystyrene, despite their being very different in their chemical and physical properties compared with EVs [27]. The findings of Usfoor et al. [35] demonstrated the overestimation of particle concentration and that an approach of swift correction of the results of concentration measurements received for samples is suggested.

These studies highlight the general need to develop and validate new reference materials with similar physical and biochemical properties to EVs to standardize EVs measurements between instruments and laboratories [36]. In our study, although using the nominal concentration of nanoparticles is difficult, we can interpret the results obtained by simple comparison. Activation of EVs secretion, either by rotenone or hypoxia, leads to an increase in the amount of EVs of the same kind if we consider the EVs secreted by pLKO as an internal standard. These EV's have comparable Brownian motion and refractive indices, allowing the NTA to be used as a tool to measure this increase. On the other hand, the inhibition of secretion did not appear to result in a decrease in EVs of the same kind. This population, although having a comparable size distribution and close nominal concentration, is probably constitutively different, understanding a population whose density or area distribution differs but has an identical signal, size, and concentration. This result opens new perspectives for the use of the NTA measurements. Indeed, it would then be advisable to extract from the NTA results the information of volume, thus of density as well as of surface occupied by each analyzed particle. The correlograms that could be obtained would allow a different EVs distribution analysis more likely to identify the biological phenomenon at stake.

Furthermore, considering that EVs secretion is a survival process for almost all tumoral cells, another explanation for not detecting EVs drop would be the implementation of another process to offset the loss of EVs. Indeed, other members of the RAB-GTPase family are able to endorse a function promoting EVs secretion instead of RAB27A [4,5,15]. When assessing the expression of RAB27B, RAB11 and RAB35, which may be the main potential actors of such a compensation, the only protein exhibiting an enhancement was RAB27B in the glioblastoma model.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines and Culture

U87-MG and HCT-116 cells were used as classical glioblastoma and colorectal cancer models, respectively. Both cell lines were provided by ATCC. U87-MG cells were cultured in MEM (Gibco, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% FBS, 1% NEAA, 1% sodium pyruvate, 0.75 g of sodium bicarbonate, and 1 µg/mL of puromycin. HCT-116 cells were cultured in McCoy's 5A Medium with L-glutamine (#BE12-688EF, Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% FBS, 100 IU/mL of penicillin, and 100 mg/mL of streptomycin. In order to obtain stable down expression of RAB27A, both cell lines were infected with virions containing either three different shRNAs targeting RAB27A, named sh1, sh2, sh3, or a scramble vector as a control (pLKO cell lines). Polybrene was used at a final concentration of 8 µg/mL to help virions entering the cells. For the selection of plasmid-integrated cells, puromycin was used at a working concentration of 5 µg/mL and 30 µg/mL for U87-MG and HCT-116 cell lines, respectively. For each experiment, cells were seeded at a density of 10,000 cells/cm² or 20,000 cells/cm² for U87-MG and HCT-116, respectively, in an EVs-free medium (EFM) for different durations (24, 48, or 72 h). Cells were cultured either in normoxia (N; 5% CO₂, 20 %O₂) or in hypoxia (H; 5% CO₂, 1% O₂) at 37°C at a hypoxia workstation (InvivoO2, Baker, Alliance Bio Expertise Guipry-Messac, France).

4.2. Cell Treatments

Nexinhib20 (Nx20; 5 µM, 2 h; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), initially described for the inhibition of neutrophils exocytosis [16], was used to inhibit the secretion of EVs by altering the RAB27A mode of action. Indeed, Nx20 should be an inhibitor of the interaction between RAB27A and its effector JFC1 (synaptotagmin-like protein 1, 16).

Indomethacin (Indo; 40 µM, 48 h; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used to interfere with the EVs secretion process by inhibiting the ABC transporter A3 (ABCA3, 17). Rotenone (Rot; 0.5 µM, 48 h; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used to increase the secretion of EVs by inducing stress within the mitochondrial respiratory chain [18,31].

Both U87-MG and HCT-116 pLKO cell lines were also treated with an siRNA-targeting RAB27A for 48 h (MISSION esiRNA targeting human RAB27A, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) to compare transient and stable downregulations.

For each experiment, cells were seeded in a complete medium for one night. The next day, the medium was changed for EFM at the time of the different treatments. The supernatants and the cells were collected 48 h following the treatments. Cells were counted, and cell viability was evaluated using a trypan blue exclusion assay.

4.3. EVs Isolation

EVs were isolated following an adaptation of Théry et al.'s protocol [8] using differential ultracentrifugation. First, the supernatants were centrifuged at 300× g for 10 min in order to eliminate the remaining cells. Then, a centrifugation at 2000× g for 10 min was achieved to pellet dead cells (crude supernatant). A 10,000× g centrifugation for 40 min was realized, and the supernatants were filtered using a 0.2 µm filter. A first ultracentrifugation at 120,000× g for 70 min was performed to obtain pellet containing EVs, which were washed in PBS before the second and last 70 min ultracentrifugation at 120,000× g. The

pelleted and washed EVs were then resuspended either in PBS for nanoparticle tracking analysis, or in a cell lysis buffer for Western blot analysis.

Concerning NTA, the supernatants were analyzed either after the protocol described below or after only the $300\times g$ and $2000\times g$ centrifugations (named crude supernatant).

4.4. Western Blot Analysis

U87-MG cells were lysed using a cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France) for 30 min on ice. Then, a mechanical lysis was realized using 300 μ L syringes and centrifuged for 20 min at $17,000\times g$. HCT-116 cells were lysed using a homemade RIPA buffer for 20 min on ice, then sonicated for 20 s (one pulse every 2 s) and centrifuged at $18,000\times g$ for 30 min. In each case, supernatants were collected, and protein concentration was evaluated using a Bradford protein concentration assay (BioRad, Marnes-La-Coquette, France). SDS-PAGE was achieved on 30 μ g of proteins for cell lysate or 10 μ g for exosomes, and proteins were transferred on PVDF membranes (GE Healthcare, Tremblay-en-France, France). Membranes were incubated for 1 h in blocking solution (5% BSA or 5% nonfat dry milk in 1X TBS-0.1% Tween-20) and were then exposed to specific primary antibodies (anti-RAB27A (D7V6B), Cell Signaling #95394; anti-RAB27B, Cell Signaling #44813; anti RAB11 (D4F5 XP), Cell Signaling #5589; anti-RAB5, Cell Signaling #9690 (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France); anti-HSC-70, Santa Cruz sc-7298; anti- β actin, Santa Cruz sc-47778 (Santa-Cruz, Heidelberg, Germany) in a blocking solution overnight at 4 °C. Membranes were washed three times in TBS-0.1% Tween-20 before incubation during 1 h in a blocking solution at room temperature with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody targeting mouse or rabbit immunoglobulins (Dako Cytomation, Les Ulis, France) diluted at 1:1000. Membranes were washed two times in TBS-0.1% Tween-20, then once in TBS before revelation using a G-Box (Syngene, Fisher Scientific, Illkirch, France) and the GeneSys application suite.

4.5. RT-qPCR Analysis

RNA was extracted from cells and isolated using an RNeasy Mini Kit (# 74106; QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. After quantification using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Illkirch, France), 2 μ g of total RNA were reverse transcribed with a high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The qPCRs were achieved on 100 ng of cDNA using Premix Ex Taq (#RR39WR, TaKaRa, Saint Germain-en-Laye, France) on a QuantStudio 3 real-time thermal cycler (Applied Biosystems, Fisher Scientific, Illkirch, France) with TaqMan probes for each reaction. Probes used for quantitative RT-qPCR are listed in Table 2. Reactions were performed in triplicate from each biological replicate. Relative gene expression was quantified using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ubiquitin C (UBC), and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) as house-keeping genes. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantitative method was used to normalize expression of the reference gene and to calculate the relative quantification (RQ) levels of target genes.

Table 2. References of probes used for quantitative RT-qPCR.

Gene	Supplier	Reference
GAPDH (GAPDH)	ThermoFisher Scientific	Hs02758991_g1
UBC (UBC)	ThermoFisher Scientific	Hs00824723_m1
HPRT1 (HPRT1)	ThermoFisher Scientific	Hs02800695_m1
RAB27A (RAB27A)	ThermoFisher Scientific	Hs00608302_m1
RAB27B (RAB27B)	ThermoFisher Scientific	Hs00188156_m1
RAB35 (RAB35)	ThermoFisher Scientific	Hs00199284_m1

4.6. Nanoparticle Tracking Analysis

NTA was performed using NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) with specific parameters according to the manufacturer's user manual (NanoSight NS300 User Manual, MAN0541-01-EN-00, 2017). Captures and analysis were achieved by using the built-in NanoSight Software NTA3.3.301 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK). The camera level was set at 14 as all particles were visible at this level without signal saturation, and the detection threshold was fixed at 5 to include most of the observed particles while excluding indistinct ones. Samples were diluted in PBS to a final volume of 1 mL, and their concentration was adjusted by observing a particles/frame rate of around 50 (30–100 particles/frame). For each measurement, five consecutive 60-s videos were recorded under the following conditions: cell temperature—25 °C, syringe speed—22 $\mu\text{L/s}$ (100 a.u.). Particles (EVs) were detected using a 488 nm laser (blue), and a scientific CMOS camera. Among the information given by the software, the following were studied: mean size, mode (i.e., the most represented EVs size population), and particles/mL. Using the last one and the number of cells collected at the different incubation times, we were able to calculate an EVs/cell ratio for each run of each condition.

4.7. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Past 3 software (National History Museum, University of Oslo). The Mann–Whitney test was used for multiple comparisons. At least three independent biological replicates were achieved for each experiment. The *p*-values of less than 0.05 were considered significant.

5. Conclusions

The limitations in using NTA for EVs quantification are regularly underlined. For example, Vestad et al. [10] reported intra- and inter- assay variations when same EVs samples were analyzed in different laboratories. Similar observations were also evidenced by other teams [9,37]. According to these authors, standardization is needed when using NTA to ensure proper quantification. Therefore, the results we obtained in our experimental conditions seem in accordance with previous observations, and we recommend remaining careful when monitoring EVs secretion using NTA. Additionally, EVs secretion, being such a complex pathway containing so many actors, seems to be tricky to target efficiently. Indeed, other proteins are able to take over the role of the downregulated protein, as shown in the glioblastoma cell line.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23042310/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, N.C., B.B. and M.V.; methodology, C.A., A.B., T.D., H.A. and A.P.; validation, N.C., B.B. and M.V.; formal analysis, C.A., A.B., T.D. and H.A.; investigation, C.A., A.B., T.D. and H.A.; resources, N.C., B.B. and M.V.; data curation, A.P., B.B. and M.V.; writing—original draft preparation, C.A., A.B. and M.V.; writing—review and editing, G.B., B.B. and N.C.; visualization, C.A. and A.B.; supervision, N.C., B.B. and M.V.; project administration, N.C., B.B. and M.V.; funding acquisition, N.C., B.B. and M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by La Ligue contre le cancer, comité du Limousin. C.A. is supported by a grant from the Nouvelle Aquitaine region (n°: 2018-1R 3021).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Van Niel, G.; D'Angelo, G.; Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 213–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kurian, T.K.; Banik, S.; Gopal, D.; Chakrabarti, S.; Mazumder, N. Elucidating Methods for Isolation and Quantification of Exosomes: A Review. *Mol. Biotechnol.* **2021**, *63*, 249–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mashouri, L.; Yousefi, H.; Aref, A.R.; Ahadi, A.M.; Molaei, F.; Alahari, S.K. Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Auger, C.; Christou, N.; Brunel, A.; Perraud, A.; Verdier, M. Autophagy and Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer: Interactions and Common Actors? *Cancers* **2021**, *13*, 1039. [[CrossRef](#)]
5. Brunel, A.; Bégaud, G.; Auger, C.; Durand, S.; Battu, S.; Bessette, B.; Verdier, M. Autophagy and Extracellular Vesicles, Connected to rabGTPase Family, Support Aggressiveness in Cancer Stem Cells. *Cells* **2021**, *10*, 1330. [[CrossRef](#)]
6. Van Solinge, T.S.; Abels, E.R.; Van De Haar, L.L.; Hanlon, K.S.; Maas, S.L.N.; Schnoor, R.; De Vrij, J.; Breakfield, X.O.; Broekman, M.L.D. Versatile Role of Rab27a in Glioma: Effects on Release of Extracellular Vesicles, Cell Viability, and Tumor Progression. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 324. [[CrossRef](#)]
7. Nieuwland, R.; Falcón-Pérez, J.M.; Théry, C.; Witwer, K.W. Rigor and standardization of extracellular vesicle research: Paving the road towards robustness. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *10*, e12037. [[CrossRef](#)]
8. They, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2006**, *3*, 22. [[CrossRef](#)]
9. Szatanek, R.; Baj-Krzyworzeka, M.; Zimoch, J.; Lekka, M.; Siedlar, M.; Baran, J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1153. [[CrossRef](#)]
10. Vestad, B.; Llorente, A.; Neurauter, A.; Phuyal, S.; Kierulf, B.; Kierulf, P.; Skotland, T.; Sandvig, K.; Haug, K.B.F.; Øvstebø, R. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: A variation study. *J. Extracell. Vesicles* **2017**, *6*, 1344087. [[CrossRef](#)]
11. Bachurski, D.; Schuldner, M.; Nguyen, P.-H.; Malz, A.; Reiners, K.S.; Grenzi, P.C.; Babatz, F.; Schauss, A.C.; Hansen, H.P.; Hallek, M.; et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis—An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *J. Extracell. Vesicles* **2019**, *8*, 1596016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Caputo, F.; Clogston, J.; Calzolari, L.; Rösslein, M.; Prina-Mello, A. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *J. Control. Release* **2019**, *299*, 31–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vogel, R.; Savage, J.; Muzard, J.; Della Camera, G.; Vella, G.; Law, A.; Marchioni, M.; Mehn, D.; Geiss, O.; Peacock, B.; et al. Measuring particle concentration of multimodal synthetic reference materials and extracellular vesicles with orthogonal techniques: Who is up to the challenge? *J. Extracell. Vesicles* **2021**, *10*, e12052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kok, V.C.; Yu, C.-C. Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 8019–8036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Blanc, L.; Vidal, M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases* **2018**, *9*, 95–106. [[CrossRef](#)]
16. Johnson, J.L.; Ramadass, M.; Haimovich, A.; McGeough, M.D.; Zhang, J.; Hoffman, H.M.; Catz, S.D. Increased Neutrophil Secretion Induced by NLRP3 Mutation Links the Inflammasome to Azurophilic Granule Exocytosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 507. [[CrossRef](#)]
17. Song, J.H.; Kim, S.H.; Kim, H.-J.; Hwang, S.Y.; Kim, T.S. Alleviation of the drug-resistant phenotype in idarubicin and cytosine arabinoside double-resistant acute myeloid leukemia cells by indomethacin. *Int. J. Oncol.* **2008**, *32*, 931–936. [[CrossRef](#)]
18. Wu, F.; Xu, H.-D.; Guan, J.-J.; Hou, Y.-S.; Gu, J.-H.; Zhen, X.-C.; Qin, Z.-H. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. *Neuroscience* **2015**, *284*, 900–911. [[CrossRef](#)]
19. Zonneveld, M.I.; Keulers, T.G.H.; Rouschop, K.M.A. Extracellular Vesicles as Transmitters of Hypoxia Tolerance in Solid Cancers. *Cancers* **2019**, *11*, 154. [[CrossRef](#)]
20. Shao, C.; Yang, F.; Miao, S.; Liu, W.; Wang, C.; Shu, Y.; Shen, H. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 120. [[CrossRef](#)]
21. Stefanius, K.; Servage, K.; Orth, K. Exosomes in cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2021**, *66*, 83–92. [[CrossRef](#)]
22. Clayton, S.M.; Archard, J.A.; Wagner, J.; Farwell, D.G.; Bewley, A.F.; Beliveau, A.; Birkeland, A.; Rao, S.; Abouyared, M.; Belafsky, P.C.; et al. Immunoregulatory Potential of Exosomes Derived from Cancer Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **2020**, *29*, 327–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ostrowski, M.; Carmo, N.B.; Krumeich, S.; Fanget, I.; Raposo, G.; Savina, A.; Moita, C.F.; Schauer, K.; Hume, A.N.; Freitas, R.P.; et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 19–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jin, H.; Tang, Y.; Yang, L.; Peng, X.; Li, B.; Fan, Q.; Wei, S.; Yang, S.; Li, X.; Wu, B.; et al. Rab GTPases: Central Coordinators of Membrane Trafficking in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 648384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bobrie, A.; Krumeich, S.; Reyat, F.; Recchi, C.; Moita, L.; Seabra, M.; Ostrowski, M.; Théry, C. Rab27a Supports Exosome-Dependent and -Independent Mechanisms That Modify the Tumor Microenvironment and Can Promote Tumor Progression. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 4920–4930. [[CrossRef](#)]

26. Zheng, Y.; Campbell, E.C.; Lucocq, J.; Riches, A.; Powis, S.J. Monitoring the Rab27 associated exosome pathway using nanoparticle tracking analysis. *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 1706–1713. [[CrossRef](#)]
27. Dragovic, R.A.; Gardiner, C.; Brooks, A.S.; Tannetta, D.S.; Ferguson, D.; Hole, P.; Carr, B.; Redman, C.W.; Harris, A.; Dobson, P.J.; et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7*, 780–788. [[CrossRef](#)]
28. Koch, R.; Aung, T.; Vogel, D.; Chapuy, B.; Wenzel, D.; Becker, S.; Sinzig, U.; Venkataramani, V.; Von Mach, T.; Jacob, R.; et al. Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 395–404. [[CrossRef](#)]
29. Catalano, M.; O'Driscoll, L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: A review of EV inhibitors. *J. Extracell. Vesicles* **2019**, *9*, 1703244. [[CrossRef](#)]
30. Mejías, J.C.; Forrest, O.A.; Margaroli, C.; Rubio, D.A.F.; Viera, L.; Li, J.; Xu, X.; Gaggari, A.; Tirouvanziam, R.; Roy, K. Neutrophil-targeted, protease-activated pulmonary drug delivery blocks airway and systemic inflammation. *JCI Insight* **2019**, *4*, e131468. [[CrossRef](#)]
31. Kumar, D.; Gupta, D.; Shankar, S.; Srivastava, R.K. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3280–3291. [[CrossRef](#)]
32. Patton, M.C.; Zubair, H.; Khan, M.A.; Singh, S.; Singh, A.P. Hypoxia alters the release and size distribution of extracellular vesicles in pancreatic cancer cells to support their adaptive survival. *J. Cell. Biochem.* **2020**, *121*, 828–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kumar, A.; Deep, G. Hypoxia in tumor microenvironment regulates exosome biogenesis: Molecular mechanisms and translational opportunities. *Cancer Lett.* **2020**, *479*, 23–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Huang, Z.; Feng, Y. Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced β -Catenin Signaling in Endothelial Cells. *Oncol. Res.* **2017**, *25*, 651–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Usfoor, Z.; Kaufmann, K.; Rakib, A.S.H.; Hergenröder, R.; Shpacovitch, V. Features of Sizing and Enumeration of Silica and Polystyrene Nanoparticles by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). *Sensors* **2020**, *20*, 6611. [[CrossRef](#)]
36. Valkonen, S.; van der Pol, E.; Böing, A.; Yuana, Y.; Yliperttula, M.; Nieuwland, R.; Laitinen, S.; Siljander, P. Biological reference materials for extracellular vesicle studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *98*, 4–16. [[CrossRef](#)]
37. Crigna, A.T.; Fricke, F.; Nitschke, K.; Worst, T.; Erb, U.; Karremann, M.; Buschmann, D.; Elvers-Hornung, S.; Tucher, C.; Schiller, M.; et al. Inter-Laboratory Comparison of Extracellular Vesicle Isolation Based on Ultracentrifugation. *Transfus. Med. Hemother.* **2020**, *48*, 48–59. [[CrossRef](#)]

IV.1.2. Résultats complémentaires

IV.1.2.1. Autres aspects étudiés sur le modèle HCT116 shRAB27A

Les résultats présentés dans cet article soulignent l'importance d'instaurer des précautions particulières lors de l'interprétation de données suite à une analyse par NTA. Il nous est donc paru important d'utiliser une autre technique de quantification des EVs au sein de la lignée HCT116, de sorte à confirmer ou infirmer les résultats obtenus grâce à l'utilisation du NanoSight. Nous avons choisi une analyse par cytométrie en flux, où les EVs, obtenues par ultracentrifugations des surnageants de culture de HCT116 shRAB27A, ont été isolées à l'aide de billes magnétiques recouvertes avec du CD63, marqueur des exosomes. Une fois l'isolement des exosomes CD63⁺ réalisée, les échantillons marqués à l'aide d'un anticorps fluorescent reconnaissant le CD63 ont été soumis au cytomètre en flux pour analyse. En conséquence, l'observation d'un marquage plus important traduit l'accumulation d'EVs CD63⁺ sur les billes. Comme observé en [Figure 24](#), les conditions sh1 et sh3 présentent un marquage moins important de CD63 (**A**), ainsi qu'une médiane d'intensité de fluorescence plus faible que la condition pLKO (**B**). Ces résultats semblent confirmer le fait que la diminution de la sécrétion vésiculaire attendue suite à l'inhibition de Rab-27A est bien effective, mais n'est pas détectée par le NanoSight, dans nos conditions expérimentales.

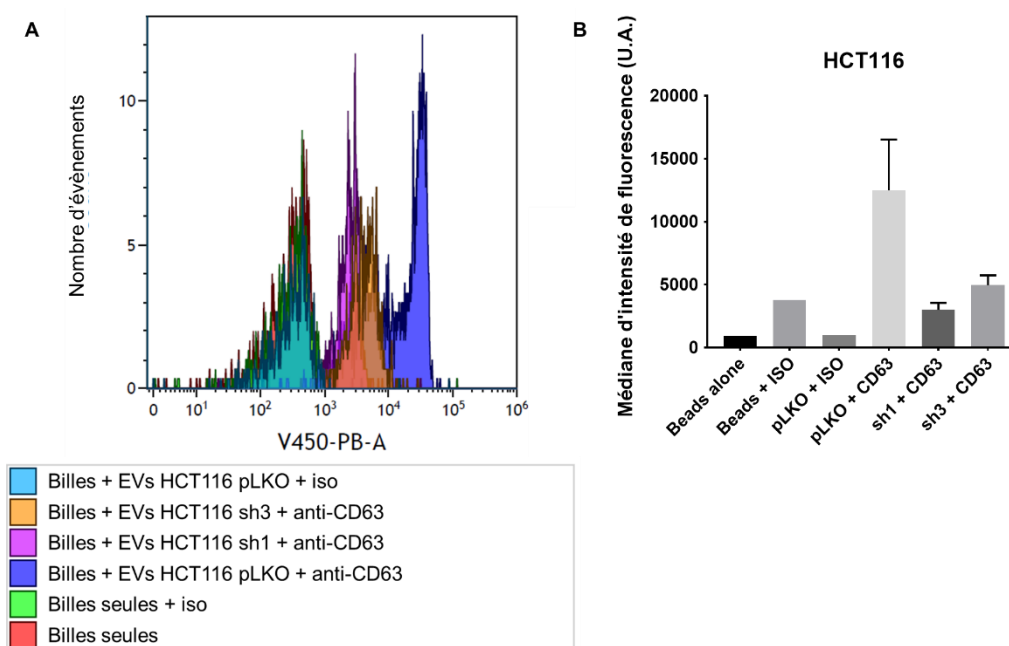


Figure 24 - Evaluation de la quantité d'EVs CD63⁺ sécrétées, par analyse de cytométrie en flux.

A : Histogramme de cytométrie en flux représentant le nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence correspondant à la présence d'EVs exprimant le CD63. Les différentes conditions testées sont les suivantes : billes seules, billes marquées avec l'anticorps isotypique (ISO), billes couplées aux EVs issues d'HCT116 pLKO marquées avec l'ISO, billes couplées aux EVs issues d'HCT116 pLKO marquées avec l'anti-CD63 fluorescent, billes couplées aux EVs issues d'HCT116 sh1 marquées avec l'anti-CD63 fluorescent, et billes couplées aux EVs issues d'HCT116 sh3 marquées avec l'anti-CD63 fluorescent. **B** : Quantification de la médiane d'intensité de fluorescence dans les différentes conditions. Les résultats sont issus de deux expériences indépendantes (n=2).

L'ensemble de ces données semble indiquer que l'approche de la quantification des EVs par NTA en utilisant le NanoSight 300 n'est pas optimale pour la détection d'une diminution de sécrétion.

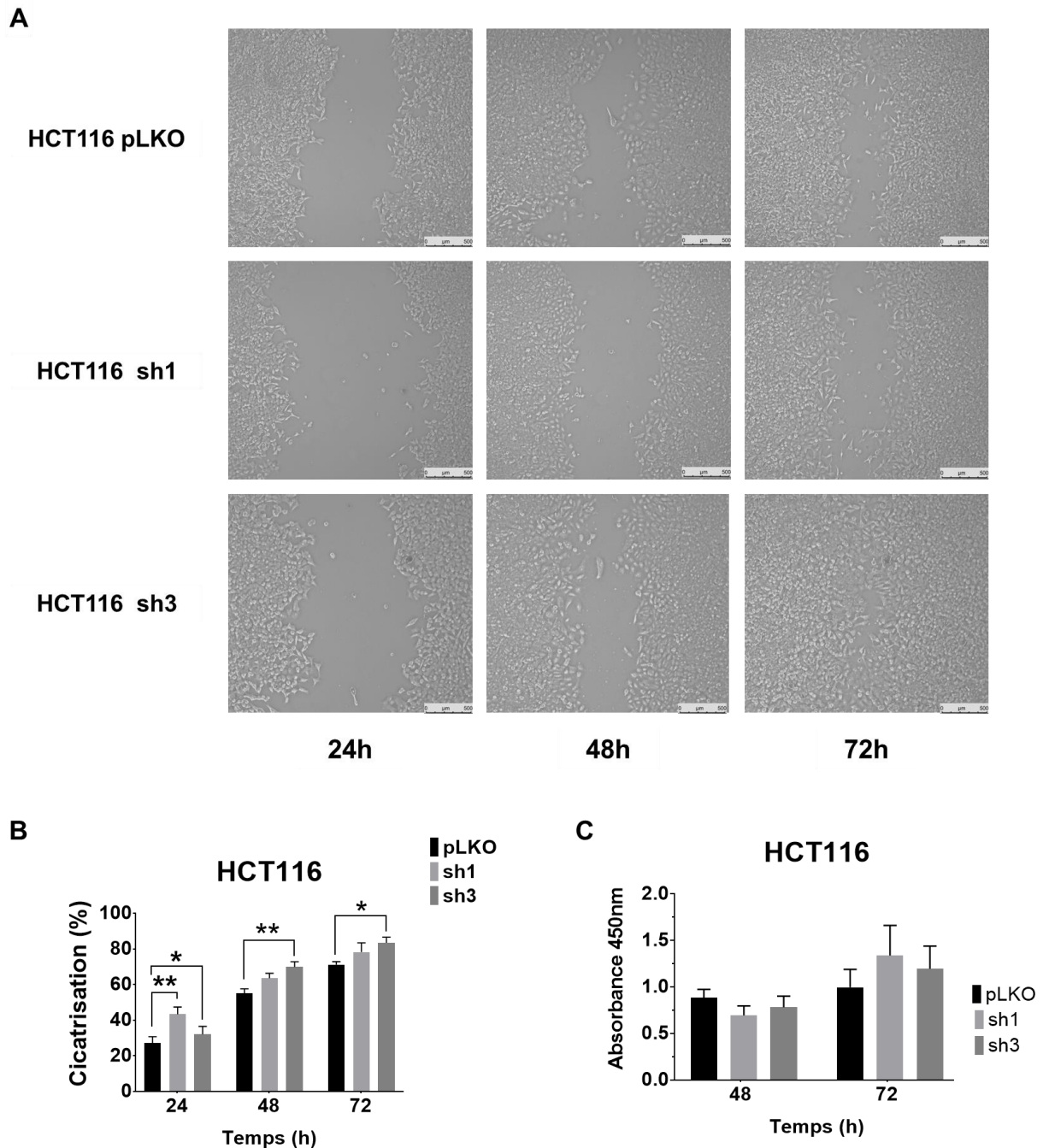


Figure 25 - Evaluation des aspects fonctionnels des modèles HCT116 shRAB27A.

A : Captures à 24, 48 et 72h de l'évolution de la cicatrisation après blessure dans le cadre de scratch tests. **B** : Quantification de la migration cellulaire suite aux scratch tests à 24, 48 et 72h après blessure. **C** : Evolution de la prolifération cellulaire à 48h et 72h évaluée par des tests d'incorporation du BrdU.

D'autre part, les aspects fonctionnels des modèles shRAB27A ont été étudiés, notamment la prolifération, la migration cellulaire, le compartiment souche et l'autophagie. D'après la quantification des scratch tests, une augmentation de la vitesse de cicatrisation est observée dans les HCT116 shRAB27A, et notamment les sh3, à 24, 48 et 72h après blessure (Figure 25 A et B). En revanche, les tests d'incorporation du BrdU ne témoignent d'aucune variation significative de la prolifération cellulaire entre les HCT116 shRAB27A et le contrôle à 48 ou 72h (C). De ce fait, l'augmentation de la cicatrisation observée traduirait une migration cellulaire facilitée.

Concernant le compartiment souche, aucune variation significative de l'expression des marqueurs LGR5, OCT4, BMI1, Nanog et Sox2 n'a été détectée par RT-qPCR dans les modèles shRAB27A (Figure 26).

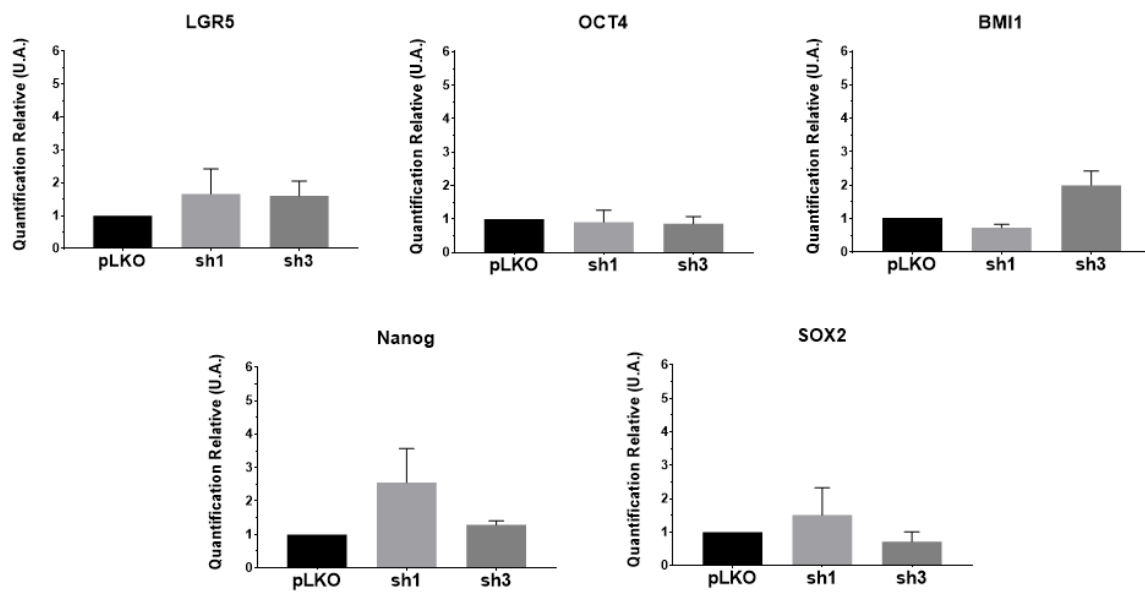


Figure 26 - Evaluation de l'expression des marqueurs « souches » par RT-qPCR.

Enfin, l'expression d'ATG5 n'est pas affectée par l'inhibition de *RAB27A* (Figure 27). Cette analyse est trop partielle pour conclure sur l'effet de cette déplétion sur le processus autophagique, d'autant plus qu'ATG5 n'est pas un réel marqueur de la fonctionnalité de l'autophagie.

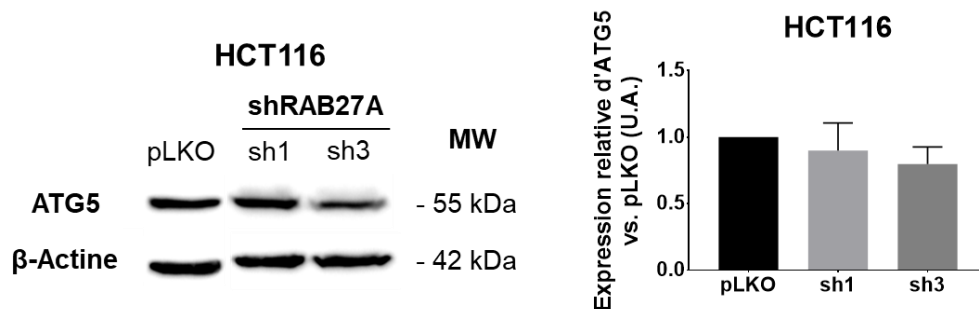
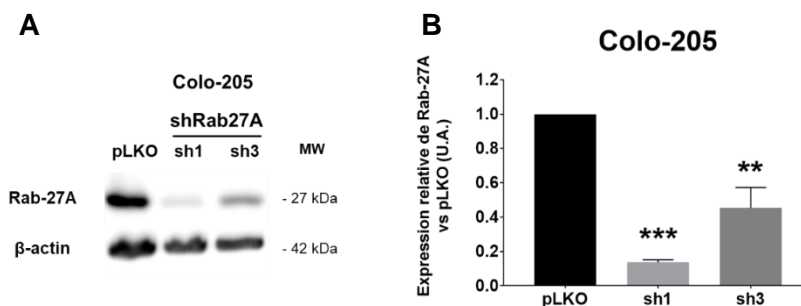


Figure 27 – Evaluation de l'expression d'ATG5 dans les modèles shRAB27A par western blot

Dans l'état actuel des investigations, il semble que l'inhibition de *RAB27A* affecterait les capacités migratoires des cellules de cancer colique de stade précoce, ce qui pourrait être en faveur d'une agressivité augmentée.

IV.1.2.2. Etude de la sécrétion d'EVs dans le modèle Colo205 shRAB27A

Le modèle shRAB27A ayant également été développé chez les Colo205, l'inhibition de l'expression de Rab-27A (avec les sh1 et 3, qui s'étaient avérés être les plus efficaces sur le modèle HCT116) a été validée par Western blot ([Figure 28](#)). De la même manière que dans le modèle HCT116, Rab-27A présente une expression diminuée suite au traitement avec les shRNAs. Le sh1 semble présenter une efficacité plus importante que le sh3, les deux shRNA entraînant une diminution de l'expression de Rab-27A d'environ 90 et 60%, respectivement.



[Figure 28](#) - Validation de l'inhibition de Rab-27A dans la lignée Colo205

A : Evaluation de l'expression de Rab-27A par western blot dans les Colo205 shRAB27A et **B** : quantification en comparaison au contrôle (pLKO).

Une fois cette validation effectuée, la sécrétion d'EVs a également été évaluée par NTA dans le modèle Colo205 ([Figure 29](#)). Comme pour les HCT116, aucune variation significative n'a été observée en termes de quantité ([Figure 29 A](#)) ou de taille ([Figure 29 B](#)) des EVs sécrétées après analyse au NanoSight. Cependant, compte tenu des doutes que nous avons émis sur la capacité du NanoSight à mettre en évidence une diminution de sécrétion des EVs, il nous paraît difficile de conclure quant à l'effet de l'inhibition d'expression de Rab27A sur cette sécrétion dans le modèle des Colo205.

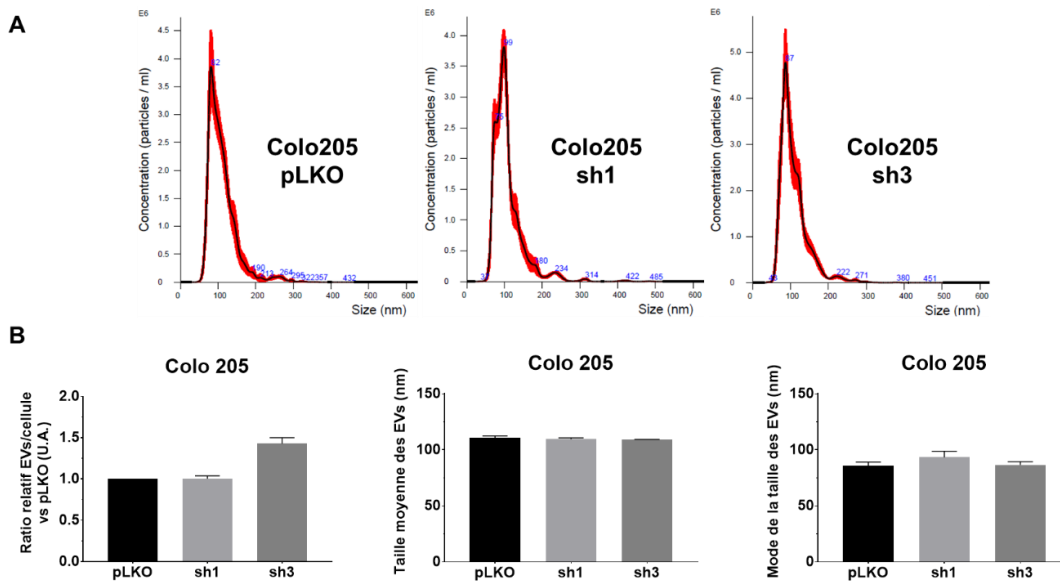


Figure 29 - Evaluation de la sécrétion vésiculaire dans les Colo205 shRAB27A.

A : Evolution de la concentration en EVs estimée par le NanoSight en fonction de leur taille (nm).
B : Représentations graphiques de l'évolution de la concentration en EVs (gauche), de la taille moyenne (milieu) et de la taille la plus représentée des EVs (droite) issues de Colo205 shRAB27A.

Enfin, l'expression d'ATG5 chez les Colo205 shRAB27A n'a montré aucune variation significative lorsque évaluée par western blot (Figure 30), comme cela avait été le cas dans les cellules HCT116.

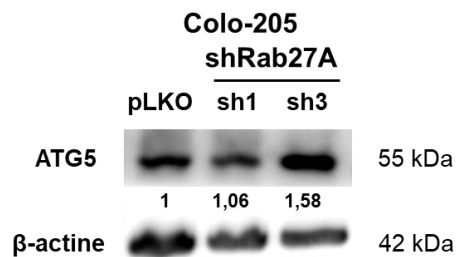


Figure 30 - Evaluation de l'expression d'ATG5 dans les Colo205 shRAB27A

L'évaluation de l'expression d'ATG5 a été réalisée par western blot et quantifiée. Les rapport ATG5/actine sont indiqués.

IV.2. Conséquences de l'altération de l'autophagie dans les cellules de cancer colique

Le premier volet de ces travaux, portant sur l'inhibition de la sécrétion d'EVs par le biais de shRNA ciblant la protéine Rab27A ne nous a pas permis d'étudier directement le lien entre autophagie et sécrétion d'EVs devant l'absence de démonstration de réduction de la sécrétion d'EVs. Nous avons donc envisagé l'approche complémentaire, consistant à inhiber une protéine du processus autophagique, la protéine ATG5, intervenant dans l'élongation de l'autophagosome. Sur les cellules ainsi modifiées, nous avons étudié les conséquences fonctionnelles de cette inhibition.

IV.2.1. Validation de l'extinction d'ATG5 et de l'altération de l'autophagie

Dans le but d'étudier les effets d'altérations de l'autophagie, l'expression d'ATG5 a été réprimée à l'aide de shRNAs lentiviraux, appelés « 164 » et « 166 » dans le reste de ce travail. Ces modèles ont été comparés avec la condition contrôle « pLKO » dans laquelle un vecteur « scramble » a été utilisé. Ces shRNAs ont été utilisés aussi bien dans les HCT116 que dans les Colo205, représentant respectivement un stade précoce et un stade tardif de cancer colique. Suite à l'emploi des shRNAs, l'expression d'ATG5 a été étudiée à l'échelle transcriptomique par RT-qPCR, et à l'échelle protéique par western blot (**Figure 31** **Erreur ! Source du renvoi introuvable. A, B**). Ainsi, l'expression d'ATG5 a été diminuée à hauteur de 75% dans les HCT116 et de l'ordre de 50 à 60% dans les Colo205 (**A**). Au niveau protéique, l'expression d'ATG5 a été diminuée de près 80% dans les HCT116, et 60% dans les Colo205, corrélant les résultats de RT-qPCR (**B**). Suivant cette validation, l'expression de deux marqueurs majeurs du processus autophagique (LC3 et p62) a été évaluée par western blot afin de confirmer l'altération de l'autophagie induite par l'inhibition d'ATG5 (**C**). Ainsi, une diminution de l'expression de LC3-II couplée à une accumulation de p62 sont observées dans les shATG5 des deux lignées cellulaires, traduisant une altération de l'autophagie (**C**). Dès lors, les modèles shATG5 développés dans les HCT116 et les Colo205 ont pu être utilisés comme support de l'étude des effets d'altérations de l'autophagie sur ces cellules.

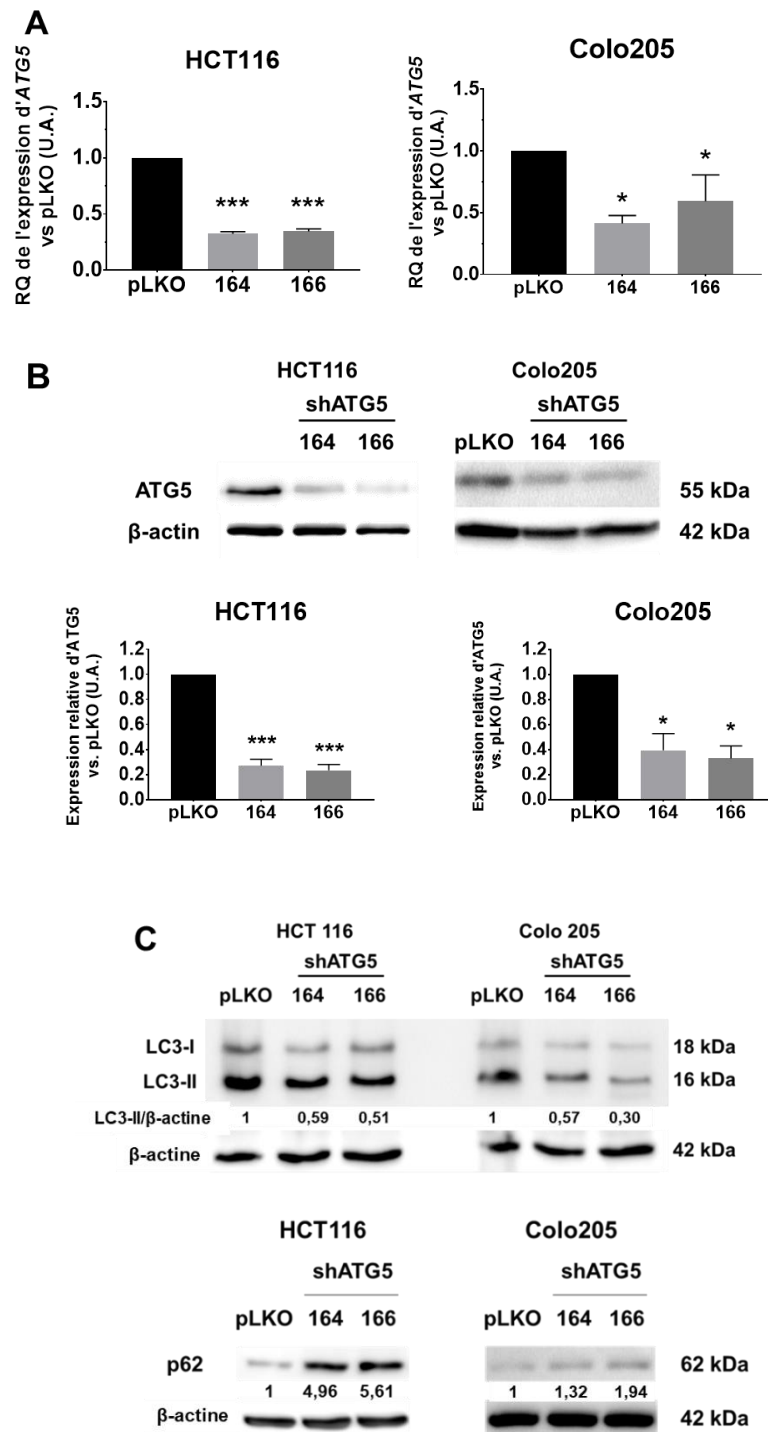


Figure 31 - Validation de l'altération de l'autophagie dans les cellules de cancer colique shATG5.

L'inhibition d'ATG5 a été étudiée par RT-qPCR (A) et western blot (B) dans les HCT116 et les Colo205. L'expression d'ATG5 a été comparée entre les conditions shATG5 et le vecteur contrôle « pLKO », et quantifiée (B). Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C : L'expression de LC3 et p62 a été évaluée par western blot sur les deux modèles cellulaires pour attester de l'altération de l'autophagie. Les rapports LC3-II/actine et p62/actine sont renseignés dans la Figure C en guise de quantification relative vis-à-vis de pLKO.

IV.2.2. Effets des altérations de l'autophagie sur la fonctionnalité des cellules de cancer colique

L'autophagie étant altérée dans les modèles shATG5, les aspects fonctionnels des cellules ont dès lors été étudiés.

Tout d'abord, la prolifération cellulaire a été évaluée par incorporation du BrdU aux temps 24, 48 et 72h (Figure 32). Ni les HCT116, ni les Colo205 shATG5 n'ont montré de variation de prolifération en comparaison à pLKO.

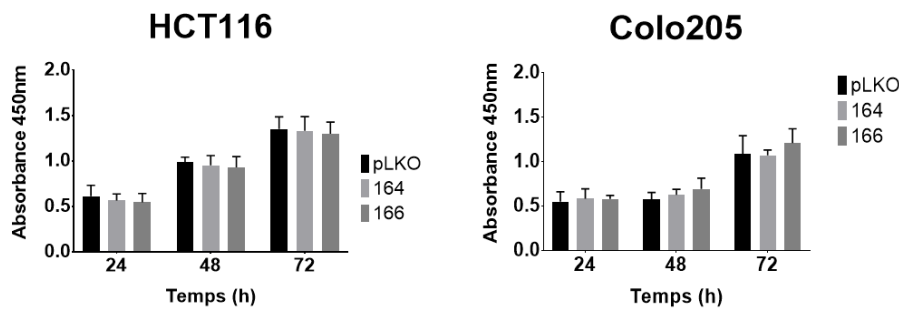


Figure 32 - Evaluation de la prolifération cellulaire par tests d'incorporation du BrdU dans les HCT116 et les Colo205 à 24, 48 et 72h après ensemencement.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes.

D'autre part, nous avons étudié par RT-qPCR l'expression de deux marqueurs classiquement surexprimés dans les cellules souches cancéreuses, *LGR5* et *Oct4* (Figure 33). D'après les résultats obtenus, aucune variation significative de leur expression n'a été observée dans les deux lignées cellulaires shATG5 en comparaison au contrôle, suggérant que l'altération de l'autophagie n'affecte pas le compartiment souche dans ces lignées cellulaires.

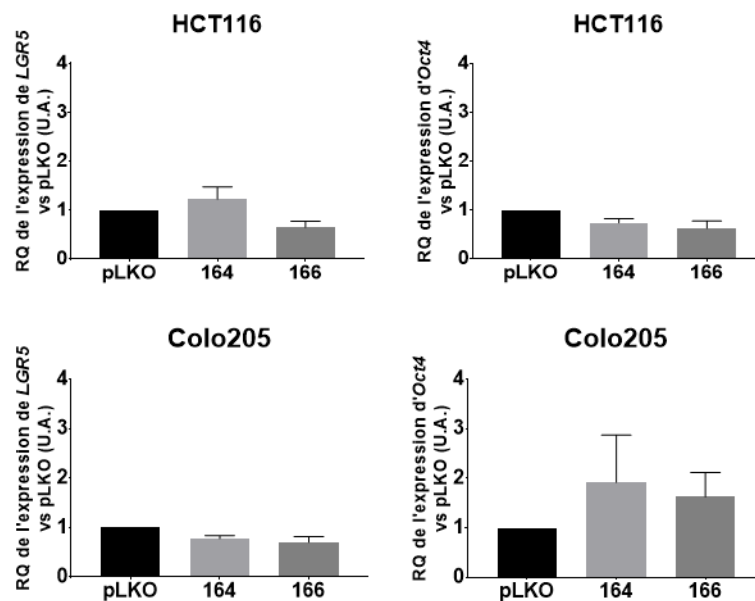


Figure 33 - Analyse de l'expression de *LGR5* (gauche) et d'*Oct4* (droite) par RT-qPCR dans les HCT116 et les Colo205.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes.

Enfin, la sensibilité des deux lignées à la chimiothérapie classiquement utilisée dans le CCR, le 5-FU, a été évaluée par ELISA cell-death (Figure 34). Les résultats montrent que les HCT116 shATG5 traitées avec du 5-FU à 8 μ M présentent une sensibilité accrue vis-à-vis de cette molécule en comparaison aux HCT116 pLKO (Figure 34 haut). De manière générale, le 5-FU entraîne une létalité plus importante chez ces cellules (Figure 34 haut). En revanche, cette observation n'est pas valable en ce qui concerne les Colo205 (Figure 34 bas). En effet, les Colo205 shATG5 ne présentent aucune variation de la sensibilité vis-à-vis du 5-FU par rapport aux pLKO. De plus, les Colo205 sont environ 5 fois moins sensibles au 5-FU que les HCT116 d'une manière générale.

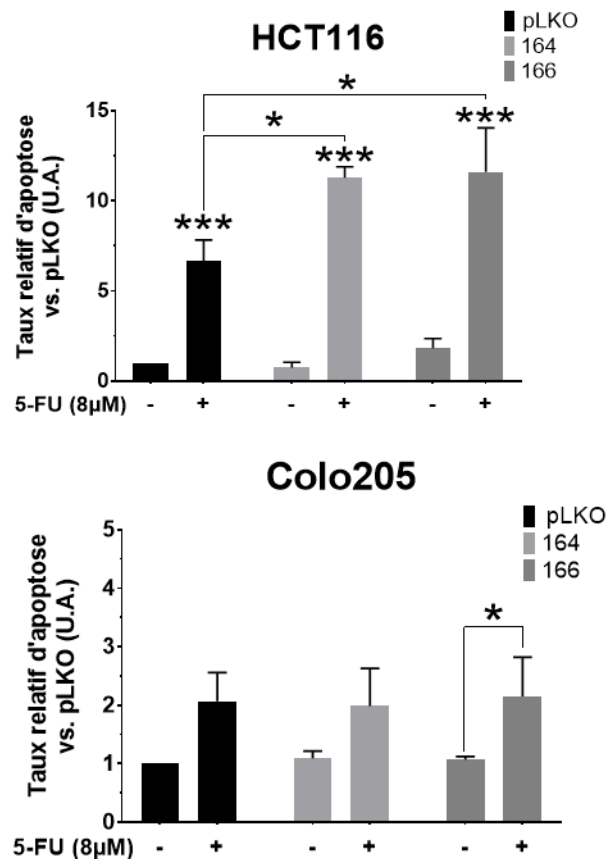


Figure 34 - Evaluation de la chimiosensibilité vis-à-vis du 5-FU à 8 μ M des HCT116 et des Colo205 par ELISA cell-death.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$.

Ces résultats suggèrent que l'altération de l'autophagie n'affecte ni la prolifération cellulaire, ni le compartiment souche, aussi bien dans les cellules de stade précoce que celles de stade tardif. En revanche, les HCT116 présentent une chimiosensibilité accrue après altération de l'autophagie.

IV.2.3. Effets des altérations de l'autophagie sur l'agressivité des cellules de cancer colique

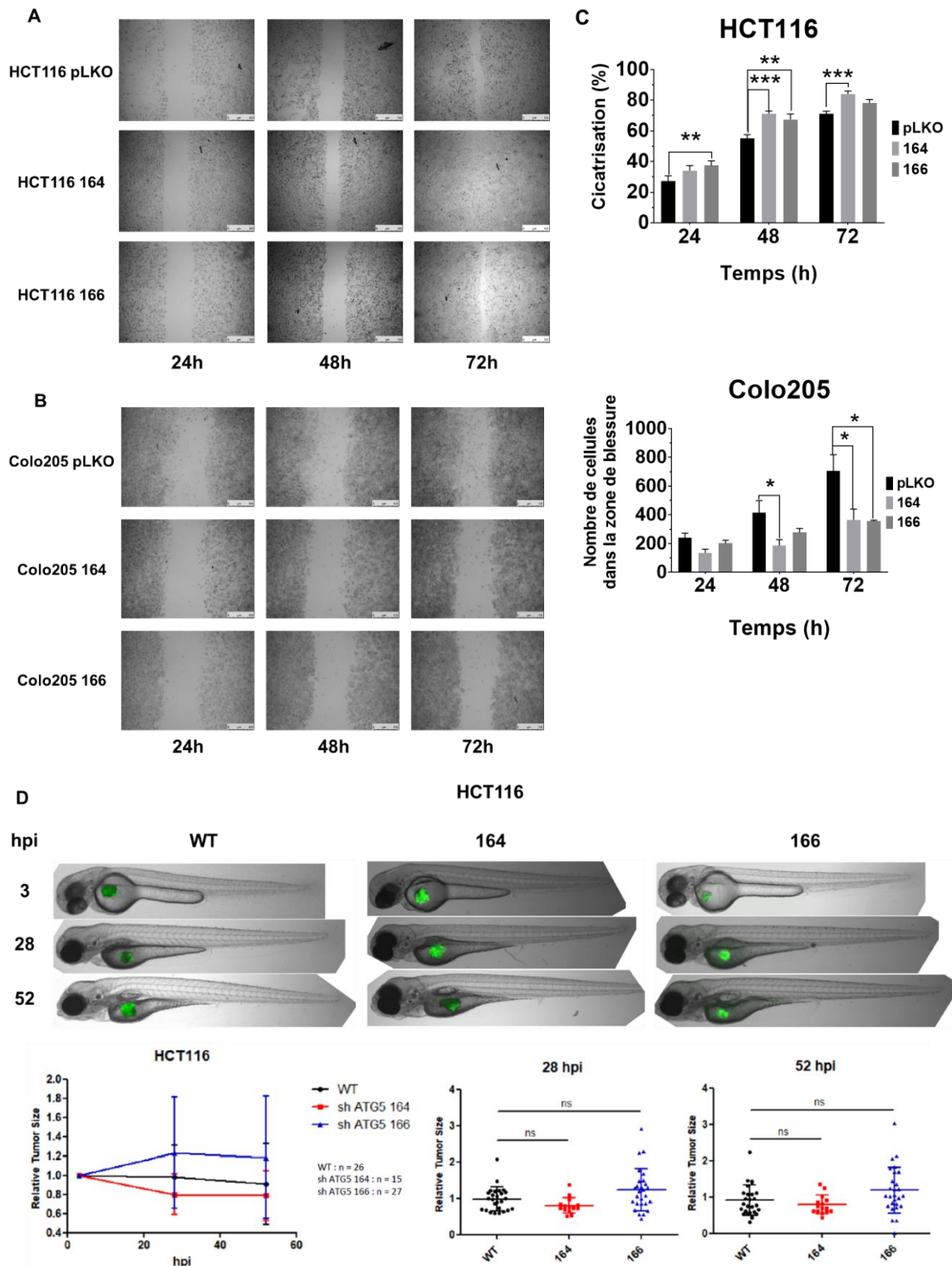
Comme observé dans la plupart des cancers et notamment dans le cancer colique, une induction de l'autophagie peut interférer avec le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM (Lv *et al.* 2012; Catalano *et al.* 2015)). De plus, il a également été montré qu'une altération de l'autophagie dans le cancer colique pouvait entraîner une suractivation de la TEM (Shen *et al.* 2018). Dès lors, autophagie et TEM semblent étroitement liées dans le développement cancéreux, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à cet aspect dans les modèles shATG5. De ce fait, nous nous sommes intéressés aux effets de l'altération de l'autophagie sur la migration cellulaire, particulièrement par TEM.

En premier lieu, par des tests de cicatrisation (« scratch tests »), nous avons observé des effets différents de l'altération de l'autophagie sur la migration cellulaire en fonction du stade de cancer colique représenté (Figure 35 A,B,C). En effet, les HCT116 shATG5 montrent une cicatrisation plus rapide que les pLKO à 48 et 72h après blessure, suggérant une aptitude migratoire plus importante dans ces cellules (Figure 35 A,C). A l'inverse, les Colo205 shATG5 présentent une aptitude migratoire moindre par rapport aux pLKO, suggérant un effet différent de l'altération de l'autophagie en fonction du stade de cancer colique en termes de capacités migratoires (Figure 35 B,C).

Au vu de ces premiers résultats *in vitro*, des expériences de xénogreffes dans le sac vitellin d'embryons de poissons zèbres *in vivo* ont été réalisées afin de confirmer les capacités migratoires des HCT116 shATG5 observées lors des tests de cicatrisation (Figure 35 D). De façon surprenante, les HCT116 shATG5 n'ont démontré aucune différence en termes de migration en dehors du sac vitellin, ou de taille tumorale en comparaison avec le contrôle, après 3, 24 ou 52 heures post injection (hpi), bien qu'une tendance à l'augmentation de la taille tumorale soit observée dans les sh166 (Figure 35 D). Cette expérience n'a jusqu'alors été réalisée que sur les HCT116.

Nous nous sommes alors interrogés quant à l'activation ou non de la TEM suite aux altérations de l'autophagie dans les deux lignées cellulaires, notamment en analysant l'expression de marqueurs de ce processus. Dans un premier temps, l'expression de l'E-cadhérine, protéine d'adhésion cellulaire dont la perte d'expression témoigne d'une activation de la migration cellulaire par TEM, a été évaluée par western blot (Figure 35 E). Dès lors, différentes isoformes de l'E-cadhérine ont pu être identifiées et montrent une expression variable dans les modèles cellulaires étudiés. Ainsi, de manière surprenante, les HCT116 montrent une expression d'E-cadhérine globalement moins élevée que les Colo205. L'isoforme la plus représentée dans les HCT116 est celle de 50 kDa, connue pour son implication dans l'invasion cellulaire (Christou *et al.* 2017b) Figure 35 E). Dans les Colo205, seule l'isoforme à 80 kDa est faiblement exprimée, et la forme totale (120 kDa) n'est pas la forme la plus représentée dans ces cellules (Figure 35 E). Quoi qu'il en soit, aucune variation significative de l'expression de l'E-cadhérine, quelle que soit l'isoforme, n'est observée entre les shATG5 et les pLKO dans les deux lignées cellulaires, suggérant que la TEM n'est pas particulièrement activée suite à une altération de l'autophagie dans ces cellules (Figure 35 E).

Nous avons poursuivi l'investigation de ce processus en recherchant par RT-qPCR l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la TEM. L'analyse de l'expression de *SNAI1* (*SNAIL*) et *SNAI2* (*SLUG*) semble confirmer cette observation, puisqu'aucune variation significative n'est observée dans les HCT116 shATG5 en comparaison avec le contrôle (Figure 35 F). Or, *SNAI2* présente une expression plus importante chez les Colo205 shATG5 166 notamment. Cependant, au vu des résultats obtenus concernant l'expression de l'E-cadhérine et la migration cellulaire, cette surexpression de *SNAI2* dans les Colo205 shATG5 ne semble pas être corrélée avec une TEM plus importante dans ces cellules.



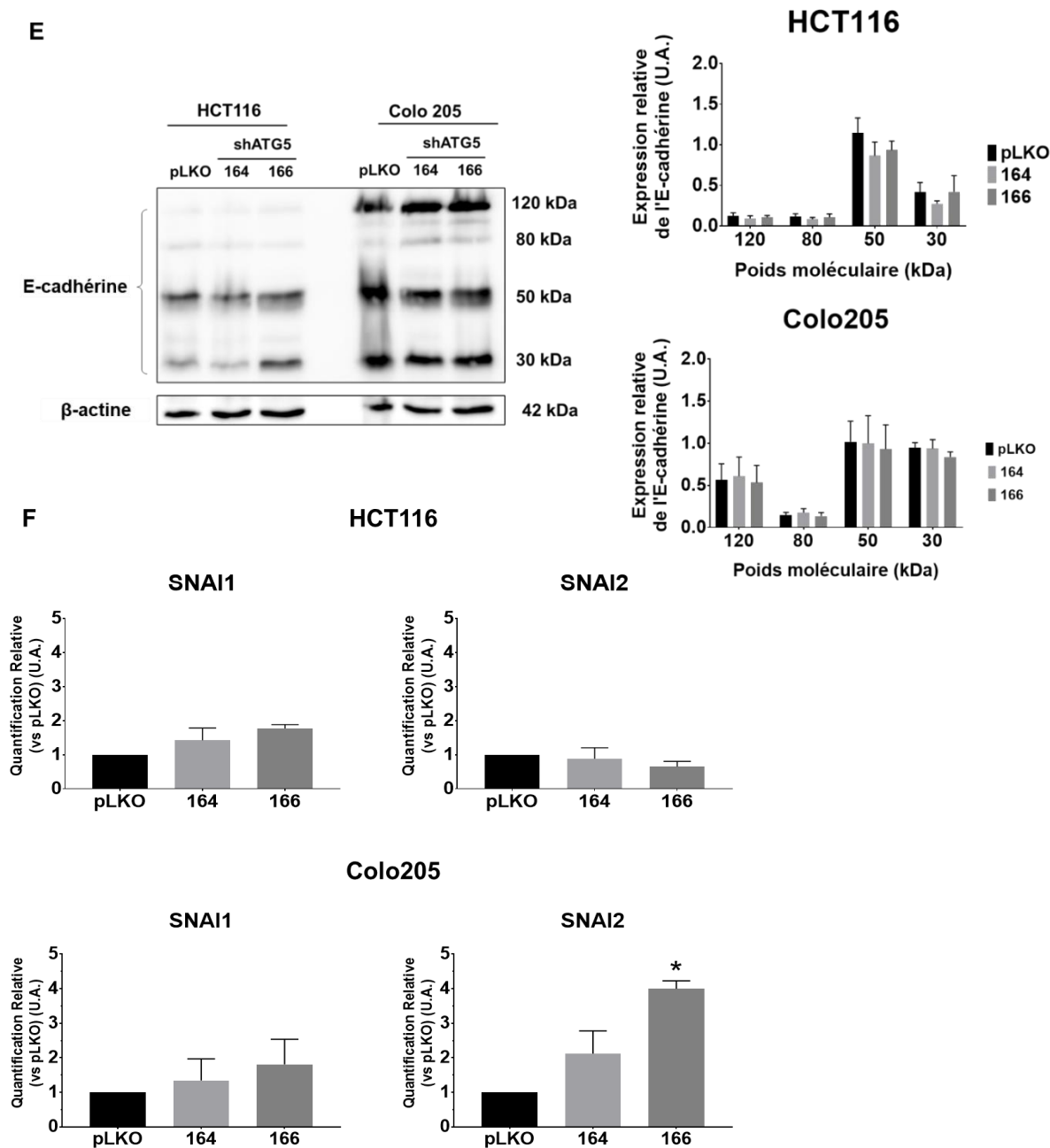
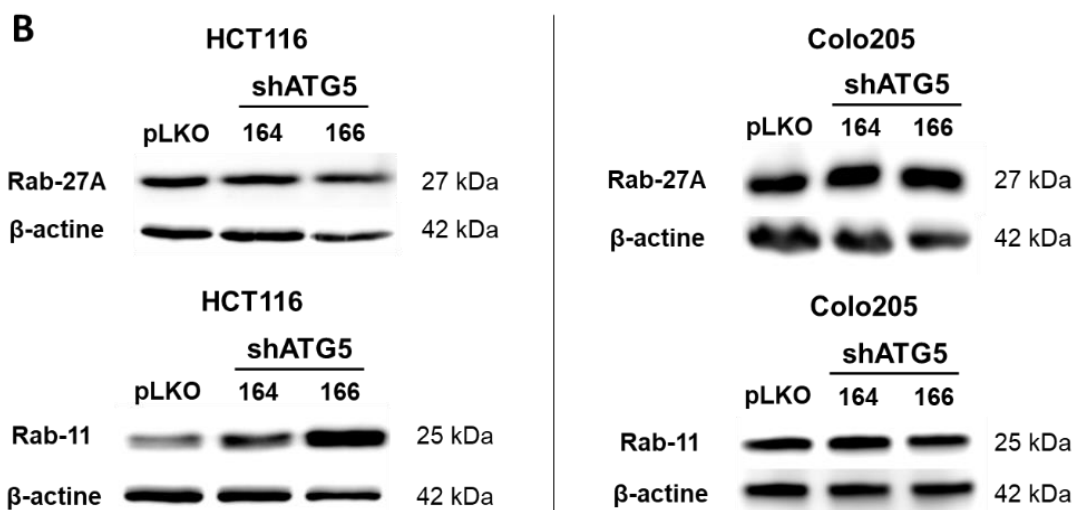
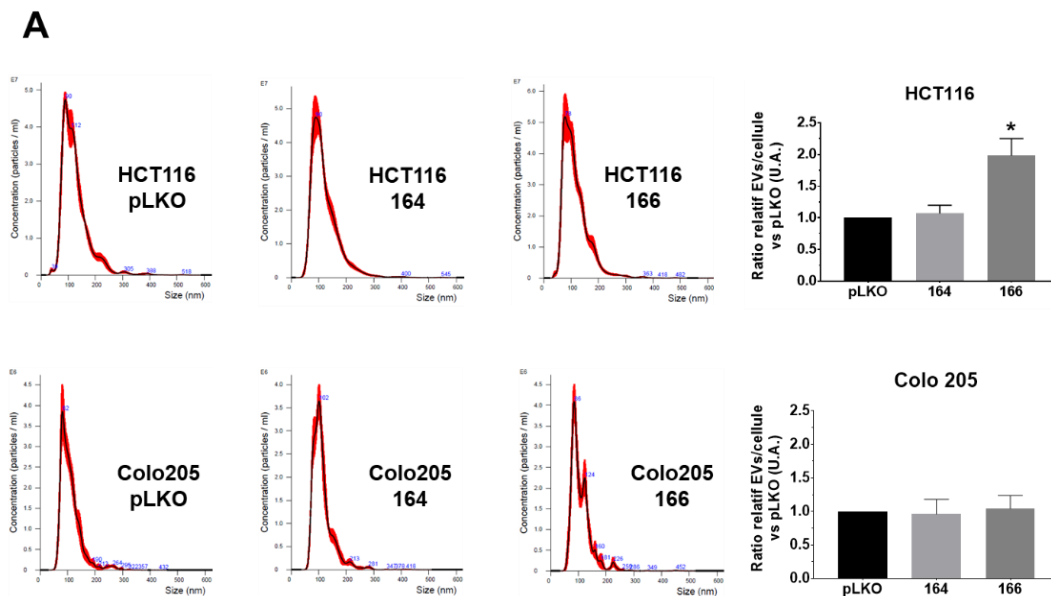


Figure 35 - Effets de l'altération de l'autophagie sur la migration cellulaire et la TEM

La migration cellulaire a été évaluée par scratch tests sur les HCT116 (**A**) et les Colo205 (**B**) shATG5 en comparaison au contrôle (pLKO). **C** : La cicatrisation de la blessure a été évaluée en mesurant l'aire de la blessure pour les HCT116, ou en comptant le nombre de cellules ayant migré dans la zone de la blessure pour les Colo205. **D** : La migration cellulaire a été étudiée *in vivo* par xénogreffes de HCT116 marquées à la calcéine, dans le sac vitellin d'embryons de poissons zèbres (zebrafish) à 3, 24 et 52 heures post injection (hpi). La taille des tumeurs a également été mesurée dans le sac vitellin des embryons de poissons zèbres. **E** : Evaluation de l'expression des différentes isoformes d'E-cadhérine par western blot, et quantification relative par rapport à pLKO. **F** : Evaluation de l'expression des marqueurs de l'EMT *SNAI1* et *SNAI2* par RT-qPCR. Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

IV.2.4. Effets de l'altération de l'autophagie sur la sécrétion d'EVs

Dans le but d'étudier les effets d'altérations de l'autophagie sur la sécrétion vésiculaire, celle-ci a été évaluée par analyse au NanoSight à partir de surnageants issus d'HCT116 et Colo205. Dès lors, une augmentation significative de la sécrétion d'EVs est observée dans une seule des conditions HCT116 shATG5 : le 166, mais ni dans les HCT116 sh164, ni dans les Colo205 shATG5 (Figure 36A). Afin de comprendre pourquoi la sécrétion d'EVs augmente dans cette lignée cellulaire, une analyse de l'expression de protéines associées au trafic vésiculaire a été réalisée par western blot. Ainsi, dans les HCT116, aucune variation de l'expression de Rab-27A n'est observée, tandis que Rab-11 est surexprimée dans les HCT116 shATG5 166 (Figure 36 B,C). L'augmentation de l'expression de Rab-11 dans les HCT116 sh166 pourrait en partie expliquer l'augmentation de la sécrétion d'EVs observée précédemment dans ces mêmes cellules.



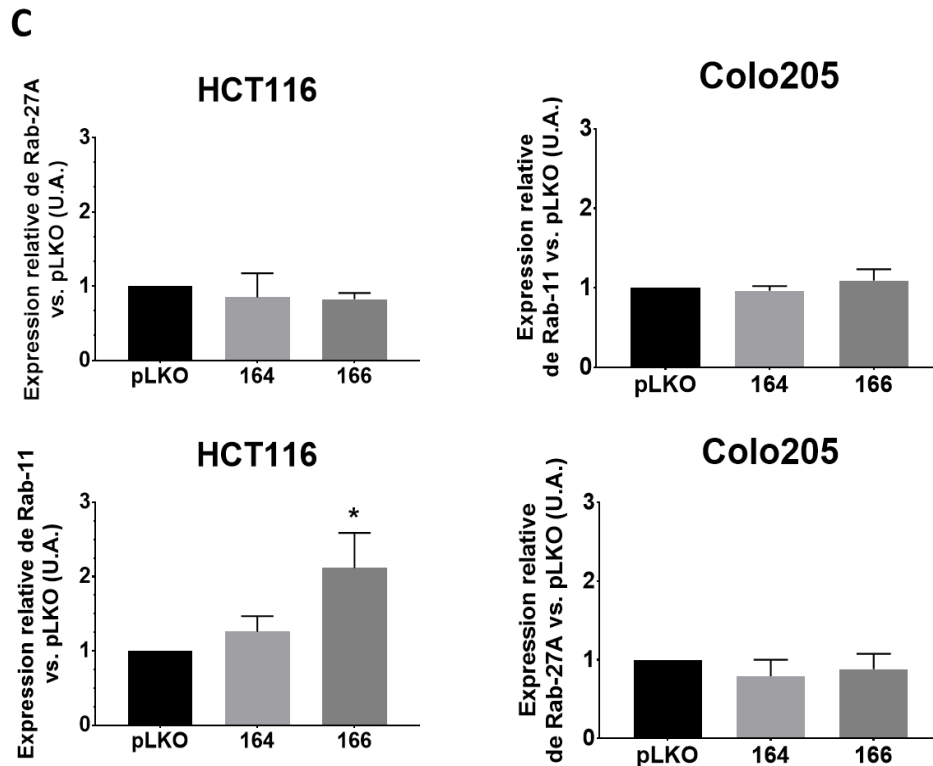


Figure 36 - Evaluation de la sécrétion d'EVs et de l'expression des protéines associées dans les modèles shATG5

A : Analyse par NTA de la concentration en EVs sécrétée dans les surnageants issus de HCT116 et Colo205 shATG5 (gauche), et quantification relative par rapport au contrôle (pLKO ; droite).
B : Evaluation de l'expression de Rab-27A et Rab-11 par western blot dans les modèles shATG5.
C : Quantification relative des western blots de Rab-27A et Rab-11 par rapport à pLKO. Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$.

IV.2.5. Transfert d'agressivité par le biais de la sécrétion d'EVs dans les modèles shATG5

Ayant préalablement observé des capacités migratoires plus importantes dans les HCT116 shATG5, témoignant d'une agressivité augmentée, et ayant constaté une augmentation de la sécrétion d'EVs, notamment dans les HCT116 shATG5 166, nous nous sommes intéressés aux propriétés que les EVs sécrétées par ces cellules pouvaient avoir en termes d'agressivité. En effet, il est connu, notamment d'après de précédents travaux du laboratoire CAPTuR, que des EVs, et en particulier les exosomes, sont capables de transférer de l'information aux cellules environnantes entraînant un transfert d'agressivité (Pinet *et al.* 2016). Dans ce contexte, des tests de cicatrisation ont été réalisés après traitement avec des EVs provenant des surnageants de culture de cellules shATG5, dans les deux modèles cellulaires. Les conditions pLKO seules ont été utilisées en tant que conditions contrôles lors des quantifications. Aucune variation significative de la migration cellulaire n'a été observée dans les pLKO traitées avec les EVs issues des shATG5 que cela soit chez les HCT116 (Figure 37 A,C) ou les Colo205 (Figure 37 B,C), suggérant que nos modèles cellulaires d'altération de l'autophagie n'ont pas la capacité de transférer leur agressivité par le biais de la sécrétion d'EVs.

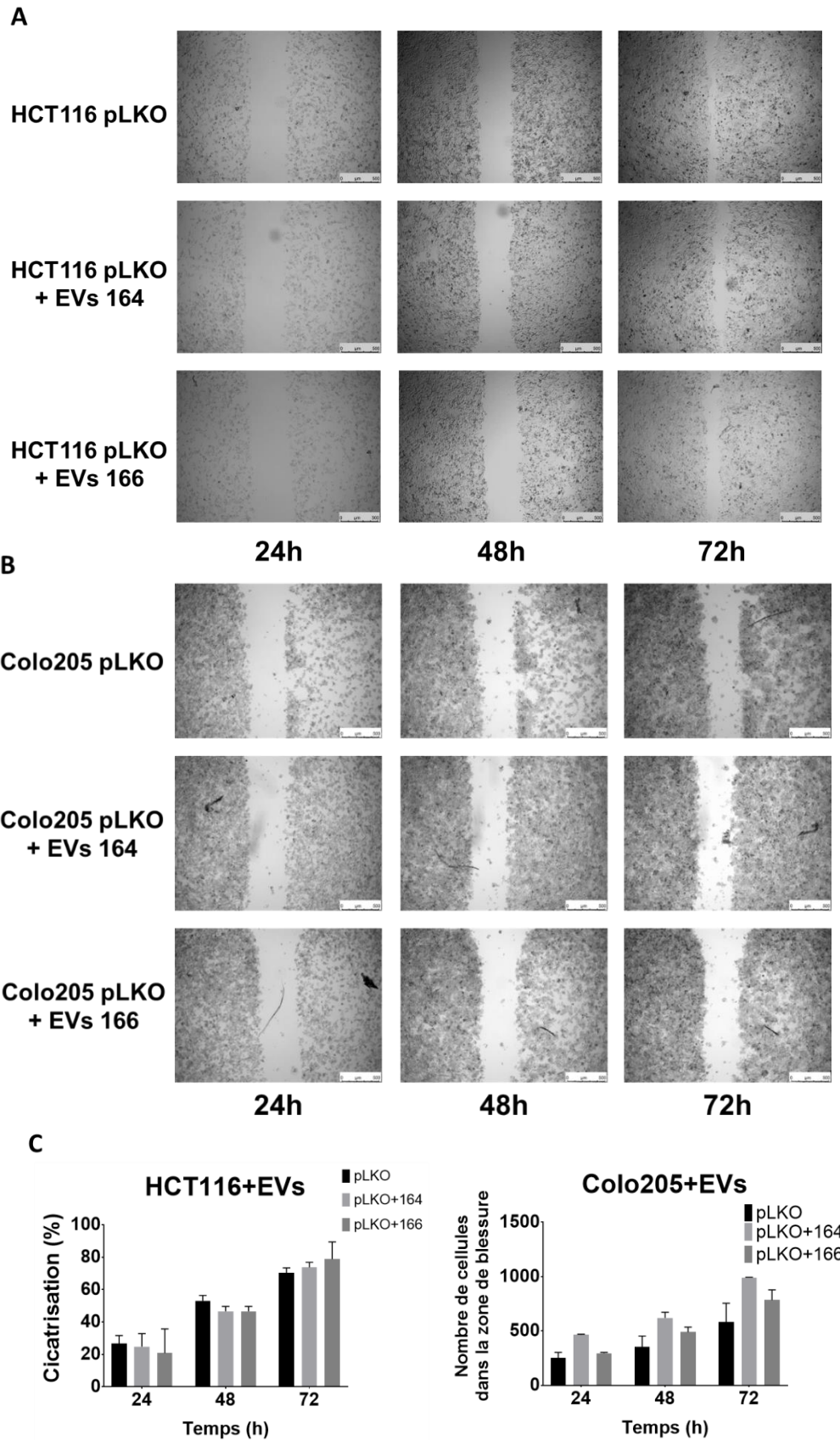


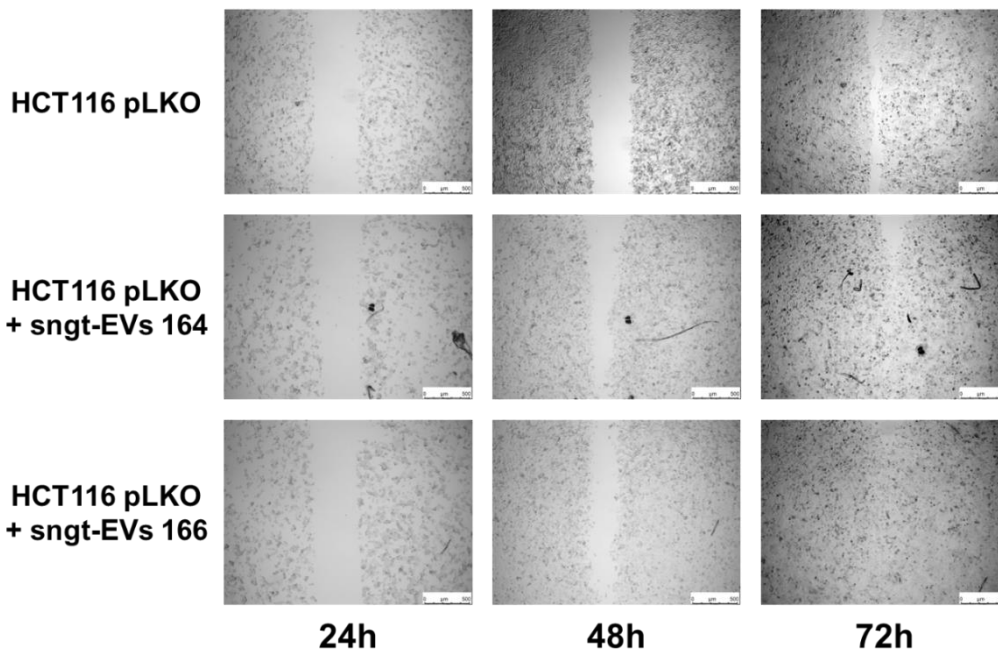
Figure 37 - Evaluation de la migration cellulaire par scratch tests après traitement avec des EVs issues de shATG5

La cicatrisation de la blessure a été évaluée en mesurant l'aire de la blessure pour les HCT116 (A,C), ou en comptant le nombre de cellules ayant migré dans la zone de la blessure pour les Colo205 (B,C). Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes.

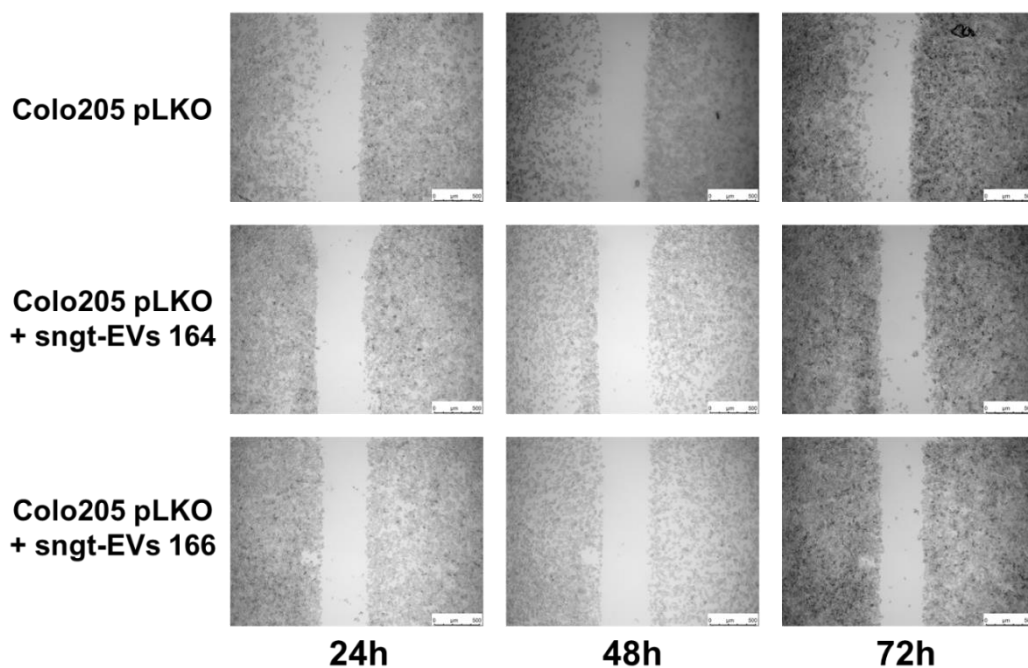
IV.2.6. Transfert de surnageants des shATG5 et effets sur l'agressivité des cellules de cancer colique

La même expérience que celle présentée ci-dessus a été réalisée, cette fois en traitant les pLKO avec les surnageants déplétés des EVs (sngts-EVs) issus des cultures de cellules shATG5. Ces surnageants ont été centrifugés à 300 x g durant 10 minutes, puis à 2000 x g pendant 10 minutes afin d'éliminer les cellules vivantes et mortes, respectivement. Puis, les surnageants ont subi une centrifugation à 10000 x g durant 40 minutes avant une première ultracentrifugation à 120000 x g durant 70 minutes, permettant de culoter les EVs. Ainsi, les surnageants issus de cette première ultracentrifugation ont été utilisés pour les traitements présentés ci-après en [Figure 38](#).

A



B



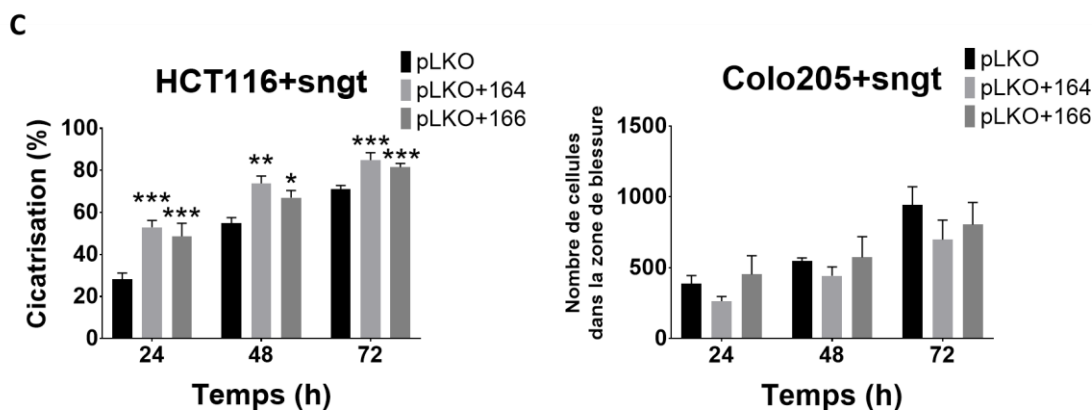


Figure 38 - Evaluation de la migration cellulaire par scratch tests après traitements avec les surnageants de culture des shATG5

La cicatrisation de la blessure a été évaluée en mesurant l'aire de la blessure pour les HCT116 (A,C), ou en comptant le nombre de cellules ayant migré dans la zone de la blessure pour les Colo205 (B,C). Le test de Mann-Whitney a été utilisé sur trois expériences indépendantes ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

De façon surprenante, et contrairement aux traitements avec les EVs, une augmentation significative de la cicatrisation, et donc de la migration cellulaire, a été observée chez les HCT116 shATG5 en comparaison avec les pLKO (A,C). En revanche, aucune variation significative de la migration cellulaire n'est observée chez les Colo205 shATG5 en comparaison avec le contrôle (B,C). Ces résultats suggèrent dès lors que les surnageants de culture des HCT116 shATG5 contiendraient un facteur induisant une augmentation de l'agressivité des cellules traitées, en améliorant leurs aptitudes migratoires.

IV.2.7. Identification des processus cellulaires affectés par l'altération de l'autophagie dans les cellules de cancer colique

Dans le but de comprendre et d'identifier de manière globale les effets que les altérations de l'autophagie induisent sur les modèles cellulaires, des expériences de séquençage ARN (RNAseq) ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire d'Andrew Beggs à Birmingham. Les ARN issus de lysats cellulaires de HCT116 et Colo205 pLKO, shATG5 et pLKO traitées avec les surnageants de shATG5 (pLKO+shATG5), ont été séquencés, et une analyse d'expression génique différentielle a été réalisée et représentée sous forme de heatmaps (Figure 39).

Chez les HCT116, 82 gènes ont été trouvés différentiellement exprimés entre les sh164 et les pLKO, et 88 gènes entre les sh166 et les pLKO (A). Parmi ceux-ci, 14 gènes ont été retrouvés en commun entre les comparaisons HCT116 sh164 vs pLKO et sh166 vs pLKO. Chez les Colo205, 61 gènes ont été trouvés différentiellement exprimés entre les sh164 et les pLKO, et 21 gènes entre les sh166 et les pLKO (B). Parmi ceux-ci, 7 gènes ont été retrouvés en commun entre les comparaisons Colo205 sh164 vs pLKO et sh166 vs pLKO. Concernant les pLKO traitées avec les surnageants des shATG5, aucune expression différentielle de gène n'a été observée chez les HCT116 et les Colo205. Une analyse de Gene Ontology (GO) est en cours afin de déterminer les voies enrichies dans les différentes conditions en comparaison aux pLKO dans les deux lignées.

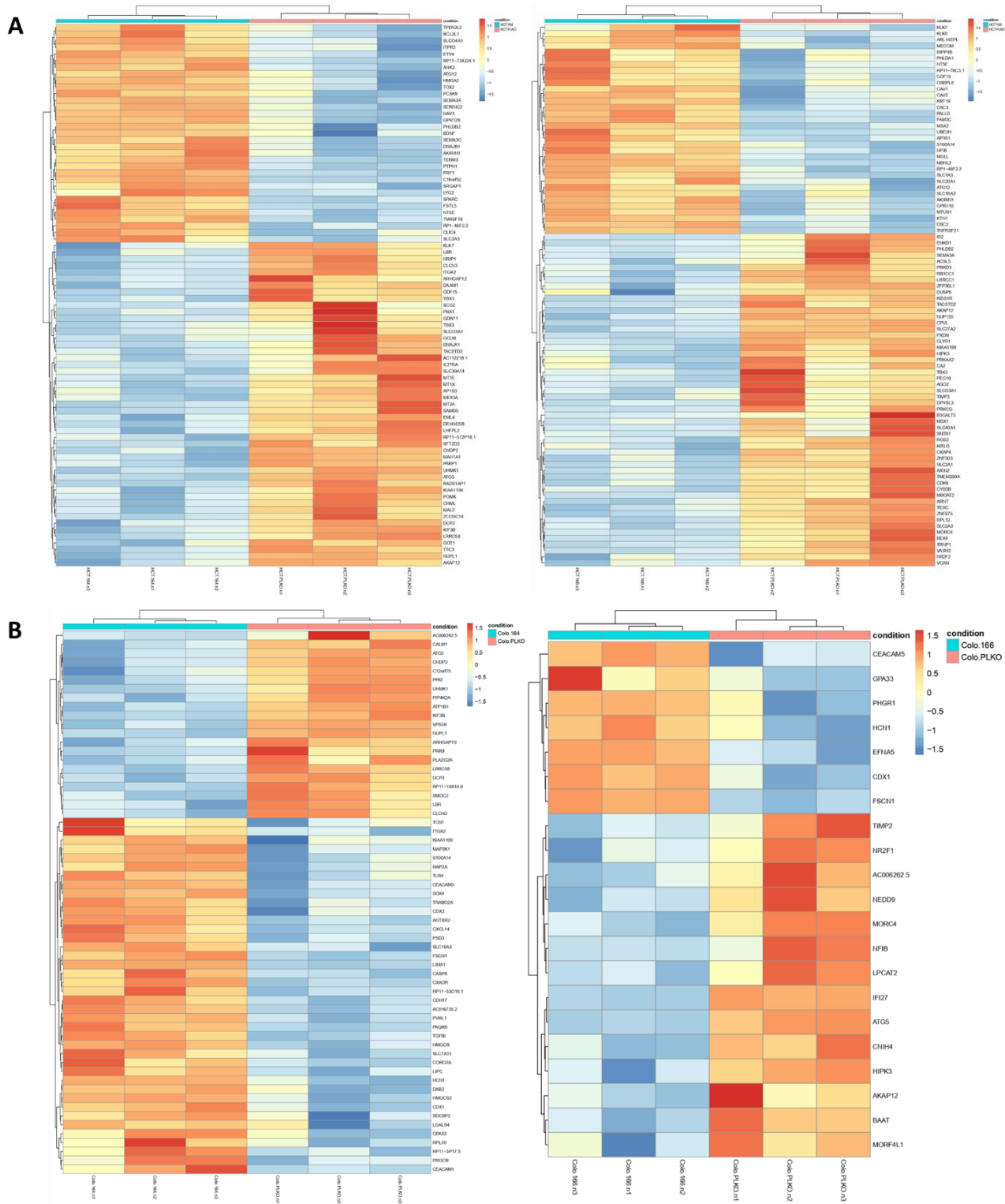


Figure 39 - Etude d'expression génique différentielle entre les shATG5 et les pLKO dans les cellules de cancer colique

Les différences d'expression génique entre les shATG5 et les pLKO ont été évaluées par RNAseq chez les HCT116 (A) et les Colo205 (B), et représentées sous forme de heatmaps.

Chapitre V. Discussion générale et perspectives

Ces travaux de thèse se sont inscrits dans le cadre de l'étude de mécanismes supports de l'agressivité du cancer colique que sont la sécrétion de vésicules extracellulaires et l'autophagie. Le cancer colique représente encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique. En effet, la présence de cellules souches cancéreuses (CSCs) au sein des tumeurs est responsable en partie des résistances thérapeutiques et rechutes post-traitement observées chez les patients. Ces cellules sont en effet capables de survivre dans des conditions drastiques auxquelles les cellules saines ne peuvent faire face, à savoir un accès restreint voire inexistant aux nutriments et une déprivation en oxygène, notamment. Parmi les mécanismes de survie employés par les cellules souches cancéreuses, l'autophagie semble prépondérante bien que son rôle soit controversé au cours du développement cancéreux. En effet, une autophagie basale efficace préserverait les cellules saines d'une quelconque transformation maligne en jouant un rôle protecteur, tandis que son activation dans des stades plus avancés est associée à une agressivité augmentée du fait de son rôle dans la survie des CSCs notamment (L. Galluzzi *et al.* 2015; Robin Mathew, Karantza-Wadsworth, et White 2007). D'autre part, les cellules cancéreuses communiquent avec leur environnement par le biais de la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs), permettant notamment aux CSCs de garder le contrôle sur leur microenvironnement (Al-Nedawi *et al.* 2008). Ces deux processus ont recours à la formation de vésicules intracellulaires et peuvent utiliser des acteurs cellulaires communs, comme les protéines G de la famille Rab, bien connues pour leur rôle de régulateurs du trafic intracellulaire (Blanc et Vidal 2018). Ces observations nous ont conduits à nous intéresser à l'étude d'altérations de l'autophagie et de la sécrétion d'EVs dans les cellules de cancer colique de stade précoce et de stade avancé.

Dans un premier temps, la sécrétion d'EVs a été étudiée par le biais de modèles cellulaires shRAB27A, développés dans les HCT116, et ayant fait l'objet de travaux présentés dans l'article inclut en partie IV.1.1. Le ciblage de *RAB27A* a été choisi du fait de l'implication de la protéine codée par ce gène dans la sécrétion d'EVs, et en particulier d'exosomes (Blanc et Vidal 2018; Ostrowski *et al.* 2010; van Solinge *et al.* 2020). Toutefois, d'après les analyses par NTA à l'aide du NanoSight NS300, aucune diminution de la sécrétion d'EVs, ni modification de leur taille n'a été observée. De ce fait, différentes approches ont été utilisées dans le but de diminuer la sécrétion d'EVs, notamment l'utilisation de siRNA ciblant *RAB27A*, ou des traitements pharmacologiques (Nexinhib20 et indométacine).

A la suite de l'inhibition de *RAB27A*, que cela soit par shRNA ou siRNA, les 80% d'extinction n'ont *a priori* entraîné aucune variation de la sécrétion d'EVs d'après les analyses par NTA. Or, de tels taux d'inhibition sont censés permettre d'observer une diminution de la sécrétion vésiculaire au NanoSight d'après les travaux Zheng *et al.* (Zheng *et al.* 2013). D'autre part, suite aux tentatives d'inhibition pharmacologique de la sécrétion d'EVs par le biais du Nexinhib20 (inhibiteur de la dégranulation des neutrophiles (Johnson *et al.* 2017)) ou de l'indométacine (inhibiteur du transporteur lipidique ABCA3 (Song *et al.* 2008)), aucune diminution de la sécrétion vésiculaire n'a pu être observée par NTA. Ces molécules n'agissant pas sur l'expression de Rab-27A ou son action, leur utilisation a souligné les difficultés rencontrées concernant l'observation d'une diminution de la sécrétion d'EVs au NanoSight, suggérant un problème de sensibilité de l'appareil.

Dès lors, nous avons choisi l'approche inverse, c'est-à-dire de provoquer une augmentation de la sécrétion vésiculaire et de la monitorer au NanoSight. Pour ce faire, deux méthodes ont été utilisées : un traitement à la roténone (D. Kumar *et al.* 2015), ou une incubation en conditions hypoxiques (1% d'O₂ (A. Kumar et Deep 2020; Patton *et al.* 2020; Shao *et al.* 2018)). Alors, suivant l'une ou l'autre approche, une augmentation significative de la sécrétion d'EVs a bel et bien été enregistrée au NanoSight. Ces observations nous ont donc menés à nous questionner sur la pertinence de l'utilisation d'un tel appareil, si celui-ci ne nous permet de détecter des variations qu'au-delà d'un certain seuil.

Il est important de préciser que le NanoSight n'a pas été développé exclusivement pour l'analyse de vésicules extracellulaires, mais bien pour la caractérisation de nanoparticules, plus facilement identifiables et régulières. De même, bien que cela soit proposé par le logiciel, le phénomène de diffusion dynamique de la lumière (« dynamic light scattering » ; DLS) n'est pas la méthode la plus adaptée pour évaluer une concentration d'EVs dans les échantillons. Dès lors, des problèmes de reproductibilité et de fiabilité sont souvent rencontrés (Vestad *et al.* 2017), suggérant de paramétrer le plus finement possible l'appareil et le logiciel, et ainsi de limiter les biais d'utilisation et d'interprétation (Usfoor *et al.* 2020). Toutefois, la NTA est une technique couramment utilisée aujourd'hui dans la communauté scientifique dans le cadre de l'étude de la sécrétion de vésicules extracellulaires (L. Chen *et al.* 2018; Dorayappan *et al.* 2018; Perez-Hernandez *et al.* 2013; Théry *et al.* 2018; van Solinge *et al.* 2020; Zou *et al.* 2019).

Par ailleurs, le NanoSight NS300 n'est pas le seul appareil utilisé pour réaliser des analyses par NTA. En effet, le dispositif ZetaView (Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Allemagne) repose également sur le principe de NTA, mais diffère du NanoSight par les composantes informatiques pilotant l'appareil. D'après une étude comparative de l'utilisation de ces deux dispositifs pour caractériser des nanoparticules, des EVs issues de sérums de patients, ou de cultures cellulaires, l'un ou l'autre dispositif peut présenter des avantages et inconvénients selon les paramètres étudiés (Bachurski *et al.* 2019). En effet, il serait *a priori* recommandé d'utiliser le ZetaView plutôt que le NanoSight dans le cadre de l'évaluation et de comparaisons de la concentration en EVs dans des échantillons biologiques, du fait de sa plus grande précision et de sa meilleure fiabilité tout en nécessitant moins de réplicats que le NanoSight. Le NanoSight serait quant à lui plutôt recommandé dans le cadre de l'étude de la répartition de taille des EVs dans les échantillons du fait de sa meilleure résolution et sa magnification plus importante (Bachurski *et al.* 2019). Il serait donc intéressant de pouvoir comparer les résultats obtenus à l'aide du NanoSight avec des expérimentations sur ZetaView.

En outre, l'expérience de cytométrie en flux révélant la présence ou non d'EVs CD63+ dans nos échantillons a contribué à incriminer une nouvelle fois le défaut de sensibilité du NanoSight. En effet, une diminution du marquage fluorescent associé à la présence de CD63 a été observée dans les conditions shRAB27A en comparaison aux pLKO, confirmant les effets de l'inhibition de Rab-27A sur la sécrétion d'EVs, et particulièrement d'exosomes. Ces observations soulignent dès lors l'importance de l'utilisation de techniques complémentaires à la NTA afin de s'assurer des résultats obtenus.

En effet, plusieurs techniques sont aujourd'hui proposées dans le cadre de la caractérisation des EVs en termes de distribution de taille et de concentration. En premier lieu, la microscopie électronique à transmission est couramment utilisée afin de caractériser la morphologie et la taille des EVs et éventuellement analyser la quantité d'EVs sécrétées par des cellules (Szatanek *et al.* 2017). Cependant, cette technique présente des inconvénients techniques du fait de la déshydratation des échantillons pouvant conduire à leur rétractation, ainsi que des contraintes de temps de préparation notamment (Bachurski *et al.* 2019).

D'autre part, la technique de « tunable resistive pulse sensing » (TRPS) permet de caractériser la distribution de taille et la concentration des EVs dans un échantillon, en analysant les variations de courant ionique enregistrées lors du passage d'EVs au sein d'un nanopore de taille modulable (van der Pol *et al.* 2014). Cette approche repose alors sur l'évaluation du potentiel zêta des particules ou EVs analysées, associé à la charge électrique des ions à leur surface. Toutefois, cette technique nécessite une calibration par des billes, représentant une limite du fait que la concentration en billes n'est pas traçable (van der Pol *et al.* 2014).

La cytométrie en flux peut également être utilisée dans le cadre de la caractérisation des EVs, que cela soit par couplage à des billes recouvertes de marqueurs spécifiques de certaines populations d'EVs, soit par simple marquage à l'aide d'anticorps (Szatanek *et al.* 2017; van der Pol *et al.* 2014). Cependant, dans le deuxième cas, l'hétérogénéité des populations d'EVs dans les échantillons n'est pas à la faveur de la résolution et de la faible sensibilité de la plupart des cytomètres, en comparaison à des billes de structure homogène, entraînant des estimations de distribution de taille et de concentration faussées (Szatanek *et al.* 2017; van der Pol *et al.* 2014). La combinaison de différentes techniques pourrait donc permettre d'affiner la caractérisation des EVs au sein des échantillons.

Les résultats présentés dans ces travaux de thèse, en regard des données de la littérature, soulignent le besoin de développer de nouveaux outils pour le monitoring des EVs en règle générale. De même, il serait intéressant de pouvoir disposer de particules présentant les mêmes caractéristiques physiques et biochimiques que les EVs et qui permettraient de calibrer et de standardiser les mesures et ainsi limiter de façon drastique les biais d'interprétation (Valkonen *et al.* 2017). De plus, les informations collectées par le NanoSight ne suffiraient pas à déterminer précisément la concentration en EVs au sein d'échantillons : il serait en effet appréciable de disposer également d'informations concernant la densité des EVs une à une, permettant dès lors une meilleure caractérisation in fine.

Cependant, le problème de sensibilité du NanoSight ne représente pas la seule explication possible de l'absence d'observation d'une diminution de la sécrétion vésiculaire dans nos conditions. En effet, la sécrétion d'EVs ne repose pas exclusivement sur la protéine Rab-27A et est un processus biologique qui pourrait être compensé par l'action d'autres acteurs au sein de la cellule tels que les protéines Rab-27B, Rab-35 et Rab-11. Or, aucune de ces protéines ne présente de variation significative de son expression dans les modèles shRAB27A, écartant leur éventuelle participation à une quelconque compensation.

Des analyses fonctionnelles ont alors été réalisées sur les HCT116 shRAB27A. Les résultats semblent indiquer une augmentation de la migration cellulaire, sans affecter la prolifération cellulaire, le compartiment souche ou l'autophagie. L'augmentation de la migration cellulaire pourrait être associée à une augmentation de l'agressivité tumorale dans les stades précoces de cancer colique. Peu d'études font le lien entre sécrétion d'EVs et migration cellulaire, bien qu'il semblerait que ces phénomènes soient associés dans des lignées cellulaires de cancer gastrique (Rocha *et al.* 2019). Il serait donc intéressant d'étudier plus précisément l'invasion tumorale, ainsi que l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans nos modèles HCT116 shRAB27A. Enfin, ATG5 ayant été la seule protéine autophagique étudiée dans ces modèles, il serait intéressant d'évaluer l'expression d'autres acteurs de ce processus, tels que Beclin-1 et LC3 par exemple.

Chez les Colo205, la même tendance que chez les HCT116 est observée, à savoir l'absence d'une quelconque variation dans la sécrétion des EVs d'après les analyses par NTA malgré l'inhibition de Rab-27A, de même que pour l'expression du marqueur autophagique ATG5. Il semblerait donc que le stade de cancer colique représenté ne soit pas déterminant quant aux effets de l'inhibition de Rab-27A sur la sécrétion vésiculaire ou sur l'autophagie. Néanmoins les résultats obtenus sont bien trop parcellaires pour émettre une conclusion fiable et ces travaux nécessitent encore beaucoup d'investigations, notamment la vérification par une méthode complémentaire de la concentration d'EVs sécrétées dans ces modèles.

De la même manière que nous avons développé des modèles shRAB27A dans le but d'étudier les altérations de la sécrétion d'EVs, l'étude d'altérations de l'autophagie a été réalisée par le biais de shRNA ciblant ATG5. Il s'agit d'une protéine clé intervenant dans l'étape de conjugaison, nécessaire à l'extension de la membrane autophagosomale. Cette étude a été conduite dans les HCT116 et les Colo205, représentant respectivement un stade précoce et un stade tardif de cancer colique. Comme attendu, l'inhibition de ce gène a entraîné une diminution de l'expression de LC3-II et une accumulation de p62, caractéristiques d'une altération du processus autophagique. Bien que n'ayant montré aucune variation significative de leur prolifération ou de l'expression de marqueurs souches (*LGR5* et *Oct4*) en comparaison au contrôle, les HCT116 shATG5 ont montré une sensibilité accrue vis-à-vis du 5-FU, drogue couramment utilisée en tant qu'agent chimiothérapeutique. Cette molécule est un dérivé fluoré de l'uracile, ce qui bloque sa méthylation en thymine, inhibant ainsi la synthèse de l'ADN (Christou *et al.* 2017a; Hervieu *et al.* 2021). De ce fait, le 5-FU a un mode d'action dirigé vers les cellules cyclantes. Or, l'autophagie est un mécanisme qui, outre sa fonction de recyclage, permet aux cellules d'acquérir une certaine indépendance vis-à-vis de l'environnement et leur confère un cycle cellulaire lent, ralenti, et donc une résistance aux traitements. Son inhibition va donc conduire à une sensibilisation aux molécules chimiothérapeutiques. C'est ce que nous avons observé dans la lignée HCT116. Cela rejoint les travaux de Li *et al.*, qui ont montré que l'inhibition de l'autophagie potentialisait les effets du 5-FU dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer colique, par ralentissement du cycle cellulaire (Jie Li *et al.* 2009). De tels résultats n'ont pas été retrouvés dans les Colo205, de stade plus tardif (envahissement péritonéal). Ces premiers résultats suggèrent des effets différents des altérations de l'autophagie en fonction du stade de cancer colique représenté. En effet, d'après les données de la littérature, des altérations de l'autophagie lors des premiers instants du développement cancéreux semblent conforter la transformation maligne, tandis qu'une autophagie efficace semble importante pour la survie des cellules tumorales à des stades avancés (L. Galluzzi *et al.* 2015).

Cependant, le double rôle que peut jouer l'autophagie vis-à-vis de la réponse aux traitements alimente la controverse quant à l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie dans le but de potentialiser les effets des chimiothérapies, et nécessite de personnaliser leur utilisation en fonction des caractéristiques clinico-moléculaires des cancers coliques.

Ces premières données concernant les conséquences d'altérations de l'autophagie sur l'agressivité tumorale nous ont conduits à évaluer d'autres paramètres tels que la migration cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La prolifération cellulaire n'ayant montré aucune variation significative dans les deux lignées, de nouvelles différences notables ont été observées entre les deux stades de cancer colique. En effet, la migration cellulaire est significativement augmentée *in vitro* dans les HCT116 shATG5, et l'inverse est observé dans les Colo205. De précédentes études s'étaient déjà concentrées sur les effets de modulations de l'autophagie vis-à-vis de la migration cellulaire et la TEM. Par exemple, l'inhibition d'ATG16L1 (protéine du complexe d'élongation de l'autophagosome) entraîne une diminution de la chimiorésistance associée à la TEM dans des prélèvements de patients atteints de CCR (S. Xu *et al.* 2019). Par ailleurs, une inhibition de Beclin-1 (initiation de l'autophagie) entraîne une diminution de la TEM dans le cancer colorectal de stade avancé (Shen *et al.* 2018). D'autre part, une induction de l'autophagie entraînerait une diminution de la TEM dans le cancer du sein et le glioblastome (Lv *et al.* 2012; Catalano *et al.* 2015). Les résultats obtenus sur le modèle HCT116 shATG5, appuyés par la littérature, sont à la faveur d'une augmentation de la migration cellulaire par TEM, contrairement aux Colo205 shATG5. Cependant, ces études rapportent des effets de l'inhibition ou de l'activation de l'autophagie de manière générale, dans le cancer colorectal ou dans d'autres tissus, mais ne proposent pas d'élément de comparaison ni entre des stades différents de cancer, ni sur le cancer colique seul. De plus l'information sur le statut mutationnel ou le background moléculaire des tumeurs n'est pas nécessairement pris en compte dans ces études.

Nous avons alors utilisé dans nos travaux deux lignées de cancer colique différentes par le stade qu'elles représentent et leur statut mutationnel. Les HCT116 représentent un stade précoce, de statut clinico-moléculaire CMS1 avec une instabilité microsatellitaire, et sont mutées pour *KRAS* et *PIK3CA*, tandis que les Colo205 représentent un stade métastatique, de statut CMS2, et présentent des mutations de *BRAF*, *APC*, et *TP53*. Les résultats obtenus mettent alors en relief des différences en termes de migration associées à une différence de stade cancéreux, mais aussi de statut mutationnel. Ainsi, une altération de l'autophagie dans les stades précoces de cancer colique de CMS1 et présentant une mutation de *KRAS* entraînerait donc une augmentation de l'agressivité en favorisant la migration cellulaire. A l'inverse, dans le cas de métastases péritonéales de cancer colique présentant un statut CMS2 et une mutation de *BRAF* et *APC*, une altération de l'autophagie tendrait à diminuer l'agressivité en réduisant les capacités migratoires des cellules. Par conséquent, dans le cadre d'une personnalisation des thérapies anti-cancéreuses, il pourrait être intéressant d'étudier l'action d'inhibiteurs de l'autophagie pour des patients présentant des tumeurs de classe CMS2 à des stades avancés et étant mutées pour *APC*.

Toutefois, lorsque la migration cellulaire a été évaluée *in vivo* par injection de HCT116 shATG5 dans le sac vitellin d'embryons de zebrafish, aucune variation significative n'a été observée. De plus, l'expression de l'E-cadhérine et des facteurs de transcription *SNAI1* et *SNAI2* associés à la TEM n'est pas affectée par les altérations de l'autophagie dans nos modèles, suggérant un phénotype différent de celui de la TEM « conventionnelle » dans les cellules de stade précoce de cancer colique. Nous nous sommes alors intéressés au phénotype hybride dit E/M (Celià-Terrassa *et al.* 2012). Il s'agit de cellules présentant des caractéristiques à la fois de cellules épithéliales et de cellules mésenchymateuses, que cela soit du point de vue de l'expression de marqueurs phénotypiques, ou de la morphologie des cellules. En effet, contrairement à des cellules procédant à une TEM complète, les cellules E/M ne présentent pas nécessairement de perte d'expression de l'E-cadhérine.

Ces cellules E/M réaliseraient une TEM partielle, et auraient un pouvoir pénétrant accru dans les vaisseaux sanguins et les tissus, ce qui favoriserait l'établissement de métastases (Pastushenko *et al.* 2018). Cependant, peu d'éléments permettent de conclure à l'observation d'un phénotype E/M dans nos modèles, notamment l'absence de variation de l'expression des marqueurs « souches » et des facteurs de transcription *SNAI1* et *SNAI2*, responsables de l'agressivité associée aux phénotypes hybrides E/M (Grosse-Wilde *et al.* 2015; Kröger *et al.* 2019). D'autres marqueurs des CSCs pourraient également être analysés, notamment *Nanog*, *SOX2*, ou *BMI1*, ainsi que d'autres facteurs de transcription de l'EMT tels que *ZEB1/2* ou *TWIST1/2* (Jolly *et al.* 2019). Quant à l'augmentation de l'expression de *SNAI2* dans les Colo205 shATG5, celle-ci ne traduirait pas nécessairement une augmentation de la TEM au vu de l'absence de variation de la migration cellulaire dans ces modèles.

Concernant les différentes isoformes d'E-cadhérine retrouvées différemment exprimées entre les HCT116 et les Colo205, rien ne semble décrit à ce sujet dans la littérature. Toutefois, on pourrait expliquer l'expression globalement plus importante de l'E-cadhérine dans les Colo205 par le fait que ce sont des cellules issues de métastases, suggérant qu'elles procèdent à la transition mésenchymo-épithéliale (TME (Dongre et Weinberg 2019)).

Il serait intéressant d'étudier également la migration *in vivo* pour les Colo205 shATG5. De plus, d'une manière générale, des tests d'invasion seraient pertinents afin de compléter la caractérisation fonctionnelle des modèles shATG5 dans les deux lignées. De plus, l'analyse de l'expression des métalloprotéases matricielles (MMP) pourrait également apporter des éléments de réponse quant aux phénomènes d'augmentation de la migration cellulaire observés dans les stades précoces. Enfin, des tests d'agrégation en plaques non-adhérentes pourraient nous indiquer si les HCT116 shATG5 sont plus à même de se dissocier les unes des autres en comparaison aux pLKO. En effet, la dissociation des cellules les unes des autres au sein des agrégats pourrait indiquer une perte de fonction de l'E-cadhérine, bien que l'on n'observe pas de diminution de son expression.

L'agressivité n'étant pas seulement associée à l'invasion et la migration cellulaire, la sécrétion d'EVs a également été étudiée dans les modèles shATG5. Seule une augmentation significative de la sécrétion vésiculaire est observée dans les HCT116 shATG5 166. Celle-ci peut en partie être expliquée par une expression de Rab-11 augmentée dans ces cellules. En effet, bien que connue pour être majoritairement impliquée dans le trafic endosomal, Rab-11 est également recrutée dans les processus de sécrétion d'EVs (Savina *et al.* 2005; Théry, Ostrowski, et Segura 2009; Kowal, Tkach, et Théry 2014).

Cependant, les EVs sécrétées par les shATG5 n'affectent pas l'agressivité des cellules traitées que cela soit dans les HCT116 ou les Colo205. En revanche, les surnageants de culture, déplétés en EVs, issus des HCT116 shATG5 semblent présenter un facteur induisant une augmentation de la migration des HCT116 pLKO traitées. Il nous faut maintenant déterminer le facteur responsable de ce phénomène dans les stades précoces de cancer colique. Les Colo205, quant à elles, ne semblent être affectées ni par les EVs, ni par les surnageants de culture issus des shATG5.

Les premières investigations concernant l'étude des mécanismes sous-jacents à l'augmentation de la migration observée dans les stades précoces après altération de l'autophagie ont débuté par des analyses de RNAseq. Cette expérience a mis en évidence l'expression différentielle de plus de 80 gènes entre les HCT116 shATG5 et les HCT116 pLKO. Toutefois, seulement 14 gènes ont été retrouvés en commun entre les deux comparaisons « HCT116 sh164 vs pLKO » et « HCT116 sh166 vs pLKO ». Le faible nombre de gènes retrouvés en commun, malgré le nombre important de gènes différentiellement exprimés dans chaque comparaison, peut être expliqué en partie par la séquence différente des deux shRNA utilisés. En effet, d'après les données du « RNAi Consortium » (TRC), les potentielles cibles des deux sh sont différentes, suggérant ainsi des sites d'incorporation différents dans le génome, pouvant entraîner des variations d'expression génique n'étant pas directement associées à l'inhibition d'ATG5 et donc à l'altération de l'autophagie. Il serait alors pertinent de réitérer l'expérience de RNAseq à partir de cellules traitées avec un inhibiteur pharmacologique de l'autophagie tel que la chloroquine afin de comparer les résultats avec ceux des modèles shATG5. Les analyses par RNAseq n'ayant pas encore permis de mettre en évidence une quelconque voie préférentiellement enrichie, il n'en demeure pas moins qu'un nombre important de gènes sont différentiellement exprimés entre les shATG5 et les pLKO dans les stades précoces. Concernant les stades tardifs, il semblerait que le nombre de gènes différentiellement exprimés entre pLKO et shATG5 soit moins important. Ces observations soulignent la plus grande sensibilité des cellules de cancer colique de stade précoce vis-à-vis de variations l'autophagie par rapport aux stades métastatiques. Il serait également intéressant d'étendre les investigations sur des lignées de même stade mais de statut mutationnel différent afin d'observer les effets d'altération de l'autophagie en fonction des mutations rencontrées dans les tumeurs.

Enfin, les pLKO traitées avec les surnageants issus des shATG5 n'ont montré aucune différence d'expression génique dans les stades précoces et tardifs, suggérant que les différences observées en termes de migration cellulaire dans les HCT116 pLKO traitées avec les surnageants issus de shATG5 en comparaison aux HCT116 pLKO ne peuvent pas être expliquées par l'activation ou l'inhibition d'une voie particulière. Il serait alors intéressant de réaliser une analyse comparative de la composition des surnageants de culture issus de HCT116 pLKO et de HCT116 shATG5 par spectrométrie de masse.

De manière générale, les résultats obtenus sur les modèles shRAB27A et shATG5 dans les lignées cellulaires HCT116 et Colo205 doivent être approfondis afin d'aboutir à des conclusions concernant les phénomènes migratoires observés. Des études complémentaires sur des modèles de culture primaire ou *in vivo* devraient permettre d'apporter des éléments de réponse aux questionnements soulevés dans ces travaux.

Conclusion

Les altérations de la sécrétion de vésicules extracellulaires et de l'autophagie dans les lignées cellulaires HCT116 et Colo205 n'ont permis de conclure à d'éventuels liens entre les deux mécanismes dans le cadre de l'agressivité tumorale. Toutefois, chacun de ces modèles a permis de mettre en évidence des événements induits par une altération de la sécrétion d'EVs ou de l'autophagie, respectivement.

Le développement des modèles shRAB27A a souligné les contraintes rencontrées et les précautions à prendre lors du monitoring de la sécrétion d'EVs. Il est de ce fait nécessaire de comparer les résultats de plusieurs méthodes complémentaires, afin d'attester d'une quelconque variation dans ce processus. De plus, il est important de tenir compte des mécanismes pouvant se mettre en place au sein des cellules afin de compenser les altérations subies.

Quant aux altérations de l'autophagie, celles-ci permettent de souligner le rôle plural de ce processus dans le développement cancéreux, au vu des différences observées entre les cellules de stades précoce et tardif. D'un point de vue clinique, à l'heure actuelle, l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie en tant que solutions thérapeutiques généralisées est difficile du fait de la toxicité engendrée par de tels traitements (Altomare et Hurwitz 2013). Toutefois, il semblerait que la combinaison d'inhibiteurs autophagiques et d'agents chimiothérapeutiques soit efficace contre le développement métastatique *in vitro* (Reita *et al.* 2019), et vis-à-vis de certains profils clinico-moléculaires particuliers de cancers coliques (Deng *et al.* 2021). Dans le cadre du développement de thérapies de plus en plus personnalisées, l'inhibition de l'autophagie serait tout de même envisageable dans un certain contexte mutationnel pour traiter les patients atteints de cancers coliques chimiorésistants.

Références bibliographiques

- Akimoto, Naohiko, Tomotaka Ugai, Rong Zhong, Tsuyoshi Hamada, Kenji Fujiyoshi, Marios Giannakis, Kana Wu, Yin Cao, Kimmie Ng, et Shuji Ogino. 2021. « Rising Incidence of Early-Onset Colorectal Cancer — a Call to Action ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 18 (4): 230-43. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00445-1>.
- Akuthota, Praveen, Lívia A. S. Carmo, Kennedy Bonjour, Ryann O. Murphy, Thiago P. Silva, Juliana P. Gamalier, Kelsey L. Capron, et al. 2016. « Extracellular Microvesicle Production by Human Eosinophils Activated by “Inflammatory” Stimuli ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00117>.
- Albregues, Jean, Guerrino Meneguzzi, et Cédric Gaggioli. 2014. « L’invasion des cellules tumorales: Quand les fibroblastes s’en mêlent ». *médecine/sciences* 30 (4): 391-97. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004012>.
- Alers, S., A. S. Loffler, S. Wesselborg, et B. Stork. 2012. « Role of AMPK-MTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (1): 2-11. <https://doi.org/10.1128/MCB.06159-11>.
- Al-Hajj, Muhammad, Max S. Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J. Morrison, et Michael F. Clarke. 2003. « Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3983-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>.
- Alirezai, Mehrdad, Christopher C. Kemball, Claudia T. Flynn, Malcolm R. Wood, J. Lindsay Whitton, et William B. Kiosses. 2010. « Short-term fasting induces profound neuronal autophagy ». *Autophagy* 6 (6): 702-10. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12376>.
- Al-Nedawi, Khalid, Brian Meehan, Johann Micallef, Vladimir Lhotak, Linda May, Abhijit Guha, et Janusz Rak. 2008. « Intercellular Transfer of the Oncogenic Receptor EGFRvIII by Microvesicles Derived from Tumour Cells ». *Nature Cell Biology* 10 (5): 619-24. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>.
- Altomare, Ivy, et Herbert Hurwitz. 2013. « Everolimus in colorectal cancer ». *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14 (4): 505-13. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.770473>.
- Amaravadi, Ravi K., Alec C. Kimmelman, et Jayanta Debnath. 2019. « Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions ». *Cancer Discovery* 9 (9): 1167-81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0292>.
- Amin, Mahul B., Frederick L. Greene, Stephen B. Edge, Carolyn C. Compton, Jeffrey E. Gershenwald, Robert K. Brookland, Laura Meyer, Donna M. Gress, David R. Byrd, et David P. Winchester. 2017. « The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge from a Population-Based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (2): 93-99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.
- André, Thierry, Kai-Keen Shiu, Tae Won Kim, Benny Vittrup Jensen, Lars Henrik Jensen, Cornelis Punt, Denis Smith, et al. 2020. « Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 383 (23): 2207-18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2017699>.
- Ao, X, L Zou, et Y Wu. 2014. « Regulation of Autophagy by the Rab GTPase Network ». *Cell Death & Differentiation* 21 (3): 348-58. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.187>.
- Axe, Elizabeth L., Simon A. Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H. Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, et Nicholas T. Ktistakis. 2008. « Autophagosome Formation from Membrane Compartments Enriched in Phosphatidylinositol 3-

- Phosphate and Dynamically Connected to the Endoplasmic Reticulum ». *Journal of Cell Biology* 182 (4): 685-701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>.
- Bachurski, Daniel, Maximiliane Schuldner, Phuong-Hien Nguyen, Alexandra Malz, Katrin S Reiners, Patricia C Grenzi, Felix Babatz, et al. 2019. « Extracellular Vesicle Measurements with Nanoparticle Tracking Analysis – An Accuracy and Repeatability Comparison between NanoSight NS300 and ZetaView ». *Journal of Extracellular Vesicles* 8 (1): 1596016. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596016>.
- Baeken, Marius W., Katja Weckmann, Philip Diefenthaler, Jan Schulte, Kamran Yusifli, Bernd Moosmann, Christian Behl, et Parvana Hajieva. 2020. « Novel Insights into the Cellular Localization and Regulation of the Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C ». *Cells* 9 (10): 2315. <https://doi.org/10.3390/cells9102315>.
- Baena, Raul, et Pedro Salinas. 2015. « Diet and Colorectal Cancer ». *Maturitas* 80 (3): 258-64. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.12.017>.
- Baietti, Maria Francesca, Zhe Zhang, Eva Mortier, Aurélie Melchior, Gisèle Degeest, Annelies Geeraerts, Ylva Ivarsson, et al. 2012. « Syndecan–Syntenin–ALIX Regulates the Biogenesis of Exosomes ». *Nature Cell Biology* 14 (7): 677-85. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>.
- Bakin, Andrei V., Anne K. Tomlinson, Neil A. Bhowmick, Harold L. Moses, et Carlos L. Arteaga. 2000. « Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor β -Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (47): 36803-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005912200>.
- Bardou, Marc, Alan N Barkun, et Myriam Martel. 2013. « Obesity and Colorectal Cancer ». *Gut* 62 (6): 933-47. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304701>.
- Barker, Nick. 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, Nick, Johan H. van Es, Jeroen Kuipers, Pekka Kujala, Maaïke van den Born, Miranda Cozijnsen, Andrea Haegebarth, et al. 2007. « Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene *Lgr5* ». *Nature* 449 (7165): 1003-7. <https://doi.org/10.1038/nature06196>.
- Barker, Nick, Rachel A. Ridgway, Johan H. van Es, Marc van de Wetering, Harry Begthel, Maaïke van den Born, Esther Danenberg, Alan R. Clarke, Owen J. Sansom, et Hans Clevers. 2009. « Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer ». *Nature* 457 (7229): 608-11. <https://doi.org/10.1038/nature07602>.
- Bartolomeo, Sabrina Di, Marco Corazzari, Francesca Nazio, Serafina Oliverio, Gaia Lisi, Manuela Antonioli, Vittoria Pagliarini, et al. 2010. « The Dynamic Interaction of AMBRA1 with the Dynein Motor Complex Regulates Mammalian Autophagy ». *The Journal of Cell Biology* 191 (1): 155-68.
- Becker, Annette, Basant Kumar Thakur, Joshua Mitchell Weiss, Han Sang Kim, Héctor Peinado, et David Lyden. 2016. « Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis ». *Cancer Cell* 30 (6): 836-48. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>.
- Beifuss, Karin. 2018. « Anatomie et physiopathologie en soins infirmiers ». Elsevier Masson SAS. 2018. <https://www.elsevier-masson.fr/anatomie-et-physiopathologie-en-soins-infirmiers-9782294752209.html>.
- Bel, Shai, Mihir Pendse, Yuhao Wang, Yun Li, Kelly A. Ruhn, Brian Hassell, Tess Leal, Sebastian E. Winter, Ramnik J. Xavier, et Lora V. Hooper. 2017. « Paneth Cells

- Secrete Lysozyme via Secretory Autophagy during Bacterial Infection of the Intestine ». *Science* 357 (6355): 1047-52. <https://doi.org/10.1126/science.aal4677>.
- Bellone, M., G. Iezzi, P. Rovere, G. Galati, A. Ronchetti, M. P. Protti, J. Davoust, C. Rugarli, et A. A. Manfredi. 1997. « Processing of Engulfed Apoptotic Bodies Yields T Cell Epitopes. » *The Journal of Immunology* 159 (11): 5391-99.
- Bergsmedh, Anna, Anna Szeles, Marie Henriksson, Anders Bratt, M. Judah Folkman, Anna-Lena Spetz, et Lars Holmgren. 2001. « Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (11): 6407-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.101129998>.
- Beyer, Christian, et David S. Pisetsky. 2010. « The Role of Microparticles in the Pathogenesis of Rheumatic Diseases ». *Nature Reviews Rheumatology* 6 (1): 21-29. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.229>.
- Bhatt, Aadra P., Matthew R. Redinbo, et Scott J. Bultman. 2017. « The Role of the Microbiome in Cancer Development and Therapy ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (4): 326-44. <https://doi.org/10.3322/caac.21398>.
- Bjørkøy, Geir, Trond Lamark, Andreas Brech, Heidi Outzen, Maria Perander, Aud Øvervatn, Harald Stenmark, et Terje Johansen. 2005. « P62/SQSTM1 Forms Protein Aggregates Degraded by Autophagy and Has a Protective Effect on Huntingtin-Induced Cell Death ». *Journal of Cell Biology* 171 (4): 603-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>.
- Blanc, Lionel, et Michel Vidal. 2018. « New Insights into the Function of Rab GTPases in the Context of Exosomal Secretion ». *Small GTPases* 9 (1-2): 95-106. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1264352>.
- Bobrie, Angélique, Sophie Krumeich, Fabien Rey, Chiara Recchi, Luis F. Moita, Miguel C. Seabra, Matias Ostrowski, et Clotilde Théry. 2012. « Rab27a Supports Exosome-Dependent and -Independent Mechanisms That Modify the Tumor Microenvironment and Can Promote Tumor Progression ». *Cancer Research* 72 (19): 4920-30. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0925>.
- Body, Amy, Hans Prenen, Sarah Latham, Marissa Lam, Samuel Tipping-Smith, Ajay Raghunath, et Eva Segelov. 2021. « The Role of Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Colon Cancer ». *Cancer Management and Research* Volume 13 (mars): 2567-79. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S262870>.
- Bornes, Laura, Guillaume Belthier, et Jacco van Rheenen. 2021. « Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Light of Plasticity and Hybrid E/M States ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (11): 2403. <https://doi.org/10.3390/jcm10112403>.
- Brabletz, S, O Schmalhofer, et T Brabletz. 2009. « Gastrointestinal Stem Cells in Development and Cancer ». *The Journal of Pathology* 217 (2): 307-17. <https://doi.org/10.1002/path.2475>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, et Ahmedin Jemal. 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, Sarah J. 2006. « Notch Signalling: A Simple Pathway Becomes Complex ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (9): 678-89. <https://doi.org/10.1038/nrm2009>.
- Brunel, Aude, Gaëlle Bégaud, Clément Auger, Stéphanie Durand, Serge Battu, Barbara Bessette, et Mireille Verdier. 2021. « Autophagy and Extracellular Vesicles, Connected to RabGTPase Family, Support Aggressiveness in Cancer Stem Cells ». *Cells* 10 (6): 1330. <https://doi.org/10.3390/cells10061330>.

- Brunel, Aude, Sophie Hombourger, Elodie Barthout, Serge Battu, Donat Kögel, Patrick Antonietti, Elise Deluche, et al. 2021. « Autophagy inhibition reinforces stemness together with exit from dormancy of polydisperse glioblastoma stem cells ». *Aging* 13 (14): 18106-30. <https://doi.org/10.18632/aging.203362>.
- Cao, Hui, Enping Xu, Hong Liu, Ledong Wan, et Maode Lai. 2015. « Epithelial–Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Metastasis: A System Review ». *Pathology - Research and Practice* 211 (8): 557-69. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.05.010>.
- Catalano, Myriam, Giuseppina D'Alessandro, Francesca Lepore, Marco Corazzari, Sara Caldarola, Cristina Valacca, Fiorella Faienza, et al. 2015. « Autophagy Induction Impairs Migration and Invasion by Reversing EMT in Glioblastoma Cells ». *Molecular Oncology* 9 (8): 1612-25. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.04.016>.
- Cecconi, Francesco, et Beth Levine. 2008. « The Role of Autophagy in Mammalian Development: Cell Makeover Rather than Cell Death ». *Developmental Cell* 15 (3): 344-57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.012>.
- Cejas, Paloma, Miriam López-Gómez, Cristina Aguayo, Rosario Madero, Javier de Castro Carpeño, Cristóbal Belda-Iniesta, Jorge Barriuso, et al. 2009. « KRAS Mutations in Primary Colorectal Cancer Tumors and Related Metastases: A Potential Role in Prediction of Lung Metastasis ». *PLOS ONE* 4 (12): e8199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008199>.
- Celià-Terrassa, Toni, Óscar Meca-Cortés, Francesca Mateo, Alexia Martínez de Paz, Nuria Rubio, Anna Arnal-Estapé, Brian J. Ell, et al. 2012. « Epithelial-Mesenchymal Transition Can Suppress Major Attributes of Human Epithelial Tumor-Initiating Cells ». *Journal of Clinical Investigation* 122 (5): 1849-68. <https://doi.org/10.1172/JCI59218>.
- Chen, Li, Ruju Chen, Sherri Kemper, et David R. Brigstock. 2018. « Pathways of Production and Delivery of Hepatocyte Exosomes ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 12 (1): 343-57. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0421-7>.
- Chen, Ying-Da, Yi-Ting Fang, Yi-Lin Cheng, Chiou-Feng Lin, Li-Jin Hsu, Shu-Ying Wang, Robert Anderson, Chih-Peng Chang, et Yee-Shin Lin. 2017. « Exophagy of Annexin A2 via RAB11, RAB8A and RAB27A in IFN- γ -Stimulated Lung Epithelial Cells ». *Scientific Reports* 7 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06076-4>.
- Cheung, Kevin J., et Andrew J. Ewald. 2016. « A Collective Route to Metastasis: Seeding by Tumor Cell Clusters ». *Science* 352 (6282): 167-69. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6546>.
- Christou, Niki, Clément Auger, Serge Battu, Fabrice Lalloué, Marie-Odile Jauberteau-Marchan, Céline Hervieu, Mireille Verdier, et Muriel Mathonnet. 2021. « Intraperitoneal Chemotherapy for Peritoneal Metastases: Technical Innovations, Preclinical and Clinical Advances and Future Perspectives ». *Biology* 10 (3): 225. <https://doi.org/10.3390/biology10030225>.
- Christou, Niki, Aurélie Perraud, Sabrina Blondy, Marie-Odile Jauberteau, Serge Battu, et Muriel Mathonnet. 2017a. « E-Cadherin: A Potential Biomarker of Colorectal Cancer Prognosis ». *Oncology Letters* 13 (6): 4571-76. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6063>.
- . 2017b. « The Extracellular Domain of E Cadherin Linked to Invasiveness in Colorectal Cancer: A New Resistance and Relapses Monitoring Serum-Bio Marker? ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 143 (7): 1177-90. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2382-x>.
- Clarke, William T, et Joseph D Feuerstein. 2019. « Colorectal Cancer Surveillance in Inflammatory Bowel Disease: Practice Guidelines and Recent Developments ». *World Journal of Gastroenterology* 25 (30): 4148-57. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i30.4148>.

- Clevers, Hans. 2011. « The Cancer Stem Cell: Premises, Promises and Challenges ». *Nature Medicine* 17 (3): 313-19. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>.
- Cocucci, Emanuele, Gabriella Racchetti, et Jacopo Meldolesi. 2009. « Shedding Microvesicles: Artefacts No More ». *Trends in Cell Biology* 19 (2): 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>.
- Colombo, Marina, Graça Raposo, et Clotilde Théry. 2014. « Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 255-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- Cuervo, Ana Maria. 2008. « Autophagy and Aging: Keeping That Old Broom Working ». *Trends in Genetics* 24 (12): 604-12. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.10.002>.
- Dekker, Evelien, Pieter J Tanis, Jasper L A Vleugels, Pashtoon M Kasi, et Michael B Wallace. 2019. « Colorectal Cancer ». *The Lancet* 394 (10207): 1467-80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0).
- Demory Beckler, Michelle, James N. Higginbotham, Jeffrey L. Franklin, Amy-Joan Ham, Patrick J. Halvey, Imade E. Imasuen, Corbin Whitwell, Ming Li, Daniel C. Liebler, et Robert J. Coffey. 2013. « Proteomic Analysis of Exosomes from Mutant KRAS Colon Cancer Cells Identifies Intercellular Transfer of Mutant KRAS ». *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (2): 343-55. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.022806>.
- Deng, Jiayin, Ai-Ling Tian, Hui Pan, Allan Sauvat, Marion Leduc, Peng Liu, Liwei Zhao, et al. 2021. « Everolimus and Plicamycin Specifically Target Chemoresistant Colorectal Cancer Cells of the CMS4 Subtype ». *Cell Death & Disease* 12 (11): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04270-x>.
- Dice, J. F., J. M. Backer, P. Miao, L. Bourret, et M. A. McElligott. 1985. « Regulation of Catabolism of Ribonuclease A Microinjected into Human Fibroblasts ». *Progress in Clinical and Biological Research* 180: 385-94.
- Dick, John E. 2008. « Stem Cell Concepts Renew Cancer Research ». *Blood* 112 (13): 4793-4807. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-077941>.
- Diepenbruck, Maren, et Gerhard Christofori. 2016. « Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) and Metastasis: Yes, No, Maybe? ». *Current Opinion in Cell Biology* 43 (décembre): 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>.
- Dikic, Ivan, et Zvulun Elazar. 2018. « Mechanism and Medical Implications of Mammalian Autophagy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (6): 349-64. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>.
- Dongre, Anushka, et Robert A. Weinberg. 2019. « New Insights into the Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition and Implications for Cancer ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (2): 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
- Dorayappan, Kalpana Deepa Priya, Ross Wanner, John J. Wallbillich, Uksha Saini, Roman Zingarelli, Adrian A. Suarez, David E. Cohn, et Karuppaiyah Selvendiran. 2018. « Hypoxia-Induced Exosomes Contribute to a More Aggressive and Chemoresistant Ovarian Cancer Phenotype: A Novel Mechanism Linking STAT3/Rab Proteins ». *Oncogene* 37 (28): 3806-21. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0189-0>.
- Doyotte, Aurelie, Matthew R. G. Russell, Colin R. Hopkins, et Philip G. Woodman. 2005. « Depletion of TSG101 Forms a Mammalian 'Class E' Compartment: A Multicisternal Early Endosome with Multiple Sorting Defects ». *Journal of Cell Science* 118 (14): 3003-17. <https://doi.org/10.1242/jcs.02421>.
- Drake, Richard L., A. Wayne Vogle, Fabrice Duparc, et Jacques Duparc. 2020. « Gray's Anatomie - Le Manuel pour les étudiants 4e édition ». Elsevier Masson SAS. 2020.

<https://www.elsevier-masson.fr/grays-anatomie-le-manuel-pour-les-etudiants-9782294762239.html>.

- Druzhkova, Irina, Marina Shirmanova, Nadezhda Ignatova, Varvara Dudenkova, Maria Lukina, Elena Zagaynova, Dina Safina, et al. 2020. « Expression of EMT-Related Genes in Hybrid E/M Colorectal Cancer Cells Determines Fibroblast Activation and Collagen Remodeling ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 8119. <https://doi.org/10.3390/ijms21218119>.
- Dupont, Nicolas, Shanya Jiang, Manohar Pilli, Wojciech Ornatowski, Dhruva Bhattacharya, et Vojo Deretic. 2011. « Autophagy-Based Unconventional Secretory Pathway for Extracellular Delivery of IL-1 β : Autophagy-Based Unconventional Secretory Pathway ». *The EMBO Journal* 30 (23): 4701-11. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.398>.
- Ejlerskov, Patrick, Izabela Rasmussen, Troels Tolstrup Nielsen, Ann-Louise Bergström, Yumi Tohyama, Poul Henning Jensen, et Frederik Vilhardt. 2013. « Tubulin Polymerization-Promoting Protein (TPPP/P25 α) Promotes Unconventional Secretion of α -Synuclein through Exophagy by Impairing Autophagosome-Lysosome Fusion ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (24): 17313-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401174>.
- Fader, Claudio M., Diego Sánchez, Marcelo Furlán, et María I. Colombo. 2008. « Induction of Autophagy Promotes Fusion of Multivesicular Bodies with Autophagic Vacuoles in K562 Cells ». *Traffic* 9 (2): 230-50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x>.
- Fichtner, Michael, Emir Bozkurt, Manuela Salvucci, Christopher McCann, Katherine A. McAllister, Luise Halang, Heiko Düssmann, et al. 2020. « Molecular Subtype-Specific Responses of Colon Cancer Cells to the SMAC Mimetic Birinapant ». *Cell Death & Disease* 11 (11): 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03232-z>.
- Figueiredo, Jane C., Li Hsu, Carolyn M. Hutter, Yi Lin, Peter T. Campbell, John A. Baron, Sonja I. Berndt, et al. 2014. « Genome-Wide Diet-Gene Interaction Analyses for Risk of Colorectal Cancer ». Édité par Christopher I. Amos. *PLoS Genetics* 10 (4): e1004228. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004228>.
- Friand, Véronique, Guido David, et Pascale Zimmermann. 2015. « Syntenin and Syndecan in the Biogenesis of Exosomes: Syndecan-Syntenin Pathway in Exosome Biogenesis ». *Biology of the Cell* 107 (10): 331-41. <https://doi.org/10.1111/boc.201500010>.
- Fujita, Naonobu, Mitsuko Hayashi-Nishino, Hiromi Fukumoto, Hiroko Omori, Akitsugu Yamamoto, Takeshi Noda, et Tamotsu Yoshimori. 2008. « An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure ». Édité par Suresh Subramani. *Molecular Biology of the Cell* 19 (11): 4651-59. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0312>.
- Fung, Christopher, Rebecca Lock, Sizhen Gao, Eduardo Salas, et Jayanta Debnath. 2007. « Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (3): 797-806. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-10-1092>.
- Galfrascoli, Elena, Sheila Piva, Michela Cinquini, Antonio Rossi, Nicla La Verde, Annalisa Bramati, Anna Moretti, et al. 2011. « Risk/Benefit Profile of Bevacizumab in Metastatic Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Digestive and Liver Disease* 43 (4): 286-94. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2010.10.010>.
- Galluzzi, L., F. Pietrocola, J. M. Bravo-San Pedro, R. K. Amaravadi, E. H. Baehrecke, F. Cecconi, P. Codogno, et al. 2015. « Autophagy in Malignant Transformation and Cancer Progression ». *The EMBO Journal* 34 (7): 856-80. <https://doi.org/10.15252/embj.201490784>.

- Galluzzi, Lorenzo, Eric H Baehrecke, Andrea Ballabio, Patricia Boya, José Manuel Bravo-San Pedro, Francesco Cecconi, Augustine M Choi, et al. 2017. « Molecular Definitions of Autophagy and Related Processes ». *The EMBO Journal* 36 (13): 1811-36. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796697>.
- Ganley, Ian G., Du H. Lam, Junru Wang, Xiaojun Ding, She Chen, et Xuejun Jiang. 2009. « ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates MTOR Signaling and Is Essential for Autophagy ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (18): 12297-305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>.
- Garcia, Josep, Herbert I. Hurwitz, Alan B. Sandler, David Miles, Robert L Coleman, Regula Deurloo, et Olivier L Chinot. 2020. « Bevacizumab (Avastin®) in Cancer Treatment: A Review of 15 Years of Clinical Experience and Future Outlook ». *Cancer Treatment Reviews* 86 (juin): 102017. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017>.
- Gerbe, François, Emmanuelle Sidot, Danielle J. Smyth, Makoto Ohmoto, Ichiro Matsumoto, Valérie Dardalhon, Pierre Cesses, et al. 2016. « Intestinal Epithelial Tuft Cells Initiate Type 2 Mucosal Immunity to Helminth Parasites ». *Nature* 529 (7585): 226-30. <https://doi.org/10.1038/nature16527>.
- Ghossoub, Rania, Frédérique Lembo, Aude Rubio, Carole Baron Gaillard, Jérôme Bouchet, Nicolas Vitale, Josef Slavík, Miroslav Machala, et Pascale Zimmermann. 2014. « Syntenin-ALIX Exosome Biogenesis and Budding into Multivesicular Bodies Are Controlled by ARF6 and PLD2 ». *Nature Communications* 5 (1): 3477. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>.
- Gorlick, Richard, et Debabrata Banerjee. 2002. « Fluoropyrimidine resistance in colon cancer ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 2 (4): 409-16. <https://doi.org/10.1586/14737140.2.4.409>.
- Granier, Clémence, Vassili Soumelis, Marion Mandavit, Laure Gibault, Radia Belazzoug, Eléonore de Guillebon, Cécile Badoual, Eric Tartour, et Hélène Roussel. 2017. « Les « immune checkpoints », comment ça marche ». *Annales de Pathologie* 37 (1): 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2016.12.007>.
- Gross, Julia Christina, Varun Chaudhary, Kerstin Bartscherer, et Michael Boutros. 2012. « Active Wnt Proteins Are Secreted on Exosomes ». *Nature Cell Biology* 14 (10): 1036-45. <https://doi.org/10.1038/ncb2574>.
- Grosse-Wilde, Anne, Aymeric Fouquier d'Hérouël, Ellie McIntosh, Gökhan Ertaylan, Alexander Skupin, Rolf E. Kuestner, Antonio del Sol, Kathie-Anne Walters, et Sui Huang. 2015. « Stemness of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival ». Édité par Eshel Ben-Jacob. *PLOS ONE* 10 (5): e0126522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126522>.
- Gruenberg, Jean. 2020. « Life in the Lumen: The Multivesicular Endosome ». *Traffic* 21 (1): 76-93. <https://doi.org/10.1111/tra.12715>.
- Gudbergsson, Johann Mar, et Kasper Bendix Johnsen. 2019. « Exosomes and Autophagy: Rekindling the Vesicular Waste Hypothesis ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 13 (4): 443-50. <https://doi.org/10.1007/s12079-019-00524-8>.
- Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Sonesson, Laetitia Marisa, et al. 2015. « The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer ». *Nature Medicine* 21 (11): 1350-56. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.
- Gupta, Gaorav P., et Joan Massagué. 2006. « Cancer Metastasis: Building a Framework ». *Cell* 127 (4): 679-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>.

- György, Bence, Tamás G. Szabó, Mária Pásztói, Zsuzsanna Pál, Petra Misják, Borbála Aradi, Valéria László, et al. 2011. « Membrane Vesicles, Current State-of-the-Art: Emerging Role of Extracellular Vesicles ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (16): 2667-88. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>.
- Hammer, Oyvind, David A T Harper, et Paul D Ryan. 2001. « PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis », 9.
- Hanahan, Douglas, et Robert A Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hara, Taichi, Akito Takamura, Chieko Kishi, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Jun-Lin Guan, et Noboru Mizushima. 2008. « FIP200, a ULK-Interacting Protein, Is Required for Autophagosome Formation in Mammalian Cells ». *Journal of Cell Biology* 181 (3): 497-510. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712064>.
- Hayashi-Nishino, Mitsuko, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Akihito Yamaguchi, Tamotsu Yoshimori, et Akitsugu Yamamoto. 2009. « A Subdomain of the Endoplasmic Reticulum Forms a Cradle for Autophagosome Formation ». *Nature Cell Biology* 11 (12): 1433-37. <https://doi.org/10.1038/ncb1991>.
- He, Xi C, Jiwang Zhang, Wei-Gang Tong, Ossama Tawfik, Jason Ross, David H Scoville, Qiang Tian, et al. 2004. « BMP Signaling Inhibits Intestinal Stem Cell Self-Renewal through Suppression of Wnt- β -Catenin Signaling ». *Nature Genetics* 36 (10): 1117-21. <https://doi.org/10.1038/ng1430>.
- Hervieu, Céline, Niki Christou, Serge Battu, et Muriel Mathonnet. 2021. « The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials ». *Cancers* 13 (5): 1092. <https://doi.org/10.3390/cancers13051092>.
- Hessvik, Nina Pettersen, et Alicia Llorente. 2018. « Current Knowledge on Exosome Biogenesis and Release ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (2): 193-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>.
- Hirata, Akihiro, Jochen Utikal, Satoshi Yamashita, Hitomi Aoki, Akira Watanabe, Takuya Yamamoto, Hideyuki Okano, et al. 2013. « Dose-Dependent Roles for Canonical Wnt Signalling in *de Novo* Crypt Formation and Cell Cycle Properties of the Colonic Epithelium ». *Development* 140 (1): 66-75. <https://doi.org/10.1242/dev.084103>.
- Holmgren, Lars, Anna Szeles, Eva Rajnavölgyi, Judah Folkman, Georg Klein, Ingemar Ernberg, et Kerstin I. Falk. 1999. « Horizontal Transfer of DNA by the Uptake of Apoptotic Bodies ». *Blood* 93 (11): 3956-63. <https://doi.org/10.1182/blood.V93.11.3956>.
- Hosokawa, Nao, Taichi Hara, Takeshi Kaizuka, Chieko Kishi, Akito Takamura, Yutaka Miura, Shun-ichiro Iemura, et al. 2009. « Nutrient-Dependent MTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy ». Édité par Sandra L. Schmid. *Molecular Biology of the Cell* 20 (7): 1981-91. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>.
- Hosokawa, Nao, Takahiro Sasaki, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Taichi Hara, et Noboru Mizushima. 2009. « Atg101, a Novel Mammalian Autophagy Protein Interacting with Atg13 ». *Autophagy* 5 (7): 973-79. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9296>.
- Howitt, Michael R., Sydney Lavoie, Monia Michaud, Arthur M. Blum, Sara V. Tran, Joel V. Weinstock, Carey Ann Gallini, et al. 2016. « Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut ». *Science* 351 (6279): 1329-33. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1648>.

- Hristov, Mihail, Wolfgang Erl, Stefan Linder, et Peter C. Weber. 2004. « Apoptotic Bodies from Endothelial Cells Enhance the Number and Initiate the Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells in Vitro ». *Blood* 104 (9): 2761-66. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3614>.
- Hsu, Chieh, Yuichi Morohashi, Shin-Ichiro Yoshimura, Natalia Manrique-Hoyos, Sangyong Jung, Marcel A. Lauterbach, Mostafa Bakhti, et al. 2010. « Regulation of Exosome Secretion by Rab35 and Its GTPase-Activating Proteins TBC1D10A-C ». *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 223-32. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>.
- Huels, David J, Rachel A Ridgway, Sorina Radulescu, Marc Leushacke, Andrew D Campbell, Sujata Biswas, Simon Leedham, et al. 2015. « E-cadherin Can Limit the Transforming Properties of Activating B-catenin Mutations ». *The EMBO Journal* 34 (18): 2321-33. <https://doi.org/10.15252/embj.201591739>.
- Huotari, Jatta, et Ari Helenius. 2011. « Endosome Maturation: Endosome Maturation ». *The EMBO Journal* 30 (17): 3481-3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
- INCa. 2022. « Le dépistage du cancer colorectal en pratique - Dépistage du cancer colorectal ». 2022. <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Se-faire-depister/Depistage-du-cancer-colorectal/Le-depistage-en-pratique>.
- Ismail, Noura, Yijie Wang, Duaa Dakhlallah, Leni Moldovan, Kitty Agarwal, Kara Batte, Prexy Shah, et al. 2013. « Macrophage Microvesicles Induce Macrophage Differentiation and MiR-223 Transfer ». *Blood* 121 (6): 984-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374793>.
- Itakura, Eisuke, Chieko Kishi, Kinji Inoue, et Noboru Mizushima. 2008. « Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG ». Édité par Suresh Subramani. *Molecular Biology of the Cell* 19 (12): 5360-72. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0080>.
- Itakura, Eisuke, Chieko Kishi-Itakura, et Noboru Mizushima. 2012. « The Hairpin-Type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes ». *Cell* 151 (6): 1256-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>.
- Itzkowitz, Steven H., et Xianyang Yio. 2004. « Inflammation and Cancer IV. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: The Role of Inflammation ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (1): G7-17. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2004>.
- Johnson, Jennifer L., Mahalakshmi Ramadass, Ariela Haimovich, Matthew D. McGeough, Jinzhong Zhang, Hal M. Hoffman, et Sergio D. Catz. 2017. « Increased Neutrophil Secretion Induced by NLRP3 Mutation Links the Inflammasome to Azurophilic Granule Exocytosis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00507>.
- Jolly, Mohit Kumar, Marcelo Boareto, Bin Huang, Dongya Jia, Mingyang Lu, Eshel Ben-Jacob, José N. Onuchic, et Herbert Levine. 2015. « Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis ». *Frontiers in Oncology* 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2015.00155>.
- Jolly, Mohit Kumar, Jason A. Somarelli, Maya Sheth, Adrian Biddle, Satyendra C. Tripathi, Andrew J. Armstrong, Samir M. Hanash, Sharmila A. Bapat, Annapoorni Rangarajan, et Herbert Levine. 2019. « Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotypes Promote Metastasis and Therapy Resistance across Carcinomas ». *Pharmacology & Therapeutics* 194 (février): 161-84. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.09.007>.
- Ju, Guan-qun, Jun Cheng, Liang Zhong, Shuai Wu, Xiang-yu Zou, Guang-yuan Zhang, Di Gu, et al. 2015. « Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem

- Cells Facilitate Tubular Epithelial Cell Dedifferentiation and Growth via Hepatocyte Growth Factor Induction ». Édité par Benedetta Bussolati. *PLOS ONE* 10 (3): e0121534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121534>.
- Jung, Chang Hwa, Chang Bong Jun, Seung-Hyun Ro, Young-Mi Kim, Neil Michael Otto, Jing Cao, Mondira Kundu, et Do-Hyung Kim. 2009. « ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate MTOR Signaling to the Autophagy Machinery ». Édité par Sandra L. Schmid. *Molecular Biology of the Cell* 20 (7): 1992-2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>.
- Kahn, Robin, Maria Mossberg, Anne-lie Ståhl, Karl Johansson, Ingrid Lopatko Lindman, Caroline Heijl, Mårten Segelmark, Matthias Mörgelin, L.M. Fredrik Leeb-Lundberg, et Diana Karpman. 2017. « Microvesicle Transfer of Kinin B1-Receptors Is a Novel Inflammatory Mechanism in Vasculitis ». *Kidney International* 91 (1): 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.023>.
- Kang, R, H J Zeh, M T Lotze, et D Tang. 2011. « The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis ». *Cell Death & Differentiation* 18 (4): 571-80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>.
- Karoui, M., A. Rullier, G. Piessen, J. L. Legoux, E. Barbier, C. De Chaisemartin, C. Lécaille, et al. 2020. « Perioperative FOLFOX 4 Versus FOLFOX 4 Plus Cetuximab Versus Immediate Surgery for High-Risk Stage II and III Colon Cancers: A Phase II Multicenter Randomized Controlled Trial (PRODIGE 22) ». *Annals of Surgery* 271 (4): 637-45. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003454>.
- Kaushik, Susmita, et Ana Maria Cuervo. 2018. « The Coming of Age of Chaperone-Mediated Autophagy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (6): 365-81. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>.
- Kaushik, Susmita, Jose Antonio Rodriguez-Navarro, Esperanza Arias, Roberta Kiffin, Srabani Sahu, Gary J. Schwartz, Ana Maria Cuervo, et Rajat Singh. 2011. « Autophagy in Hypothalamic AgRP Neurons Regulates Food Intake and Energy Balance ». *Cell Metabolism* 14 (2): 173-83. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.008>.
- Keller, D. S., A. Windsor, R. Cohen, et M. Chand. 2019. « Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Review of the Evidence ». *Techniques in Coloproctology* 23 (1): 3-13. <https://doi.org/10.1007/s10151-019-1926-2>.
- Kenific, Candia M, Andrew Thorburn, et Jayanta Debnath. 2010. « Autophagy and Metastasis: Another Double-Edged Sword ». *Current Opinion in Cell Biology* 22 (2): 241-45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.10.008>.
- Kerr, J F R, A H Wyllie, et A R Currie. 1972. « Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics ». *British Journal of Cancer* 26 (4): 239-57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- Keum, NaNa, et Edward Giovannucci. 2019. « Global Burden of Colorectal Cancer: Emerging Trends, Risk Factors and Prevention Strategies ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16 (12): 713-32. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>.
- Kim, Hae Su, Jin Seok Heo, Jeeyun Lee, Ji Yun Lee, Min-Young Lee, Sung Hee Lim, Woo Yong Lee, et al. 2016. « The impact of KRAS mutations on prognosis in surgically resected colorectal cancer patients with liver and lung metastases: a retrospective analysis ». *BMC Cancer* 16 (1): 120. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2141-4>.
- Kim, Joungmok, et Kun-Liang Guan. 2011. « Regulation of the autophagy initiating kinase ULK1 by nutrients: Roles of mTORC1 and AMPK ». *Cell Cycle* 10 (9): 1337-38. <https://doi.org/10.4161/cc.10.9.15291>.

- Kimura, Tomonori, Jingyue Jia, Suresh Kumar, Seong Won Choi, Yuexi Gu, Michal Mudd, Nicolas Dupont, et al. 2017. « Dedicated SNAREs and Specialized TRIM Cargo Receptors Mediate Secretory Autophagy ». *The EMBO Journal* 36 (1): 42-60. <https://doi.org/10.15252/embj.201695081>.
- Klionsky, D. J. 2000. « Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation ». *Science* 290 (5497): 1717-21. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>.
- Klionsky, Daniel J. 2007. « Autophagy: From Phenomenology to Molecular Understanding in Less than a Decade ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (11): 931-37. <https://doi.org/10.1038/nrm2245>.
- Kocaturk, Nur Mehpare, Yunus Akkoc, Cenk Kig, Oznur Bayraktar, Devrim Gozuacik, et Ozlem Kutlu. 2019. « Autophagy as a Molecular Target for Cancer Treatment ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 134 (juin): 116-37. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.04.011>.
- Koch, Raphael, Thiha Aung, Daniel Vogel, Bjoern Chapuy, Dirk Wenzel, Sabrina Becker, Ursula Sinzig, et al. 2016. « Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone ». *Clinical Cancer Research* 22 (2): 395-404. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0577>.
- Koppe, Manuel J., Otto C. Boerman, Wim J. G. Oyen, et Robert P. Bleichrodt. 2006. « Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin ». *Annals of Surgery* 243 (2): 212-22. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000197702.46394.16>.
- Korinek, Vladimir, Nick Barker, Patrice J. Morin, Dick van Wichen, Roel de Weger, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, et Hans Clevers. 1997. « Constitutive Transcriptional Activation by a β -Catenin-Tcf Complex in APC^{-/-} Colon Carcinoma ». *Science, New Series* 275 (5307): 1784-87.
- Koukourakis, Michael I., Dimitra Kalamida, Alexandra Giatromanolaki, Christos E. Zois, Efthimios Sivridis, Stamatia Pouliliou, Achilleas Mitrakas, Kevin C. Gatter, et Adrian L. Harris. 2015. « Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines ». Édité par Srinivasa M Srinivasula. *PLOS ONE* 10 (9): e0137675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137675>.
- Kowal, Joanna, Mercedes Tkach, et Clotilde Théry. 2014. « Biogenesis and Secretion of Exosomes ». *Current Opinion in Cell Biology* 29 (août): 116-25. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>.
- Kroemer, Guido, Guillermo Mariño, et Beth Levine. 2010. « Autophagy and the Integrated Stress Response ». *Molecular Cell* 40 (2): 280-93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>.
- Kröger, Cornelia, Alexander Afeyan, Jasmin Mraz, Elinor Ng Eaton, Ferenc Reinhardt, Yevgenia L. Khodor, Prathapan Thiru, et al. 2019. « Acquisition of a Hybrid E/M State Is Essential for Tumorigenicity of Basal Breast Cancer Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (15): 7353-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812876116>.
- Kumar, Ashish, et Gagan Deep. 2020. « Hypoxia in Tumor Microenvironment Regulates Exosome Biogenesis: Molecular Mechanisms and Translational Opportunities ». *Cancer Letters* 479 (juin): 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.03.017>.
- Kumar, Dhruv, Dwijendra Gupta, Sharmila Shankar, et Rakesh K. Srivastava. 2015. « Biomolecular Characterization of Exosomes Released from Cancer Stem Cells: Possible Implications for Biomarker and Treatment of Cancer ». *Oncotarget* 6 (5). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2462>.

- Lamouille, Samy, Jian Xu, et Rik Derynck. 2014. « Molecular Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (3): 178-96. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.
- Larios, Jorge, Vincent Mercier, Aurélien Roux, et Jean Gruenberg. 2020. « ALIX- and ESCRT-III–Dependent Sorting of Tetraspanins to Exosomes ». *Journal of Cell Biology* 219 (3). <https://doi.org/10.1083/jcb.201904113>.
- Laurent-Puig, P., J. Agostini, et K. Maley. 2010. « Oncogénèse colorectale ». *Bulletin du Cancer* 97 (11): 1311-21. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1216>.
- Lazarou, Michael, Danielle A. Sliter, Lesley A. Kane, Shireen A. Sarraf, Chunxin Wang, Jonathon L. Burman, Dionisia P. Sideris, Adam I. Fogel, et Richard J. Youle. 2015. « The Ubiquitin Kinase PINK1 Recruits Autophagy Receptors to Induce Mitophagy ». *Nature* 524 (7565): 309-14. <https://doi.org/10.1038/nature14893>.
- Leng, Zhengwei, Qinghua Xia, Jinhua Chen, Yong Li, Jiqian Xu, Ende Zhao, Hai Zheng, Walden Ai, et Jiangchuan Dong. 2018. « Lgr5+CD44+EpCAM+ Strictly Defines Cancer Stem Cells in Human Colorectal Cancer ». *Cellular Physiology and Biochemistry* 46 (2): 860-72. <https://doi.org/10.1159/000488743>.
- Lenz, Heinz-Josef, Eric Van Cutsem, Maria Luisa Limon, Ka Yeung Mark Wong, Alain Hendlisch, Massimo Aglietta, Pilar García-Alfonso, et al. 2022. « First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study ». *Journal of Clinical Oncology* 40 (2): 161-70. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01015>.
- Levine, Beth, et Guido Kroemer. 2008. « Autophagy in the Pathogenesis of Disease ». *Cell* 132 (1): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.
- . 2019. « Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective ». *Cell* 176 (1-2): 11-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>.
- Levine, Beth, Noboru Mizushima, et Herbert W. Virgin. 2011. « Autophagy in Immunity and Inflammation ». *Nature* 469 (7330): 323-35. <https://doi.org/10.1038/nature09782>.
- Levy, Jean M. Mulcahy, Christina G. Towers, et Andrew Thorburn. 2017. « Targeting Autophagy in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 17 (9): 528-42. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>.
- Li, Jie, Ni Hou, Ahmad Faried, Soichi Tsutsumi, Toshiyuki Takeuchi, et Hiroyuki Kuwano. 2009. « Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells ». *Annals of Surgical Oncology* 16 (3): 761-71. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0260-0>.
- Li, Jun, Bin Yang, Qi Zhou, Yongzhong Wu, Dan Shang, Yu Guo, Zifang Song, Qichang Zheng, et Jun Xiong. 2013. « Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial–mesenchymal transition ». *Carcinogenesis* 34 (6): 1343-51. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt063>.
- Li, Xiaohua, Shikun He, et Binyun Ma. 2020. « Autophagy and Autophagy-Related Proteins in Cancer ». *Molecular Cancer* 19 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>.
- Liang, Chengyu, Jong-soo Lee, Kyung-Soo Inn, Michaela U. Gack, Qinglin Li, Esteban A. Roberts, Isabelle Vergne, et al. 2008. « Beclin1-Binding UVRAG Targets the Class C Vps Complex to Coordinate Autophagosome Maturation and Endocytic Trafficking ». *Nature Cell Biology* 10 (7): 776-87. <https://doi.org/10.1038/ncb1740>.
- Liao, Xiaoyun, Paul Lochhead, Reiko Nishihara, Teppei Morikawa, Aya Kuchiba, Mai Yamauchi, Yu Imamura, et al. 2012. « Aspirin Use, Tumor *PIK3CA* Mutation, and Colorectal-Cancer Survival ». *New England Journal of Medicine* 367 (17): 1596-1606. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1207756>.

- Lièvre, A, H Blons, et P Laurent-Puig. 2010. « Oncogenic Mutations as Predictive Factors in Colorectal Cancer ». *Oncogene* 29 (21): 3033-43. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.89>.
- Liu, Suling, Yang Cong, Dong Wang, Yu Sun, Lu Deng, Yajing Liu, Rachel Martin-Trevino, et al. 2014. « Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of Their Normal Counterparts ». *Stem Cell Reports* 2 (1): 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.009>.
- Lock, Rebecca, Candia M. Kenific, Andrew M. Leidal, Eduardo Salas, et Jayanta Debnath. 2014. « Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion ». *Cancer Discovery* 4 (4): 466-79. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0841>.
- Lucchetti, Donatella, Federica Calapà, Valentina Palmieri, Caterina Fanali, Federica Carbone, Alfredo Papa, Ruggero De Maria, Marco De Spirito, et Alessandro Sgambato. 2017. « Differentiation Affects the Release of Exosomes from Colon Cancer Cells and Their Ability to Modulate the Behavior of Recipient Cells ». *The American Journal of Pathology* 187 (7): 1633-47. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.015>.
- Lugini, Luana, Mauro Valtieri, Cristina Federici, Serena Cecchetti, Stefania Meschini, Maria Condello, Michele Signore, et Stefano Fais. 2016. « Exosomes from Human Colorectal Cancer Induce a Tumor-like Behavior in Colonic Mesenchymal Stromal Cells ». *Oncotarget* 7 (31). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10574>.
- Lv, Qi, Wei Wang, Jianfei Xue, Fang Hua, Rong Mu, Heng Lin, Jun Yan, Xiaoxi Lv, Xiaoguang Chen, et Zhuo-Wei Hu. 2012. « DEDD Interacts with PI3KC3 to Activate Autophagy and Attenuate Epithelial–Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer ». *Cancer Research* 72 (13): 3238-50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3832>.
- Makrodoouli, Eleni, Eftychia Oikonomou, Michal Koc, Ladislav Andera, Takehiko Sasazuki, Senji Shirasawa, et Alexander Pintzas. 2011. « BRAF and RAS Oncogenes Regulate Rho GTPase Pathways to Mediate Migration and Invasion Properties in Human Colon Cancer Cells: A Comparative Study ». *Molecular Cancer* 10 (1): 118. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-118>.
- Manhas, J., A. Bhattacharya, S. K. Agrawal, B. Gupta, P. Das, S. V. S. Deo, S. Pal, et S. Sen. 2016. « Characterization of Cancer Stem Cells from Different Grades of Human Colorectal Cancer ». *Tumor Biology* 37 (10): 14069-81. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5232-6>.
- Mao, C., Z.Y. Yang, X.F. Hu, Q. Chen, et J.L. Tang. 2012. « PIK3CA Exon 20 Mutations as a Potential Biomarker for Resistance to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Annals of Oncology* 23 (6): 1518-25. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr464>.
- Martinelli, Silvia, Elmira A. Anderzhanova, Thomas Bajaj, Svenja Wiechmann, Frederik Dethloff, Katja Weckmann, Daniel E. Heinz, et al. 2021. « Stress-Primed Secretory Autophagy Promotes Extracellular BDNF Maturation by Enhancing MMP9 Secretion ». *Nature Communications* 12 (1): 4643. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24810-5>.
- Mathew, R., S. Kongara, B. Beaudoin, C. M. Karp, K. Bray, K. Degenhardt, G. Chen, S. Jin, et E. White. 2007. « Autophagy Suppresses Tumor Progression by Limiting Chromosomal Instability ». *Genes & Development* 21 (11): 1367-81. <https://doi.org/10.1101/gad.1545107>.
- Mathew, Robin, Vassiliki Karantza-Wadsworth, et Eileen White. 2007. « Role of Autophagy in Cancer ». *Cancer*, 7.
- Matsunaga, Kohichi, Tatsuya Saitoh, Keisuke Tabata, Hiroko Omori, Takashi Satoh, Naoki Kurotori, Ikuko Maejima, et al. 2009. « Two Beclin 1-Binding Proteins, Atg14L and

- Rubicon, Reciprocally Regulate Autophagy at Different Stages ». *Nature Cell Biology* 11 (4): 385-96. <https://doi.org/10.1038/ncb1846>.
- McCullough, John, Adam Frost, et Wesley I. Sundquist. 2018. « Structures, Functions, and Dynamics of ESCRT-III/Vps4 Membrane Remodeling and Fission Complexes ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (1): 85-109. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060600>.
- Mélin, Carole, Aurélie Perraud, Niki Christou, Romain Bibes, Philippe Cardot, Marie-Odile Jauberteau, Serge Battu, et Muriel Mathonnet. 2015. « New Ex-Ovo Colorectal-Cancer Models from Different SdFFF-Sorted Tumor-Initiating Cells ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (28): 8433-43. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9029-z>.
- Melki, Imene, Nicolas Tessandier, Anne Zufferey, et Eric Boilard. 2017. « Platelet Microvesicles in Health and Disease ». *Platelets* 28 (3): 214-21. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1265924>.
- Minciocchi, Valentina R., Michael R. Freeman, et Dolores Di Vizio. 2015. « Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 40 (avril): 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010>.
- Mizushima, Noboru. 2007. « Autophagy: Process and Function ». *Genes & Development* 21 (22): 2861-73. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>.
- Mizushima, Noboru, Tamotsu Yoshimori, et Yoshinori Ohsumi. 2011. « The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27 (1): 107-32. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>.
- Moffat, Jason, Dorre A. Grueneberg, Xiaoping Yang, So Young Kim, Angela M. Kloepper, Gregory Hinkle, Bruno Piqani, et al. 2006. « A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen ». *Cell* 124 (6): 1283-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.040>.
- Mowers, E E, M N Sharifi, et K F Macleod. 2017. « Autophagy in Cancer Metastasis ». *Oncogene* 36 (12): 1619-30. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.333>.
- . 2018. « Functions of Autophagy in the Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis ». *The FEBS Journal* 285 (10): 1751-66. <https://doi.org/10.1111/febs.14388>.
- Muralidharan-Chari, Vandhana, James Clancy, Carolyn Plou, Maryse Romao, Philippe Chavrier, Graca Raposo, et Crislyn D'Souza-Schorey. 2009. « ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles ». *Current Biology* 19 (22): 1875-85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>.
- Nash, Garrett M., Mark Gimbel, Jinru Shia, Daniel R. Nathanson, MacKevin I. Ndubuisi, Zhao-Shi Zeng, Nancy Kemeny, et Philip B. Paty. 2010. « KRAS Mutation Correlates With Accelerated Metastatic Progression in Patients With Colorectal Liver Metastases ». *Annals of Surgical Oncology* 17 (2): 572-78. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0605-3>.
- Nazio, Francesca, Flavie Strappazon, Manuela Antonioli, Pamela Bielli, Valentina Cianfanelli, Matteo Bordi, Christine Gretzmeier, et al. 2013. « MTOR Inhibits Autophagy by Controlling ULK1 Ubiquitylation, Self-Association and Function through AMBRA1 and TRAF6 ». *Nature Cell Biology* 15 (4): 406-16. <https://doi.org/10.1038/ncb2708>.
- Nguyen, Ha Thi, et Hong-Quan Duong. 2018. « The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy ». *Oncology Letters* 16 (1): 9-18. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>.

- Niel, Guillaume van, Gisela D'Angelo, et Graça Raposo. 2018. « Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (4): 213-28. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
- Nilsson, Per, Krishnapriya Loganathan, Misaki Sekiguchi, Yukio Matsuba, Kelvin Hui, Satoshi Tsubuki, Motomasa Tanaka, Nobuhisa Iwata, Takashi Saito, et Takaomi C. Saido. 2013. « A β Secretion and Plaque Formation Depend on Autophagy ». *Cell Reports* 5 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.042>.
- O'Keefe, Stephen J. D. 2016. « Diet, Microorganisms and Their Metabolites, and Colon Cancer ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13 (12): 691-706. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.165>.
- Onorati, Angelique V., Matheus Dyczynski, Rani Ojha, et Ravi K. Amaravadi. 2018. « Targeting Autophagy in Cancer: Targeting Autophagy in Cancer ». *Cancer* 124 (16): 3307-18. <https://doi.org/10.1002/cncr.31335>.
- Ostrowski, Matias, Nuno B. Carmo, Sophie Krumeich, Isabelle Faret, Graça Raposo, Ariel Savina, Catarina F. Moita, et al. 2010. « Rab27a and Rab27b Control Different Steps of the Exosome Secretion Pathway ». *Nature Cell Biology* 12 (1): 19-30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>.
- Oudheusden, Thijs Ralf Van, Holger Grull, Patricia Yvonne Wilhelmina Dankers, et Ignace Hubertus Johannes Theodorus De Hingh. 2015. « Targeting the Peritoneum with Novel Drug Delivery Systems in Peritoneal Carcinomatosis: A Review of the Literature ». *Anticancer Research* 35 (2): 627-34.
- Overman, Michael J., Sara Lonardi, Ka Yeung Mark Wong, Heinz-Josef Lenz, Fabio Gelsomino, Massimo Aglietta, Michael A. Morse, et al. 2018. « Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 36 (8): 773-79. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9901>.
- Palazzo, Maxime. 2018. « Polypes et polyposes festonnés », 8.
- Pasani, Satwik, Sarthak Sahoo, et Mohit Kumar Jolly. 2020. « Hybrid E/M Phenotype(s) and Stemness: A Mechanistic Connection Embedded in Network Topology ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (1): 60. <https://doi.org/10.3390/jcm10010060>.
- Pasquier, Benoit. 2016. « Autophagy Inhibitors ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (5): 985-1001. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2104-y>.
- Pastushenko, Ievgenia, Audrey Brisebarre, Alejandro Sifrim, Marco Fioramonti, Tatiana Revenco, Soufiane Boumahdi, Alexandra Van Keymeulen, et al. 2018. « Identification of the Tumour Transition States Occurring during EMT ». *Nature* 556 (7702): 463-68. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>.
- Patton, Mary C., Haseeb Zubair, Mohammad Aslam Khan, Seema Singh, et Ajay P. Singh. 2020. « Hypoxia Alters the Release and Size Distribution of Extracellular Vesicles in Pancreatic Cancer Cells to Support Their Adaptive Survival ». *Journal of Cellular Biochemistry* 121 (1): 828-39. <https://doi.org/10.1002/jcb.29328>.
- Peinado, Héctor, David Olmeda, et Amparo Cano. 2007. « Snail, Zeb and BHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype? ». *Nature Reviews Cancer* 7 (6): 415-28. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>.
- Perez-Hernandez, Daniel, Cristina Gutiérrez-Vázquez, Inmaculada Jorge, Soraya López-Martín, Angeles Ursa, Francisco Sánchez-Madrid, Jesús Vázquez, et María Yáñez-Mó. 2013. « The Intracellular Interactome of Tetraspanin-Enriched Microdomains Reveals Their Function as Sorting Machineries toward Exosomes ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (17): 11649-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>.

- Perlemuter, Gabriel, et Marie Danielou. 2019. « Hépatogastro-entérologie ». Elsevier Masson SAS. 2019. <https://www.elsevier-masson.fr/hepatogastro-enterologie-9782294758843.html>.
- Pierce, G. B., et C. Wallace. 1971. « Differentiation of Malignant to Benign Cells ». *Cancer Research* 31 (2): 127-34.
- Pinet, Sandra, Barbara Bessette, Nicolas Vedrenne, Aurélie Lacroix, Laurence Richard, Marie-Odile Jauberteau, Serge Battu, et Fabrice Lalloué. 2016. « TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells ». *Oncotarget* 7 (31): 50349-64. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10387>.
- Pino, Maria S., et Daniel C. Chung. 2010. « The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer ». *Gastroenterology* 138 (6): 2059-72. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- Pisco, A O, et S Huang. 2015. « Non-Genetic Cancer Cell Plasticity and Therapy-Induced Stemness in Tumour Relapse: 'What Does Not Kill Me Strengthens Me' ». *British Journal of Cancer* 112 (11): 1725-32. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.146>.
- Pol, E. van der, F. a. W. Coumans, A. E. Grootemaat, C. Gardiner, I. L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T. G. van Leeuwen, et R. Nieuwland. 2014. « Particle Size Distribution of Exosomes and Microvesicles Determined by Transmission Electron Microscopy, Flow Cytometry, Nanoparticle Tracking Analysis, and Resistive Pulse Sensing ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12 (7): 1182-92. <https://doi.org/10.1111/jth.12602>.
- Ponpuak, Marisa, Michael A Mandell, Tomonori Kimura, Santosh Chauhan, Cédric Cleyrat, et Vojo Deretic. 2015. « Secretory Autophagy ». *Current Opinion in Cell Biology* 35 (août): 106-16. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.016>.
- Raiborg, Camilla, et Harald Stenmark. 2009. « The ESCRT Machinery in Endosomal Sorting of Ubiquitylated Membrane Proteins ». *Nature* 458 (7237): 445-52. <https://doi.org/10.1038/nature07961>.
- Randow, Felix. 2011. « How cells deploy ubiquitin and autophagy to defend their cytosol from bacterial invasion ». *Autophagy* 7 (3): 304-9. <https://doi.org/10.4161/auto.7.3.14539>.
- Ravanan, Palaniyandi, Ida Florance Srikumar, et Priti Talwar. 2017. « Autophagy: The Spotlight for Cellular Stress Responses ». *Life Sciences* 188 (novembre): 53-67. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.029>.
- Reita, Damien, Cyril Bour, Radhia Benbrika, Audrey Groh, Erwan Pencreach, Eric Guérin, et Dominique Guenot. 2019. « Synergistic Anti-Tumor Effect of MTOR Inhibitors with Irinotecan on Colon Cancer Cells ». *Cancers* 11 (10): 1581. <https://doi.org/10.3390/cancers11101581>.
- Reya, Tannishtha, et Hans Clevers. 2005. « Wnt Signalling in Stem Cells and Cancer ». *Nature* 434 (7035): 843-50. <https://doi.org/10.1038/nature03319>.
- Ricci-Vitiani, Lucia, Dario G. Lombardi, Emanuela Pilozzi, Mauro Biffoni, Matilde Todaro, Cesare Peschle, et Ruggero De Maria. 2007. « Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells ». *Nature* 445 (7123): 111-15. <https://doi.org/10.1038/nature05384>.
- Rocha, Sara, Sara Pinto Teles, Mafalda Azevedo, Patrícia Oliveira, Joana Carvalho, et Carla Oliveira. 2019. « Gastric Cancer Extracellular Vesicles Tune the Migration and Invasion of Epithelial and Mesenchymal Cells in a Histotype-Dependent Manner ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11): E2608. <https://doi.org/10.3390/ijms20112608>.
- Russell, Ryan C., Ye Tian, Haixin Yuan, Hyun Woo Park, Yu-Yun Chang, Joungmok Kim, Haerin Kim, Thomas P. Neufeld, Andrew Dillin, et Kun-Liang Guan. 2013. « ULK1

- Induces Autophagy by Phosphorylating Beclin-1 and Activating VPS34 Lipid Kinase ». *Nature Cell Biology* 15 (7): 741-50. <https://doi.org/10.1038/ncb2757>.
- Santé Publique France. 2018. « Estimations régionales et départementales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France, 2007-2016 ». 2018. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/estimations-regionales-et-departementales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-2007-2016>.
- . 2022. « Cancer du colon rectum ». 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum>.
- Sasaki, Kazuhito, Nelson H Tsuno, Eiji Sunami, Giichiro Tsurita, Kazushige Kawai, Yurai Okaji, Takeshi Nishikawa, et al. 2010. « Chloroquine Potentiates the Anti-Cancer Effect of 5-Fluorouracil on Colon Cancer Cells ». *BMC Cancer* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-370>.
- Satar, Nazilah, Kamal Fakiruddin, Moon Lim, Pooi Mok, Norashikin Zakaria, Noor Fakharuzi, Ahmad Abd Rahman, Zubaidah Zakaria, Badrul Yahaya, et Puteri Baharuddin. 2018. « Novel Triple-positive Markers Identified in Human Non-small Cell Lung Cancer Cell Line with Chemotherapy-Resistant and Putative Cancer Stem Cell Characteristics ». *Oncology Reports*, mai. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6461>.
- Savina, Ariel, Claudio M. Fader, María T. Damiani, et María Isabel Colombo. 2005. « Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner ». *Traffic* 6 (2): 131-43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x>.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, et Kevin W. Eliceiri. 2012. « NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis ». *Nature Methods* 9 (7): 671-75. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Schneider, Christoph, Claire E. O'Leary, et Richard M. Locksley. 2019. « Regulation of Immune Responses by Tuft Cells ». *Nature Reviews Immunology* 19 (9): 584-93. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0176-x>.
- Schulpen, Maya, et Piet A. van den Brandt. 2020. « Mediterranean Diet Adherence and Risk of Colorectal Cancer: The Prospective Netherlands Cohort Study ». *European Journal of Epidemiology* 35 (1): 25-35. <https://doi.org/10.1007/s10654-019-00549-8>.
- Schwitalla, Sarah, Alexander A. Fingerle, Patrizia Cammareri, Tim Nebelsiek, Serkan I. Göktuna, Paul K. Ziegler, Ozge Canli, et al. 2013. « Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties ». *Cell* 152 (1-2): 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.012>.
- Scott, Cameron C., Fabrizio Vacca, et Jean Gruenberg. 2014. « Endosome Maturation, Transport and Functions ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Endosome dynamics & Tubulogenesis, 31 (juillet): 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>.
- Sengupta, Shomit, Timothy R. Peterson, et David M. Sabatini. 2010. « Regulation of the MTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress ». *Molecular Cell* 40 (2): 310-22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.026>.
- Shahnazari, Shahab, et John H Brumell. 2011. « Mechanisms and Consequences of Bacterial Targeting by the Autophagy Pathway ». *Current Opinion in Microbiology*, Host-microbe interactions, 14 (1): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.11.001>.
- Shao, Chuchu, Fengming Yang, Suyu Miao, Weitao Liu, Chaoshan Wang, Yongqian Shu, et Hua Shen. 2018. « Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology ». *Molecular Cancer* 17 (1): 120. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0869-y>.

- Shen, Hong, Ling Yin, Ganlu Deng, Cao Guo, Ying Han, Yiyi Li, Changjing Cai, Yaojie Fu, Shanshan Liu, et Shan Zeng. 2018. « Knockdown of Beclin-1 Impairs Epithelial-Mesenchymal Transition of Colon Cancer Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (8): 7022-31. <https://doi.org/10.1002/jcb.26912>.
- Shipitsin, Michail, Lauren L. Campbell, Pedram Argani, Stanislaw Weremowicz, Noga Bloushtain-Qimron, Jun Yao, Tatiana Nikolskaya, et al. 2007. « Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity ». *Cancer Cell* 11 (3): 259-73. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.013>.
- Shmelkov, Sergey V., Jason M. Butler, Andrea T. Hooper, Adilia Hormigo, Jared Kushner, Till Milde, Ryan St Clair, et al. 2008. « CD133 Expression Is Not Restricted to Stem Cells, and Both CD133+ and CD133- Metastatic Colon Cancer Cells Initiate Tumors ». *American Society for Clinical Investigation*. 2 juin 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI34401>.
- Singh, Sheila K., Ian D. Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E. Bonn, Cynthia Hawkins, Jeremy Squire, et Peter B. Dirks. 2003. « Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors ». *Cancer Research* 63 (18): 5821-28.
- Singh, Shikha Satendra, Somya Vats, Amelia Yi-Qian Chia, Tuan Zea Tan, Shuo Deng, Mei Shan Ong, Frank Arfuso, et al. 2018. « Dual Role of Autophagy in Hallmarks of Cancer ». *Oncogene* 37 (9): 1142-58. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0046-6>.
- Snover, Dale C., et Kenneth P. Batts. 2010. « Serrated Colorectal Neoplasia ». *Surgical Pathology Clinics* 3 (2): 207-40. <https://doi.org/10.1016/j.path.2010.05.001>.
- Société canadienne du cancer. 2022. « Chirurgie du cancer colorectal ». Société canadienne du cancer. 2022. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/colorectal/treatment/surgery>.
- Solinge, Thomas S. van, Erik R. Abels, Lieke L. van de Haar, Killian S. Hanlon, Sybren L. N. Maas, Rosalie Schnoor, Jeroen de Vrij, Xandra O. Breakefield, et Marike L. D. Broekman. 2020. « Versatile Role of Rab27a in Glioma: Effects on Release of Extracellular Vesicles, Cell Viability, and Tumor Progression ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 7 (novembre): 554649. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.554649>.
- Son, Sung Min, Moon-Yong Cha, Heesun Choi, Seokjo Kang, Hyunjung Choi, Myung-Shik Lee, Sun Ah Park, et Inhee Mook-Jung. 2016. « Insulin-Degrading Enzyme Secretion from Astrocytes Is Mediated by an Autophagy-Based Unconventional Secretory Pathway in Alzheimer Disease ». *Autophagy* 12 (5): 784-800. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1159375>.
- Song, Ju Han, Seung Hyun Kim, Hyeoung-Joon Kim, Seung Yong Hwang, et Tae Sung Kim. 2008. « Alleviation of the drug-resistant phenotype in idarubicin and cytosine arabinoside double-resistant acute myeloid leukemia cells by indomethacin ». *International Journal of Oncology* 32 (4): 931-36. <https://doi.org/10.3892/ijo.32.4.931>.
- Ståhl, Anne-lie, Ida Arvidsson, Karl E. Johansson, Milan Chromek, Johan Rebetz, Sebastian Loos, Ann-Charlotte Kristoffersson, Zivile D. Békássy, Matthias Mörgelin, et Diana Karpman. 2015. « A Novel Mechanism of Bacterial Toxin Transfer within Host Blood Cell-Derived Microvesicles ». Édité par Steven R. Blanke. *PLOS Pathogens* 11 (2): e1004619. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004619>.
- Stewart, Sheila A., Derek M. Dykxhoorn, Deborah Palliser, Hana Mizuno, Evan Y. Yu, Dong Sung An, David M. Sabatini, et al. 2003. « Lentivirus-Delivered Stable Gene Silencing by RNAi in Primary Cells ». *RNA* 9 (4): 493-501. <https://doi.org/10.1261/rna.2192803>.
- Stuffers, Susanne, Catherine Sem Wegner, Harald Stenmark, et Andreas Brech. 2009. « Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs ». *Traffic* 10 (7): 925-37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>.

- Sun, Qiming, Weiliang Fan, Keling Chen, Xiaojun Ding, She Chen, et Qing Zhong. 2008. « Identification of Barkor as a Mammalian Autophagy-Specific Factor for Beclin 1 and Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (49): 19211-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810452105>.
- Sung, Bong Hwan, Tatiana Ketova, Daisuke Hoshino, Andries Zijlstra, et Alissa M. Weaver. 2015. « Directional Cell Movement through Tissues Is Controlled by Exosome Secretion ». *Nature Communications* 6 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms8164>.
- Suzuki, Kuninori, et Yoshinori Ohsumi. 2007. « Molecular Machinery of Autophagosome Formation in Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae* ». *FEBS Letters* 581 (11): 2156-61. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.096>.
- Szatanek, Rafal, Monika Baj-Krzyworzeka, Jakub Zimoch, Malgorzata Lekka, Maciej Siedlar, et Jarek Baran. 2017. « The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6): 1153. <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>.
- Szvicsek, Zsuzsanna, Ádám Oszvald, Lili Szabó, Gyöngyvér Orsolya Sándor, Andrea Kelemen, András Áron Soós, Krisztina Pálóczi, et al. 2019. « Extracellular Vesicle Release from Intestinal Organoids Is Modulated by Apc Mutation and Other Colorectal Cancer Progression Factors ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (12): 2463-76. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03052-1>.
- Talmadge, James E., et Isaiah J. Fidler. 2010. « AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective ». *Cancer Research* 70 (14): 5649-69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>.
- Tanida, Isei, Takashi Ueno, et Eiki Kominami. 2004. « LC3 Conjugation System in Mammalian Autophagy ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (12): 2503-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>.
- Tauro, Bow J., Rommel A. Mathias, David W. Greening, Shashi K. Gopal, Hong Ji, Eugene A. Kapp, Bradley M. Coleman, et al. 2013. « Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-Derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition ». *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (8): 2148-59. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.027086>.
- Teo, Hsiangling, Olga Perisic, et Roger L Williams. 2004. « ESCRT-II, an Endosome-Associated Complex Required for Protein Sorting: Crystal Structure and Interactions with ESCRT-III and Membranes ». *Developmental Cell*, 11.
- Théry, Clotilde, Sebastian Amigorena, Graça Raposo, et Aled Clayton. 2006. « Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids ». *Current Protocols in Cell Biology* 30 (1): 3.22.1-3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.
- Théry, Clotilde, Matias Ostrowski, et Elodie Segura. 2009. « Membrane Vesicles as Conveyors of Immune Responses ». *Nature Reviews Immunology* 9 (8): 581-93. <https://doi.org/10.1038/nri2567>.
- Théry, Clotilde, Kenneth W Witwer, Elena Aikawa, Maria Jose Alcaraz, Johnathon D Anderson, Ramarosan Andriantsitohaina, Anna Antoniou, et al. 2018. « Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines ». *Journal of Extracellular Vesicles* 7 (1): 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- Thiery, Jean Paul, et Jonathan P. Sleeman. 2006. « Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2): 131-42. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>.

- Todaro, Matilde, Miriam Gaggiani, Veronica Catalano, Antonina Benfante, Flora Iovino, Mauro Biffoni, Tiziana Apuzzo, et al. 2014. « CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis ». *Cell Stem Cell* 14 (3): 342-56. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.009>.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwill, B. Brugger, et M. Simons. 2008. « Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes ». *Science* 319 (5867): 1244-47. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>.
- Twelves, Chris, Alfred Wong, Marek P. Nowacki, Markus Abt, Howard Burris, Alfredo Carrato, Jim Cassidy, et al. 2005. « Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer ». *New England Journal of Medicine* 352 (26): 2696-2704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043116>.
- Urano, Yasuomi, Chinatsu Mori, Ayano Fuji, Keito Konno, Takayuki Yamamoto, Shohei Yashirogi, Mayu Ando, Yoshiro Saito, et Noriko Noguchi. 2018. « 6-Hydroxydopamine Induces Secretion of PARK7/DJ-1 via Autophagy-Based Unconventional Secretory Pathway ». *Autophagy* 14 (11): 1943-58. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1493043>.
- Usfoor, Zohair, Katharina Kaufmann, Al Shahriar Hossain Rakib, Roland Hergenröder, et Victoria Shpacovitch. 2020. « Features of Sizing and Enumeration of Silica and Polystyrene Nanoparticles by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) ». *Sensors* 20 (22): 6611. <https://doi.org/10.3390/s20226611>.
- Uttenweiler, Andreas, et Andreas Mayer. 2008. « Microautophagy in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* ». In *Autophagosome and Phagosome*, édité par Vojo Deretic, 245-59. *Methods in Molecular Biology*TM. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_16.
- Uytterhoeven, Valerie, Elsa Lauwers, Ine Maes, Katarzyna Miskiewicz, Manuel N. Melo, Jef Swerts, Sabine Kuenen, et al. 2015. « Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy ». *Neuron* 88 (4): 735-48. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.012>.
- Valkonen, S., E. van der Pol, A. Böing, Y. Yuana, M. Yliperttula, R. Nieuwland, S. Laitinen, et P. R. M. Siljander. 2017. « Biological Reference Materials for Extracellular Vesicle Studies ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, EU-COST BM-2012 Microvesicles and Exosomes at Health and Disease, 98 (février): 4-16. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.008>.
- Vermeulen, Louis, Felipe De Sousa E Melo, Maartje van der Heijden, Kate Cameron, Joan H. de Jong, Tijana Borovski, Jurriaan B. Tuynman, et al. 2010. « Wnt Activity Defines Colon Cancer Stem Cells and Is Regulated by the Microenvironment ». *Nature Cell Biology* 12 (5): 468-76. <https://doi.org/10.1038/ncb2048>.
- Vestad, Beate, Alicia Llorente, Axl Neurauter, Santosh Phuyal, Bente Kierulf, Peter Kierulf, Tore Skotland, Kirsten Sandvig, Kari Bente F. Haug, et Reidun Øvstebø. 2017. « Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study ». *Journal of Extracellular Vesicles* 6 (1): 1344087. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1344087>.
- « VIDAL, L'intelligence médicale au service du soin ». 2019. VIDAL. 2019. <https://www.vidal.fr/>.
- Villarroya-Beltri, Carolina, Francesc Baixauli, María Mittelbrunn, Irene Fernández-Delgado, Daniel Torralba, Olga Moreno-Gonzalo, Sara Baldanta, Carlos Enrich, Susana Guerra, et Francisco Sánchez-Madrid. 2016. « ISGylation Controls Exosome Secretion by

- Promoting Lysosomal Degradation of MVB Proteins ». *Nature Communications* 7 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms13588>.
- Walcher, Lia, Ann-Kathrin Kistenmacher, Huizhen Suo, Reni Kitte, Sarah Dlucek, Alexander Strauß, André-René Blandszun, Tetyana Yevsa, Stephan Fricke, et Uta Kossatz-Boehlert. 2020. « Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies ». *Frontiers in Immunology* 11 (août): 1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>.
- Wang, Ting, Daniele M. Gilkes, Naoharu Takano, Lisha Xiang, Weibo Luo, Corey J. Bishop, Pallavi Chaturvedi, Jordan J. Green, et Gregg L. Semenza. 2014. « Hypoxia-Inducible Factors and RAB22A Mediate Formation of Microvesicles That Stimulate Breast Cancer Invasion and Metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (31). <https://doi.org/10.1073/pnas.1410041111>.
- Waterhouse, Miguel, Maria Themeli, Hartmut Bertz, Nicholas Zoumbos, Jürgen Finke, et Alexandros Spyridonidis. 2011. « Horizontal DNA Transfer from Donor to Host Cells as an Alternative Mechanism of Epithelial Chimerism after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17 (3): 319-29. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.09.001>.
- Webber, Jason, Vincent Yeung, et Aled Clayton. 2015. « Extracellular Vesicles as Modulators of the Cancer Microenvironment ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Extracellular vesicles: a paradigm shift in how we think about cell-cell communication & Molecular neuroprotection, 40 (avril): 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.013>.
- Wetering, Marc van de, Elena Sancho, Cornelis Verweij, Wim de Lau, Irma Oving, Adam Hurlstone, Eduard Batlle, et al. 2002. « The β -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells », 10.
- WHO. 2020. *WORLD CANCER REPORT: Cancer Research for Cancer Development*. Place of publication not identified: IARC.
- Wolf, Jonas, Dyah Laksmi Dewi, Johannes Fredebohm, Karin Müller-Decker, Christa Flechtenmacher, Jörg D Hoheisel, et Michael Boettcher. 2013. « A Mammosphere Formation RNAi Screen Reveals That ATG4A Promotes a Breast Cancer Stem-like Phenotype ». *Breast Cancer Research* 15 (6): R109. <https://doi.org/10.1186/bcr3576>.
- Wong, Martin C.S., Junjie Huang, Veeleah Lok, Jingxuan Wang, Franklin Fung, Hanyue Ding, et Zhi-Jie Zheng. 2021. « Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 19 (5): 955-966.e61. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.02.026>.
- Wood, David A., Guy F. Robbins, Calvin Zippin, Diana Lum, et Maus Stearns. 1979. « Staging of Cancer of the Colon and Cancer of the Rectum ». *Cancer* 43 (3): 961-68. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197903\)43:3<961::AID-CNCR2820430327>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197903)43:3<961::AID-CNCR2820430327>3.0.CO;2-W).
- Wu, F., H.-D. Xu, J.-J. Guan, Y.-S. Hou, J.-H. Gu, X.-C. Zhen, et Z.-H. Qin. 2015. « Rotenone Impairs Autophagic Flux and Lysosomal Functions in Parkinson's Disease ». *Neuroscience* 284 (janvier): 900-911. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.004>.
- Xu, Jing, Robert Camfield, et Sharon M. Gorski. 2018. « The Interplay between Exosomes and Autophagy – Partners in Crime ». *Journal of Cell Science* 131 (15): jcs215210. <https://doi.org/10.1242/jcs.215210>.
- Xu, Shengnan, Kathryn E. Ware, Yuantong Ding, So Young Kim, Maya U. Sheth, Sneha Rao, Wesley Chan, et al. 2019. « An Integrative Systems Biology and Experimental

- Approach Identifies Convergence of Epithelial Plasticity, Metabolism, and Autophagy to Promote Chemoresistance ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (2): 205. <https://doi.org/10.3390/jcm8020205>.
- Yang, Bolin, Huiru Bai, Yunli Sa, Ping Zhu, et Ping Liu. 2020. « Inhibiting EMT, Stemness and Cell Cycle Involved in Baicalin-Induced Growth Inhibition and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells ». *Journal of Cancer* 11 (8): 2303-17. <https://doi.org/10.7150/jca.37242>.
- You, Xia-Hong, Yu-Huan Jiang, Zhou Fang, Fan Sun, Yao Li, Wei Wang, Zi-Jin Xia, Xiao-Zhong Wang, et Hou-Qun Ying. 2020. « Chemotherapy plus Bevacizumab as an Optimal First-Line Therapeutic Treatment for Patients with Right-Sided Metastatic Colon Cancer: A Meta-Analysis of First-Line Clinical Trials ». *ESMO Open* 5 (2): e000605. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000605>.
- Yu, TaChung, Fangfang Guo, Yanan Yu, Tiantian Sun, Dan Ma, Jixuan Han, Yun Qian, et al. 2017. « *Fusobacterium Nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy ». *Cell* 170 (3): 548-563.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.008>.
- Zavadil, Jiri, Lukas Cermak, Noemi Soto-Nieves, et Erwin P Böttinger. 2004. « Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch Signalling in Epithelial-to-Mesenchymal Transition ». *The EMBO Journal* 23 (5): 1155-65. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600069>.
- Zeuner, Ann, Matilde Todaro, Giorgio Stassi, et Ruggero De Maria. 2014. « Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic ». *Cell Stem Cell* 15 (6): 692-705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.012>.
- Zhang, Min, Samuel J Kenny, Liang Ge, Ke Xu, et Randy Schekman. 2015. « Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion ». Édité par Noboru Mizushima. *eLife* 4 (novembre): e11205. <https://doi.org/10.7554/eLife.11205>.
- Zheng, Ying, Elaine C. Campbell, John Lucocq, Andrew Riches, et Simon J. Powis. 2013. « Monitoring the Rab27 Associated Exosome Pathway Using Nanoparticle Tracking Analysis ». *Experimental Cell Research* 319 (12): 1706-13. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.10.006>.
- Zhong, Yun, Qing Jun Wang, Xianting Li, Ying Yan, Jonathan M. Backer, Brian T. Chait, Nathaniel Heintz, et Zhenyu Yue. 2009. « Distinct Regulation of Autophagic Activity by Atg14L and Rubicon Associated with Beclin 1-Phosphatidylinositol-3-Kinase Complex ». *Nature Cell Biology* 11 (4): 468-76. <https://doi.org/10.1038/ncb1854>.
- Zhou, Jin-Yong, Min Chen, Long Ma, Xiaoxiao Wang, Yu-Gen Chen, et Shen-Lin Liu. 2016. « Role of CD44^{high}/CD133^{high} HCT-116 Cells in the Tumorigenesis of Colon Cancer ». *Oncotarget* 7 (7): 7657-66. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7084>.
- Zou, Wenchong, Mingqiang Lai, Yue Zhang, Lei Zheng, Zhe Xing, Ting Li, Zhipeng Zou, et al. 2019. « Exosome Release Is Regulated by MTORC1 ». *Advanced Science* 6 (3): 1801313. <https://doi.org/10.1002/advs.201801313>.

Annexes

Annexe 1. Classification TNM (8 ^{ème} édition, 2017 ; (Amin <i>et al.</i> 2017); https://www.snfge.org/content/3-cancer-du-colon-non-metastatique	141
Annexe 2. Liste des publications et présentations orales et affichées dans le cadre du projet de thèse	143

**Annexe 1. Classification TNM (8^{ème} édition, 2017 ; (Amin *et al.* 2017);
<https://www.snfge.org/content/3-cancer-du-colon-non-metastatique>**

Tis	Carcinome in situ, tumeur intra-muqueuse envahissant la lamina propria (chorion) sans extension à travers la musculaire muqueuse à la sous-muqueuse
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculature
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonéalisés
T4	Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures et/ou perforant le péritoine viscéral T4a : tumeur perforant le péritoine viscéral * T4b : tumeur envahissant directement des autres organes ou structures de voisinage **
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux *** N1a : métastase dans 1 ganglion lymphatique régional N1b : métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux N1c : nodule(s) (ou) dépôt(s) tumoral(aux) « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonéalisés, sans ganglion métastatique régional ****
N2	Métastases ≥ 4 ganglions lymphatiques régionaux N2a : métastases dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux N2b : métastases dans ≥ 7 ganglions lymphatiques régionaux
M0	Pas de métastase(s) à distance
M1	Métastase(s) à distance M1a : métastase(s) localisée(s) à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) non régionaux) sans métastase péritonéale M1b : métastases atteignant plusieurs organes sans métastase péritonéale M1c : métastase(s) péritonéale(s) avec ou sans métastases d'autres organes

Annexe 2. Liste des publications et présentations orales et affichées dans le cadre du projet de thèse

Publications :

- **Auger C.**, Brunel A., Darbas T., Akil H., Perraud A., Bégaud G., Bessette B., Christou N., Verdier M. (2022). Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis: A different appreciation of up and down secretion. *Int. J. Mol. Sci.*(ISSN 1422-0067)
- Brunel, A., Bégaud, G., **Auger, C.**, Durand, S., Battu, S., Bessette, B., & Verdier, M. (2021). Autophagy and Extracellular Vesicles, Connected to rabGTPase Family, Support Aggressiveness in Cancer Stem Cells. *Cells*, 10(6), 1330. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/cells10061330>
- Christou, N., **Auger, C.**, Battu, S., Lalloué, F., Jauberteau-Marchan, M.-O., Hervieu, C., Verdier, M., *et al.* (2021). Intraperitoneal Chemotherapy for Peritoneal Metastases: Technical Innovations, Preclinical and Clinical Advances and Future Perspectives. *Biology*, 10(3), 225. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/biology10030225>
- **Auger, C.**, Christou, N., Brunel, A., Perraud, A., & Verdier, M. (2021). Autophagy and Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer: Interactions and Common Actors? *Cancers*, 13(5), 1039. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13051039>

Présentations orales :

- **Auger C.**, Brunel A., Perraud A., Mathonnet M., Bessette B., Verdier M., Christou N. – Autophagy alteration and its role in early and late-stage colorectal cancer cells' aggressiveness – 10^{ème} congrès du Club Francophone de l'Autophagie (CFATG), Juin 2022, Besançon
- **Auger C.**, Brunel A., Perraud A., Mathonnet M., Bessette B., Verdier M., Christou N. – Etude des effets d'altérations de l'autophagie sur l'agressivité du cancer colorectal – Congrès du Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Mars 2022, Lyon
- **Auger C.**, Brunel A., Darbas T., Perraud A., Christou N., Bessette B., Verdier M. – Using nanoparticle tracking analysis (NTA) for appreciation of up and down extracellular vesicle secretion – 17th Cancéropôle GSO Annual Meeting, Novembre 2021, Carcassonne
- **Auger C.**, Perraud A., Mathonnet M., Christou N., Verdier M. – Autophagie et sécrétion de vésicules extracellulaires, quel rôle dans le développement du cancer colorectal ? – Congrès du Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Mars 2021 (en ligne)

Posters :

- **Auger C.**, Brunel A., Perraud A., Mathonnet M., Bessette B., Verdier M., Christou N. – Autophagy alteration and its role in promotion of migration by epithelial-mesenchymal transition in early-stage colorectal cancer – 17th Cancéropôle GSO Annual Meeting, Novembre 2021, Carcassonne
- **Auger C.**, Brunel A., Darbas T., Perraud A., Christou N., Bessette B., Verdier M. – Using nanoparticle tracking analysis (NTA) for appreciation of up and down extracellular vesicle secretion – 17th Cancéropôle GSO Annual Meeting, Novembre 2021, Carcassonne
- **Auger C.**, Perraud A., Mathonnet M., Christou N., Verdier M. – Evaluation of the role of autophagy and extracellular vesicles in colorectal cancer stem cells – 16th Cancéropôle GSO Annual Meeting, Novembre 2020 (en ligne)
- **Auger C.**, Hervieu C., Battu S., Mathonnet M., Perraud A., Verdier M. – Autophagie et vésicules extracellulaires dans les cellules souches de cancer colorectal : vers un nouvel outil diagnostique ? – Journée de la Ligue contre le cancer, comité de la Haute-Vienne (87), Novembre 2019, Limoges

Résumé

Le cancer colique représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique à travers le monde, et spécifiquement en Région Nouvelle-Aquitaine où son incidence est supérieure à la moyenne nationale. Les tumeurs coliques, hautement métastatiques sont caractérisées par la présence de cellules souches cancéreuses (CSC), responsables de l'émergence de résistances thérapeutiques. Ces cellules sont en effet capables de survivre dans des conditions drastiques notamment grâce à une autophagie basale élevée, et de garder le contrôle sur leur microenvironnement grâce à la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs). Ces deux processus sollicitant des acteurs communs du trafic vésiculaire, nous avons étudié les effets d'altérations de ces mécanismes dans des cellules de cancer colique par l'utilisation de shRNA ciblant spécifiquement *ATG5* (autophagie) et *RAB27A* (sécrétion d'EVs). Chaque modèle ayant été développé dans deux lignées de cancer colique de stade différent, leur fonctionnalité a été évaluée. La sécrétion d'EVs a été évaluée dans les modèles shRAB27A par « nanoparticle tracking analysis » (NTA). Cette technique ne nous ayant permis d'observer aucune variation de la sécrétion vésiculaire dans nos modèles, une partie de ces travaux a été dédiée à la présentation des limites de l'utilisation d'un tel dispositif dans le cadre de l'évaluation de la sécrétion d'EVs. Des approches complémentaires ont finalement permis d'attester l'altération de ce processus dans les modèles shRAB27A. D'autre part, les modèles shATG5 présentent des capacités migratoires plus importantes dans les stades précoces, contrairement aux stades métastatiques, suggérant une sensibilité différente aux variations de l'autophagie en fonction du stade de cancer colique et du statut mutationnel. Ces résultats seraient donc en faveur d'une agressivité augmentée suite à une autophagie altérée dans les stades précoces. L'analyse par RNAseq n'ayant permis d'identifier de voie expliquant les variations de la migration cellulaire, des investigations plus avancées sont requises dans le cadre de la caractérisation de ces modèles.

Mots-clés : Cancer colique, cellules souches cancéreuses, autophagie, vésicules extracellulaires, migration cellulaire

Abstract

Colon cancer is one of the most important health issues around the world, and particularly in Région Nouvelle-Aquitaine in France, where its incidence is higher than the national average. Moreover, these highly metastatic tumors are characterized by the presence of cancer stem cells (CSC) that are responsible of the emergence of therapeutic resistance. Such cells can survive under drastic conditions, in part due to a high basal autophagy level, and to keep the control on their microenvironment through the secretion of extracellular vesicles (EVs). As these two processes may require some common actors in vesicular trafficking, we focused on the study of alterations of these mechanisms in colon cancer cells using lentiviral shRNAs targeting *ATG5* (autophagy) and *RAB27A* (EVs secretion). Each model was developed in two different colon cancer cell lines, in which the functional features were evaluated. The EVs secretion was assessed in shRAB27A models using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). As this technology did not allow us to detect any significant variation of EVs secretion in these models, a part of these thesis works focused on presenting the limits of the use of such a device to monitor EVs secretion. Some complementary approaches finally allowed us to confirm that EVs secretion was altered in shRAB27A models. On the other hand, shATG5 models showed increased cell migration abilities in early stages compared to late stages, suggesting a different sensitivity toward autophagy variations according to the cancer stage and mutational status. These results may highlight a higher aggressiveness in early-stage colon cancer cells after autophagy alteration. As the RNAseq analysis did not allow us to identify which dedicated pathway is responsible for such observations in cell migration abilities, further investigations are then needed to better characterize these models.

Keywords: Colon cancer, cancer stem cells, autophagy, extracellular vesicles, cell migration

