



Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

INSERM-UMR U1308 CAPTuR - « Contrôle de l'Activation Cellulaire, Progression Tumorale et Résistances thérapeutiques »

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

Présentée et soutenue par
Céline Hervieu

Le Mercredi 6 juillet 2022

**Etude comparative des cellules souches cancéreuses
issues de tumeurs primitives et de métastases
de cancer colorectal**

Thèse dirigée par **Pr Muriel Mathonnet** et **Pr Serge Battu**

Membres du jury :

Corinne Bousquet , DR2, INSERM-UMR U1037, CRCT, Toulouse	Présidente
Céline Gongora , DR2, INSERM U1194, IRCM, Montpellier	Rapportrice
Audrey Ferrand , CR1, INSERM U1220, IRSD, Toulouse	Rapportrice
Mireille Verdier , MCU-HDR, INSERM-UMR U1308, Limoges	Examinatrice
Muriel Mathonnet , PU-PH, CHU - U1308, Limoges	Directrice de thèse
Serge Battu , PU, INSERM-UMR U1308, Limoges	Directeur de thèse



A mes parents,

à ma grande sœur,

à mon Yassou,

à mes grands-parents,

à mes proches...

« Ce qui compte c'est pas l'arrivée, c'est la quête. »
Orelsan

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à l'ensemble des membres du jury. A la présidente de jury **Corinne Bousquet**, ainsi qu'aux rapportrices **Céline Gongora** et **Audrey Ferrand** pour avoir accepté de consacrer du temps dans l'évaluation de mes travaux de thèse. Je vous remercie pour votre compréhension concernant l'organisation de cette soutenance de thèse et le léger retard de mon manuscrit. Je tiens également à adresser toute ma reconnaissance aux examinateurs de ce jury **Mireille Verdier**, **Muriel Mathonnet** et **Serge Battu**. Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, **Muriel et Serge**, pour m'avoir accordé votre confiance et donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein du laboratoire. Je nous revois en entretien skype pour ma candidature à ce projet, il y a maintenant 4 ans, et à notre première rencontre Serge juste après mon audition pour les bourses doctorales. Merci de m'avoir laissée cette (trop) grande autonomie, j'ai beaucoup appris sur moi-même, malgré que ça fasse peur parfois. Je tiens également à te remercier **Mireille** pour ton soutien et pour tes nombreux conseils en tant que statutaire et amie mais aussi directrice de l'ED. Merci d'avoir acceptée de faire l'expérience *in vivo* avec moi, car sans toi elle n'aurait surement pas eu lieu. Merci de m'avoir encadrée pendant ce tutorat, d'avoir acceptée de réaliser les gestes que je ne me sentais pas apte à réaliser et de t'être rendue disponible pour moi. Je te remercie également pour tes précieux retours et conseils sur l'article.

Je souhaite également remercier toutes les personnes de l'UMR-INSERM U1308, qui restera pour moi EA3842 CAPTuR. Merci à l'ancienne directrice, **Marie-Odile**, et au nouveau directeur de ce labo, **Fabrice**, toujours disponibles quand j'ai eu besoin de votre aide ou de signatures. Merci **Fabrice** pour ces discussions intéressantes, pour vos conseils sur les congrès et votre compréhension malgré toutes mes péripéties dont mes frais d'inscription jamais remboursés d'un congrès qui n'a pas eu lieu à cause du Covid-19. Je tiens également remercier l'ensemble des statutaires de l'équipe : **Gaëlle**, **Aurélie**, **Barbara**, **François**, **Thomas**, **Stéphanie**, **Nikki**, **Anne-Marie** et **Philippe**. Merci **Gaëlle** pour ton aide et ta pédagogie pour m'expliquer la SdFFF avec **Serge**, et merci pour tes relectures méticuleuses de mon manuscrit de thèse. Merci à toi également **Aurélie** pour m'avoir accordé du temps à mon arrivée dans l'équipe avec **Sabrina**, la team CCR, et merci pour le super bureau. Merci **Anne-Marie** pour ta réactivité dans les réservations, je t'ai beaucoup sollicité pour peu de congrès au final mais l'EACR arrive et je tiens vraiment à te remercier pour ton aide. J'adresse mes remerciements aux services d'**anatomopathologie du CHU de Limoges**, ainsi qu'aux membres

du **service animalier** et l'ensemble des **plateformes et plateaux techniques de l'Université de Limoges**. Merci aux anciens post-doctorants de l'équipe, **Sofiane** et **Hafidha**. **Sofiane**, tu as été la première personne de l'EA3842 que j'ai rencontrée et tu m'as montré dès le début toute ta bienveillance en me proposant de m'installer en salle de pause en attendant **Serge** à mon premier jour. Merci pour tous tes précieux conseils scientifiques notamment en cytométrie, et pour toutes ces discussions. Merci aux anciens doctorants de l'équipe : **Sabrina, Hugo, Axel, Eric, Camille, Marine** et **Tarek**. Merci **Sabrina** de m'avoir encadrée à mon arrivée au labo et d'avoir pris de ton temps pour me montrer l'organisation du labo. Merci pour toutes ces discussions dans le bureau CCR (avec ou sans chaussures ;)) et dans le labo souvent avec nos suédois **Hugo** et **Axel**. Merci à l'ancienne team openspace **Eric, Camille, Marine** et **Tarek** pour nos soirées en début de thèse et pour nos discussions. Je remercie également les doctorants du bureau ADPLim. Merci aux doctorants actuels (enfin on devrait plutôt dire doctorantes) : **Elodie, Clément, Aude, Léa, Boutaina, Héloïse, May** et **Charlotte**. Je vais commencer par mon musicien du dimanche ou plutôt de toute la semaine, **Clem**. Merci pour ses moments dans notre bureau, team CCR rpz, et en dehors. On ne rappellera pas l'épisode d'un lendemain de soirée au labo (enfin si du coup car c'est quand même mémorable) mais on se passera des détails... Merci d'avoir été là du début à la fin sans aucune embrouille. Il va me manquer notre bureau complètement perdu au fond du labo. Je me rappelle de nos décomptes de fin de semaine pour justifier nos « pétages » de câbles, mais qui en fin de thèse commençait dès le lundi... Merci **Clem** et petite pensée pour **Estelle** bien évidemment, il faut qu'on se refasse une soirée Chez Nanard tous les quatre (ou pas). Merci à la nouvelle team openspace, **Léa, Héloïse, Boutaina** et **May**, vous avez apporté de la fraîcheur en arrivant au labo et ça fait plaisir (même si elle a déjà un peu diminué depuis). Bonne continuation dans la suite de vos thèses. Merci à **Aude** et **Charlotte** pour les discussions, bon courage **Charlotte** pour prendre la suite de ce projet (t'inquiètes il y a encore du taff). Je garde la meilleure pour la fin : **Elo**, MERCI ! Un grand et énorme merci pour tout. Tu m'as énormément apporté personnellement et professionnellement, tu es mon coup de cœur de la thèse, mon binôme. Je ne sais pas comment j'aurai fait sans toi. Tu as toujours été là, tu m'as écouté me plaindre un peu puis beaucoup vers la fin et tu m'as toujours soutenue. J'ai beaucoup évolué grâce à toi, tu as vraiment été un pilier dans cette thèse. Merci pour toutes ces discussions au labo en arrivant ou en repartant, et en dehors lors de nos soirées chill & switch. Merci également pour toutes tes relectures et tes corrections du manuscrit si précieuses. Même si je quitterai Limoges, je serai là de près ou de loin pour te soutenir jusqu'à la fin de ta thèse et peut-être qu'on se retrouvera dans la même ville un jour, en France

ou à l'étranger. Je te souhaite plein de belles choses par la suite, que ça soit perso ou pro, tu le mérites. De toute façon, cette amitié est faite pour perdurer, PS : Love you. Quand je parle d'**Elo**, je pense également à ma **Tiff**. Merci de m'avoir incluse dans votre duo et merci pour toutes ces soirées papotages et grignotages. Merci pour ce super weekend à Toulouse et pour celui dans ma Normandie natale, c'était inoubliable ! Bien évidemment, j'espère tout autant te recroiser plus tard et faire perdurer ses weekends toutes les trois aussi souvent que possible. D'ailleurs on doit bloquer notre weekend à Paname. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite dans votre belle maison et avec Fofò. Merci à l'ensemble des stagiaires qui sont venues au labo, mention spéciale pour **Alice** et **Marie**. Ma première expérience d'encadrement avec toi **Alice**, un stage de master 2 c'est long et court à la fois. En tout cas, j'espère ne pas t'avoir trop dégoutée de la recherche ;) et je te souhaite une bonne continuation pour la suite. **Marie**, tu as fait partie de la team CCR toi aussi, merci pour ces moments de partage dans le bureau PS : n'oublie pas ton chargeur en partant.

Je tiens à remercier mes amis pour les moments de partages passés ensemble. Merci au groupe des copines : **Solène, Lara, Marianne, Maïlys, Charlotte, Anissa, Lola, Juliette** et **Margaux**, pour nos weekends à Paris, à Nantes et à Pornichet. On se retrouve vite pour fêter nos 10 ans du bac. Mention spéciale à ma **Soso** et ma **Laraou** pour votre soutien et nos discussions, notre amitié m'est tellement précieuse. Merci au groupe de copains de Thaon : **Hugo, Ben (et Louise), Nicolas, Valentin (et Floriane), Simon (et Sabrina) et Clément (et Julie)** pour nos weekends et surtout les vacances camping. On remet ça cet été. Merci aux copains du bad, mes Limougeauds, **Chloé, Justine, Marie, Séb, Jérôme, Guillaume** et plus récemment **Tiphaine, Olivier et Zach** pour toutes ces soirées, interclubs et tournois. Hâte d'être à notre weekend détente en août.

Je tiens également à remercier ma famille pour leur soutien sans faille tout au long de cette thèse. MERCI à mes parents, **Nath et Fifi**, de m'avoir soutenue dans mes choix même ceux qui m'éloignés bien loin de Caen. Merci d'avoir toujours été là pour mes déménagements, on en a chargé des voitures et des camions jusqu'à la thèse (et ce n'est pas fini). Merci de m'avoir aidé, supporté et permis de continuer mes études un peu partout, Montpellier, Cambridge, Paris et Limoges. Je suis fière de ce que je suis devenue et c'est en grande partie grâce à vous. Merci également à ma grande sœur, **Marine**, pour ton soutien et ton amour. Merci pour toutes ces discussions et ce partage depuis toutes petites. Merci de m'avoir emmenée avec toi au Sénégal. C'était une expérience tellement enrichissante qu'on est pas prêtes d'oublier. Merci d'avoir toujours été là dans les bons comme dans les moins bons moments. Je serai toujours là pour toi et papa et maman. Je souhaite remercier également mes **tatas et tontons** de la manche et du calvados ainsi que mes **cousins et**

cousines et même mes **petit-cousins et petite-cousines** ; oui je cherche encore. En écrivant ce manuscrit, j'ai forcément une pensée pour mes grands-parents, qui je l'espère seraient fières de moi. Un grand merci à toi, **Yassine**, pour ton soutien à toutes épreuves. Merci d'être venu jusqu'à Limoges, ça aurait été tellement plus compliqué sans toi, le début de notre « vraie » vie de grands. Merci d'avoir toujours été là, surtout sur la fin de thèse où j'en ai eu le plus besoin. Tu m'as beaucoup appris, personnellement et professionnellement. Merci pour tous tes petits plats et de m'avoir laissé ton bureau pendant la rédaction. Et surtout merci d'avoir adopté notre **Yuka** adorée, dite Yukyuk. Mille mercis.

Pour clôturer ces remerciements, je tiens à remercier encore une fois toutes ces personnes et plus globalement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse.

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

Table des illustrations.....	12
Table des tableaux.....	13
Liste des abréviations.....	14
Préambule.....	16
Chapitre I. Le cancer colorectal.....	17
I.1. Le côlon.....	17
I.1.1. Anatomie et fonctions du côlon.....	17
I.1.2. Histologie de la paroi colique.....	17
I.1.3. Organisation des cryptes coliques : les cryptes de Lieberkühn.....	18
I.1.3.1. Compartiment des cellules souches.....	19
I.1.3.2. Compartiment des cellules progénitrices.....	21
I.1.3.3. Compartiment des cellules différenciées.....	21
I.2. Le cancer colorectal.....	22
I.2.1. Données épidémiologiques sur le cancer colorectal.....	22
I.2.2. Différentes formes du cancer colorectal : sporadique ou héréditaire.....	23
I.2.3. La cancérogénèse colorectale.....	25
I.2.3.1. La voie conventionnelle de l'instabilité chromosomique (CIN).....	26
I.2.3.2. La voie de la méthylation des îlots CpG (CIMP).....	27
I.2.3.3. La voie d'instabilité des microsatellites (MSI).....	28
I.2.3.4. Les cinq sous-types moléculaires de cancers colorectaux.....	28
I.2.3.5. Les principaux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs.....	29
I.2.3.5.1. Inactivation mutationnelle des gènes suppresseurs de tumeurs.....	30
I.2.3.5.2. Activation des voies des oncogènes.....	32
I.2.3.6. Les différents modèles de cancérogénèse.....	33
I.2.3.6.1. Modèle stochastique.....	34
I.2.3.6.2. Modèle des cellules souches cancéreuses.....	34
I.2.3.6.3. Modèle de plasticité cellulaire.....	36
I.2.4. Les différentes classifications des cancers colorectaux.....	36
I.2.4.1. Classification selon le stade tumoral.....	37
I.2.4.2. Classification selon le grade tumoral.....	39
I.2.4.3. Classification selon les caractéristiques moléculaires.....	42
I.2.5. Les stratégies thérapeutiques des cancers colorectaux.....	44
I.2.5.1. Résection chirurgicale.....	44
I.2.5.2. Thérapie systémique : chimiothérapies.....	45
I.2.5.3. Thérapies ciblées et immunothérapie.....	48
Chapitre II. Les cellules souches cancéreuses colorectales.....	55
II.1. Les cellules souches cancéreuses colorectales.....	55
II.1.1. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses.....	55
II.1.2. Origine des cellules souches cancéreuses.....	55
II.2. Les méthodes d'isolement des cellules souches cancéreuses.....	56
II.2.1. Méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques.....	56
II.2.2. Méthodes basées sur des caractéristiques fonctionnelles.....	57
II.2.3. Méthodes basées sur des caractéristiques biophysiques.....	59
II.3. La pertinence clinique des cellules souches cancéreuses.....	60

II.3.1. Mécanismes de résistance attribués aux cellules souches cancéreuses	60
II.3.2. Ciblage thérapeutique des cellules souches cancéreuses	61
Revue Hervieu <i>et al.</i> , 2021	63
Objectifs	64
Résultats	65
Article Hervieu <i>et al.</i> , 2022	67
Discussion & perspectives.....	68
Conclusion	76
Références bibliographiques	77

Table des illustrations

Figure 1. Anatomie du côlon et de la paroi colique.	17
Figure 2. Organisation cellulaire des cryptes de Lieberkühn.	19
Figure 3. Incidence et nombre de décès par cancer en France, en 2018.	23
Figure 4. Les trois principales voies moléculaires du cancer colorectal.	25
Figure 5. Mécanismes d'initiation et de progression tumorale du cancer colorectal.	27
Figure 6. Sous-types de cancer colorectal classés selon leurs phénotypes, leurs statuts mutationnels et de méthylation.	29
Figure 7. Comparaison du modèle hiérarchique et du modèle de plasticité cellulaire.	35
Figure 8. Stades du cancer colorectal selon le degré d'envahissement de la paroi colique.	38
Figure 9. Proportion et survie à 5 ans en fonction des stades de cancers colorectaux.	47
Figure 10. Classes de traitements utilisés pour les cancers colorectaux métastatiques.	48
Figure 11. Les caractéristiques des tumeurs et leur potentiel ciblage thérapeutique.	49
Figure 12. Avantages et inconvénients des modèles utilisés pour identifier les CSCC.	58
Figure 13. Tri cellulaire par la technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation.	59
Figure 14. Résistance aux thérapies systémiques des cellules souches cancéreuses.	61

Table des tableaux

Tableau 1. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs associés au cancer colorectal. .30	
Tableau 2. Classification clinique TNM des cancers colorectaux, 8 ^{ème} édition.....38	
Tableau 3. Stades des cancers colorectaux selon la classification TNM.39	
Tableau 4. Systèmes de classification histopathologique des cancers colorectaux.....40	
Tableau 5. Classification CMS des cancers colorectaux.43	
Tableau 6. Principales chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal. ...45	
Tableau 7. Principales thérapies ciblées utilisées dans le traitement du cancer colorectal...51	
Tableau 8. Principales immunothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal. .52	

Liste des abréviations

5-FU : 5-Fluorouracile

-A-

ABC : ATP-binding cassette

AJCC : american joint committee on cancer

ALDH1 : aldéhyde déshydrogénase 1

APC : adenomatous polyposis coli

-B-

BMP : bone morphogenic proteins

-C-

CAM : membrane chorioallantoïque de poulet

CAPOX : capecitabine, oxaliplatine

CBC : crypt base columnar

CCR : cancer colorectal

CIMP : voie de la méthylation des îlots CpG

CIN : instabilité chromosomique

CMS : consensus molecular subtypes

CSC : cellules souches cancéreuses

CSCC : cellules souches cancéreuses colorectales

-D-

dMMR : déficience du système MMR

-E-

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epithelial growth factor receptor

-F-

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FOLFIRI : 5-FU, LV, irinotecan

FOLFIRINOX : 5-FU, LV, oxaliplatine, irinotecan

FOLFOX : 5-FU, LV, oxaliplatine

-I-

INCa : institut national du cancer

IUCC : international union against cancer

-L-

LV : leucovorine

-M-

MACS : magnetic-activated cell sorting

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MDM (2 et 4) : murine double minute 2/4

MEC : matrice extracellulaire

MET : microenvironnement tumoral

MLH1 : mutL homolog 1

MMR : réparation des mésappariements de l'ADN

MRM : maladie résiduelle minimale

MSH2 : mutS homolog 2

MSI : instabilité des microsatellites

MSS : stabilité des microsatellites

-O-

OMS : organisation mondiale de la santé

-P-

PAF : polypose adénomateuse familiale liée à APC

PD-1 : programmed death 1

PDC : poorly differentiated clusters

PD-L1 : programmed cell death ligand 1

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

pTNM : pathology tumor nodes metastasis

-S-

SAR : survie après récurrence

SCNA : Somatic copy number alteration

SdFFF : fractionnement par couplage flux-force de sédimentation

SEER : Surveillance, Epidemiology, and End Results Program

SG : survie globale

SSP : survie sans progression

SSR : survie sans récurrence

-T-

TA : transit-amplifying

TP : total peak

-V-

VEGF : vascular endothelial growth factor

Préambule

Le cancer colorectal est l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde. Les progrès thérapeutiques réalisés au cours des dernières décennies ont permis l'amélioration considérable de la qualité de vie des patients et de leur taux de survie. Toutefois, malgré un traitement curatif bien conduit, les récurrences surviennent dans 80% des cas, au cours des 3 ans qui suivent le traitement initial. Ces récurrences sont le plus souvent associées au développement de résistance aux thérapies. Les cellules les plus indifférenciées de la masse tumorale, les cellules souches cancéreuses, sont responsables des échecs thérapeutiques à l'origine des récurrences ainsi que de la survenue de métastases, principales causes des décès liés au cancer. Les cellules souches cancéreuses représentent donc une cible thérapeutique prometteuse.

Isoler cette sous-population cellulaire représente un réel défi en raison de leur faible proportion au sein de la tumeur ainsi que de leur nature dynamique. La technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation offre l'opportunité de décomposer les sous-populations cellulaires présentes au sein d'un échantillon biologique, en fonction de leurs propriétés biophysiques, et d'analyser individuellement leurs réponses aux thérapies. Cette méthode permet ainsi d'étudier, sans *a priori*, l'hétérogénéité cellulaire intratumorale dont les cellules souches cancéreuses. La transition entre le stade précoce et le stade métastatique étant particulièrement cruciale pour les patients atteints de cancer colorectal, l'étude de ces cellules à partir de tumeurs primaires et de métastases reste peu documentée.

Mon projet de thèse a porté sur l'étude des cellules souches cancéreuses, issues de tumeurs primitives et de métastases de cancer colorectal, et la comparaison de leurs caractéristiques ainsi que leurs réponses aux chimiothérapies. Ces travaux ont permis l'identification d'une sous-population cellulaire possédant des caractéristiques de cellules souches cancéreuses, notamment la capacité à générer des tumeurs *in vivo* et la chimiorésistance *in vitro*, à partir de lignées cellulaires et de cultures primaires de stades précoces et avancés. *In fine*, cette approche « label-free » offre de nouvelles perspectives afin de tester des thérapies sur chaque sous-population cellulaire tumorale et ainsi apporter de nouvelles pistes pour une thérapie plus personnalisée.

Chapitre I. Le cancer colorectal

I.1. Le côlon

I.1.1. Anatomie et fonctions du côlon

Le côlon forme la partie terminale du système gastro-intestinal avec le rectum et l'anus. Le côlon se décompose en quatre segments : le côlon droit ou ascendant, le côlon transverse, le côlon gauche ou descendant et le côlon sigmoïde, comme illustré dans la Figure 1.

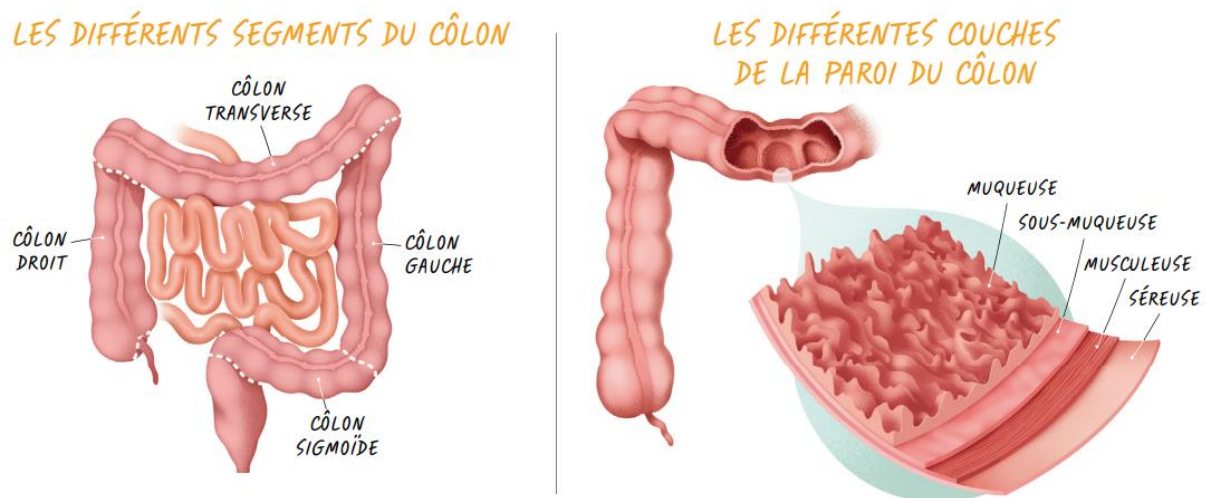


Figure 1. Anatomie du côlon et de la paroi colique.
(D'après le Guide patients – Les traitements des cancers du côlon, Institut national du cancer. Illustrations de Pierre Bourcier)

Le côlon a trois fonctions principales : absorber l'eau et les électrolytes des résidus alimentaires indigestes, produire et absorber des vitamines et enfin former et propulser les matières fécales vers le rectum pour leur élimination (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017). L'évacuation du contenu colique est facilitée par un mouvement mécanique coordonné en forme de vague, appelé péristaltisme, et par la présence de mucus.

I.1.2. Histologie de la paroi colique

La paroi du côlon est composée de quatre couches successives qui sont, de l'extérieur vers la lumière du côlon, (Figure 1) :

- La séreuse, la couche la plus externe de la paroi colique, constitue une partie du péritoine viscéral. Elle est composée de tissu conjonctif et de cellules épithéliales squameuses, le mésothélium (Siri et al., 2020).

- La musculature, *muscularis propria*, est composée de deux couches de muscles lisses, une couche musculaire circulaire interne et une couche musculaire longitudinale externe. Entre ces deux couches musculaires se situe le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach) qui est l'un des deux principaux plexus nerveux entériques. Les rôles de ce plexus sont principalement le contrôle de la motilité digestive et du péristaltisme mais aussi le renouvellement du mucus (Herath et al., 2020).
- La sous-muqueuse est constituée d'une couche de tissu conjonctif fibreux qui entoure la muqueuse. Elle contient les principales branches des vaisseaux sanguins et lymphatiques, qui alimentent le côlon, et le plexus de Meissner (ou plexus sous-muqueux), qui contrôle les sécrétions glandulaires et régule la configuration de la surface luminale ainsi que le débit sanguin local (Siri et al., 2020).
- La muqueuse est la couche la plus interne du côlon, c'est-à-dire la surface luminale du côlon. Elle est sous-divisée en trois couches : une fine couche musculaire appelée *muscularis mucosae*, une couche de tissu conjonctif appelée *lamina propria* et enfin d'une fine couche de cellules épithéliales formant un épithélium simple unistratifié. L'épithélium intestinal constitue la plus grande barrière épithéliale de l'organisme, où se déroulent les processus d'absorption et de sécrétion. Ces processus sont favorisés par la surface de l'épithélium qui est décuplée en raison des invaginations appelées cryptes (Siri et al., 2020).

I.1.3. Organisation des cryptes coliques : les cryptes de Lieberkühn

Dans le côlon, la surface épithéliale est entrecoupée de cryptes, appelées cryptes de Lieberkühn. Ces cryptes possèdent trois compartiments cellulaires distincts : les cellules souches indifférenciées, les cellules progénitrices et les cellules différenciées (Figure 2). Les cellules souches sont localisées au fond des cryptes de l'épithélium colique puis migrent le long de ces cryptes et se différencient en cellules progénitrices, qui elles-mêmes se différencient en cellules spécialisées matures au niveau de la lumière de l'épithélium. L'épithélium colique est fortement dépendant de l'approvisionnement continu de tous ces types cellulaires afin de protéger le moteur du renouvellement : les cellules souches (Gehart and Clevers, 2019).

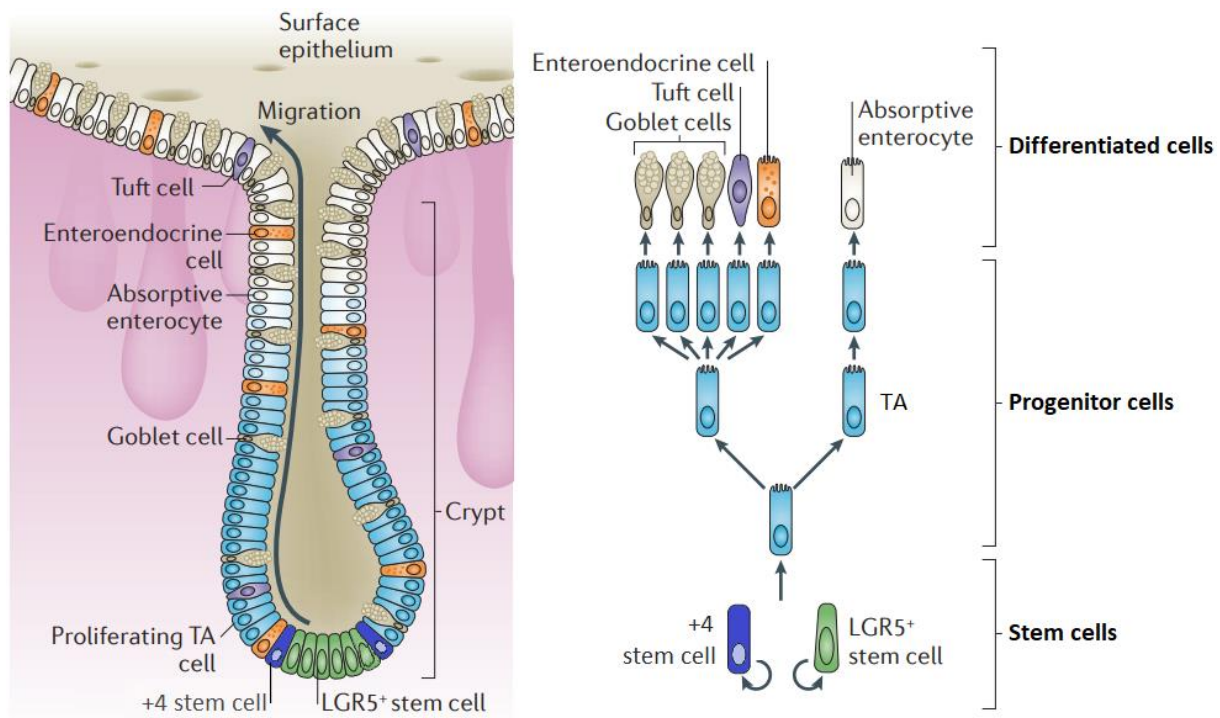


Figure 2. Organisation cellulaire des cryptes de Lieberkühn.

(Adapté de Barker, 2014)

I.1.3.1. Compartiment des cellules souches

Les cellules souches jouent un rôle fondamental dans le renouvellement de l'épithélium colique du fait de leur capacité à se différencier en tous les types de cellules spécialisées du côlon. L'identité des cellules capables de contribuer au processus de régénération a fait l'objet d'intenses recherches. Historiquement, deux grands types de cellules souches ont été identifiés :

- **Les cellules « crypt base columnar » (CBC)** ont été décrites pour la première fois en 1974 et considérées à l'origine comme des cellules à cycle continu au fond des cryptes (Cheng and Leblond, 1974). La preuve que les CBC sont des cellules souches a été apportée plus tard grâce aux progrès technologiques (Bjerknes and Cheng, 1999; Winton et al., 1988). L'utilisation de souris génétiquement modifiées a permis de mettre en évidence que les cellules LGR5⁺ présentes au fond de cryptes correspondent aux CBC (Figure 2) (Barker et al., 2007). Ces publications ont prouvé que les cellules CBC LGR5⁺ ont la capacité de générer des cellules de lignées multiples et de s'autorenouveler à long terme, ces deux propriétés étant celles de cellules souches.

- **Les cellules en position +4**, c'est-à-dire localisées entre le compartiment de cellules souches et celui de cellules progénitrices (Figure 2), sont des « label-retaining cells » ce qui était initialement considéré comme une caractéristique de cellules souches (Potten et al., 1978, 2002). Par la suite, des marqueurs de ces cellules en position +4 ont été identifiés comme *Bmi1*, *Tert*, *Hopx* et *Lrig1* (Montgomery et al., 2011; Sangiorgi and Capecchi, 2008; Takeda et al., 2011; Wong et al., 2012). Même si la contribution des cellules en position +4 à l'homéostasie tissulaire est controversée, leur rôle dans la régénération épithéliale induite par une lésion a été bien documentée.

Que ce soient les CBC ou les cellules en position +4, ces cellules souches sont localisées au fond des cryptes et résident au sein d'une niche qui joue un rôle de protection (Gehart and Clevers, 2019). La niche est un espace limité qui permet le maintien des propriétés « souche ». En effet, dès qu'une cellule souche quitte la niche, elle perd son caractère « souche » mais peut le réacquérir en intégrant à nouveau la niche (Gehart and Clevers, 2019). Ainsi, la progéniture des cellules souches est en compétition pour occuper la niche, connue sous le nom de « concurrence neutre », et le nombre de cellules souches va donc dépendre de l'espace disponible (Batlle and Clevers, 2017). La niche est constituée à la fois d'une composante épithéliale et mésenchymateuse incluant : la matrice extracellulaire (MEC), les myofibroblastes, les fibroblastes ainsi que les cellules endothéliales, neurales et musculaires lisses (Meran et al., 2017). Les fibroblastes entourant les cryptes peuvent également contrôler le comportement des cellules souches intestinales mais les signaux qu'ils délivrent peuvent être altérés en cas d'inflammation et entraîner une dérégulation des cellules souches, pouvant induire leur transformation en cellules initiateuses de cancer (Onfroy-Roy et al., 2021). Une inflammation chronique peut aussi impacter les propriétés mécaniques de la MEC et participer au développement et à la progression du CCR (Onfroy-Roy et al., 2020). Ainsi, le devenir des cellules est fortement régulé par l'ensemble des composants de la niche, *via* quatre principales voies de signalisation :

- La voie WNT/ β -caténine joue un rôle fondamental dans le maintien de l'état indifférencié et dans l'autorenouvellement des cellules souches (Batlle and Clevers, 2017). Cette voie régule également la prolifération et le destin cellulaire, et est indispensable à l'homéostasie tissulaire.

- La voie Notch bloque la différenciation des cellules souches vers la lignée sécrétoire, ce qui permet de maintenir les cellules souches au fond des cryptes et de réguler le ratio entre les descendances sécrétoire et absorbante (De Sousa E Melo and de Sauvage, 2019).
- La signalisation liée à l'EGF (*Epidermal growth factor*) contrôle la prolifération cellulaire et donc le renouvellement de l'épithélium (Gehart and Clevers, 2019).
- La voie des BMP (*Bone morphogenic proteins*) est impliquée dans la différenciation cellulaire. La niche sécrète des inhibiteurs de BMP pour protéger les cellules souches, ce qui crée un gradient avec une activité faible au fond des cryptes et plus élevée à la surface de l'épithélium (Meran et al., 2017).

Lorsque les signaux associés à ces quatre voies de signalisation sont fournis à des cellules progénitrices *in vitro*, ces cellules redeviennent rapidement des cellules souches, soulignant leur importance dans le maintien du caractère « souche » (Batlle and Clevers, 2017).

I.1.3.2. Compartiment des cellules progénitrices

Les cellules souches coliques génèrent des cellules progénitrices hautement prolifératives, appelées « transit-amplifying (TA) cells ». La production des cryptes est largement déterminée par l'activité proliférative de ces cellules (Clevers, 2013). Les cellules TA naissantes se divisent quelques fois avant de s'engager progressivement vers une lignée spécifique de cellules différenciées (absorbantes ou sécrétoires), tout en migrant vers la base de la crypte (Barker, 2014). Une fois à la base de la crypte, les cellules TA vont cesser de proliférer et donner naissance à un type de cellule différenciée (Figure 2).

I.1.3.3. Compartiment des cellules différenciées

Les cellules différenciées sont divisées en lignées absorbantes avec les entérocytes d'absorption (ou colonocytes), et en lignées sécrétoires avec les cellules caliciformes (ou « goblet cells »), les cellules entéro-endocrines et les cellules Tuft (Gehart and Clevers, 2019). Les colonocytes sont les cellules différenciées les plus abondantes (Barker, 2014). Les cellules différenciées remplissent des fonctions essentielles et variées, notamment l'absorption des nutriments pour les entérocytes qui sont en contact direct avec la lumière intestinale, la sécrétion de mucus concernant

les cellules calciformes, le contrôle métabolique pour les cellules entéro-endocrines et la régulation immunitaire par les cellules Tuft (Gehart and Clevers, 2019).

De par cette diversité cellulaire, l'homéostasie colique est finement régulée mais dépend de l'approvisionnement continu de tous les types cellulaires dans des proportions appropriées. L'altération de cet équilibre peut mener au développement d'un cancer.

I.2. Le cancer colorectal

I.2.1. Données épidémiologiques sur le cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est un des cancers les plus fréquents dans le monde. En France, le CCR a touché plus de 43 000 personnes et a causé environ 17 000 décès en 2018, selon l'Institut national du cancer (INCa, e-cancer.fr). En termes d'incidence, le CCR est le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et le deuxième chez la femme, comme illustré dans la Figure 3. D'après les chiffres de l'INCa, le CCR est la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme et le troisième chez la femme (Figure 3). Le taux de survie net standardisé à 5 ans des personnes diagnostiquées entre 2010 et 2015 est de 63%.

En France, une campagne de dépistage a été mis en place, basée sur la détection de sang dans les selles à partir d'un immunotest, et proposé à tous les sujets de plus de 50 ans. Malheureusement, seule 30% de la population cible réalise cet examen alors que le dépistage précoce du CCR est un élément essentiel dans la survie des patients. Les principaux facteurs de risque du CCR sont : l'âge, le style de vie (alcool, tabac, alimentation, surpoids et obésité, inactivité physique, etc.), la présence de polypes ainsi que des antécédents personnels (tels que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) ou familiaux (maladies héréditaires). Les facteurs environnementaux vont favoriser le développement d'un cancer dit « sporadique » alors que les antécédents familiaux peuvent être associés à un cancer dit « héréditaire ».

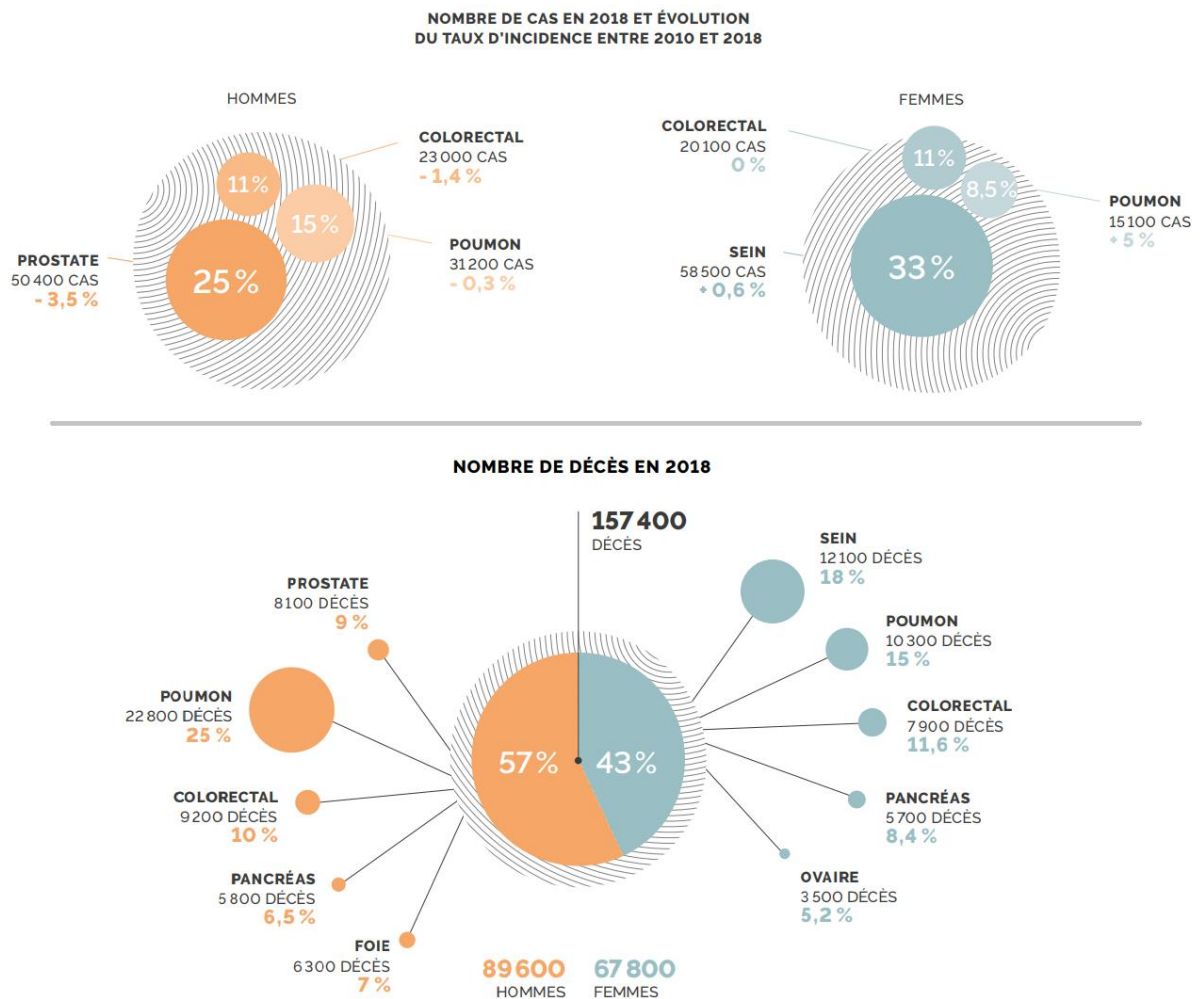


Figure 3. Incidence et nombre de décès par cancer en France, en 2018.
(D'après Panorama des cancers en France - Edition 2022, Institut national du cancer)

I.2.2. Différentes formes du cancer colorectal : sporadique ou héréditaire

Les cancers sporadiques représentent la majorité des cas de CCR, 75-80%. Les CCR associés à des antécédents familiaux correspondent à 20-25% des cas, et seulement 2 à 5% d'entre eux sont des cancers héréditaires (Bibeau et al., 2020).

Les formes héréditaires de CCR sont dues à une altération monogénique, le plus souvent à transmission autosomique dominante (Buecher, 2010). Il existe plusieurs types de CCR héréditaires : ceux sans polypose, comme le syndrome de Lynch ; et ceux avec polypose, notamment les polyposes adénomateuses. La polypose se caractérise par la présence de plusieurs polypes, c'est-à-dire des petites excroissances se développant aux dépens de la muqueuse du côlon ou du rectum. Les polypes sont très fréquentes dans la population générale et le plus souvent

asymptomatiques (Koessler et al., 2016). Il s'agit généralement de lésions bénignes, toutefois, les polypes dentelés et les polypes adénomateux peuvent dégénérer en cancer. La polypose adénomateuse familiale (PAF) liée à *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*) est l'un des syndromes héréditaires les plus connus et représente moins d'1% des cancers héréditaires du côlon. La PAF est une maladie autosomique dominante liée à une mutation constitutionnelle du gène *APC*, c'est-à-dire avec une copie de ce gène suppresseur de tumeur inactivée (Ferron et al., 2005). L'étape majeure de la cancérogénèse colique étant l'inactivation des deux copies d'*APC*, le développement d'un CCR est donc plus rapide avec un risque proche de 100% (Ferron et al., 2005). Les CCR héréditaires peuvent également se développer sans polypose préalable, c'est le cas notamment du syndrome de Lynch (« hereditary non polyposis colorectal cancer ») qui est la forme la plus fréquente de prédisposition héréditaire au CCR, représentant 1 à 4% de l'ensemble des CCR (Bibeau et al., 2020). La mutation à l'origine de ce syndrome est liée à un gène de réparation des mésappariements de l'ADN, appelé MMR (« MisMatch repair »), le plus souvent *MutL Homolog 1 (MLH1)* ou *MutS Homolog 2 (MSH2)* (Buecher, 2010). L'instabilité des microsatellites est l'une des principales conséquences de l'altération de la fonction des gènes *MMR*. Ce syndrome se caractérise par un risque très élevé de développer un CCR mais également des cancers extra-coliques (Bibeau et al., 2020).

Les CCR sporadiques sont multifactoriels et se développent dans plus de 80% des cas à partir d'une tumeur bénigne, d'après l'INCa. La genèse des CCR sporadiques implique des facteurs génétiques (facteurs de susceptibilité) et environnementaux (Buecher, 2010). Les facteurs de susceptibilité se distinguent des facteurs génétiques dits « majeurs », qui sont responsables des cancers héréditaires. La principale différence est le fait que les facteurs de susceptibilité ne sont pas des mutations mais des variations de séquence considérées comme du « polymorphisme fonctionnel » qui, individuellement, sont associés à une augmentation très modérée du risque de CCR (Buecher, 2010). L'association de plusieurs altérations de ce type peut néanmoins faire passer le risque de CCR de très modéré à modéré.

Les facteurs héréditaires et environnementaux contribuent tous les deux au développement d'un CCR, *via* des altérations génétiques héréditaires et somatiques qui constituent des facteurs pronostiques.

I.2.3. La cancérogénèse colorectale

La tumorigénèse colique est un processus multi-étapes qui débute par la transformation de l'épithélium colique sain en adénome, qui évolue ensuite en adénocarcinome puis en carcinome invasif. Ces transformations sont causées par l'accumulation progressive de mutations génétiques et d'altérations épigénétiques qui activent des oncogènes et inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs (Kuipers et al., 2015). Ce processus a été décrit pour la première fois en 1990 par Fearon et Vogelstein, connu sous le nom de la « séquence adénome-carcinome » (Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués à la fois dans l'initiation et la progression des CCR sporadiques. Historiquement, la séquence adénome-carcinome a été décrite comme un processus linéaire (Fearon and Vogelstein, 1990). Au cours des dernières années, ce modèle a évolué en trois voies moléculaires majeures pouvant conduire au développement de CCR (Figure 4) (Schmitt and Greten, 2021).

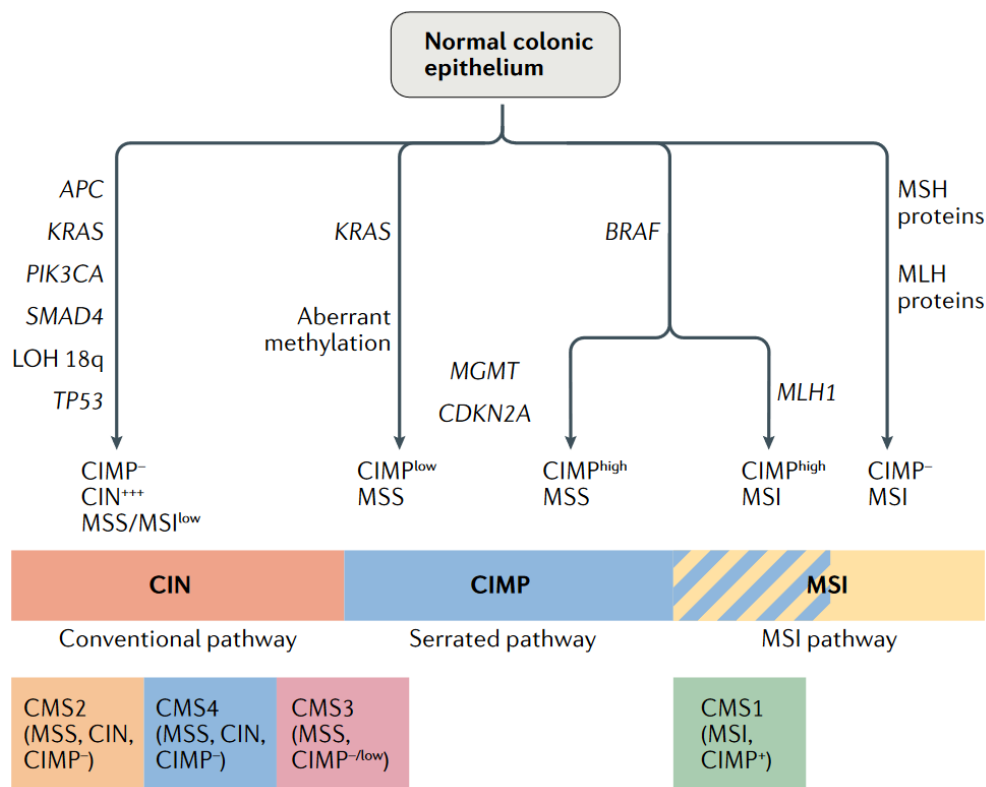


Figure 4. Les trois principales voies moléculaires du cancer colorectal.

CIN: chromosomal instability ; MSS/MSI: microsatellite stable/instable ; CIMP: CpG island methylation pathway ; CMS: consensus molecular subtypes. (D'après Schmitt and Greten, 2021)

Ces trois voies sont : la voie conventionnelle de l'instabilité chromosomique ou « chromosomal instability (CIN) », la voie d'instabilité des microsatellites ou « microsatellite instable (MSI) » et la voie de la méthylation des îlots CpG ou « CpG island methylation pathway (CIMP) » également appelée « serrated pathway ». Les principales mutations et altérations identifiées dans chacune de ces voies sont présentées dans la Figure 4.

I.2.3.1. La voie conventionnelle de l'instabilité chromosomique (CIN)

La majorité des cas de CCR, entre 70 et 80%, suivent la voie conventionnelle de CIN. Cette voie est caractérisée par une aneuploïdie ou des anomalies chromosomiques structurales, une perte fréquente d'hétérozygotie au niveau des *loci* des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que des réarrangements chromosomiques (Schmitt and Greten, 2021). Les CCR CIN⁺ présentent des mutations dans des oncogènes spécifiques et/ou dans des gènes suppresseurs de tumeurs. L'inactivation du gène *APC* est l'évènement initiateur de la cancérogénèse colique *via* cette voie (Figures 4 et 5). La protéine APC est un membre clé du complexe de dégradation de la β -caténine qui, une fois mutée, entraîne une activation constitutive de la voie WNT favorisant la formation de foyers de cryptes aberrants (Van der Heijden and Vermeulen, 2019a). La mutation d'*APC* est suivie par une mutation de *KRAS* qui participe à la transformation en adénome précoce, et par des mutations de *PIK3CA* et *SMAD4*, ainsi que de la perte d'hétérozygotie du chromosome 18 (LOH 18q) qui sont impliquées dans l'évolution vers un adénome tardif (Figures 4 et 5). Enfin, la transformation de l'adénome tardif vers un carcinome est liée à la mutation de *TP53* (Figures 4 et 5). L'accumulation de mutations et d'altérations épigénétiques est un processus lent qui prend environ 10 à 15 ans mais qui peut progresser plus rapidement dans certains cas, notamment chez les patients ayant une prédisposition génétique comme le syndrome de Lynch (Kuipers et al., 2015). Le développement du CCR par cette voie est associé à des niveaux élevés de CIN (CIN⁺⁺⁺), à une stabilité des microsatellites (« microsatellite stable (MSS) ») et à des niveaux faibles ou nuls de méthylation des îlots CpG (CIMP⁻) (Schmitt and Greten, 2021).

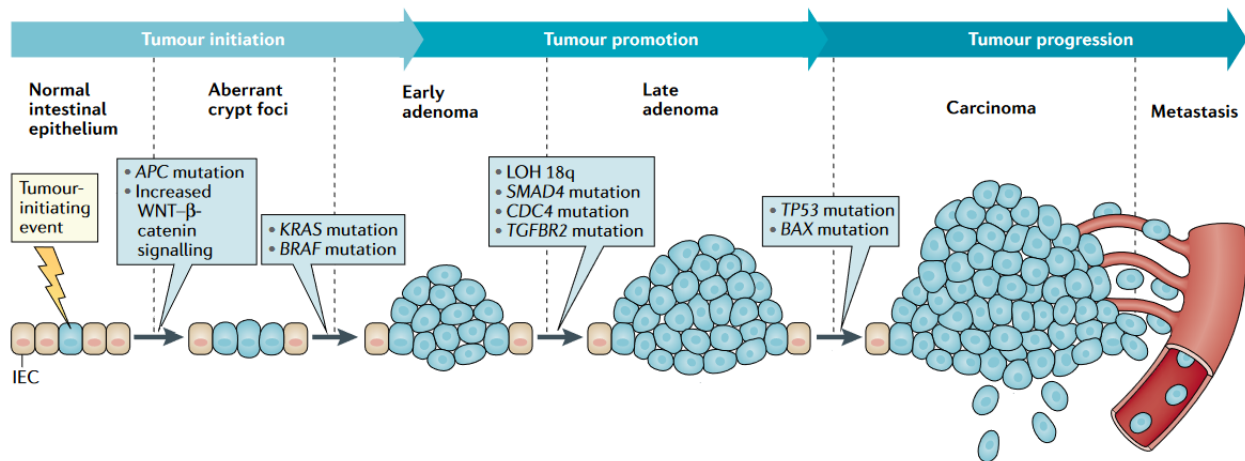


Figure 5. Mécanismes d'initiation et de progression tumorale du cancer colorectal.

(Adapté de Schmitt and Greten, 2021)

I.2.3.2. La voie de la méthylation des îlots CpG (CIMP)

Environ 20 à 30% des cas de CCR se développent par la voie CIMP, à partir d'un sous-ensemble de polypes appelés « polypes dentelés » (Kuipers et al., 2015; Schmitt and Greten, 2021). Dans cette voie, trois types de tumeurs colorectales peuvent être distingués : les tumeurs CIMP^{low} MSS qui sont souvent associées à des mutations de *KRAS*, les tumeurs CIMP^{high} MSS porteuses d'une mutation de *BRAF* et les tumeurs CIMP^{high} MSI avec une mutation de *BRAF* (Figure 4). Les tumeurs CIMP^{high} MSS/MSI *BRAF*-mutées sont fréquemment associés au « silencing » de *MGMT* et *CDKN2A*, ou *MLH1* (Schmitt and Greten, 2021). Ainsi, les tumeurs CIMP^{high} sont associées aux mutations de *BRAF* et à la méthylation de *MLH1*, tandis que les tumeurs CIMP^{low} sont porteuses de mutations *KRAS*. De plus, la survenue de polypes dentelés dans le côlon droit, qui inclue le caecum, les segments ascendant et transverse, est souvent associée à des tumeurs MSI ainsi qu'une instabilité épigénétique caractérisée par une méthylation aberrante excessive de l'ADN au niveau des îlots CpG (CIMP⁺) (Kuipers et al., 2015). En revanche, les polypes qui se développent dans le côlon gauche, qui comprend les segments descendant et sigmoïde ainsi que le rectum, sont généralement MSS et porteurs de mutations *KRAS* dont un sous-ensemble présente une forme atténuée de CIMP (Kuipers et al., 2015). Les modifications de la méthylation de l'ADN liées au développement de cancer incluent deux changements fondamentaux : l'hyperméthylation des îlots CpG dans les promoteurs de gènes pouvant réduire au silence les gènes suppresseurs de tumeurs,

et l'hypométhylation des éléments génétiques répétitifs qui peut entraîner une instabilité génomique ou l'activation d'oncogènes (Kuipers et al., 2015). Ainsi, la voie CIMP est une voie alternative d'altérations génétiques qui se produit indépendamment des mutations *APC*. Cette voie est souvent initiée par l'activation de l'axe RAS-RAF-MEK-ERK et caractérisée par un phénotype CIMP puis par une MSI, en particulier pour les tumeurs localisées de manière proximale et *BRAF*-mutées (Schmitt and Greten, 2021).

I.2.3.3. La voie d'instabilité des microsatellites (MSI)

La troisième voie de développement du CCR est la voie MSI qui est causée par le dysfonctionnement des gènes de la voie MMR et associée à une hypermutabilité génétique (Schmitt and Greten, 2021). Les défauts de MMR sont responsables d'environ 15% des CCR (Ozcan et al., 2018). Les tumeurs déficientes en MMR accumulent des mutations d'insertion et de délétion dans de courtes séquences nucléotidiques répétitives, appelées « microsatellites », entraînant un phénotype MSI. Les protéines MLH et MSH sont souvent impliquées dans ce phénotype, à cause notamment de la survenue de mutations dans les gènes *MMR* ou d'une méthylation aberrante de *MLH1* (Markowitz and Bertagnolli, 2009; Schmitt and Greten, 2021). Ces altérations sont souvent associées ensuite à des mutations de *TGFBR2* et *BAX* (Markowitz and Bertagnolli, 2009). L'altération la voie MMR pendant la réplication donne lieu à une accumulation de mutations dans l'ADN, se produisant principalement dans des fragments d'ADN microsatellites comportant des séquences nucléotidiques répétitives (Kuipers et al., 2015). Les tumeurs MSI se présentent sous forme de CCR sporadiques ou héréditaires, en particulier dans le contexte du syndrome de Lynch qui est causé par des mutations germinales des gènes *MMR*. Les CCR sporadiques présentant une MSI sont généralement proximaux (côlon droit) (Davies et al., 2005).

I.2.3.4. Les cinq sous-types moléculaires de cancers colorectaux

La définition de ces trois voies n'est pas mutuellement exclusive. Un CCR peut potentiellement comporter des caractéristiques de plusieurs voies (Schmitt and Greten, 2021). Les Figures 5 et 6 mettent en lumière cette superposition de caractéristiques, en particulier entre les voies CIMP et MSI. L'analyse des anomalies moléculaires dans les CCR a permis de les répartir en cinq groupes en fonction de leurs phénotypes, de leurs statuts mutationnels et du niveau de méthylation, comme

illustré dans la Figure 6 (Jass, 2007). Cette représentation est basée sur la classification proposée par JR. Jass. La fréquence du nombre de ces caractéristiques moléculaires varie en fonction de la localisation de la tumeur dans l'intestin, du côlon ascendant jusqu'au rectum, ce qui conduit à la dichotomie traditionnelle entre CCR proximal (partie supérieure du côlon) et distal (partie inférieure du côlon) (Kuipers et al., 2015).

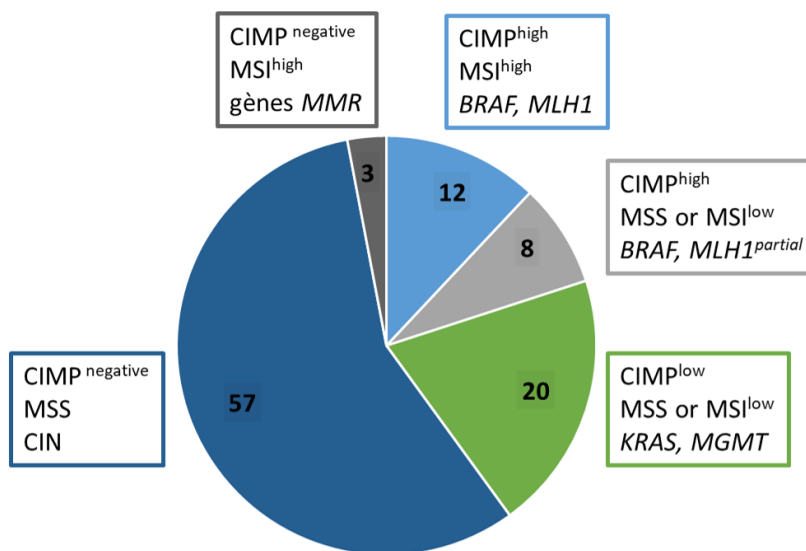


Figure 6. Sous-types de cancer colorectal classés selon leurs phénotypes, leurs statuts mutationnels et de méthylation.

CIMP : CpG island methylation phenotype ; CIN : chromosomal instability ;
 MSI : microsatellite instability ; MSS : microsatellite stable ; MMR : mismatch repair.
 (Graphique réalisé à partir des publications de Jass, 2007 et Arends, 2013)

I.2.3.5. Les principaux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Les altérations de deux types de gènes sont responsables de la cancérogénèse colorectale : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Certains gènes sont communs à plusieurs de ces voies (CIN, CIMP, MSI) tandis que d'autres sont retrouvés spécifiquement dans une seule voie, notamment les mutations *BRAF* et le phénotype CIMP qui interviennent uniquement dans la « serrated pathway » (CIMP) (Kuipers et al., 2015). Les altérations des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs fréquemment impliquées dans le développement du CCR sont résumés dans le Tableau 1 ainsi que leur fréquence.

Tableau 1. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs associés au cancer colorectal.

Affected Gene	Frequency %	Nature of Defect	Comments
<i>APC</i>	85	Activation of Wnt signaling due to inability to degrade the β -catenin oncoprotein ^{41,42}	Germ-line mutation in familial adenomatous polyposis; somatic inactivation found in 85% of sporadic colorectal cancers ⁴³
<i>MLH1, MSH2, MSH6</i>	15–25	DNA single-nucleotide mismatch-repair defect permitting the accumulation of oncogenic mutations and tumor-suppressor loss ^{10-14,31,35}	Germ-line mutation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer ³⁰ ; epigenetic silencing causes loss of tumor MLH1 protein expression
<i>TP53</i>	35–55	Encoding a protein responsible for cell-cycle regulation ^{44,45} ; inactivating missense mutations paired with loss of heterozygosity at 17p	Germ-line mutation in Li–Fraumeni syndrome ⁴⁶
<i>TGFBR2</i>	25–30	Receptor responsible for signaling pathways mediating growth arrest and apoptosis; inactivated by frame-shift mutation in polyA repeat within <i>TGFBR2</i> coding sequence in patients with mismatch-repair defects ⁴⁷ or by inactivating mutation of kinase domain ^{48,49}	Mutation present in >90% of tumors with microsatellite instability and 15% of microsatellite-stable colon cancers ⁵⁰
<i>SMAD4</i>	10–35	Critical components of transforming growth factor β pathway signaling, along with related proteins SMAD2 and SMAD3; SMAD4 and SMAD2 are located on chromosome 18q, a frequent site of loss of heterozygosity in colorectal cancers; inactivated by homozygous deletion or mutation ^{51,52}	Germ-line mutations in familial juvenile polyposis, with a risk of colorectal cancer as high as 60% over three to four decades ⁵³
<i>KRAS</i>	35–45	Encoding the KRAS G-protein, with constitutive activation resulting in activation of both the PI3K–PDK1–PKB and RAF–MEK–ERK1/2 signaling pathways, thereby promoting cell survival and apoptosis suppression ^{54,55}	Germ-line mutation in the cardiofaciocutaneous syndrome ⁵⁶
<i>BRAF V600E</i>	8–12	Activating mutation in the BRAF serine–threonine kinase, a downstream mediator of signaling through the RAF–MEK–ERK1/2 pathway, which mimics the biologic consequences of KRAS mutation ^{38,57}	Associated with hyperplastic polyposis, with increased incidence in serrated adenomas ^{58,59} ; like KRAS, germ-line mutation in the cardiofaciocutaneous syndrome ⁵⁶
<i>PTEN</i>	10–15	Promotion of the activation of PI3K pathway signaling through loss of function by inactivating mutation, resulting in cell-survival signaling and apoptosis suppression	Germ-line mutation in Cowden’s syndrome, which carries a high risk of breast cancer, with 10% increased risk of colorectal cancer; possible role in maintenance of chromosomal stability ⁶⁰⁻⁶²

(D’après Markowitz and Bertagnolli, 2009)

I.2.3.5.1. Inactivation mutationnelle des gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes codent pour des protéines qui agissent pour limiter la prolifération, le cycle cellulaire et l’invasion afin de maintenir l’homéostasie tissulaire (Kanthan et al., 2012). Lors de la cancérogénèse colorectale, ces gènes sont fréquemment inactivés ce qui favorise la croissance tumorale, en particulier les gènes *APC*, *TP53*, *TGFBR2* et *SMAD4*.

APC

La perte de fonction du gène *APC* est l’évènement initiateur du développement du CCR (Figure 5). Des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture (« frameshift »), des mutations ponctuelles, des délétions et des pertes d’allèle sont à l’origine de l’inactivation de ce gène suppresseur de tumeur, localisé sur le chromosome 5q, dans environ 85% des cas (Tableau 1) (Fearon, 2011). La majorité

de ces mutations conduisent à des protéines tronquées. La protéine APC joue un rôle clé dans la dégradation de la β -caténine et dans l'inhibition de sa localisation nucléaire. La mutation du gène *APC* entraîne la formation d'une protéine incapable de phosphoryler la β -caténine, s'accumulant ainsi au niveau cytoplasmique (Kanthan et al., 2012). La β -caténine cytoplasmique migre ensuite vers le noyau et interagit avec les facteurs de transcription TCF/LEF, provoquant l'augmentation de l'expression de gènes cibles tels que les proto-oncogènes *c-myc* et la *cycline D1*. Dans la plupart des adénomes et des CCR sporadiques, des mutations somatiques et des délétions sont présentes et inactivent les deux copies du gène *APC*. Dans les tumeurs non mutées pour le gène *APC*, des mutations de la β -caténine ont été observées et rendent la protéine résistante au complexe de dégradation ce qui active également la voie de signalisation WNT (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

TP53

L'inactivation de la voie de signalisation p53 est retrouvée dans de nombreux cancers, y compris le CCR avec une fréquence de 35 à 55% (Tableau 1). Dans la plupart des tumeurs, la combinaison d'une mutation faux-sens inactivant l'activité transcriptionnelle de p53 et d'une délétion chromosomique 17p éliminant le second allèle *TP53*, induit l'inactivation des deux allèles de *TP53* (Markowitz and Bertagnolli, 2009). Les mutations ponctuelles et la perte d'hétérozygotie de cette protéine sont impliquées dans la transition d'adénome tardif en carcinome invasif (Figure 5). L'un des rôles de la protéine p53 est de réguler le cycle cellulaire, en activant les voies de réparation de l'ADN en cas de dommages et d'induire la mort cellulaire si les lésions ne peuvent être réparées. La protéine p53 est régulée négativement par MDM2 et MDM4 (« Murine Double Minute 2/4 ») en l'absence de stress cellulaire *via* une ubiquitination, mais cette interaction est perturbée en cas de stress ce qui permet à p53 de vérifier les potentiels dommages induits (Kanthan et al., 2012). Une fonction inefficace de p53, induite par les altérations, empêche la protéine de répondre correctement à ces *stimuli* et favorise la croissance et l'invasion de la tumeur. Ainsi, la protéine p53 joue un rôle primordial dans le maintien de la stabilité génomique, ce qui lui doit le surnom de « gardienne du génome ». Dans de nombreux CCR présentant des défauts de MMR, le gène *TP53* n'est pas muté mais l'activité de la voie p53 est probablement atténuée par des mutations de l'inducteur d'apoptose *BAX* (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

TGFBR2/SMAD4

L'inactivation mutationnelle de la signalisation du TGF- β joue un rôle majeur dans la transition de l'adénome précoce en adénome tardif (Figure 5). Des mutations somatiques inactivent le gène *TGFBR2* dans 25-30% des cas de CCR (Tableau 1) (Markowitz and Bertagnolli, 2009). Des mutations « frameshift » dans une répétition de polyadénine au sein de la séquence codante du *TGFBR2* sont responsables de son inactivation dans les tumeurs présentant des défauts de MMR. En revanche, dans au moins la moitié des CCR avec une MMR efficace, des mutations faux-sens inactivatrices affectant le domaine kinase de TGFBR2 ou, plus fréquemment, des mutations et des délétions inactivant le composant aval de la voie TGF- β , SMAD4, ou ses facteurs de transcription partenaires, SMAD2 et SMAD3, entraîne l'inactivation de la voie de signalisation TGF- β (Markowitz and Bertagnolli, 2009). SMAD4 et SMAD2, localisés sur le chromosome 18q, peuvent être inactivés par une perte d'hétérozygotie 18q, une délétion ou une mutation homozygote (Markowitz and Bertagnolli, 2009). Ainsi, la signalisation du TGF- β peut être perturbée par des mutations ciblant le gène *TGFBR2* ou dans le gène codant les protéines SMAD qui sont des composants en aval de cette voie.

I.2.3.5.2. Activation des voies des oncogènes

Les oncogènes sont des gènes impliqués dans l'apparition et le développement du cancer. Dans le CCR, plusieurs oncogènes ont été identifiés (Fearon, 2011), dont les principaux sont : *KRAS*, *BRAF* et *PIK3CA*. Ces oncogènes interviennent dans deux voies oncogéniques, la voie RAS-RAF-MAPK et la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT, qui jouent un rôle important dans la progression du CCR (Kanthan et al., 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Voie RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK)

Les mutations oncogéniques de *KRAS* et *BRAF*, qui activent la voie de signalisation « mitogen-activated protein kinase » (MAPK), se produisent dans respectivement 35-45% et 8-12% de CCR (Tableau 1). Les mutations de *KRAS* stimulent l'activité GTPase de *KRAS*, qui induit la cascade de signalisation MAPK via *RAF*. Ces mutations sont des mutations ponctuelles au niveau des codons 12, 13 et 61, dont la majorité touchent le codon 12 (Fearon, 2011). L'activation constitutive de la protéine *KRAS* entraîne l'activation de l'axe RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) mais

aussi de la voie PI3K-AKT favorisant ainsi la survie cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Markowitz and Bertagnolli, 2009). Les mutations de *BRAF*, comme la V600E, induisent l'activité de la sérine-thréonine kinase BRAF et entraînent la cascade de signalisation MAPK. Ces mutations miment les conséquences biologiques de la mutation *KRAS* (Markowitz and Bertagnolli, 2009) et sont liées aux CCR CIMP⁺ (Fearon, 2011). L'activation de la signalisation MAPK intervient au stade d'adénome précoce (Kuipers et al., 2015).

Voie PI3K-AKT

Les mutations somatiques activatrices de *PI3KCA*, qui code pour la sous-unité catalytique de PI3K, représentent entre 15 et 25% des altérations (Fearon, 2011). Ces mutations sont souvent des mutations ponctuelles agissant positivement sur l'activité kinase. Les altérations génétiques moins fréquentes qui peuvent se substituer aux mutations de *PI3KCA* comprennent la perte de PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), un inhibiteur de la signalisation PI3K, ainsi que l'amplification du substrat 2 du récepteur de l'insuline (IRS2) qui est un activateur en amont de la signalisation PI3K, et la co-amplification de AKT et PAK4, qui sont des médiateurs en aval de la signalisation PI3K (Markowitz and Bertagnolli, 2009). Les mutations de *PI3KCA* et de *PTEN* ainsi que l'activation de la signalisation PI3K favorisent la transition de l'adénome précoce en adénome tardif (Kuipers et al., 2015).

Ainsi, toutes ces altérations génétiques et épigénétiques impliquées dans la cancérogénèse colorectale amplifient l'hétérogénéité inter-patients et inter-tumeurs des CCR. De plus, l'hétérogénéité tumorale s'exprime à la fois dans l'espace (hétérogénéité spatiale) et dans le temps (hétérogénéité temporelle), ce qui complexifie l'étude des étapes de développement du CCR. La transformation de l'épithélium colique en adénome, puis en carcinome invasif, et jusqu'à la survenue de métastases est un processus lent mais difficilement détectable. Ainsi, une meilleure compréhension des modèles de cancérogénèse est nécessaire.

I.2.3.6. Les différents modèles de cancérogénèse

L'hétérogénéité cellulaire intratumorale est une autre forme de complexité, qui s'ajoute à l'hétérogénéité entre les tumeurs et les patients. Historiquement, deux modèles ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle

des cellules cancéreuses au sein des tumeurs : le modèle stochastique, ou d'évolution clonale, et le modèle hiérarchique également appelé « modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) ». Depuis quelques années, un nouveau modèle a émergé, le modèle de plasticité cellulaire, ayant permis de concilier en partie ces deux modèles auparavant opposés.

I.2.3.6.1. Modèle stochastique

Dans le modèle stochastique, toutes les cellules tumorales sont equipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent toutes s'auto-renouveler et donner naissance à des progénitures distinctes (Vessoni et al., 2020). Une proportion de cellules tumorales prolifère de manière stochastique pour alimenter la croissance de la tumeur tandis que d'autres se différencient (Beck and Blanpain, 2013). Leur comportement est déterminé aléatoirement par des variables intrinsèques et extrinsèques. En effet, dans la théorie de l'évolution clonale, les différences intrinsèques entre toutes les cellules sont basées sur des programmes génétiques et épigénétiques. Ainsi, une mutation survenant dans une cellule tumorale lui confère un avantage sélectif en terme de croissance et l'accumulation de mutations dans cette cellule lui attribuera le statut de clone dominant (Visvader and Lindeman, 2012). Les clones ayant acquis un avantage de croissance se développeront tandis que les clones moins performants finiront par s'éteindre. L'accumulation de ces mutations peut permettre d'accroître l'agressivité de la tumeur et la résistance aux traitements par exemple. Toutefois, ces avantages clonaux ne sont pas définitifs et peuvent varier dans le temps et dans l'espace en fonction des zones de la tumeur (Prasetyanti and Medema, 2017). Dans le modèle d'évolution clonale, les mutations stochastiques dans les cellules tumorales individuelles servent de plateforme d'adaptation et de sélection pour les clones les plus aptes à former une tumeur. Donc, ce modèle explique l'hétérogénéité intratumorale comme un résultat de la sélection naturelle (Prasetyanti and Medema, 2017).

I.2.3.6.2. Modèle des cellules souches cancéreuses

Le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) repose sur une organisation hiérarchique des cellules, où seules certaines cellules contribuent à la croissance à long terme de la tumeur : les CSC. Ces cellules sont dotées d'un potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation multi-lignées indéfini permettant de donner

naissance à des cellules phénotypiquement diverses (Visvader and Lindeman, 2012), tandis que les progéniteurs ont un potentiel de croissance limité (Figure 7). Les CSC peuvent provenir de la transformation de cellules souches de tissus normaux mais aussi de cellules progénitrices ayant acquis des propriétés de cellules souches *via* des mutations (Visvader and Lindeman, 2012). Grâce à leur propriété d'auto-renouvellement et de différenciation, les CSC sont capables d'initier et d'alimenter la croissance tumorale, en maintenant le pool de CSC par divisions symétriques (auto-renouvellement) et en générant tous les types de cellules cancéreuses différenciées par divisions asymétriques (Prasetyanti and Medema, 2017). En effet, la théorie des CSC suggère que les CSC peuvent donner naissance aux populations de cellules malignes morphologiquement diverses contenues dans une tumeur, y compris les composants non tumorigènes de la masse tumorale. Par conséquent, les tumeurs sont organisées de manière hiérarchique, ressemblant au fonctionnement des tissus normaux soutenue par des cellules souches saines, comme illustré dans la Figure 7. Ainsi, les CSC génèrent une hétérogénéité cellulaire en installant une hiérarchie de différenciation et conduisent à une gamme de types cellulaires distincts formant l'intégralité de la masse tumorale (Prasetyanti and Medema, 2017). Donc, dans ce modèle, seules les CSC contribuent à l'hétérogénéité cellulaire et à la diversité de population de cellules tumorales.

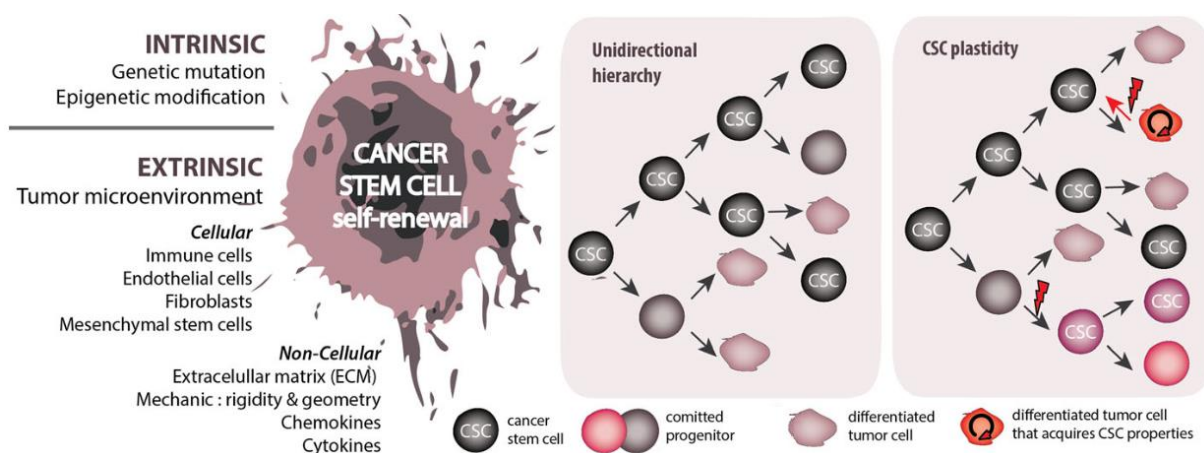


Figure 7. Comparaison du modèle hiérarchique et du modèle de plasticité cellulaire.
(D'après Prasetyanti and Medema, 2017)

I.2.3.6.3. Modèle de plasticité cellulaire

Dans les modèles stochastique et hiérarchique, la transmission des caractéristiques est unidirectionnelle alors que le modèle de plasticité cellulaire est réversible et donc bidirectionnel. En effet, une cellule différenciée peut se dédifférencier et acquérir des propriétés de CSC dans des conditions spécifiques, comme indiqué dans la Figure 7. Parallèlement, une mutation dans une cellule différenciée peut conférer une capacité d'auto-renouvellement et établir un nouveau clone de CSC hiérarchique, amplifiant la diversité fonctionnelle au sein d'une tumeur (Prasetyanti and Medema, 2017). Le phénotype variable des CSC, la présence de plusieurs pools de CSC dans des tumeurs individuelles, la capacité des CSC à subir une évolution génétique et la possibilité pour des cellules non-CSC de se transformer en cellules de type-CSC (« CSC-like ») soulignent la nature dynamique de ces cellules (Visvader and Lindeman, 2012). De plus, le phénotype cellulaire peut être influencé par les facteurs extrinsèques comme le microenvironnement tumoral (MET) et les thérapies (Prasetyanti and Medema, 2017). Ainsi, le caractère « souche » doit être considéré comme un état cellulaire réversible tout comme les avantages clonaux du modèle stochastique.

Ainsi, les modèles stochastiques et hiérarchiques ne s'excluent pas nécessairement. Le modèle de plasticité cellulaire accroît les possibilités d'apparition de populations cellulaires hétérogènes au sein d'une tumeur. Malheureusement, la plasticité cellulaire atténue la promesse thérapeutique initiale du modèle des CSC. La nature hétérogène et dynamique du CCR complexifie leur classification et donc la prise en charge qui en résulte.

I.2.4. Les différentes classifications des cancers colorectaux

La classification des CCR permet de définir le pronostic des patients et de déterminer les meilleures approches thérapeutiques. Trois classifications sont couramment utilisées pour le CCR, basées sur différents critères : le degré d'envahissement de la paroi colique, le grade histologique et les caractéristiques moléculaires.

I.2.4.1. Classification selon le stade tumoral

La classification « pathology Tumor Nodes Metastasis (pTNM) » permet de définir le stade de développement de la tumeur en fonction de son étendue anatomique. Initialement proposée par le Dr Pierre Denoix dans les années 1940-1950, la première classification internationale des maladies malignes basée sur le TNM a été publiée en 1968 par l'« international union against cancer (IUCC) » et l'« american joint committee on cancer (AJCC) » (Goldstraw, 2013). Cette classification est régulièrement mise à jour et celle actuellement utilisée est la 8^{ème} édition de la classification TNM publiée en 2017 (Amin et al., 2017; Brierley et al., 2017). La classification TNM vise à évaluer la profondeur de la tumeur dans les différentes couches du côlon et du rectum (T) (Figure 1) ainsi que l'atteinte des ganglions lymphatiques à proximité (N) et enfin la présence de métastases (M), comme illustré dans le Tableau 2 (Tong et al., 2018). Pour chaque composant (T, N et M), différents groupes et sous-groupes existent pour être plus représentatifs de l'hétérogénéité tumorale au niveau clinique (Tableau 2). La classification TNM a permis de définir cinq stades de CCR allant de 0 à IV, comme illustré dans la Figure 8 et détaillé dans le Tableau 3 :

- **Le stade 0** : La tumeur est très superficielle et limitée à la muqueuse, appelée tumeur *in situ* (Tis), absence de ganglions lymphatiques atteints et de métastases.
- **Le stade I** : La tumeur a envahi la sous-muqueuse (T1) et la musculieuse (T2), sans atteinte des ganglions lymphatiques ni métastases.
- **Le stade II** : La tumeur a franchi la musculieuse et a atteint la séreuse (T3), avec potentielle perforation du péritoine (T4A) et invasion dans des structures voisines (T4B), mais sans atteinte des ganglions lymphatiques ni d'organes distants.
- **Le stade III** : La tumeur a atteint un ou plusieurs ganglions lymphatiques régionaux (N1/2) sans développer de métastases.
- **Le stade IV** : La tumeur a envahi d'autres organes sous la forme d'une ou plusieurs métastases (M1).

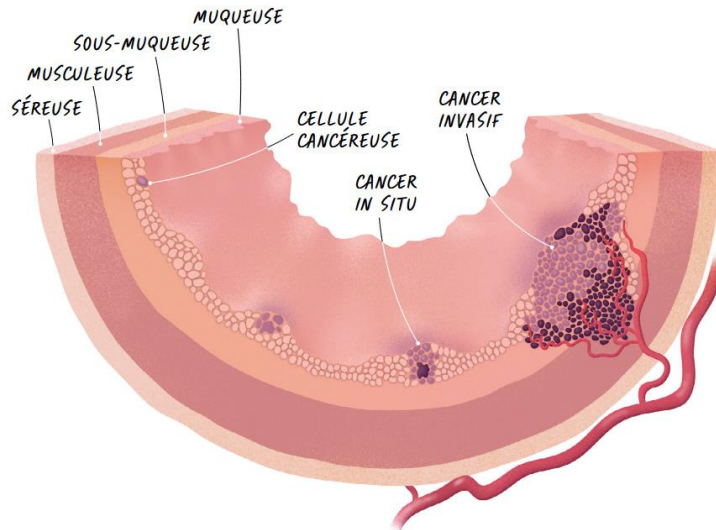


Figure 8. Stades du cancer colorectal selon le degré d’envahissement de la paroi colique.
(D’après le Guide patients – Les traitements des cancers du côlon, Institut national du cancer. Illustration de Pierre Bourcier)

Tableau 2. Classification clinique TNM des cancers colorectaux, 8^{ème} édition.

Primary tumor (T)
Tx: Primary tumor cannot be assessed
T0: No evidence of primary tumor
Tis: Carcinoma <i>in situ</i> , limited to intraepithelial or invasive lamina propria
T1: Tumor invading submucosa
T2: Tumor invading the muscularis propria
T3: Tumor penetrating the muscularis propria and arriving at colorectal fat tissue
T4: Tumor directly invading other organs or structures
T4a: Tumor penetrating visceral peritoneum
T4b: Tumor directly invading or adhering to other organs or structures
Lymph nodes (N)
Nx: Regional lymph nodes cannot be assessed
N0: No lymph node metastasis and no TD
N1: 1-3 lymph nodes metastases
N1a: 1 lymph node metastases
N1b: 2-3 lymph nodes metastases
N1c: Although there was no regional lymph node metastasis, TDs were submucosal, mesangial or peritoneum-covered para-colorectal tissue.
N2: More than or equal to 4 lymph node metastases
N2a: 4-6 regional lymph node metastases
N2b: More than or equal to 7 lymph node metastases
Metastasis (M)
M1: There is distant lymph node metastasis
M1a: Metastasis is limited to one organ or site (e.g., liver, lung, ovary, and extra-regional lymph node metastases)
M1b: Transfer more than one organ or site ¹
M1c: Peritoneal metastases with or without metastasis of other organs ¹

¹ : différence par rapport à la 7^{ème} édition. TD: tumor deposit (Adapté de Tong *et al.* 2018)

Tableau 3. Stades des cancers colorectaux selon la classification TNM.

8 th édition			
Stage	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
II A	T3	N0	M0
II B	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0
III A	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
III B	T3-4a	N1/N1c	M0
	T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
III C	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0
IV A	Any T	Any N	M1a
IV B	Any T	Any N	M1b
IV C	Any T	Any N	M1c

(D'après Tong *et al.* 2018)

La classification pTNM possède une forte valeur pronostique et est couramment utilisée en clinique pour définir l'approche thérapeutique. De plus, cette classification peut servir de référence pour prédire la probabilité de survie à cinq ans (Meyerhardt, 2005). Toutefois, la stratégie thérapeutique établie à partir de l'étendue anatomique de la tumeur, qui est la base du système TNM, n'est pas toujours corrélée avec la survie du patient car des patients au même stade peuvent réagir très différemment (Barresi *et al.*, 2015). De plus, cette classification n'inclue pas l'état de différenciation des cellules au sein des tumeurs ni les caractéristiques moléculaires de la tumeur.

I.2.4.2. Classification selon le grade tumoral

La classification histologique définit l'apparence des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, et apporte des informations sur la vitesse de division des cellules et leur probabilité de propagation. Le grade de la tumeur représente l'un des facteurs prédictifs les plus importants de l'agressivité du CCR (Reggiani Bonetti *et al.*, 2016). Le grade tumoral correspond au degré de différenciation de la tumeur (Selves, 2009), qui est évalué au cours de l'examen histopathologique. Le système le plus utilisé pour définir le grade histologique du CCR est basé sur le pourcentage de glandes tumorales formant la masse (Reggiani Bonetti *et al.*, 2016).

Selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le CCR est divisé en quatre grades, comme résumé dans le Tableau 4 (Selves, 2009; Turner et al., 2007) :

- **Le grade 1** : le tissu tumoral ressemble étroitement au tissu colorectal normal, avec des cellules cancéreuses bien différenciées et uniquement constituées de structures glandulaires (>95%), proches des glandes de Lieberkühn.
- **Le grade 2** : les tumeurs sont moyennement différenciées et comportent de nombreuses structures glandulaires (avec lumière), entre 50-95%, et des zones plus compactes.
- **Le grade 3** : le tissu tumoral est faiblement différencié avec un pourcentage de structures glandulaires entre 5-50%.
- **Le grade 4** : les tumeurs sont composées de cellules très anormales et indifférenciées, avec peu de lumières glandulaires (<5%) et un stroma souvent réduit (aspect compact).

Dans la 4^{ème} édition de la classification histologique de l'OMS, les grades 1 et 2 ont été regroupés en tumeurs de bas grade tandis que les grades 3 et 4 en tumeurs de haut grade, en raison d'un degré significatif de variabilité inter-observateurs (Barresi et al., 2014). Les CCR de bas grade sont constitués de cellules cancéreuses bien différenciées, anormales mais ressemblant aux cellules normales et se développant lentement. En revanche, les CCR de haut grade sont formés de cellules cancéreuses peu différenciées ou indifférenciées, ne ressemblant pas aux cellules normales et disposées de façon très différente. Ces derniers ont une tendance à se développer rapidement et sont plus susceptibles de se propager par rapport aux cancers de bas grade. Ainsi, moins le grade est élevé, moins la tumeur est agressive et meilleure est l'évolution probable de la maladie.

Tableau 4. Systèmes de classification histopathologique des cancers colorectaux.

Predominant pattern		
WHO	Percentage of gland formation	College of American Pathologists
Well differentiated	>95	Low
Moderately differentiated	50-95	Low
Poorly differentiated	5-50	High
Undifferentiated	<5	High

(Adapté de Turner *et al.* 2007)

Malgré l'évolution du système à quatre niveaux en système à deux niveaux, des limites persistent notamment pour les adénocarcinomes mucineux colorectaux. Les critères de classification ne sont pas bien définis pour ce type d'adénocarcinome, qui représente entre 4 et 38% des CCR, et dont la valeur pronostique n'a pas été démontrée (Barresi et al., 2015). Un autre système de classement histologique basé sur les « poorly differentiated clusters (PDC) » a été proposé comme pronostic histopathologique du CCR (Reggiani Bonetti et al., 2016). Cette classification est basée sur le degré de différenciation histologique et le statut mutationnel de la tumeur. Trois grades de malignité sont définis par ce système, en fonction du nombre de PDC (Reggiani Bonetti et al., 2016) :

- **Le grade I** : le tissu tumoral contient moins de 5 PDC
- **Le grade II** : la tumeur possède entre 5 et 9 PDC
- **Le grade III** : le tissu tumoral est composé de plus de 10 PDC

Un nombre élevé de PDC est significativement associé à une invasion péri-neurale et lympho-vasculaire, à la présence de métastases nodales ou de micrométastases, ainsi qu'à une survie globale (SG) et sans progression plus courte dans le cas du CCR (Reggiani Bonetti et al., 2016). De plus, une association significative entre un nombre élevé de PDC et la présence d'une mutation *KRAS* a été observée, ce qui pourrait indiquer que la mutation *KRAS* est responsable de la formation des PDC (Reggiani Bonetti et al., 2016). Ces associations pourraient également expliquer le mauvais pronostic des CCR *KRAS* mutés. L'avantage de ce nouveau système est que les PDC sont facilement reconnaissables dans les coupes histologiques de CCR colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ou à partir de biopsies endoscopiques et que les résultats sont plus reproductibles. Ainsi, le grade tumoral est reconnu comme un paramètre pronostique important dans le CCR. Néanmoins, aucun consensus n'existe sur le système de classement actuellement (Reggiani Bonetti et al., 2016).

Par rapport à la classification TNM, cette nouvelle classification histologique prend en compte le statut mutationnel des CCR en montrant un lien entre le nombre élevé de PDC et la mutation *KRAS*. Toutefois, les caractéristiques moléculaires des tumeurs ne se limitent pas à ces mutations et incluent les statuts MSS/MSI, CIMP et CIN qui jouent un rôle important dans la cancérogénèse colorectale, comme précédemment introduit.

I.2.4.3. Classification selon les caractéristiques moléculaires

De nombreuses classifications indépendantes basées sur les caractéristiques moléculaires des tumeurs ont été proposées par différentes équipes (Budinska et al., 2013; De Sousa E Melo et al., 2013; Marisa et al., 2013; Roepman et al., 2014; Sadanandam et al., 2013; Schlicker et al., 2012). Un consortium international d'experts a permis d'unifier les six classifications préexistantes en une classification unique appelée « Consensus Molecular Subtypes (CMS) » (Guinney et al., 2015). Cette nouvelle classification a mis en évidence quatre sous-types moléculaires de CCR à partir d'une analyse génique sur une cohorte de plus de 4000 patients. L'intérêt de ce projet a été d'identifier des signatures moléculaires de CCR pouvant être associées à une signature prédictive de réponse aux thérapies. Les quatre sous-groupes moléculaires sont (Bibeau and Martineau, 2016; Guinney et al., 2015; Phelip, 2018; Schmitt and Greten, 2021) :

- **Le CMS1** : présente un phénotype MSI⁺ et un profil hypermuté CIMP⁺. Ce sous-groupe possède un taux élevé de mutation de *BRAF*, une infiltration de cellules immunitaires ainsi qu'une localisation préférentielle au niveau du côlon droit, une prédominance féminine et un âge avancé. Il est associé à la meilleure médiane de survie sans récurrence (SSR) des 4 groupes, mais présente la médiane de survie après récurrence (SAR) la plus défavorable.
- **Le CMS2** : se caractérise par un profil MSS, CIN⁺ et CIMP⁻. Ce sous-type présente une fréquence de mutations somatiques (« somatic copy number alteration (SCNA) ») élevée dont un taux élevé de mutation de *TP53*, une surexpression ou une amplification de l'*EGFR* ainsi qu'une activation fréquente des voies WNT et MYC, et une localisation préférentielle au niveau du côlon gauche. La SSR est intermédiaire, mais les SG et SAR sont les plus élevées des 4 groupes. Il est qualifié de « canonique », en raison de sa fréquence plus élevée et des altérations moléculaires les plus fréquemment rencontrées dans le CCR.
- **Le CMS3** : est de type épithélial et présente un statut MSS et CIMP^{-/low}. Ce groupe a un taux élevé de mutations de *KRAS* mais peu de mutations somatiques SCNA^{low}, une amplification de *MYC*, une surexpression d'*IGFBP2* et une dérégulation des voies du métabolisme. Sa répartition est assez homogène entre le côlon gauche et le côlon droit. Les SSR, SG et SAR sont intermédiaires.

- **Le CMS4** : regroupe les tumeurs avec une forte infiltration stromale et un profil SCNA^{high}, MSI⁺ et CIMP⁺. Ce sous-type présente une activation fréquente de la voie du TGFβ et de l'angiogénèse, ainsi qu'une surexpression de la voie NOTCH3. Les tumeurs se situent préférentiellement au niveau du côlon gauche. Les SSR et SG sont les plus faibles des 4 groupes, et la SAR est intermédiaire.

Ainsi, le groupe CMS2 présente le meilleur pronostic global tandis que le CMS4 le moins bon (Schmitt and Greten, 2021). Enfin, une partie des CCR (13%) ne présente pas assez de caractéristiques propres pour s'intégrer à l'un des 4 sous-types et sont considérés comme non classés ou mixtes. Pour ce groupe, les SSR, SG et SAR sont intermédiaires (Bibeau and Martineau, 2016). Ces différents sous-types et leurs proportions sont résumés dans le Tableau 5 et inclus dans la Figure 4.

Tableau 5. Classification CMS des cancers colorectaux.

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

(D'après Guinney *et al.* 2015)

En conclusion, l'intérêt de la classification des CCR est souligné par le caractère très hétérogène de ces tumeurs, ce qui complique la prise en charge thérapeutique des patients. La classification pTNM permet de définir le stade tumoral en fonction de son étendue anatomique tandis que la classification histologique informe sur l'état de différenciation des cellules tumorales, définissant le grade tumoral. Ces deux systèmes sont utilisés en routine lors des examens cliniques (Barresi *et al.*, 2015; Brierley *et al.*, 2017). La classification CMS prend en considération les facteurs moléculaires, biologiques et cliniques des CCR. Ce système est la classification la plus robuste actuellement disponible pour le CCR avec une valeur pronostique indiscutable et parfois prédictive de l'efficacité des thérapies (Dienstmann *et al.*, 2018; Phelip,

2018). Toutefois, la classification CMS est difficilement réalisable en routine étant donnée qu'elle nécessite une analyse de plus de 80 gènes (Phelip, 2018). Néanmoins, l'analyse de certains critères présents dans la classification CMS sont recommandés comme le statut MSI/MSS et le statut mutationnel des oncogènes *RAS* et *BRAF* ayant un rôle prédictif de l'efficacité de certaines thérapies.

I.2.5. Les stratégies thérapeutiques des cancers colorectaux

Les stratégies thérapeutiques utilisées pour traiter les CCR dépendent de plusieurs facteurs : de l'état de santé général du patient, des effets secondaires possibles, du type et du stade de la tumeur, ainsi que de son statut mutationnel et MMR (Benson et al., 2018; Dekker et al., 2019). Les options thérapeutiques du CCR sont : la résection chirurgicale, les chimiothérapies, les thérapies ciblées et l'immunothérapie (Van Cutsem et al., 2016). Pour assurer une survie et une qualité de vie optimales aux patients, la thérapie personnalisée est cruciale pour permettre aux patients atteints de cancer de maximiser les bénéfices tout en minimisant les effets néfastes.

I.2.5.1. Résection chirurgicale

La chirurgie à visée curative est l'approche de première intention des CCR. La résection chirurgicale consiste à retirer la portion du côlon atteinte par la tumeur primaire avec une marge de tissu sain autour ainsi que le mésentère qui contient les vaisseaux nourriciers et les ganglions lymphatiques régionaux. Une suture entre les deux segments restants du côlon ou entre le rectum et le côlon, connu sous le terme « anastomose », est réalisée afin de rétablir la continuité digestive. Deux voies d'abord chirurgicales existent (Weiser and Garcia-Aguilar, 2019) :

- **La laparotomie** qui consiste à ouvrir le ventre du patient pour accéder aux organes et surtout à la tumeur. Cette technique permet d'observer minutieusement toute la cavité abdominale avant de retirer la portion du côlon atteinte par la tumeur ainsi que les ganglions les plus proches.

La cœlioscopie ou laparoscopie, connue sous le nom « d'opération à ventre fermé », est réalisée par l'intermédiaire d'instruments centimétriques glissés dans l'abdomen des patients, les gestes étant contrôlés par vidéoassistance.

Cette technique mini-invasive est aussi efficace que la laparotomie et apporte des bénéfices pour le patient notamment une diminution à la fois de la douleur, des complications post-chirurgicales, et de la durée d'hospitalisation, ainsi qu'un bénéfice esthétique par l'absence d'une grande cicatrice.

Les métastases peuvent également être réséquées si elles sont localisées, en nombre limité, et peu évolutives sous thérapie, ce qui permet d'envisager un acte chirurgical à visée curative. Dans ces conditions, des métastases hépatiques, péritonéales ou pulmonaires peuvent ainsi être retirées. La chirurgie peut être associée à une thérapie néo-adjuvante (pré-opératoire) afin de réduire la masse tumorale et de faciliter l'intervention médicale et/ou à une thérapie adjuvante (post-opératoire) pour limiter la récurrence du cancer (Dekker et al., 2019).

I.2.5.2. Thérapie systémique : chimiothérapies

La chimiothérapie vise à éliminer ou léser les cellules tumorales. Elle peut être administrée par voie orale ou intraveineuse et agit donc au niveau systémique. Les chimiothérapies à base de fluoropyrimidines sont les plus administrées aux patients atteints de CCR, soit en traitement unique (monothérapie) soit en association avec d'autres médicaments (chimiothérapie combinée). Les fluoropyrimidines couramment utilisées sont le 5-fluorouracile (5-FU), administré par voie intraveineuse, et la capecitabine, administrée par voie orale. La leucovorine (LV), également connue sous le nom « d'acide folinique », est généralement administrée en association avec les fluoropyrimidines, combinaison appelée « 5-FU/LV », car elle améliore leur efficacité. Les chimiothérapies couramment utilisées en clinique pour le traitement du CCR sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Principales chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal.

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations
Chemotherapy	5-Fluorouracil	Antimetabolite	Localized and advanced tumors
	Capecitabine	Antimetabolite	
	Irinotecan	Topoisomerase inhibitor	
	Oxaliplatin	Alkylating agent	

(Adapté de Hervieu *et al.* 2021)

Pour les chimiothérapies combinées, le 5-FU/LV est associé à d'autres médicaments, soit à l'oxaliplatine (FOLFOX), soit à l'irinotécan (FOLFIRI) ou alors aux deux chimiothérapies (FOLFIRINOX) (André et al., 2015; Atreya et al., 2017; Benson et al., 2018; Chiorean et al., 2020; Twelves et al., 2005; Van Cutsem et al., 2016). Le catabolisme du 5-FU et de la capécitabine est majoritairement dépendant de l'enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) (Van Cutsem et al., 2016). Des déficiences de l'activité de la DPD, liées à des mutations génétiques dans le *locus* du gène de la DPD (*DPYD*), entraînent de graves toxicités chez les patients traités au 5-FU et à la capécitabine. Ainsi, l'activité de la DPD est un biomarqueur prédictif de la toxicité potentielle lors d'un traitement par ces deux molécules (Van Cutsem et al., 2016), et son dosage sérique est devenu obligatoire en France en 2019. Pour les cancers du rectum, la chimiothérapie néo-adjuvante est éventuellement couplée à une radiothérapie. Le principal objectif d'une thérapie systémique est d'augmenter la survie sans progression (SSP) tout en diminuant le risque de récives.

La survie à 5 ans des patients atteints de CCR dépend du stade tumoral au moment du diagnostic. En effet, les résultats du « Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER) » sur la période 2012-2018 ont montré qu'un CCR localisé, au moment du diagnostic, a une survie à 5 ans de 90,9% alors que, pour un CCR métastatique, sa survie à 5 ans n'est que de 15,1%, comme illustré dans la Figure 9. Ces différences de survie sont fortement liées aux mécanismes de résistance développés par la tumeur et à l'efficacité des thérapies qui diminue souvent au cours de l'évolution du CCR. Ainsi, les stratégies thérapeutiques dépendent du stade tumoral (Benson et al., 2018; Dekker et al., 2019) :

- **Aux stades 0 et I** : la stratégie thérapeutique se limite à la chirurgie.
- **Au stade II** : la résection chirurgicale est le traitement de première intention et peut être associée à une chimiothérapie adjuvante pour les patients présentant un risque élevé de récive (notamment les tumeurs T4 de la classification TNM ou faiblement différenciées donc de haut grade de la classification histologique).
- **Au stade III** : la prise en charge thérapeutique consiste en une résection chirurgicale de la tumeur primaire et des ganglions lymphatiques régionaux atteints, lorsqu'elle est possible. A ce stade, les chimiothérapies combinées à base de fluoropyrimidines et d'oxaliplatine sont recommandées.

- **Au stade IV** : le traitement de première intention est la résection chirurgicale à la fois de la tumeur primaire et des métastases (si possible). Des chimiothérapies combinées : FOLFOX, FOLFIRI, FOLFIRINOX ou capécitabine + oxaliplatine (CAPOX), sont généralement administrées aux patients atteints de CCR métastatiques. A ce stade, les thérapies biologiques ciblées sont souvent envisagées en association avec certains protocoles de chimiothérapies.

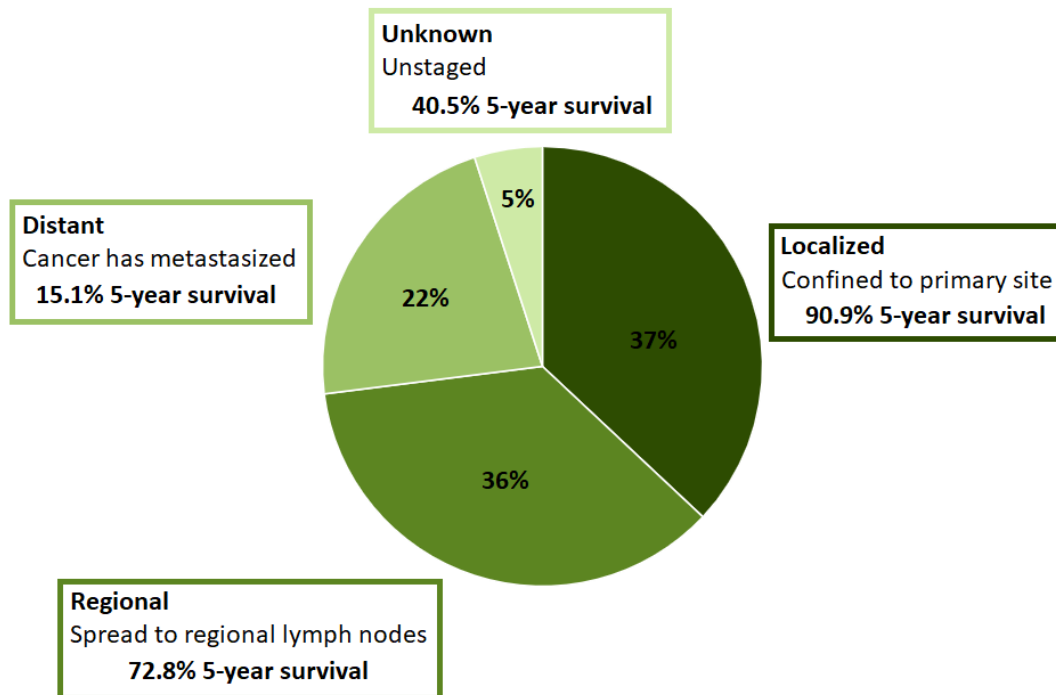


Figure 9. Proportion et survie à 5 ans en fonction des stades de cancers colorectaux.

Le pourcentage indiqué à l'intérieur du graphique correspond à la proportion de CCR détectée à ce stade au moment de diagnostic. (Graphique adapté à partir des résultats obtenus du SEER 17 2012-2018. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>)

Les patients atteints de CCR à un stade avancé reçoivent généralement plusieurs lignes de traitement, comprenant le plus souvent une combinaison de chimiothérapie avec une thérapie ciblée ou une immunothérapie, en fonction du statut mutationnel et MMR de la tumeur (Figure 10).

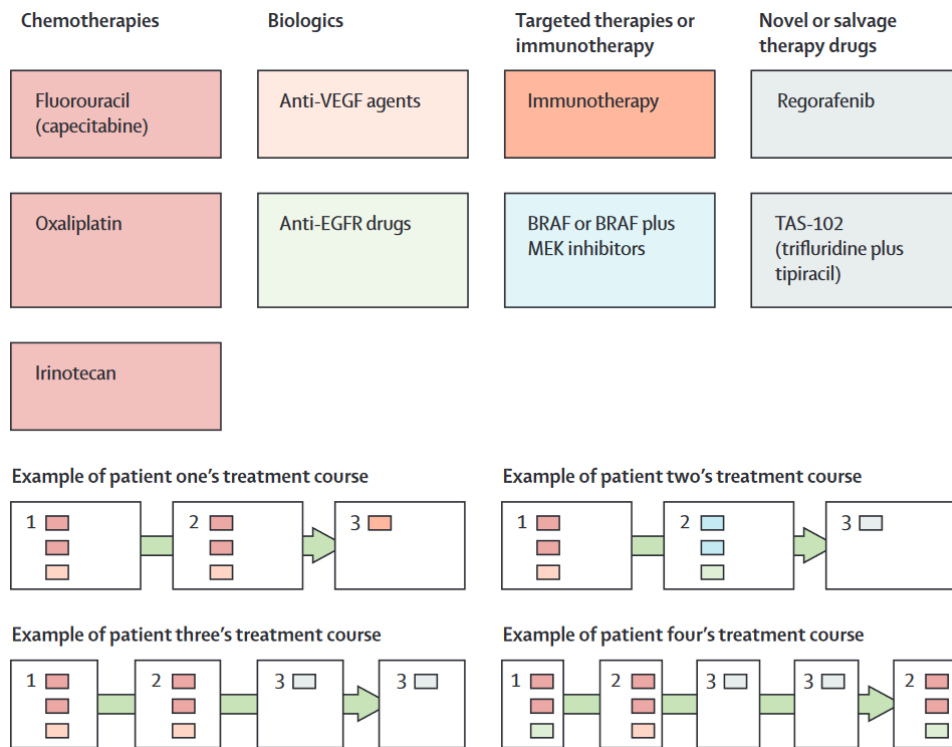


Figure 10. Classes de traitements utilisés pour les cancers colorectaux métastatiques.
(D'après Dekker *et al.* 2019)

I.2.5.3. Thérapies ciblées et immunothérapie

La stratégie thérapeutique dépend des caractéristiques de la tumeur, du patient et des traitements. L'efficacité des thérapies ciblées et de l'immunothérapie est directement liée aux statuts mutationnel et MMR de la tumeur. En effet, l'objectif de ces thérapies est de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses *via* les altérations génétiques qu'elles ont acquises. Les caractéristiques des tumeurs, connues sous le nom de « hallmarks of cancer », sont donc des cibles thérapeutiques potentielles, comme présenté dans la Figure 11 (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces caractéristiques correspondent aux capacités biologiques acquises au cours du processus multi-étapes de développement des tumeurs humaines. Aujourd'hui, dix caractéristiques ont été défini (Figure 11) (Hanahan and Weinberg, 2011) :

- Le maintien de la signalisation proliférative
- L'échappement aux signaux suppresseurs de croissance
- La résistance à la mort cellulaire
- L'immortalité réplivative

- L'induction de l'angiogénèse
- L'activation du pouvoir invasif et métastatique
- L'instabilité génomique
- L'inflammation
- La reprogrammation du métabolisme énergétique
- L'échappement à la surveillance du système immunitaire

Ces caractéristiques tumorales sont la cible de plusieurs thérapies ciblées. L'avantage des thérapies ciblées est qu'elle permet de limiter les effets néfastes liés à une atteinte des tissus sains, impactant la qualité de vie des patients, par rapport aux thérapies systémiques.

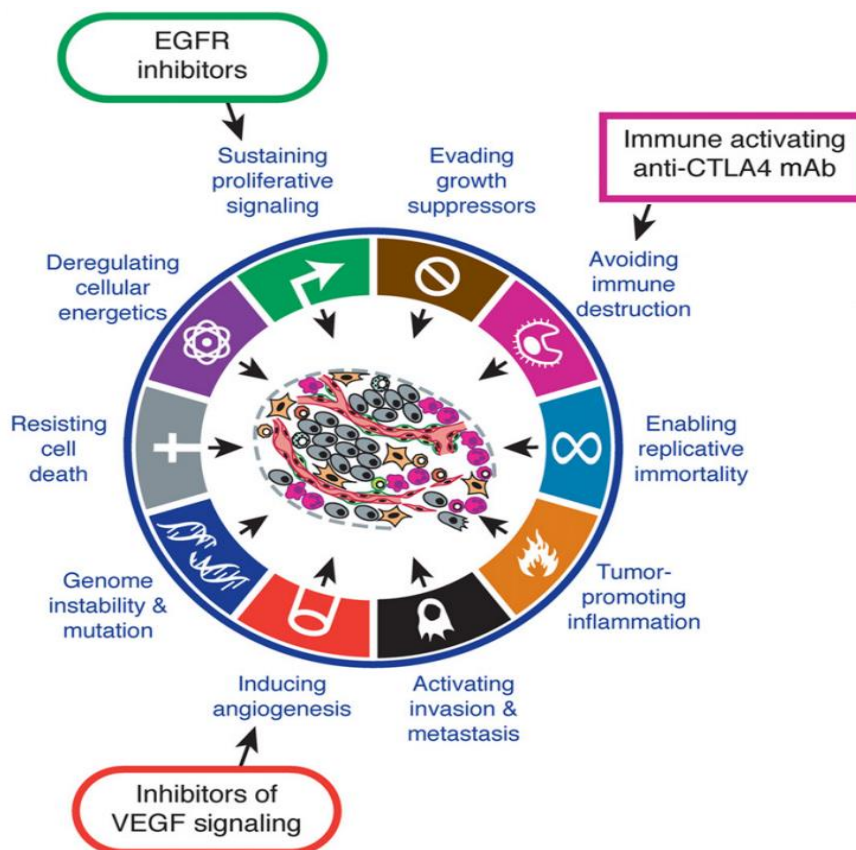


Figure 11. Les caractéristiques des tumeurs et leur potentiel ciblage thérapeutique.
(Adapté de Hanahan and Weinberg, 2011)

Deux grandes catégories de thérapies biologiques ciblées existent (Tableau 7) (Dekker et al., 2019; Van Cutsem et al., 2016) :

La thérapie anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) : cible l'angiogénèse tumorale. L'anticorps monoclonal anti-*VEGF* bévacicumab a été le premier agent biologique approuvé pour le CCR métastatique. L'association du bévacicumab avec des chimiothérapies combinées a permis d'améliorer la SSP. D'autres agents anti-*VEGF* ont été ensuite approuvés : le régorafénib, l'aflibercept et le ramucirumab. La thérapie anti-*VEGF* est recommandée pour les tumeurs porteuses de mutations dans les gènes *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF*. Pour les tumeurs *BRAF-V600E* mutées, une combinaison de trois chimiothérapies avec le bévacicumab est recommandée du fait de leur caractère agressif et de leur faible réponse aux traitements systémiques. Pour ce sous-type de tumeur, les stratégies combinatoires (inhibiteurs de *BRAF* et anticorps anti-*EGFR* associés à une chimiothérapie ou à des inhibiteurs de *MEK*) ont montré une amélioration des résultats dans plusieurs essais cliniques randomisés et sont désormais incluses dans les directives (Kopetz et al., 2019).

• **La thérapie anti-EGFR (epithelial growth factor receptor) :** cible la voie de signalisation liée à l'EGF, souvent surexprimée dans les CCR. Le cetuximab et le panitumumab sont les deux anticorps anti-*EGFR* qui ont été approuvés pour le traitement des tumeurs « wild-type » pour les gènes *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF*. Ces anticorps monoclonaux empêchent la liaison du ligand à son récepteur, réduisant la transduction du signal et limitant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses. Le cetuximab améliore le taux de réponse, la SSP et la SG en combinaison avec le FOLFIRI chez les patients atteints d'un CCR métastatique *RAS* non muté. De plus, le cetuximab et le panitumumab ont également démontré une augmentation de l'activité du FOLFOX pour le même type de tumeur.

Les thérapies biologiques ciblées sont généralement indiquées dans le traitement de première intention des patients atteints de CCR métastatiques, sauf en cas de contre-indication. D'après Van Cutsem *et al.*, les patients devraient recevoir au cours de leur traitement les trois agents cytotoxiques disponibles (fluoropyrimidine, oxaliplatine et irinotécan) et les traitements ciblés (anti-VEGF et, si *RAS* est « wild-type », anti-EGFR)

afin d'optimiser l'efficacité anti-cancéreuse et diminuer les risques de récurrences (Van Cutsem et al., 2016).

Tableau 7. Principales thérapies ciblées utilisées dans le traitement du cancer colorectal.

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations
Targeted therapy	Bevacizumab	mAb anti-VEGF-A	<i>KRAS/NRAS/BRAF</i> Mutated tumors
	Regorafenib	Multikinase inhibitor targeting e.g., VEGFR and BRAF	
	Aflibercept	Recombinant fusion protein blocking VEGF-A/B	
	Ramucirumab	mAb anti-VEGFR-2	
	Cetuximab	mAb anti-EGFR	
	Panitumumab		

mAb : anticorps monoclonal. (D'après Hervieu *et al.* 2021)

Ainsi, l'inhibition de l'angiogenèse et des signaux de prolifération améliorent la survie de patients atteints de CCR à un stade avancé mais dépend du statut mutationnel de la tumeur. Les thérapies anti-VEGF sont recommandées pour les tumeurs présentant des mutations dans les gènes *RAS* ou *RAF* alors que les thérapies anti-EGFR sont conseillées pour les tumeurs « wild-type » concernant ces gènes. Donc, le statut mutationnel est un facteur prédictif de réponse aux thérapies ciblées.

Un autre facteur prédictif de l'efficacité des traitements a été démontré dans le cadre du CCR : le statut MMR d'une tumeur pour les immunothérapies. La perturbation du système immunitaire est une des caractéristiques des tumeurs (Figure 11). Dans les tumeurs présentant un phénotype déficient en MMR (dMMR) ou MSI, qui correspond à environ 15% des CCR localisés et 5% des formes métastatiques (Diaz et al., 2022), une réaction intense du système immunitaire a été observée. La voie « programmed death 1 (PD-1) » joue un rôle important dans le contrôle des réponses immunitaires cytotoxiques, mais sa dérégulation peut endommager l'organisme (Le et al., 2015). Au sein de cette voie, deux composants sont particulièrement importants : PD-1 et CTLA-4, connus sous le nom d'« immune checkpoints ». La protéine PD-1 est majoritairement présente à la surface des lymphocytes T et inhibe leur activité « locale » lors de la liaison de son ligand « programmed cell death ligand 1 (PD-L1) », afin de limiter l'auto-immunité lors d'une réponse inflammatoire. Les ligands PD-L1 et

PD-L2 étant fortement exprimés par les cellules tumorales, l'interaction entre PD-1 et PD-L1/L2 bloque la reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire. PD-1 comme CTLA-4 jouent donc un rôle clé dans la tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales. Ainsi, des anticorps bloquant ces récepteurs permettent d'attaquer efficacement les cellules cancéreuses (Dieu-Nosjean and Caux, 2019). Deux types d'anticorps ont été développés et approuvés dans le CCR (Tableau 8) (André et al., 2020; Dekker et al., 2019; Overman et al., 2017, 2018) :

- **Les anti-PD-1**, en particulier les anticorps monoclonaux pembrolizumab et nivolumab qui ont permis d'obtenir, seuls ou en combinaison, une réponse durable chez des patients précédemment traités par chimiothérapies et atteints de CCR métastatique MSI^{high} ou dMMR. Un essai clinique en phase 3 est en cours pour évaluer l'efficacité et l'inocuité du blocage de PD-1 par le pembrolizumab par rapport à la chimiothérapie standard comme traitement de première ligne du CCR métastatique MSI^{high}-dMMR.
- **L'anti-CTLA4** : ipilimumab ; qui associé au nivolumab a montré des taux de réponse élevés ainsi que des SSP et SG encourageantes.

Le statut MSI est un facteur de bon pronostic pour les CCR localisés de stades I et II, alors qu'il est de pronostic intermédiaire pour les stades III (Benson et al., 2018). En revanche, c'est un facteur de mauvais pronostic pour les stades métastatiques, les chimiothérapies conventionnelles étant moins efficaces. Les thérapies ciblant la voie PD-1 ne sont pas efficaces pour les CCR possédant une MMR active mais apportent un bénéfice conséquent pour les tumeurs MSI^{high}-dMMR. Des thérapies ciblant d'autres altérations génétiques comme l'amplification de *HER2* et le gène de fusion *NTRK* ont également été étudiées dans le CCR (Hervieu et al., 2021).

Tableau 8. Principales immunothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal.

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations
Immunotherapy	Pembrolizumab	mAb anti-PD-1	MSI-high tumors
	Nivolumab		
	Ipilimumab	mAb anti-CTLA4	

mAb : anticorps monoclonal. (D'après Hervieu *et al.* 2021)

Malgré les progrès thérapeutiques, la prise en charge des patients atteints de CCR métastatiques reste compliquée. En effet, bien que les approches thérapeutiques se multiplient, aucune de ces modalités de traitement n'est curative dans la plupart des cas de CCR métastatiques (Ricci-Vitiani et al., 2009). Les décès liés au CCR sont dans la majorité des cas dus à la survenue de métastases. Ainsi, une meilleure compréhension et détection des changements moléculaires associés aux métastases est nécessaire afin d'améliorer les traitements de CCR métastatiques.

En conclusion, la cancérogénèse colorectale est un processus multifactoriel et multi-étapes. En effet, la genèse des CCR sporadiques dépend de facteurs génétiques et épigénétiques ainsi que de facteurs environnementaux. L'accumulation progressive de mutations génétiques et d'altérations épigénétiques provoque la transformation de l'épithélium colique sain en carcinome invasif. Les trois principales voies de transformation sont caractérisées par une méthylation aberrante au niveau des îlots CpG ainsi qu'une instabilité chromosomique et des microsatellites. Grâce à l'identification de ces voies moléculaires, la classification CMS a émergé et permet, avec les classifications pTNM et histologique, de définir le pronostic des patients atteints de CCR et de déterminer les meilleures approches thérapeutiques. Les avancées thérapeutiques réalisées au cours des dernières décennies ont permis d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients atteints de CCR et leur taux de survie. En effet, la plupart de ces patients atteignent désormais des réponses cliniques majeures (Dekker et al., 2019). Les traitements anticancéreux couramment administrés visent principalement les caractéristiques qui distinguent les cellules normales saines des cellules cancéreuses (Van der Heijden and Vermeulen, 2019b). Les chimiothérapies éliminent préférentiellement les cellules tumorales proliférantes qui forment la masse tumorale tandis que les thérapies ciblées se focalisent sur les cellules cancéreuses possédant une mutation génétique ou une dépendance à certaines voies de signalisation. Une réduction de la taille de la tumeur, un meilleur contrôle de la maladie et une survie prolongée sont souvent observés chez les patients traités par ces thérapies. Malheureusement, la tumeur peut rechuter en raison de l'acquisition d'une résistance au traitement initialement efficace, connue sous le nom de « maladie résiduelle minimale (MRM) » (Van der Heijden and Vermeulen, 2019b). Cette résistance souligne qu'une petite fraction de cellules a échappé aux traitements

qui, parfois même après de nombreuses années, peut conduire à une récurrence. La MRM peut s'expliquer par la persistance de CSC après traitement en raison entre autres de leur résistance aux thérapies systémiques (Batlle and Clevers, 2017).

Chapitre II. Les cellules souches cancéreuses colorectales

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue : "The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials" (Hervieu et al.), publiée en 2021 dans le journal Cancers. Chaque partie de ce chapitre sera introduite dans ce manuscrit et approfondie dans la revue intégrée à la fin de ce chapitre.

II.1. Les cellules souches cancéreuses colorectales

II.1.1. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses

Les CSC représentent une sous-population cellulaire impliquée dans le développement tumoral ainsi que dans la survenue de métastases. Ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler afin de maintenir le « pool » de CSC et de se différencier pour former tous les types cellulaires qui composent la tumeur (Batlle and Clevers, 2017). Ces propriétés sont communes aux cellules souches normales, mais seules les CSC ont un potentiel tumorigénique. La transformation d'une cellule souche normale en CSC nécessite l'acquisition de caractéristiques spécifiques de la tumeur, telles qu'une croissance incontrôlée, une instabilité génétique et une résistance aux traitements (Jordan, 2006). Les CSC peuvent être à l'origine de toutes les cellules malignes d'une tumeur primaire et constituer un réservoir de cellules résistantes aux thérapies, en raison de leur résistance intrinsèque. La résistance des CSC est à l'origine des rechutes et des métastases, qui peuvent survenir malgré une réponse initiale de la tumeur aux chimiothérapies (Jordan, 2006). Ainsi, étant donné le rôle crucial des CSC dans les échecs thérapeutiques, mieux les comprendre et les cibler sont des enjeux majeurs d'un point de vue clinique.

II.1.2. Origine des cellules souches cancéreuses

Initialement identifiées dans la leucémie myéloïde aiguë, les CSC ont ensuite été découvertes dans de nombreux cancers solides, dont le CCR (Bonnet and Dick, 1997). Les premières publications sur les CSC colorectales (CSCC) se sont basées sur l'expression de marqueurs cellulaires pour les identifier (Barker et al., 2007, 2009; Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Sangiorgi and Capecchi, 2008; Vermeulen et al., 2008). Ces marqueurs sont exprimés à la fois par les cellules souches normales et par les CSCC, mais les niveaux d'expression sont

particulièrement élevés dans ces dernières. La chronologie de ces découvertes ainsi que les modèles expérimentaux utilisés sont résumés dans la revue Hervieu *et al.*, présente en fin de chapitre. Les marqueurs utilisés dans ces publications historiques sont : Lgr5, CD44, Bmi1, CD133, EpCAM, CD166, CD29 et CD24 ; dont les fonctions et leur rôle pronostique dans le CCR sont détaillés dans cette même revue. Tous ces marqueurs peuvent être exprimés par les CSCC, mais ils n'ont pas tous la même fonction. Les marqueurs CD133, Lgr5, Bmi1 et CD44v6, pris individuellement, ont été décrits comme identifiants à eux seuls les CSCC, alors que les autres marqueurs cités nécessitent d'être combinés. Toutefois, leur utilisation reste controversée en raison de l'absence de marqueur(s) universel(s). A l'heure actuelle, aucun marqueur n'est capable d'identifier spécifiquement la population de CSCC du fait des propriétés partagées entre les cellules souches normales, les cellules cancéreuses non-CSCC et les CSCC (Hirata et al., 2019).

Ainsi, l'auto-renouvellement, la différenciation multi-lignées, la tumorigénicité, la résistance aux thérapies et l'expression de certains marqueurs, caractéristiques de CSCC, permettent de les distinguer des cellules cancéreuses non-CSCC et sont donc utilisés pour les isoler.

II.2. Les méthodes d'isolement des cellules souches cancéreuses

L'isolement des CSCC représente un réel défi en raison de leur faible proportion au sein de la tumeur et de leur nature dynamique (Hirata et al., 2019). De nombreuses méthodes d'isolement des CSCC ont été développées à partir de leurs propriétés. Trois grandes méthodes se démarquent en fonction des caractéristiques utilisées : phénotypiques, fonctionnelles ou biophysiques.

II.2.1. Méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques

Pendant longtemps, l'utilisation de marqueurs de surface, seuls ou en combinaison, a été la méthode de référence pour identifier les CSCC. Les deux principales techniques de tri cellulaire à partir de cellules marquées sont : la « magnetic-activated cell sorting (MACS) », qui repose sur l'utilisation de billes magnétiques conjuguées à des anticorps monoclonaux ; et la « fluorescence-activated cell sorting (FACS) », qui utilise des anticorps conjugués à des fluorochromes (Cammareri et al., 2008). Dans les deux cas, les anticorps reconnaissent le ou les

marqueur(s) d'intérêt des CSCC, comme illustré dans la revue Hervieu *et al.* Ces deux technologies permettent de trier les CSCC avec une grande pureté mais nécessitent la disponibilité d'anticorps et le marquage des cellules, risquant de modifier leurs propriétés et d'induire une différenciation cellulaire (Mathonnet, 2014; Mélin et al., 2012). De plus, au vu de l'avancée de nos connaissances sur les CSCC et notamment sur leur plasticité, la caractérisation phénotypique est insuffisante pour définir une CSCC. Toutefois, l'utilisation de marqueur(s) est toujours d'actualité mais nécessite en parallèle l'analyse de leurs capacités fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*.

II.2.2. Méthodes basées sur des caractéristiques fonctionnelles

L'auto-renouvellement, la différenciation multi-lignée et la tumorigénicité sont des propriétés intrinsèques de CSCC, pouvant permettre de les identifier, comme précédemment évoqué. Les modèles de culture sans adhérence et en dilution limite évaluent la capacité d'une cellule tumorale, individuelle, à survivre dans ces conditions spécifiques *in vitro*. En théorie, seules les CSCC sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier pour former des colonies, en culture 2D, ou des sphères, en culture 3D (Hervieu et al., 2021). Les sphères formées reproduisent l'organisation cellulaire des tumeurs solides contenant des CSCC et constituent un outil pour tester des thérapies (Visvader and Lindeman, 2008). Les CSCC ont la particularité de pouvoir donner naissance à des colonosphères (sphères de cellules tumorales colorectales) et des colonies, en raison de leur capacité à croître et à se diviser indépendamment de leur environnement, ce que les cellules normales sont incapables de faire à cause de l'anoïkis (Borowicz et al., 2014). Toutefois, ces modèles ne permettent pas d'inclure le MET, en particulier la niche, qui joue un rôle important dans le maintien du caractère « souche ». Une nouvelle technique a émergé récemment : l'« organ-on-a-chip » qui permet d'étudier les interactions entre tissus et/ou avec le microenvironnement, en particulier le MET. Néanmoins, de nombreuses limites persistent pour l'ensemble de ces modèles, comme résumé dans la Figure 12 (Porter et al., 2020).

Recréer la morphologie structurelle est particulièrement importante pour les cancers qui proviennent de tissus fortement organisés, comme le côlon ou le rectum (Porter et al., 2020). La culture d'organoïdes offre cette opportunité en créant, à partir de prélèvements de patients, une organisation structurelle complexe et plus représentative du tissu d'origine, grâce notamment à la présence des cryptes coliques

et des différents types cellulaires qui les composent (Figure 12). Ce modèle permet ainsi d'étudier les propriétés les plus fondamentales des CSCC qui sont : l'auto-renouvellement et la différenciation.

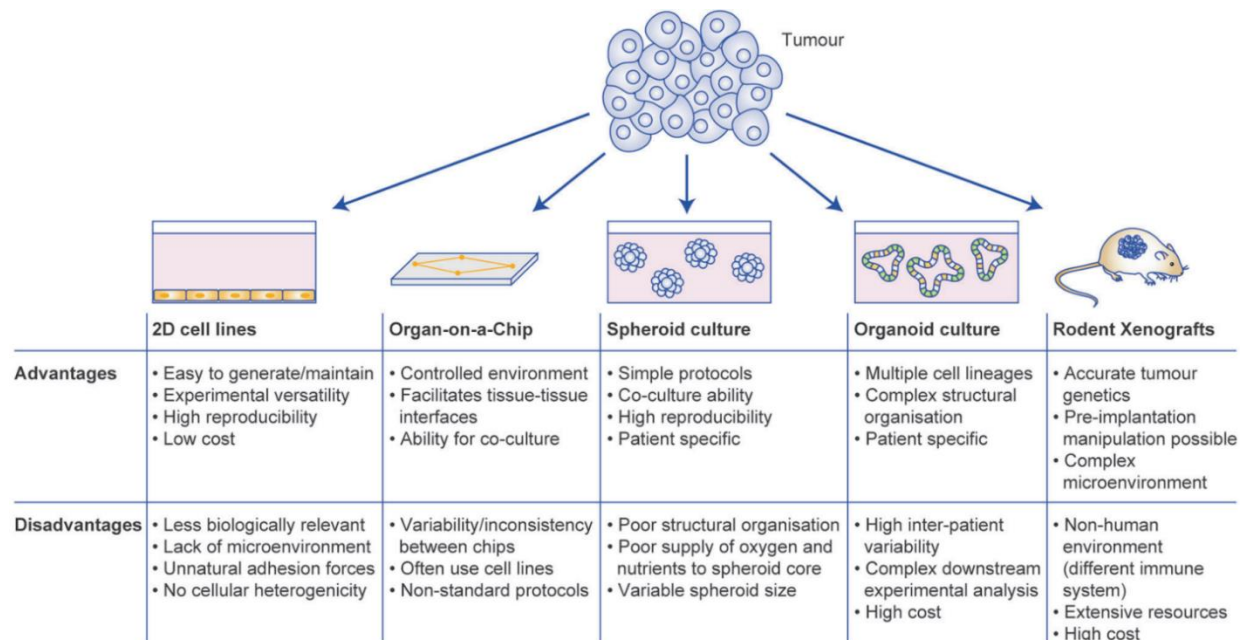


Figure 12. Avantages et inconvénients des modèles utilisés pour identifier les CSCC.

(D'après Porter *et al.* 2020)

Les CSCC possèdent d'autres caractéristiques qui leur sont spécifiques comme leur puissante capacité de détoxification grâce à une activité élevée de l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1), ainsi qu'une expression élevée de transporteurs d'efflux de la famille ATP-binding cassette (ABC), leur permettant de se protéger des substances cytotoxiques (Hervieu *et al.*, 2021). Enfin, la technique de référence pour définir une CSCC est basée sur son aptitude à initier des tumeurs *in vivo*, en dilution limite, chez des souris immunodéficientes. Cependant, l'utilisation de ces modèles murins nécessite des considérations éthiques, un équipement de laboratoire complexe et un budget conséquent (Figure 12).

Les techniques évoquées représentent une partie des méthodes utilisées pour identifier les CSCC à partir de leurs caractéristiques fonctionnelles, ce qui souligne l'étendue des possibilités mais également la complexité dans le choix des méthodes. Le plus souvent, plusieurs méthodes sont utilisées chacune mettant en évidence des propriétés spécifiques des CSCC.

II.2.3. Méthodes basées sur des caractéristiques biophysiques

Les études sur les CSCC reposent fréquemment sur l'expression d'un marqueur permettant d'identifier une population cellulaire enrichie en CSCC, généralement Lgr5, associée à une analyse des caractéristiques fonctionnelles. Cette approche sélectionne donc une sous-population cellulaire exprimant ce marqueur de surface afin de contourner l'hétérogénéité cellulaire intratumorale mais crée une sorte de « biais » par rapport à la population cellulaire globale. Les méthodes d'isolement basées sur les caractéristiques biophysiques des cellules permettent quant à elles d'isoler les CSCC sans *a priori*. La technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF) est une méthode « label-free », douce, non invasive, c'est-à-dire respectant l'intégrité fonctionnelle des cellules. Elle permet la séparation des cellules en fonction de leur taille, de leur densité mais également de leur forme ainsi que de leur rigidité, en utilisant le mode d'éluion « hyperlayer » (Mélin et al., 2012). La séparation des cellules par SdFFF dépend de l'éluion différentielle des sous-populations cellulaires soumises à la fois à l'action d'un profil parabolique, généré par le passage d'une phase mobile dans le canal, et à une force externe multi-gravitationnelle produite par la rotation du canal (Hervieu et al., 2021), comme illustré dans la Figure 13.

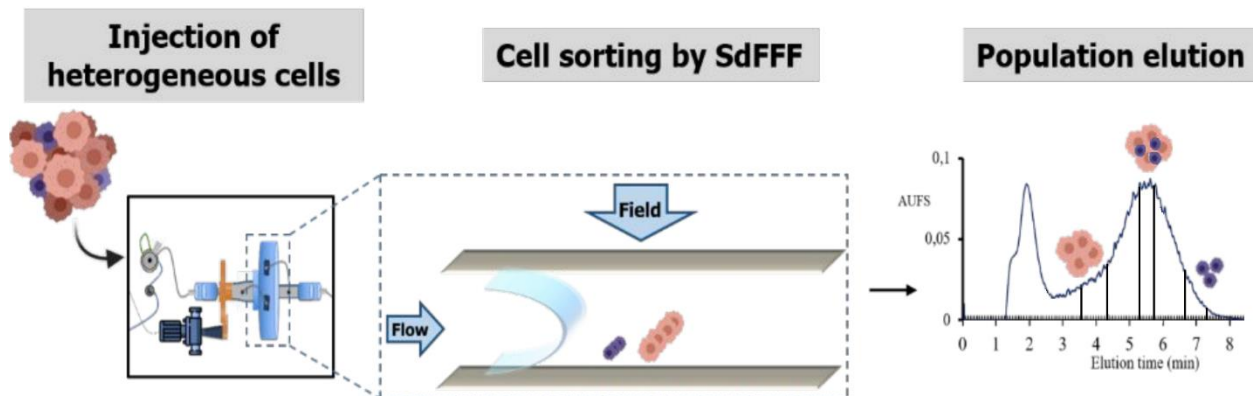


Figure 13. Tri cellulaire par la technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation.

Field : force ; flow : flux ; AUFS : unité arbitraire (Adapté de Saydé *et al.* 2021)

Au cours de cette dernière décennie, la technique SdFFF a été adaptée pour trier des sous-populations cellulaires d'origines diverses dans des domaines aussi variés que la neurologie, l'oncologie et les cellules souches (Faye et al., 2016; Lacroix et al., 2019; Mélin et al., 2012; Saydé et al., 2021; Vedrenne et al., 2016). Cette

méthode permet d'appréhender l'écologie d'une population cellulaire et de séparer les sous-populations cellulaires présentes au sein d'un échantillon biologique polydisperse. La matrice cellulaire peut être une lignée cellulaire ou une culture primaire, et le couplage de la SdFFF aux méthodes *ad hoc* de caractérisation permet d'identifier les différents sous-types de CSCC et de calibrer le fractogramme (AUFS = f(temps d'élution), Figure 13). Le tri cellulaire par SdFFF offre donc le précieux avantage de se faire sans *a priori* puisque l'absence de marquage permet d'étudier l'hétérogénéité cellulaire globale des échantillons et les CSCC.

Dans l'ensemble, les méthodes d'isolement disponibles actuellement ne permettent pas d'isoler assurément la population de CSCC, du fait de leur nature dynamique et hétérogène. L'association de plusieurs méthodes est nécessaire pour apporter de la puissance et de la rigueur dans le tri de ces cellules. Le choix de la méthode de tri se fait en fonction de la question expérimentale posée tout en prenant en considération les avantages et les faiblesses de chaque technique, résumés dans la revue Hervieu *et al.*

II.3. La pertinence clinique des cellules souches cancéreuses

Les progrès thérapeutiques réalisés au cours des dernières décennies permettent désormais à la plupart des patients atteints de CCR d'obtenir des réponses cliniques majeures (Van Cutsem et al., 2016). Pour ces patients, une régression tumorale est obtenue, reflétant l'effet thérapeutique sur les cellules formant la masse tumorale. Cependant, malgré un traitement initialement efficace, la récurrence est presque inévitable en raison du développement de résistances aux traitements, attribuées aux CSCC (Batlle and Clevers, 2017).

II.3.1. Mécanismes de résistance attribués aux cellules souches cancéreuses

L'efficacité des thérapies anticancéreuses actuelles est limitée par la résistance des tumeurs aux chimiothérapies ainsi qu'aux thérapies ciblées (Holohan et al., 2013). La résistance aux médicaments anticancéreux peut être intrinsèque (avant administration d'un traitement) et implique des facteurs de résistance préexistants dans la masse tumorale, ou bien elle peut être acquise au cours du traitement en raison de l'induction de diverses réponses adaptatives (Holohan et al., 2013). De plus, en raison du degré élevé d'hétérogénéité cellulaire intratumorale, la résistance aux

traitements peut également résulter de la sélection, induite par ce traitement, d'une sous-population tumorale résistante, comme les CSCC. De nombreux mécanismes sont impliqués dans la résistance aux thérapies et attribués aux CSCC (Hervieu et al., 2021). Ces principaux mécanismes sont : la modification du transport des thérapies et de leur cible, l'altération du métabolisme des traitements, l'amélioration de la réparation des lésions de l'ADN, la perturbation de l'équilibre entre les voies d'apoptose et de survie, et le rôle du MET. Après l'initiation tumorale, le MET peut devenir pro-tumorigénique et favoriser la survie des cellules cancéreuses, l'évasion du système immunitaire, la chimiorésistance, la migration et les métastases (Laplagne et al., 2019). L'ensemble de ces mécanismes de résistance sont approfondis dans la revue Hervieu *et al.*

II.3.2. Ciblage thérapeutique des cellules souches cancéreuses

Les CSCC sont une source majeure d'hétérogénéité cellulaire intratumorale, ce qui complexifie les stratégies thérapeutiques et leur ciblage. Généralement, un traitement cible un seul type de cellules tumorales, par exemple celles en prolifération ou celles portant une altération, ce qui ne permet pas l'élimination de l'intégralité de la tumeur. L'association de thérapies a permis d'élargir le nombre de cellules tumorales ciblées mais sans pour autant éviter le développement de résistances. Ces résistances sont souvent attribuées aux CSCC qui persistent après traitement en raison notamment de l'expression élevée de l'ALDH1 et des transporteurs ABC, ce qui empêche leur éradication. Le modèle classiquement représenté est l'élimination, par les thérapies systémiques, des cellules non-CSCC composant majoritairement la tumeur, mais sans parvenir à atteindre les CSCC (Figure 14) (Lytle et al., 2018).

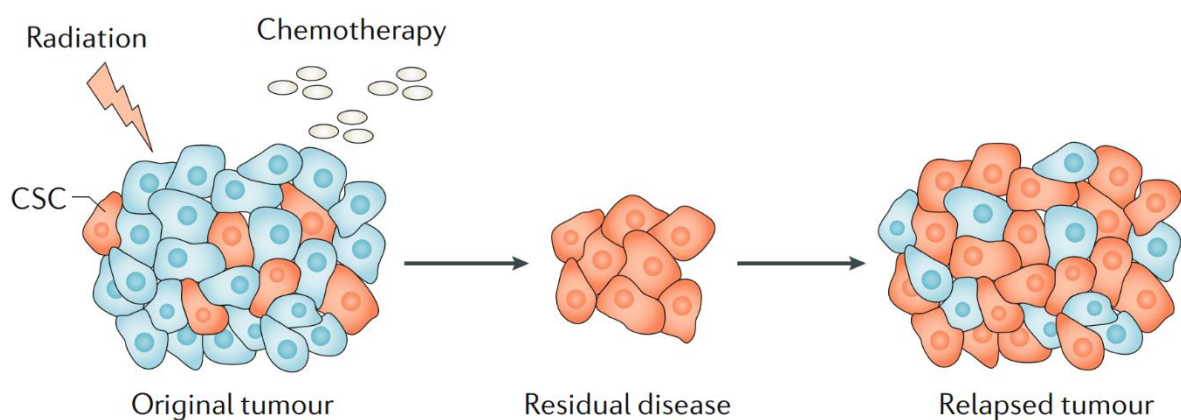


Figure 14. Résistance aux thérapies systémiques des cellules souches cancéreuses.

(D'après Lytle *et al.* 2018)

La complexité des thérapies anti-CSCC repose sur l'identification de cibles (protéines ou voies de signalisation) indispensables pour la survie de ces cellules mais pas ou peu nécessaires pour les cellules souches normales. Les caractéristiques et les voies de signalisation sont souvent communes à ces deux types de cellules souches ce qui complique le ciblage. Néanmoins, une voie de signalisation suractivée dans les cellules cancéreuses, y compris dans les CSCC, du fait de l'acquisition d'une altération génétique ou épigénétique lors de leur transformation peuvent, *via* le concept de létalité synthétique, permettre leur ciblage sans atteinte des cellules normales (O'Neil et al., 2017). Ce concept repose sur l'interaction d'au moins deux voies de signalisation contribuant à un processus cellulaire essentiel. Ainsi, les cellules normales ne possédant pas l'altération liée à la transformation cellulaire ne seront pas atteintes par le ciblage de la voie de signalisation parallèle, évitant ainsi les effets secondaires associés aux traitements actuels. L'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK, particulièrement importantes dans le développement CCR, ont montré un effet synergique et ont permis la sensibilisation des cellules aux chimiothérapies à base d'irinotécan (Tosi et al., 2018). Néanmoins, l'efficacité des thérapies fait face à un autre obstacle : la plasticité cellulaire au niveau du compartiment des cellules souches, mise en évidence par des approches de « lineage-tracing ». En effet, plusieurs publications ont démontré que le ciblage des CSCC ne suffisait pas pour éradiquer la tumeur. En effet, des cellules non-CSCC peuvent, sous l'effet de facteurs intrinsèques, comme des altérations génétiques ou épigénétiques, ou extrinsèques *via* le MET et les thérapies, acquérir des propriétés de CSCC pour compenser leur élimination (De Sousa e Melo et al., 2017; Fumagalli et al., 2020; Medema, 2017; Shimokawa et al., 2017). La niche des CSCC, et plus globalement le MET, joue un rôle crucial dans cette plasticité en permettant aux tumeurs de s'adapter plus facilement à la perte de compartiments clés (CSCC), compromettant ainsi l'efficacité des thérapies anti-CSCC.

Depuis plusieurs années, des essais-cliniques sur les CSCC sont en cours (Hervieu et al., 2021). Malheureusement, malgré des résultats précliniques intéressants, deux des trois essais cliniques en cours ne parviennent pas à démontrer l'avantage du nouvel agent pharmacologique en raison de la présence de toxicités sévères. Des modèles précliniques plus fidèles sont nécessaires car les approches actuelles ne sont pas suffisamment précises pour identifier les thérapies susceptibles

d'être cliniquement efficaces, en particulier celles qui ciblent les CSCC (Sonbol et al., 2019). Le développement de nouvelles thérapies doit tenir compte de la plasticité cellulaire ainsi que de l'hétérogénéité intra et intertumorale des patients atteints de CCR.

Dans l'ensemble, ces données soulignent l'importance des CSCC d'un point de vue thérapeutique. En tant que principal « moteur » de la résistance aux thérapies, les CSCC sont des cibles potentielles attractives pour le traitement du CCR. Le ciblage des CSCC pourrait ainsi permettre la prévention des rechutes ou de la survenue de métastases chez les patients atteints de CCR. Cependant, le développement d'agents thérapeutiques ciblant spécifiquement les CSCC est complexe, comme le soulignent les résultats des essais cliniques présentés dans la revue Hervieu *et al.* L'hétérogénéité cellulaire et la plasticité du compartiment des CSCC compliquent les stratégies thérapeutiques. Malgré une réponse thérapeutique initialement favorable, la majorité des thérapies ne parviennent pas à cibler la MRM associée aux CSCC, ce qui entraîne souvent une rechute. Les mécanismes de résistance sont nombreux et peuvent apparaître, avant et pendant le traitement, compliquant ainsi la prise en charge des patients. Malheureusement, à cause de ces résistances, jusqu'à 50% des cas de CCR diagnostiqués à un stade précoce finiront par développer une maladie métastatique (Atreya et al., 2017). En conclusion, afin d'obtenir une réponse thérapeutique à court et long termes, la stratégie thérapeutique idéale est de cibler à la fois les cellules cancéreuses (non-CSCC) de la masse tumorale pour obtenir une régression de la tumeur, les CSCC pour prévenir les rechutes et les métastases, ainsi que les signaux provenant du MET pour limiter la plasticité cellulaire et la réapparition des CSCC.

Revue Hervieu *et al.*, 2021

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue : « The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials » (Hervieu *et al.*), publiée en 2021 dans le journal *Cancers*.

Review

The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials

Céline Hervieu ¹, Niki Christou ^{1,2}, Serge Battu ¹ and Muriel Mathonnet ^{1,2,*}

¹ EA 3842 CAPTuR “Control of Cell Activation in Tumor Progression and Therapeutic Resistance”, Faculty of Medicine, Genomics, Environment, Immunity, Health and Therapeutics (GEIST) Institute, University of Limoges, 87025 Limoges CEDEX, France; celine.hervieu@unilim.fr (C.H.); christou.niki19@gmail.com (N.C.); serge.battu@unilim.fr (S.B.)

² Department of General, Endocrine and Digestive Surgery, University Hospital of Limoges, 87025 Limoges CEDEX, France

* Correspondence: muriel.mathonnet@unilim.fr

Simple Summary: Cancer stem cells (CSCs) fuel tumor growth, metastasis and resistance to therapy in colorectal cancer (CRC). These cells therefore represent a promising target for the treatment of CRC but are difficult to study because of the complexity of their isolation. This review presents the methods currently used to isolate colorectal CSCs as well as the techniques for characterizing these cells with their advantages and limitations. The aim of this review is to provide a state-of-the-art on the clinical relevance of CSCs in CRC by outlining current treatments for CRC, the resistance mechanisms developed by CSCs to overcome them, and ongoing clinical trials of drugs targeting CSCs in CRC. Overall, this review addresses the complexity of studying CSCs in CRC research and developing clinically effective treatments to enable CRC patients to achieve a short and long-term therapeutic response.

Abstract: The treatment options available for colorectal cancer (CRC) have increased over the years and have significantly improved the overall survival of CRC patients. However, the response rate for CRC patients with metastatic disease remains low and decreases with subsequent lines of therapy. The clinical management of patients with metastatic CRC (mCRC) presents a unique challenge in balancing the benefits and harms while considering disease progression, treatment-related toxicities, drug resistance and the patient’s overall quality of life. Despite the initial success of therapy, the development of drug resistance can lead to therapy failure and relapse in cancer patients, which can be attributed to the cancer stem cells (CSCs). Thus, colorectal CSCs (CCSCs) contribute to therapy resistance but also to tumor initiation and metastasis development, making them attractive potential targets for the treatment of CRC. This review presents the available CCSC isolation methods, the clinical relevance of these CCSCs, the mechanisms of drug resistance associated with CCSCs and the ongoing clinical trials targeting these CCSCs. Novel therapeutic strategies are needed to effectively eradicate both tumor growth and metastasis, while taking into account the tumor microenvironment (TME) which plays a key role in tumor cell plasticity.

Keywords: colorectal cancer; cancer stem cells; drug resistance; clinical trials



Citation: Hervieu, C.; Christou, N.; Battu, S.; Mathonnet, M. The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials. *Cancers* **2021**, *13*, 1092. <https://doi.org/10.3390/cancers13051092>

Academic Editors: Marta Baiocchi and Ann Zeuner

Received: 28 January 2021
Accepted: 27 February 2021
Published: 4 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

Colorectal cancer (CRC) is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide [1]. While the occurrence and mortality rates of CRC is declining in the European countries, these rates are increasing in rapidly transitioning countries, such as many African and South Asian countries [2]. The tumor–node–metastases (TNM) classification allows the stratification of patient groups according to the stage of the disease, based on anatomical information [3,4]. The location and stage of the tumor enable both the assessment of the patient’s prognosis and the determination of the therapeutic approach, depending on the

patient's overall health as well as the status of the tumor in terms of mutation and mismatch repair (MMR) [1,5]. Therapeutic options for the treatment of CRC are surgical resection, systemic therapy including chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy, local therapy for metastases and palliative therapy [1,6]. Importantly, surgical resection is the only curative treatment, if all macroscopic and microscopic tumor foci can be removed [1,6]. Unfortunately, even after well directed curative treatment, some patients experience treatment failure that may be associated with the development of multidrug resistance (MDR) during or after treatment. In addition, despite initially successful therapy, the development of drug resistance often leads to relapse in cancer patients, known as minimal residual disease (MRD) [7]. Both MDR and MRD can be attributed to a subpopulation of tumor cells with self-renewal and multi-lineage differentiation capabilities, the cancer stem cells (CSCs), known as colorectal cancer stem cells (CCSCs) for CRC [8]. CSCs contribute to tumor initiation and dissemination, treatment resistance and metastasis development. Tumor microenvironment (TME) and metabolic plasticity may also be involved in therapeutic failure by imposing selective pressures on cancer cells that lead to chemoresistance and cancer progression [9,10]. Therefore, the development of new therapies targeting CSCs, taking into account the TME and tumor metabolism, represents an interesting approach to overcome resistance to therapies [11]. In this review, we will present the origin of CCSCs and provide an overview of the techniques currently used to isolate them. Then, we will review current knowledge on the clinical relevance of CCSCs, through the clinical management of CRC and the mechanisms of resistance to therapies associated with CCSCs. Finally, we will introduce some clinical trials based on drugs targeting CCSCs.

2. Colorectal Cancer Stem Cells

The CSC theory suggests that tumor growth is driven by a small number of dedicated stem cells (SCs), the CSCs [8]. By definition, a CSC has the ability to self-renew in order to expand its pool and to generate all the differentiated cells that comprise the tumor (multipotency). The transformation of a colorectal stem cell into CCSC requires the acquisition of tumor-related features.

2.1. Colorectal Cancer Stem Cell Origin

The history of CSCs began two decades ago with the discovery of CSCs in human acute myeloid leukemia (AML) by Dick and colleagues [12]. For the first time, a cell capable of initiating human AML in immunodeficient mice and possessing differentiation, proliferation and self-renewal capabilities was described. A few years later, using similar experimental approaches, the presence of CSC was demonstrated in solid cancers such as colorectal cancer. The origin of CSCs in CRC is controversial, and several hypotheses have been proposed. CCSCs are associated with the acquisition of malignant molecular and cellular changes either due to the accumulation of genetic and epigenetic alterations in restricted stem/progenitor cells and normal tumor cells, or to the dedifferentiation of somatic cells caused by various genetic and environmental factors [13–15]. CSCs exhibit tumor-related characteristics such as uncontrolled growth, tumorigenicity and therapy resistance, and may constitute the small reservoir of drug-resistant cells that are responsible for relapses after chemotherapy-induced remission, known as MRD, and distant metastasis [7,11]. Thus, CCSCs play a key role in the initiation, invasion and progression of CRC as well as resistance to therapy. These CCSCs give rise to heterogeneous tumors that can be serially transplanted into immunodeficient mice that resemble the original tumor [16]. In addition, CCSCs have the ability to form disseminated metastatic tumors due to their extensive proliferative potential [15]. One of the main challenges in the study of CCSCs is their isolation, due to their low percentage within the tumor [16]. However, the CCSC population appears to be phenotypically and functionally heterogeneous and dynamic, which is another barrier to their isolation [17]. Therefore, the development of therapies that selectively eradicate CCSCs offers promising opportunities for a sustainable clinical response but requires effective technologies to detect and isolate them [11].

2.2. Colorectal Cancer Stem Cell Isolation Methods

Different methods are used to isolate CCSCs, based either on the expression pattern of CCSC markers, the functional aspect of CCSCs, or their biophysical features [18]. The objective of this chapter is to present the techniques currently in use with the advantages and disadvantages of each approach.

2.2.1. CCSC Isolation Based on Phenotypic Features

Many stem cells markers were found to be associated with CCSC features. However, the heterogeneous and dynamic nature of CCSCs challenges their isolation and enrichment. The first publications from the literature identifying subpopulations of CSCs in CRC are summarized in Table 1. Experimental models, CCSC isolation methods and characterization techniques used by the authors are detailed in this table. Studies conducted by O'Brien et al. and Ricci-Vitiani et al. identified the first CCSC marker: the five-transmembrane glycoprotein CD133 [19,20]. However, its use has become controversial as the tumorigenic and clonogenic potential of CD133⁺-CSCs depends on the positivity for a specific glycosylated epitope of the CD133 protein [21].

Table 1. Experimental models, markers and CCSC isolation and characterization methods used in the first publications identifying CSCs in CRC.

References	Experimental Models	Identified CCSC Subpopulations	CCSC Isolation Methods	CCSC Characterization Assays
O'Brien et al. [20]	CRC patient tissues CRC cells from patient tumors Animal model (mice)	CD133 ⁺	MACS and FACS	Flow cytometry Immunohistochemistry Tumorigenicity assay
Ricci-Vitiani et al. [19]	CRC patient tissues CRC cells from patient tumors Primary tumor cell cultures Animal model (mice)	CD133 ⁺	MACS and FACS	Sphere formation assay Flow cytometry Immunohistochemistry Tumorigenicity assay
Dalerba et al. [22]	CRC patient tissues CRC xenograft lines Single-cell suspensions	EpCAM ^{high} /CD44 ⁺ EpCAM ^{high} /CD44 ⁺ /CD166 ⁺	FACS	ALDH assay Flow cytometry Tumorigenicity assay
Barker et al. [23]	Animal model (Ah-cre/Apc ^{flox/flox} and Lgr5-EGFP-IRES- creER ^{T2} /APC ^{flox/flox} mice)	Lgr5 ⁺	/	LacZ analysis Immunohistochemistry
Sangiorgi and Capecchi [24]	Animal model (Bmi1-IRES-Cre-ER mice)	Bmi1 ⁺	/	LacZ analysis Immunohistochemistry
Vermeulen et al. [25]	CRC patient tissues CRC cells and single-cell-derived cultures from patient tumors Animal model (mice)	CD133 ⁺ /CD24 ⁺ CD44 ⁺ /CD166 ⁺ CD24 ⁺ /CD29 ⁺	MACS and FACS	Sphere formation assay In vitro differentiation assay Immunohistochemistry Flow cytometry Tumorigenicity assay
Pang et al. [26]	CRC patient tissues CRC cells from patient tumors Animal model (mice)	CD133 ⁺ /CD26 ⁺ CD133 ⁺ /CD26 ⁺ /CD44 ⁺	MACS and FACS	Sphere formation assay In vitro invasion assays Chemotherapeutic treatments Tumorigenicity assay
Todaro et al. [27]	CRC patient tissues Sphere-derived adherent cultures CRC cells from patient tumors or spheres Animal model (mice)	CD44v6 ⁺	MACS and FACS	Immunofluorescence Immunohistochemistry Invasion assay Sphere formation assay Tumorigenicity assay

CRC: colorectal cancer; CCSC: colorectal cancer stem cells; CD: cluster of differentiation; MACS: magnetic-activated cell sorting; FACS: fluorescence-activated cell sorting; ALDH: aldehyde dehydrogenase.

Then, Clarke's group showed that EpCAM^{high}/CD44⁺ cells isolated from human CRC could establish a tumor in mice with morphological and phenotypic heterogeneity of the original tumor and concluded that CD44 and EPCAM markers could be considered robust CCSC markers [22]. In addition, the study by Dalerba et al. highlights an additional differentially expressed marker, CD166, which could be used to further enrich CCSCs in the EpCAM^{high}/CD44⁺ population [22]. Using lineage-tracing experiments in mice, Clevers and coworkers identified stem cells in the small intestine and colon using the marker gene *Lgr5* [28] and proposed them as the cells-of-origin of intestinal cancer [23]. At the same time, Sangiorgi and Capecchi's study found another intestinal stem cell marker in vivo,

Bmi1 [24]. Importantly, Bmi-1 and Lgr5 markers define two types of SCs, quiescent and rapidly cycling SCs, respectively [23,24], and may identify CCSCs. Vermeulen et al. showed that spheroid cultures from primary CRC have a tumor-initiating capacity and that a cell subpopulation expresses CD24, CD29, CD44 and CD166 markers, suggested as CCSC markers [25]. The study by Pang et al. identifies a subpopulation of CD26⁺ cells capable of developing distant metastases when injected into the mouse cecal wall and associated with increased invasiveness and chemoresistance, whereas CD26⁻ cells cannot [26]. Interestingly, the presence of CD26⁺ cells in the primary tumor of patients without distant metastases at that time may predict future distant metastases, highlighting a critical role of CSCs in the progression of metastatic cancer and important clinical implications [26]. The transmembrane glycoprotein CD44 has several splicing variants, including CD44v6, which appears to negatively impact the prognosis of CRC patients [29,30]. Todaro et al. demonstrated that all identified CCSCs express the CD44v6 marker, which supports their migration and promotes metastasis [27]. Each of these markers has its own function and role in the prognosis of CRC, as shown in Table 2.

Table 2. Functions and roles in CRC prognosis of CCSC markers.

CCSC Markers	Functions	Roles in Prognosis of CRC	References
Bmi-1	Polycomb-repressor protein Involved in self-renewal	High expression of Bmi-1 is associated with poor survival	[23,24,31,32]
CD24 (Heat stable antigen 24)	Cell adhesion molecule Alternative ligand of P-selectin	Strong cytoplasmic expression of CD24 is correlated with shortened patient survival	[25,33]
CD26	Cell adhesion glycoprotein Promote invasion and metastases	Elevated-CD26 expression is associated with advanced tumor staging and worse overall survival	[26,34]
CD29 (Integrin-β1)	Transmembrane protein Involved in cell adhesion	Overexpression of CD29 is correlated with poor prognosis and aggressive clinicopathological features	[25,35]
CD44	Transmembrane glycoprotein Regulate cell interactions, adhesion and migration	CD44 overexpression is associated with lymph node metastasis, distant metastases and poor prognosis	[36–38]
CD44v6	Bind hepatocyte growth factor Promote migration and metastases	High level of CD44v6 has an unfavorable impact on overall survival	[27,29,38]
CD133 (Prominin-1)	Cell surface glycoprotein Regulate self-renewal and tumor angiogenesis	CD133 expression is correlated with low survival in CRC patients	[21,39,40]
CD166 (Activated leukocyte adhesion molecule)	Cell adhesion molecule Mediate homophilic interactions	Overexpression of CD166 is correlated with shortened patient survival	[22,25,41]
EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)	Transmembrane glycoprotein Regulate cell adhesion, proliferation and migration	Loss of EpCAM expression is associated with tumor stage, lymph node and distant metastases and poor prognosis	[22,37,42]
Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)	Seven-transmembrane protein Target of Wnt pathway involved in self-renewal	Lgr5 expression is associated with lymph node and distant metastases, and overexpression with reduced overall survival	[23,28,37,43]

CCSC: colorectal cancer stem cells; CD: cluster of differentiation; ECM: extracellular matrix; CRC: colorectal cancer.

All these markers can be expressed by CCSCs, but they do not all have the same capacity. Some, such as CD133, Lgr5, Bmi-1, CD26 and CD44v6 alone identify CCSCs, while the other presented markers allow the identification of CCSCs only in combination with one or more of the aforementioned markers. In conclusion, these markers play a key role in the identification of CCSCs and can be used alone or in combination to sort CCSCs by magnetic-activated cell sorting (MACS) or fluorescence-activated cell sorting (FACS) techniques.

MACS is a magnetic-based cell isolation technique, using a positive selection strategy, presented in Figure 1 panel 1 [44]. Magnetic beads are conjugated to highly specific monoclonal antibodies that recognize CCSC marker on the surface of cells of interest. Then, the heterogeneous suspension of cells is passed through a separation column, in a magnetic field, to retain the cells labeled with magnetic beads and antibodies [45]. By switching off the magnetic field, target cells will be eluted. MACS is a fast and easy method of cell separation, especially for the isolation of CCSCs that represent a small cell population in the tumor mass. However, MACS is only a mono-parameter separation method that requires cell labelling and is unable to separate cells based on the variable expression of markers [44,45].

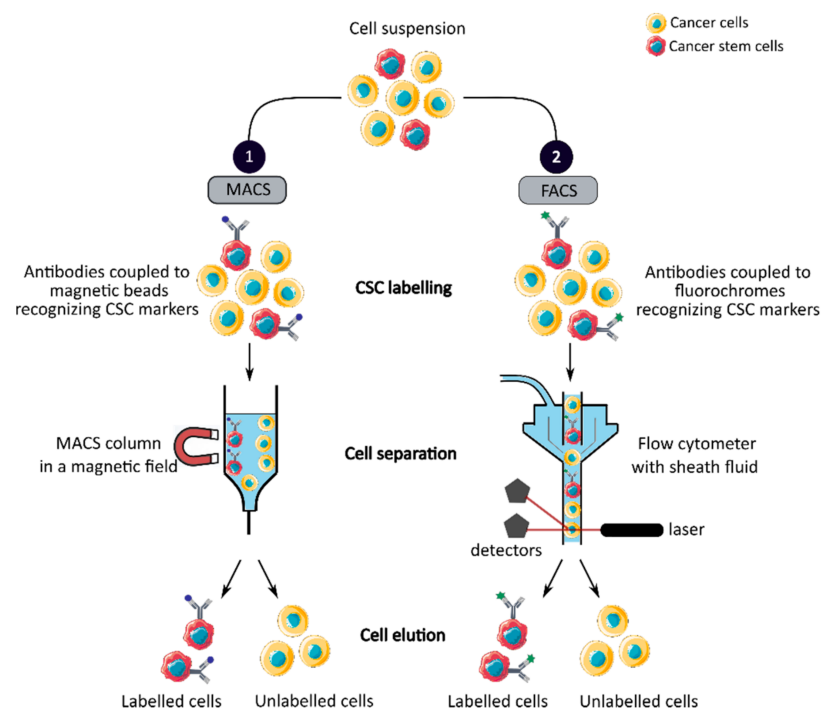


Figure 1. Phenotypic sorting of CSCs through the expression of CSC markers recognized by antibodies coupled to either magnetic beads, MACS (1), or fluorochromes, FACS (2). Once the antibodies are added, the cell suspension is passed through either a MACS column in a magnetic field that retains the antibody-labeled cells (1) or through a flow cytometer that distinguishes and isolates labeled cells from unlabeled cells (2). CSC: cancer stem cell; MACS: magnetic-activated cell sorting; FACS: fluorescence-activated cell sorting.

FACS uses fluorescently labeled antibodies that target the cell surface or intracellular markers to isolate CCSCs [44]. Antibodies are conjugated to fluorochromes and recognize the marker of interest within a cell suspension, as shown in Figure 1 panel 2 [44]. The cell suspension is then hydrodynamically focused into a stream of individual cells by the flow cytometer and passed through a laser which provides information on the size, granularity and fluorescent properties of single cells [18]. Fluorochromes with different emission wavelengths can be used simultaneously to allow multiparameter separations [44]. Both technologies allow the sorting of CCSCs with high purity but require the availability of antibodies and cell labeling, which can modify their properties and induce cell differentiation [16,44,46]. In addition, phenotypic characterization is insufficient to define a CCSC because these markers are also expressed by normal SCs.

Therefore, in order to confirm the detection and isolation of CCSCs, their functional capabilities need to be evaluated by *in vitro* and *in vivo* assays [18].

2.2.2. CCSC Isolation Based on Functional Features

CCSCs have many intrinsic properties that can be used to identify them, such as their capacity for self-renewal, multi-lineage differentiation, detoxification due to aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) activity and dye exclusion ability, colony/sphere formation and tumorigenicity, which are illustrated in Figure 2. These functional characteristics have been used to develop effective methods for isolating CCSCs. The ALDH activity assay is based on the use of a fluorescent and non-toxic ALDH substrate that freely diffuses into intact and viable cells [47]. Then, in the presence of the detoxifying enzyme ALDH, the substrate is converted into a negatively charged fluorescent product that is retained inside the cells. Thus, cells with high ALDH activity become brightly fluorescent and can be measured by flow cytometry as presented in Figure 2 panel 1a [47,48]. CCSCs increase their ALDH1 activity to resist to chemotherapeutic agents and prevent apoptosis by maintaining low levels of reactive oxygen species [47]. The advantage of the ALDH assay is high stability compared to the use of surface markers, but its specificity is low due to its expression in both normal SCs and CSCs [48].

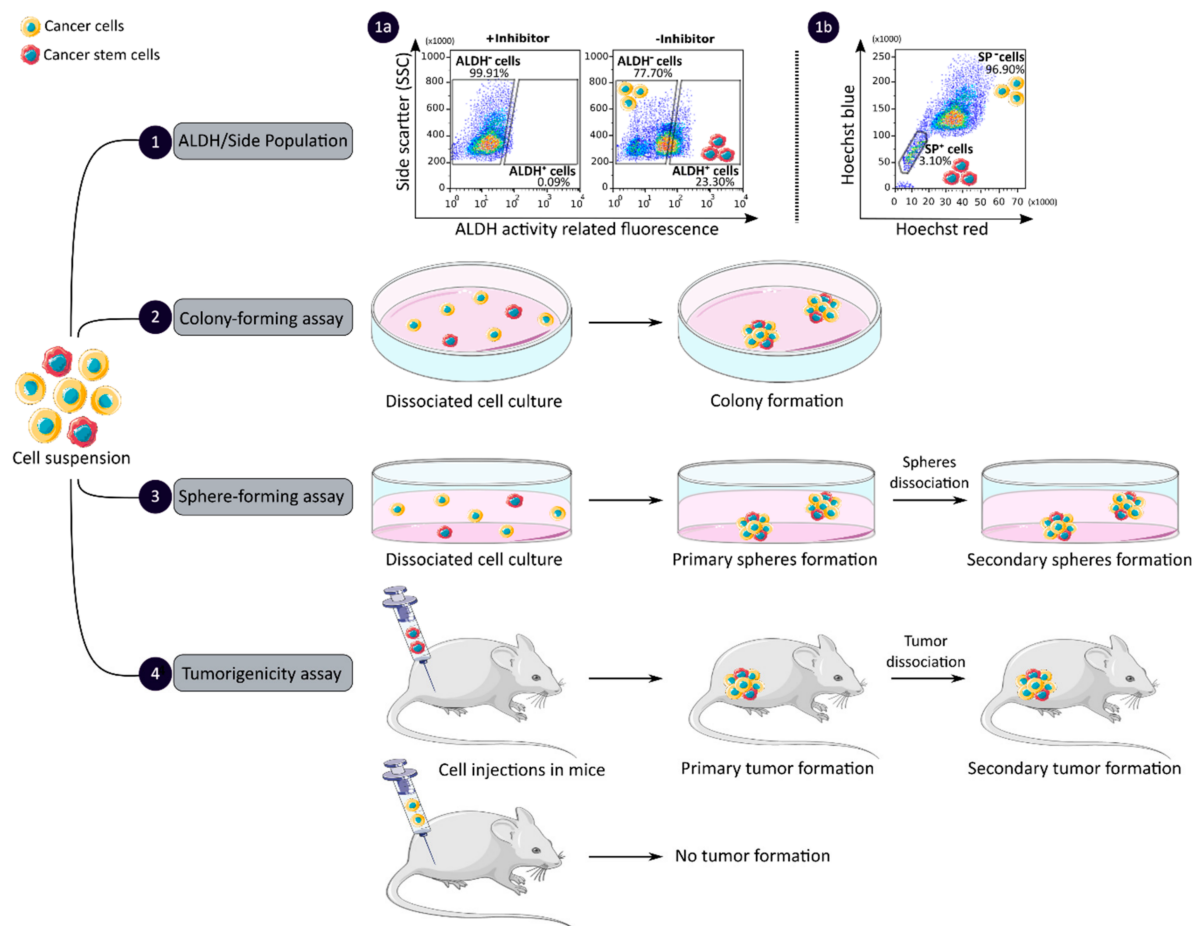


Figure 2. Functional sorting of CSCs due to their specific properties such as enhanced detoxification (1), ALDH (1a) and SP (1b), in vitro self-renewal and differentiation capacity, colony- (2) and sphere-forming (3) assays, and the ability to form tumors in vivo, tumorigenicity assay (4). CSC: cancer stem cell; ALDH: aldehyde dehydrogenase; SP: side population.

The side population (SP) assay relies on the differential ability of the cells to efflux dye via ATP-binding cassette (ABC) transporters [49]. Hoechst33342 is a fluorescent dye that binds all nucleic acids and has the particularity of passing through the plasma membrane of living cells. When excited by UV lights, Hoechst dye emits a fluorescence that can be detected by a flow cytometer [49]. SP cells are capable of actively removing the dye from the cell and have a unique low Hoechst fluorescence emission, as shown in Figure 2

panel 1b. CCSCs highly express efflux transporters, such as multidrug resistance protein 1 (ABCB1), multidrug resistance-associated proteins (ABCC1) and breast cancer resistance protein (ABCG2), to protect themselves against cytotoxic substances and therefore look like SP cells [18]. The SP assay is an easy and reliable method that does not require cell labeling, but due to its low purity and specificity, the SP assay is often combined with cell labeling to significantly increase the purity of sorted CSCs [18,49].

Colony and sphere formation assays evaluate *in vitro* the self-renewal and differentiation capacities of individual cells in two (2D) and three (3D) dimensions, respectively, which are shown in Figure 2, panels 2 and 3 [50,51]. Both assays are based on non-adherent cultures using either a soft agar layer (2D) or low adherent plates (3D) [52,53]. In the soft agar method illustrated in Figure 2 panel 2, the suspension of individual cells is mixed with the soft agar which may, after several weeks of incubation, give colonies that can be stained with crystal violet to determine their number and size [50,52]. In comparison, in the 3D culture shown in Figure 2 panel 3, the individual cells in suspension are grown at very low cell density and in serum-free medium (DMEM/F12 medium) supplemented with growth factors (human recombinant basic fibroblast growth factor and human recombinant epidermal growth factor), N2 supplement, glucose, insulin and optionally antibiotics such as penicillin/streptomycin for several weeks to obtain spheroids [51,54]. The produced spheroids mimic various characteristics of solid tumors, such as growth kinetics, gene expression pattern and cellular organization with the outer layer containing highly proliferative cells, the middle layer with senescent or quiescent cells and the inner layer comprising necrotic cells due to a lack of oxygen and nutrients [53]. CCSCs can be identified in both techniques as they have the ability to form larger and more numerous colonies and are capable of giving rise to a tumor sphere (colonosphere) resembling the primary sphere when passed in series, due to their ability to grow and divide independently of their environment which normal cells are unable to do because of anoikis [18,52,55]. Thus, *in vitro*, 3D models appear to be a relevant preclinical model for testing new drugs, evaluating potential combinations and understanding drug resistance, by mimicking CSC-containing tumors *in vitro*, before testing them *in vivo* [18,53,55]. However, these models require well-established protocols and appropriate cell dilution to certify that each colony/sphere is derived from a single cell [18].

The tumorigenicity assay is considered the gold standard method for studying the CSC properties of human tumors *in vivo* [18,56]. This approach allows to determine the tumor-initiating ability of cancer cells in immunodeficient mice and their capacity for self-renewal *in vivo* after the dissociation of primary tumors and transplantation in secondary recipient mice, as illustrated in Figure 2 panel 4 [57]. *In vivo* limiting dilution is the best method for identifying the lowest concentration of cells capable of forming a tumor and determining the frequency of CSCs [18,58]. Importantly, only CSCs have the ability to generate a xenograft that is histologically similar to the parental tumor from which it originated, to be serially transplanted in a xenograft assay due to their long-term self-renewal capacity, and to generate daughter cells [56,58]. However, the use of mouse models requires ethical consideration and complicated laboratory equipment. In addition, the results of xenograft experiments are highly dependent on the number of cells, the implantation site and the incubation period, which leads to certain limitations [18]. Nevertheless, mouse models remain unique models for studying the biology of CSCs *in vivo* [57,58].

2.2.3. CCSC Isolation Based on Biophysical Features

The development of enrichment and isolation methods for CCSCs without cell labeling offers new perspectives, such as sorting techniques based on biophysical characteristics. The sedimentation field-flow fractionation (SdFFF) is a gentle, non-invasive and label-free method that prevents interference for further cell use and the allows separation of cells according to their size, density, shape and rigidity [16,59]. Cell separation by SdFFF depends on the differential elution of cell subpopulations submitted both to the action of a parabolic profile generated by the mobile phase in the channel and to a multigravitational external

field generated by the rotation of the channel, as presented in Figure 3 [16,59]. In the past decade, SdFFF cell sorting has been adapted and applied in many fields such as neurology, oncology and stem cells [16,60–62]. The study by Mélin et al. describes a strategy, based on SdFFF elution, to obtain activated and quiescent CSC subpopulations from eight different human CRC cell lines [16]. The combination of cell sorting by SdFFF with the grafting of these CSC-enriched fractions into chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model demonstrates the potential of SdFFF to produce innovative matrices for the study of carcinogenesis and the analysis of treatment sensitivity [16,63]. The advantages of this isolation method are the use of biophysical characteristics for cell sorting without cell labeling; however, this technique requires a large number of cells and is time consuming [46].

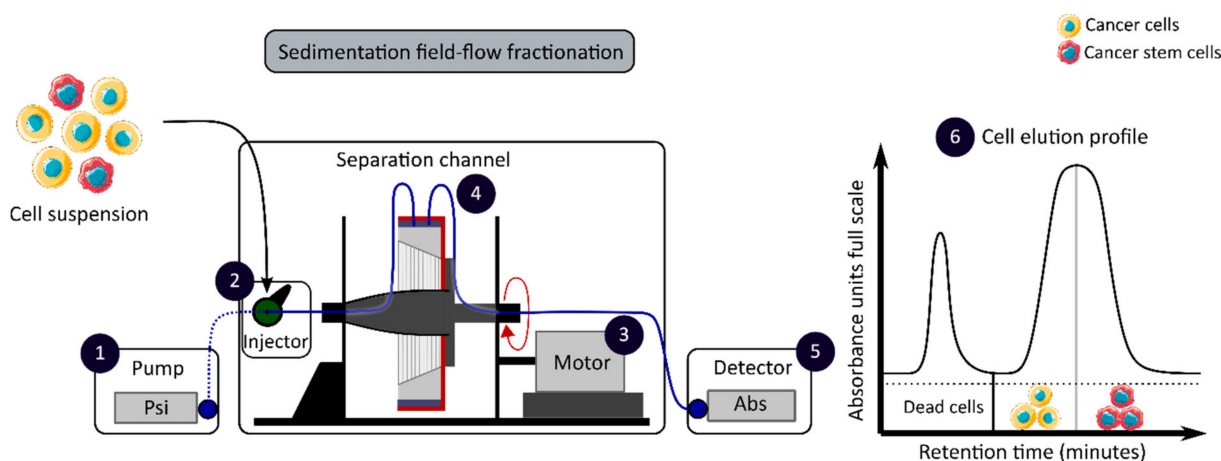


Figure 3. Biophysical sorting of CSCs according to their size, density, shape and rigidity using the SdFFF technique, which does not require cell labelling or fixation. The SdFFF is composed of a pump (1) to transport the mobile phase (PBS) and the cells, an injector (2) to introduce the cell suspension, a motor (3) to rotate the separation channel (4) and a detector (5) coupled to a computer to obtain the elution profile of the cell suspension (6). Psi is a common unit of pressure. CSC: cancer stem cell; SdFFF: sedimentation field-flow fractionation; PBS: phosphate-buffered saline; Abs: absorbance.

2.2.4. CCSC Isolation Methods: Discussion

Taken together, this chapter provides an overview of the techniques commonly used to identify and sort CCSCs, which are summarized in Table 3. The use of cell surface markers remains the most widely used in cancer research, however, it remains controversial due to the lack of a universal marker for CCSCs. Moreover, nowadays, none of the CSC isolation techniques are capable of 100% enrichment of CCSCs due to the shared properties between normal SCs, non-CCSCs and CCSCs [14,17]. As an example, Shmelkov and colleagues have shown that CD133 expression in the colon is not limited to SCs but is also expressed on differentiated tumor cells [64]. In addition, the authors found that both CD133⁺ and CD133[−] isolated from metastatic colon tumors are capable of initiating tumors in a serial xenotransplantation model [64]. A few years later, the study by Kemper et al. demonstrated that CD133 is expressed on the cell surface of CSCs and differentiated tumor cells but is differentially glycosylated [21]. Similarly, using the ALDH activity assay, Huang et al. found that ALDH1 is a marker of both normal and malignant human colonic SCs [48]. Consequently, cell surface markers and ALDH activity cannot be used alone to sort and define CSCs. Thus, the SdFFF technique offers new perspectives for CSC sorting that does not require cell labeling or fixation and thereby allows the combination of this technique with other CSC characterization methods. Therefore, the combined use of CCSC isolation methods can provide a more powerful and efficient tool for identifying and sorting CCSCs. The advantages and weaknesses of each method must be known in order to select the best method based on the experimental question, as shown in Table 3.

Table 3. Advantages and disadvantages of CCSC isolation methods.

Features	Isolation Methods	Advantages	Disadvantages	References
Phenotypic	MACS	High specificity Fast and easy method	No universal CCSC marker Monoparameter separation	[18,31,32]
	FACS	High specificity Multiparameter separation	No universal CCSC marker Require large number of cells	[18,31]
Functional	ALDH activity assay	High stability	Low specificity	[47,48]
	Side population assay	No cell labelling required	Low purity and specificity	[49]
	Colony and sphere formation assay	No need for complicated laboratory equipment	Absence of standardized protocol Require proper cell dilution	[50,52,53]
	Tumorigenicity assay	Gold standard method	Complicated laboratory equipment Ethical consideration	[56,58]
Biophysical	SdFFF	No cell labelling required Cell size and density separation	Time consuming	[16,46,59]

CCSC: colorectal cancer stem cell; MACS: magnetic-activated cell sorting; FACS: fluorescence-activated cell sorting; ALDH: aldehyde dehydrogenase; SdFFF: sedimentation field flow fractionation.

3. Clinical Relevance of Colorectal Cancer Stem Cells

Therapeutic advances made in recent decades now enable most cancer patients to achieve major clinical responses [6]. However, although therapeutic approaches are increasing, none of these treatment modalities is curative in most cases of advanced CRC [65]. Furthermore, despite initially successful treatment reflecting the therapeutic effect on the cells that form the tumor bulk, tumor recurrence is almost inevitable due to the development of drug resistance attributed to CCSCs [8].

3.1. Clinical Management of Colorectal Cancer

Treatment options and recommendations depend on several factors, including the patient's overall health, possible side effects, the type and stage of the tumor, and its mutational and MMR status [1,5]. Therapeutic approaches for the treatment of CRC include surgical resection, local therapies for metastatic disease, systemic therapy comprising chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy as presented in Table 4, and palliative chemotherapy [6]. To ensure the optimal survival and quality of life for patients, personalized therapy is crucial to enable cancer patients to maximize the benefits while minimizing the harms [5].

Surgical resection is the mainstay of curative intent treatment for localized and advanced CRCs but needs to be complete to be considered curative when there is regional invasion or histological factors with a poor prognosis [66,67]. Surgery can be associated with neoadjuvant therapy in order to shrink tumor mass and facilitate medical operation and/or with adjuvant therapy to limit cancer recurrence [1]. Importantly, neoadjuvant chemotherapy, possibly coupled with radiotherapy, is mainly indicated for rectal cancers [68]. Treatment regimens for patients with localized CRC generally include chemotherapy such as 5-fluorouracil (5-FU) or capecitabine, oxaliplatin and irinotecan, alone or in combination [69–73]. Leucovorin is commonly administered with 5-FU to enhance its anti-tumor effect [74]. Despite many advances in CRC treatment, approximately 20% of new CRC cases are already metastatic [75]. The most common sites of metastatic colorectal cancer (mCRC) are the liver, lungs and peritoneum. Unfortunately, up to 50% of patients with early-stage disease at diagnosis will eventually develop metastatic disease, and 80–90%

of them have unresectable metastatic disease because of the size, location, and/or extent of disease [76,77].

Local therapies are approved for mCRC with inoperable lesions. The choice of local therapies depends on the location and the extent of the metastases [78]. For patients with unresectable liver or lung metastases, radiofrequency ablation is recommended for the treatment of small and medium-sized lesions, but for larger lesions and those near vascular structures, microwave ablation or stereotactic body radiation therapy may be good alternatives [1,6]. Liver metastases can also be treated by administering a higher dose of chemotherapy directly into the hepatic artery compared to systemic therapy (hepatic arterial infusion) or by combining drug/radiation administration with blood vessel obstruction (chemo/radio-embolization) [79]. For patients with peritoneal metastases, cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy are recommended [6]. Local therapies can be administered with curative or palliative intent and are the most often used in combination with systemic therapy [6,79].

Systemic therapy for CRC aims to downsize the primary tumor or metastases in order to convert them to a resectable status and increase progression-free survival [6]. Patients with advanced CRC usually receive several lines of therapy, most often including a combination of chemotherapy with targeted therapy or immunotherapy, depending on tumor mutational and MMR status [5]. Targeted therapies are recommended for patients with *KRAS/NRAS/BRAF* mutated or wild-type tumors, *HER2*-amplified tumors and *NTRK* gene fusion-positive tumors, while immunotherapy is only offered for tumors with high microsatellite instability (MSI), as shown in Table 4. Thus, both statuses must be determined prior to the start of therapy [80]. Unfortunately, for advanced CRC patients whose overall health has deteriorated despite treatment, palliative treatments and the best supportive care are the only remaining options [5]. Therefore, the clinical management of patients with mCRC represents a unique challenge to balance benefits and harms, including the identification of strategies that improve disease response, limit treatment-associated toxicities, and improve the overall quality of life [81].

Table 4. Systemic therapies for localized and advanced colorectal cancer.

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations	References
Chemotherapy	5-Fluorouracil	Antimetabolite	Localized and advanced tumors	[82]
	Capecitabine	Antimetabolite		[72]
	Irinotecan	Topoisomerase inhibitor		[83]
	Oxaliplatin	Alkylating agent		[84]
	Trifluridine/Tipiracil	Nucleoside analog/TP inhibitor		[85]
Targeted therapy	Bevacizumab	mAb anti-VEGF-A	<i>KRAS/NRAS/BRAF</i> Mutated tumors	[86]
	Regorafenib	Multikinase inhibitor targeting e.g., VEGFR and BRAF		[87]
	Aflibercept	Recombinant fusion protein blocking VEGF-A/B		[88]
	Ramucirumab	mAb anti-VEGFR-2		[89]
	Cetuximab Panitumumab	mAb anti-EGFR		<i>KRAS/NRAS/BRAF</i> Wild-type tumors
Immunotherapy	Pembrolizumab	mAb anti-PD-1	MSI-high tumors	[91]
	Nivolumab			[92]
	Ipilimumab			mAb anti-CTLA4

Table 4. Cont.

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations	References
Newly developed therapy	Vemurafenib	BRAF inhibitors	BRAF V600E mutated tumors	[93]
	Dabrafenib			[93]
	Encorafenib			[94]
	Trametinib	MEK inhibitors		[93]
	Binimetinib			[94]
	Trastuzumab	mAb anti-HER2	HER2 amplified tumors	[95]
	Pertuzumab			[95]
	Lapatinib	Dual HER2/EGFR inhibitor		[96]
	Larotrectinib	TRK inhibitors	NTRK gene fusion-positive tumors	[97]
	Entrectinib			[98]

TP: thymidine phosphorylase; mAb: monoclonal antibody; VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor; EGFR: epidermal growth factor receptor; PD-1: programmed death cell receptor 1; CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; MEK: mitogen-activated kinases; TRK: tropomyosin receptor kinases; MSI: microsatellite instability; NTRK: neurotrophic receptor tyrosine kinase gene.

3.2. Mechanisms of Drug Resistance Associated with Colorectal Cancer Stem Cells

The effectiveness of current anticancer therapies is limited by the resistance of tumors to chemotherapy and targeted molecular therapies [99]. Resistance to anticancer drugs may be intrinsic, meaning that it occurs prior to treatment and involves pre-existing resistance factors in the mass of tumor cells, or it may be acquired during the treatment of tumors that were initially sensitive due to the induction of various adaptive responses [99]. Furthermore, due to the high degree of tumor heterogeneity, drug resistance may also result from the therapy-induced selection of a drug-resistant tumor subpopulation, such as CCSCs [99]. A wide range of molecular mechanisms are involved in drug resistance, as illustrated in Figure 4, and will be detailed in this chapter [74].

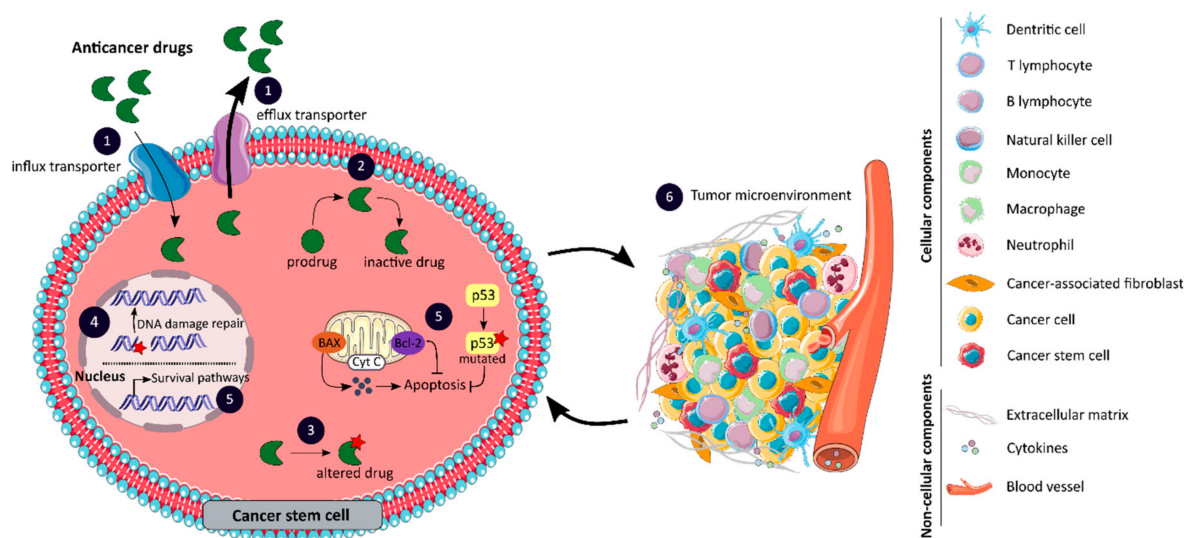


Figure 4. Major mechanisms of anticancer drug resistance attributed to CSCs such as changes in drug transport (1); impaired drug metabolism (2); alterations in drug targets (3); enhanced DNA damage repair (4); impaired balance between apoptosis and survival pathways (5); and the role of the tumor microenvironment comprising cellular and non-cellular components (6). CSC: cancer stem cell; DNA: deoxyribonucleic acid.

3.2.1. Changes in Drug Transport

The anticancer activity of a drug can be limited by poor drug influx or excessive efflux, which alters the amount of drug reaching the tumor, as shown in Figure 4 panel 1 [99]. Several transporter proteins, belonging to the superfamilies ABC and solute carrier (SLC), have been linked to anticancer drug resistance by interfering with drug transport [74]. The ABC transporters ABCB1, ABCC1 and ABCG2 play a pivotal role in the efflux of anticancer drugs [100,101]. In colon cancer, ABCB1 may be overexpressed, leading to reduced cellular accumulation of chemotherapy and therefore therapeutic failure, or may be induced by chemotherapy resulting in the acquired development of multidrug resistance [99]. The impact of SLCs on cancer therapy has been less documented, however, some members of the SLC superfamily are also involved in the transport of anticancer drugs [100]. Changes in the expression of SLC transporters, such as the organic cation transporter OCT2 and the organic zwitterion/cation transporters OCTN1, may affect the ability of tumor cells to uptake anticancer drugs and lead to the development of chemoresistance [100]. The Zhang et al. study shows that the overexpression of human OCT2 transporters increases oxaliplatin accumulation and cytotoxicity in colon cancer cell lines [102]. Taken together, efflux and influx transporters may confer resistance to anticancer agents, and the intrinsic drug resistance of CCSCs may be explained by the higher expression of these transporters [99,100,102].

3.2.2. Impaired Drug Metabolism

The efficacy of anticancer drugs may also be affected by changes in their metabolism, such as the production of an inactive metabolite, as highlighted in Figure 4 panel 2 [99]. The inactivation of anticancer drugs may be associated with the overexpression of drug-metabolizing enzymes, such as cytochrome P450-related enzymes (CYP), UDP-glucuronosyltransferase (UGT) and glutathione S-transferase (GST) [74]. CYP enzymes play a crucial role in the metabolism of many therapeutic drugs, including SN-38, the active metabolite of irinotecan. Indeed, SN-38 can be inactivated by CYP3A4- and CYP3A5-dependent oxidations that form inactive metabolites [103]. The study by Buck et al. shows a significant correlation between CYP3A5 expression and tumor response to irinotecan therapy in CRC [103]. In addition, increased CYP expression in CSCs appears to be associated with chemoresistance [104]. SN-38 is predominantly eliminated by glucuronidation which is mainly mediated by the polypeptide A1 of the UGT1 family, encoded by the *UGT1A1* gene [105]. However, inter-individual variations in UGT1A1 activity exist and are related to the presence of genetic polymorphisms. For example, patients with UGT1A1*28/*28 genotype have a higher risk of developing irinotecan-induced hematological toxicity and require a reduction in irinotecan dose which may impact its anti-cancer effect [105]. The GSTP1 subclass of the GST superfamily is overexpressed in patients with colon cancer and is an important mediator of intrinsic and acquired platinum resistance [106]. Stoeckl et al. demonstrated that GSTP1 Ile¹⁰⁵Val polymorphism is associated with increased survival in patients with advanced CRC receiving 5-FU/oxaliplatin chemotherapy [106]. Thus, the enhanced ability of tumor cells, particularly CCSCs, to inactivate anti-cancer drugs is mainly due to the overexpression of drug-metabolizing enzymes or polymorphisms [74].

3.2.3. Alterations in Drug Targets

One of the most common mechanisms of resistance to targeted therapy is mediated by alterations in the target protein as suggested in Figure 4 panel 3 [107]. Somatic mutations have been identified in the *KRAS* gene as a biomarker of intrinsic resistance to EGFR-targeting agents in patients with CRC [108]. The Misale et al. study reports for the first time that a substantial fraction of CRC patients who exhibit an initial response to anti-EGFR therapies have, at the time of disease progression, tumors with focal amplification or somatic mutations in *KRAS* which were not detectable prior to therapy initiation [108]. Thus, drug resistance resulting from *KRAS* alterations can be attributed not only to the selection of pre-existing *KRAS* mutant and amplified clones, but also to new mutations resulting from ongoing mutagenesis [108]. The acquisition of mutations in target proteins

also contributes to chemotherapy drug resistance. Irinotecan exerts its cytotoxic activity by inhibiting topoisomerase 1 (TOP1). However, increased TOP1 gene copy number at 20q11.2-q13.1 or mutations in the gene that result in reduced affinity for its active metabolite may be involved in increased drug resistance in CRC [74]. Therefore, the alteration of drug targets primarily due to the acquisition of mutations may result in resistance to targeted therapy and chemotherapy.

3.2.4. Enhanced DNA Damage Repair

Drug resistance can also be explained by an enhanced ability of tumor cells, especially CCSCs, to repair drug-induced DNA damage, as presented in Figure 4 panel 4. The repair of DNA adducts induced by platinum-based chemotherapy, such as oxaliplatin, is primarily mediated by the nucleotide excision repair (NER) pathway [74]. The upregulation of excision repair cross-complementing 1 (ERCC1), a key protein of the NER pathway, has been associated with oxaliplatin resistance in CRC [74]. In addition, the level of intratumoral ERCC1 mRNA expression is a predictive marker of survival in mCRC patients receiving combination chemotherapy with 5-FU and oxaliplatin [109]. Mismatched or wrongly matched nucleotides are corrected by the MMR system, which plays a crucial role in maintaining genome integrity [74]. DNA repair deficiency can be caused by mutations in MMR genes, such as *MLH1* and *MSH2*, and can lead to the MSI phenotype [99]. The study by Valeri et al. shows that the microRNA-21 (miR-21) downregulates hMSH2, and miR-21 overexpression reduces the therapeutic efficacy of 5-FU in a CRC xenograft model, suggesting that the downregulation of MSH2 with miR-21 overexpression may be an important indicator of therapeutic efficacy in CRC [110]. Consequently, the defects or upregulation of DNA repair pathways can serve as biomarkers of therapeutic response, and therapeutic effects can be enhanced by combining the inhibition of a DNA damage response pathway with DNA-damaging agents to eradicate CCSCs [111].

3.2.5. Impaired Balance between Apoptosis and Survival Pathways

Resistance to cell death is one of the hallmarks of human cancers that contribute to tumor progression and drug resistance [101]. Cell death by apoptosis is a physiological program controlled by a tightly regulated balance between pro-apoptotic, anti-apoptotic and pro-survival mechanisms [112]. However, this balance is frequently altered in cancer cells and particularly in CCSCs, as shown in Figure 4 panel 5. The tumor suppressor p53, encoded by the *TP53* gene, is essential for the induction of apoptosis in response to chemotherapy [74]. Nevertheless, p53 is found mutated in approximately 85% of CRC cases, and *TP53*-mutated colon cancer cells tend to be more resistant to many anticancer drugs, including 5-FU and oxaliplatin, compared to *TP53* wild-type cells [74,101]. The BCL-2 family, which contains pro- and anti-apoptotic members, plays a crucial role in the regulation of apoptosis. The loss of expression and/or activity of the pro-apoptotic factor BAX can be explained by frameshift mutations in the *BAX* gene and may result in chemoresistance [74]. The study by Nehls et al. suggests a major prognostic impact of BAX, whose protein expression appears to be important for the clinical outcome of 5-FU-based adjuvant chemotherapy in stage III colon cancer [113]. The balance between apoptosis and survival may also be altered by aberrantly overexpressed or overactivated anti-apoptotic factors, such as Bcl-2, Bcl-XL, the inhibitor of apoptosis proteins and the caspase 8 inhibitor FLIP [74,99]. Importantly, alterations in the genes encoding these anti-apoptotic factors have been linked to resistance to chemotherapy and targeted therapy [99]. Finally, the overactivation of several pro-survival signaling pathways, including Notch, Hedgehog, Wnt, Bone morphogenetic proteins, Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) and nuclear factor- κ B pathways, may also be associated with drug resistance [112]. Taken together, the altered balance between apoptosis and survival in cancer cells, and especially in CCSCs, prevents apoptosis even when DNA repair fails, which is another mechanism of resistance to therapy [112].

3.2.6. Role of the Tumor Microenvironment

In recent years, the TME has emerged as a key driver of tumor progression and drug resistance, challenging the development of new therapies in clinical oncology. TME contains both cellular components with cancerous and non-cancerous cells such as stromal myofibroblasts, endothelial cells, immune cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs), and non-cellular components including extracellular matrix (ECM), cytokines, growth factors and extracellular vesicles, as illustrated in Figure 4 panel 6 [114]. In the tumor stroma, CAFs secrete the cytokines CXCL1 and CXCL2 as well as the interleukin-6, which promote angiogenesis and tumor progression [46,114]. Vermeulen et al. showed that myofibroblast-secreted factors, in particular hepatocyte growth factor (HGF), enhance Wnt signaling activity in colon cancer cells and can restore the CSC phenotype in more differentiated tumor cells, both in vitro and in vivo [115]. Furthermore, CSCs reside in anatomically specialized regions of the TME, known as the CSC niche, which retain their properties and protect them from anticancer drugs, contributing to their enhanced resistance to treatment [46,114,116]. Importantly, CSCs can also be maintained in a quiescent state with minimum energy consumption and a low proliferation rate to resist therapies [114]. In response to environmental signals such as hypoxia, the niche adapts to ensure optimal conditions for CSC proliferation and differentiation [46]. CSCs may contribute to vessel recruitment during tumorigenesis by secreting angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXCL12, in order to accelerate angiogenesis in endothelial cells, which in turn secrete factors such as nitric oxide and osteopontin to maintain the stemness of CSCs [15]. Hypoxia is a key factor in cancer progression that regulates cell survival, angiogenesis, invasion and metastasis, via hypoxia-inducible factor (HIF) [14,116]. In addition, hypoxia can induce the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) that leads to the dissemination and invasion of tumor cells due to the loss of cell adhesion properties and the acquisition of a mesenchymal phenotype with motility and invasiveness [8,116]. The expression of SNAI1 protein, the main inducer of EMT, has been detected at the tumor–stromal interface in colon cancer [116] and elevated endogenous levels of SNAI1 in cancer cells have been shown to increase tumor initiation capacity and metastatic potential in mouse and human models [8].

3.2.7. Mechanisms of Drug Resistance Associated with CCSCs: Discussion

Several publications point out that one of the main technical issues in the CSC field is the plasticity of CCSCs and tumor cells, which may be involved in drug resistance [117–120]. Using the CRISPR-Cas9 technology, Shimokawa et al. demonstrated that the selective ablation of LGR5⁺ CCSCs in human CRC organoids leads to tumor regression in xenografts produced by these organoids [120]. However, after several weeks, tumor regrowth is observed and associated with differentiated tumor cells that dynamically replenish the pool of LGR5⁺ CCSCs, indicative of cellular plasticity [120]. Another study confirmed these results using CRC organoids that express the diphtheria toxin receptor under the control of the LGR5 locus to selectively ablate LGR5⁺ CCSCs [117]. Importantly, the removal of CCSCs limits primary tumor growth but does not prevent the regrowth of the tumor at the primary tumor site upon discontinuation of treatment due to proliferative LGR5[−] cells, whereas it does in metastatic lesions [117]. Thus, the authors demonstrated a protective role of selective CSC depletion in primary tumors on the appearance of distant metastases, suggesting an interesting therapeutic perspective for the management of metastatic diseases [117]. The process of cellular plasticity is crucial for the repopulation of impaired SC niches and tissue homeostasis, but its role in the formation of metastases is poorly studied [118]. Using a CRC mouse model and human tumor xenografts, Fumagalli et al. investigated the role of cellular plasticity in metastasis [118]. Surprisingly, the authors show that the majority of disseminated CRC cells in the circulation are LGR5[−] cancer cells and are capable of forming distant metastases, in which LGR5⁺ CSCs subsequently emerge and contribute to long-term metastatic growth [118]. Importantly, microenvironmental factors may enhance cellular plasticity [118]. Thus, cellular plasticity complicates the

development of new therapeutic strategies and the eradication of CCSCs does not appear to be sufficient to completely cure cancer due to the impact of the microenvironment [8]. The heterogeneous and dynamic nature of SCCCs constitutes another obstacle to their targeting. Using a marker-free and quantitative analysis of colon cancer growth dynamics, Lenos et al. showed that cells with CSC functionality are not necessarily the same cells as those expressing CSC markers [121]. Interestingly, the authors demonstrated that all tumor cells have the capacity to fuel tumor growth when placed in an appropriate environment, preferentially at the edge of the tumor close to the CAFs [121,122]. Thus, from the authors' point of view, the stem cell function in established cancers is not intrinsically but entirely spatiotemporally orchestrated, suggesting a major role of the microenvironment [121]. Consequently, cellular plasticity and the microenvironment appear to allow tumors to easily adapt to the loss of key compartments, thereby compromising therapeutic efficacy [122]. Therefore, TME plays a crucial role in primary tumor growth and metastasis formation by protecting CSCs from therapeutic agents and appears to be an important target along with the other resistance mechanisms discussed in this chapter for the development of new therapies [116].

4. Clinical Trials on Colorectal Cancer Stem Cells

Clinical trials targeting CCSCs are rare. The complexity relies on the identification of molecular targets required to maintain cancer stemness in CSCs, but not or less by normal tissue SCs, to selectively target CSCs [123]. All clinical trials from the National Institute of Health are listed on the [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) website [124]. We narrowed our search by focusing on the terms "colorectal cancer" and "cancer stem cells", resulting in the identification of eight intervention studies as of September 30, 2020. Among them, we excluded all clinical trials whose status was withdrawn (N = 1) and terminated (N = 2) and focused on the remaining clinical trials (N = 5). Subsequently, from these five clinical trials, we selected and reviewed the clinical trials on pharmacological agents under investigation (N = 3), as presented in Table 5.

Table 5. Clinical trials on colorectal cancer and cancer stem cells from [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

Trial Registration and Status	Study Titles	Interventions	Phases	Investigators
NCT02753127 Active, not recruiting	A Study of Napabucasin (BBI-608) in Combination with FOLFIRI in Adult Patients with Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer (CanStem303C)	Drug: Napabucasin	Phase III	Sumitomo Dainippon Pharma Oncology, Inc
NCT01189942 Completed	A Study of FOLFIRI Plus OMP-21M18 as 1st or 2nd-line Treatment in Subjects with Metastatic Colorectal Cancer	Drug: OMP-21M18	Phase I	Mereo BioPharma (OncoMed Pharmaceuticals, Inc.)
NCT02859415 Recruiting	Continuous 24 h Intravenous Infusion of Mithramycin, an Inhibitor of Cancer Stem Cell Signaling, in People with Primary Thoracic Malignancies or Carcinomas, Sarcomas or Germ Cell Neoplasms with Pleuropulmonary Metastases	Drug: Mithramycin	Phase I and II	National Cancer Institute

Napabucasin (BBI608) is the first-in-class cancer stemness inhibitor that targets the STAT3 pathway [123,125]. In a preclinical study, Li et al. showed that BBI608 inhibits the expression of stemness genes and the self-renewal of CSCs and succeeds in depleting CSCs whereas standard chemotherapy leads to the enrichment of these cells [123]. In addition, the authors demonstrated the ability of BBI608 to block both cancer relapse and metastasis in vivo, using a mouse CRC model [123]. These preclinical results provide an interesting approach for the development of new anticancer therapies targeting cancer stemness [123,125]. Several clinical trials were designed prior to the ongoing phase III clinical trial, shown in Table 5. Firstly, a phase I dose-escalation study was conducted in adult patients with advanced malignancies who had failed standard therapies in order to investigate the safety and anti-tumor activity of BBI608 as monotherapy (NCT01775423) [126,127]. BBI608 showed encouraging signs of clinical activity with only mild adverse events observed and an unreached maximum tolerated dose (MTD), suggesting an excellent safety profile of BBI608 at 500 mg twice daily [126,127]. Subsequently, two additional phase Ib/II clinical trials were conducted to determine the safety and anti-tumor activity of BBI608 in combination with panitumumab in *KRAS* wild-type patients with mCRC (NCT01776307) or with FOLFIRI (5-FU/leucovorin/irinotecan) +/- bevacizumab in mCRC (NCT02024607). Both clinical trials showed a high disease control rate (DCR) including patients with partial response, stable disease or tumor regression, which confirms the safety of these combinations with encouraging anti-tumor activity [128–130]. Thereafter, a phase III study was designed to evaluate the efficacy and safety of BBI608 versus placebo with the best supportive care in patients with advanced CRC who had failed all available standard therapy (NCT01830621) [131]. In this trial, BBI608 did not improve overall survival (OS) or progression-free survival (PFS) in unselected patients with advanced CRC but did improve OS in pSTAT3-positive patients compared to the placebo group, suggesting that STAT3 may be an important target for CRC treatment [131,132]. Finally, the ongoing phase III clinical trial aims to assess the efficacy of BBI608 plus FOLFIRI versus FOLFIRI alone in previously treated mCRC patients (N = 1250) (NCT02753127) [133]. Patients are randomized 1:1 in each group and stratified by time to progression to first-line therapy, *RAS* mutation status and primary tumor location [133]. The endpoints of this clinical trial are OS, PFS, DCR and objective response rate in both the general population and p-STAT3-positive subpopulation [133].

Demcizumab (OMP-21M18) is a humanized anti-DLL4 (delta-like ligand 4) antibody that inhibits the Notch pathway and CSC activity through the inhibition of tumor growth and reduction in tumor-initiating cell frequency [134–136]. The study by Ridgway et al. shows that treatment with a DLL4-selective antibody disrupts tumor angiogenesis and inhibits tumor growth in several mouse tumor models [137], these results were confirmed by Hoey et al. using xenograft models of colon tumors [136]. In addition, treatment with anti-human DLL4, alone or in combination with irinotecan, delays tumor recurrence and reduces the frequency of CSCs, as demonstrated by the limiting dilution assay and in vivo tumorigenesis studies [136]. As a result of these preclinical results, several clinical trials were conducted with OMP-21M18. A phase I dose-escalation study was designed to determine the safety, MTD and pharmacokinetics of OMP-21M18 in patients with a previously treated solid tumor for which there is no remaining standard curative therapy (NCT00744562) [138]. In this trial, no more than one dose-limiting toxicity (DLT) was observed at each dose, corresponding to the appearance of side effects severe enough to prevent an increase in the dose of the drug, and the MTD was not reached [138]. OMP-21M18 was generally well tolerated by patients at doses below 5 mg per week and showed anti-tumor activity highlighted by the stabilization of the disease and decrease in tumor size. However, the prolonged administration of this drug was associated with an increased risk of congestive heart failure [138]. Subsequently, a phase Ib study failed to demonstrate enhanced anti-tumor activity of OMP-21M18 in combination with the anti-PD-1 pembrolizumab in patients with advanced or metastatic solid tumors, despite the fact that the combination therapy was well tolerated (NCT02722954) [139]. Finally, a phase I study was conducted to determine the safety and optimal dose of OMP-21M18 in combination

with FOLFIRI in patients with mCRC (N = 32) (NCT01189942). Safety was scheduled to be assessed in each patient group after 56 days of treatment and disease status every 8 weeks. The endpoints of this clinical trial were to determine the MTD of OMP-21M18 plus FOLFIRI and to evaluate the safety, pharmacokinetics and preliminary efficacy of this combination. Unfortunately, to date, no results from this clinical trial have been found, although the actual completion date of the study indicated on [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) is February 2011.

Mithramycin A (Mit-A) is an antineoplastic antibiotic agent and a potent inhibitor of specificity protein 1 (SP1) [140]. In various human malignancies, SP1 is overexpressed and contributes to the malignant phenotype by regulating genes involved in proliferation, invasion, metastasis, stemness and chemoresistance [141,142]. The study by Zhao et al. demonstrates that the inhibition of SP1 by Mit-A suppresses the growth of colon CSCs and attenuates their characteristics by significantly reducing the percentage of CD44⁺/CD166⁺ cells in vitro and in vivo [142]. Another study shows that Mit-A inhibits tumor growth and significantly induces cell death and the PARP cleavage of CSC and non-CSC cells [140]. Thus, these preclinical results highlighted Mit-A as a potentially promising drug candidate for the treatment of CRC [140]. Several clinical trials have been conducted to investigate the safety and efficacy of Mit-A in chest cancers, solid tumors and Ewing sarcoma (NCT01624090 and NCT01610570) [143]. Despite the promising preclinical activity of Mit-A in various advanced malignancies, several patients developed severe hepatotoxicity due to the altered expression of hepatocellular bile transporters resulting in the early termination of the clinical trial [144]. The objective of the ongoing phase I/II clinical trial NCT02859415 was to determine the safest dose of Mit-A in patients with chest cancers, including CRC patients, by specifically selecting patients without these alterations. The endpoints of this clinical trial are to evaluate the DLT, MTD, and pharmacokinetics of Mit-A in patients with primary thoracic malignancies or carcinomas, sarcomas or germ cell neoplasms with pleuropulmonary metastases and to determine their overall response rates.

Clinical Trials on CCSCs: Discussion

Thus, the development of therapeutic agents specifically targeting CCSCs is complex, as outlined in this chapter. Unfortunately, despite encouraging preclinical results, the majority of ongoing clinical trials fail to demonstrate relevant results in phase I/II development, which examines the safety of the drug, and does not allow them to proceed to the next phase. In our search of [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), we found only three clinical trials focusing on CSCs and recruiting patients with CRC, underscoring the rarity and complexity of clinical trial design [124]. Among these trials, no study results were found for one of the drugs tested, demcizumab, although the actual completion date of the study has passed [139]. In addition, of the three drugs in clinical trials, two drugs showed drug-related toxicities in the current or previous study. The prolonged administration of demcizumab was associated with an increased risk of congestive heart failure [138] and some patients treated with Mit-A developed severe hepatotoxicity [144]. However, one of these three drugs, napabucasin, has shown interesting results in previous clinical trials and is currently in a phase III study [128–130]. In conclusion, the development of clinical trials can encounter many problems related either to drugs, to patients with unexpected side effects or toxicities, or to the design of the study.

5. Future Perspectives

The main challenge in preclinical studies is to obtain relevant results that translate into meaningful clinical activity in patients with CRC [134]. Unfortunately, despite interesting preclinical results, many clinical trials fail to demonstrate the benefits of a new pharmacological agent due to the absence of anticancer activity in cancer patients or the presence of toxicities incompatible with the continuation of the trial. The development of new clinical trials must consider the intra- and inter-tumor heterogeneity of CRC patients, which influences their responses to therapies. Nowadays, targeted therapies and immunotherapy have significantly improved the survival of CRC patients, and the newly developed therapies are increasing the therapeutic options for patients with advanced CRC harboring specific

genetic abnormalities [5]. However, despite the initial success of commonly used therapies, most drugs fail to target the MRD associated with CSCs which often leads to relapse in cancer patients. Unfortunately, up to 50% of patients with early-stage CRC at diagnosis will eventually develop metastatic disease, and most of them have unresectable metastatic disease because of the size, location, and/or extent of the disease [76,77]. New clinical trials must therefore be designed to test drugs that could become relevant treatment options for patients with early-stage and advanced CRC. However, the lack of accurate preclinical models that take into account intrinsic and extrinsic characteristics of tumors, such as CSC subpopulation, tumor stroma and TME, is a major technical problem [134]. The CCSC isolation and characterization methods presented in this review highlighted the limitations of the methods currently in use, particularly those using CCSC markers. Cell sorting using phenotypic characteristics allows the sorting of only part of the CCSC population because they are heterogeneous, plastic, and subject to many signals from the TME. Thus, the use of new innovative techniques such as SdFFF which sorts cells according to cell characteristics other than marker expression or the combination of several isolation techniques is crucial. In conclusion, more accurate preclinical models are required because current approaches are not precise enough to identify therapies that may be clinically effective, particularly those targeting CCSCs [145].

6. Conclusions

Targeting CCSCs holds promise for preventing disease relapse and metastasis in CRC patients. In addition, as a major driving force of drug resistance, CCSCs are attractive potential targets for the treatment of CRC. However, the development of therapeutic agents specifically targeting CCSCs is complex, as highlighted by the clinical trial results presented in this review. Despite the increasing number of therapies, resistance mechanisms may emerge and thus complicate the therapeutic management of patients with CRC. In order to achieve a short- and long-term therapeutic response, the ideal therapeutic strategy should target both the cancer cells of the tumor mass to obtain tumor regression, CCSCs to prevent relapse and metastasis, and TME to limit cellular plasticity and the reappearance of CCSCs.

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

Funding: This research received no external funding.

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

References

1. Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M.; Wallace, M.B. Colorectal Cancer. *Lancet* **2019**, *394*, 1467–1480. [[CrossRef](#)]
2. World Health Organization: Regional Office for Europe. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Development*; IARC: Lyon, France, 2020; ISBN 978-92-832-0447-3.
3. Brierley, J.D.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017; ISBN 978-1-119-26357-9.
4. Amin, M.B.; Edge, S.; Greene, F.; Byrd, D.R.; Brookland, R.K.; Washington, M.K.; Gershenwald, J.E.; Compton, C.C.; Hess, K.R.; Sullivan, D.C.; et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017.
5. Benson, A.B.; Venook, A.P.; Al-Hawary, M.M.; Cederquist, L.; Chen, Y.-J.; Ciombor, K.K.; Cohen, S.; Cooper, H.S.; Deming, D.; Engstrom, P.F.; et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2018**, *16*, 359–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Van Cutsem, E.; Cervantes, A.; Adam, R.; Sobrero, A.; Van Krieken, J.H.; Aderka, D.; Aranda Aguilar, E.; Bardelli, A.; Benson, A.; Bodoky, G.; et al. ESMO Consensus Guidelines for the Management of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 1386–1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Van der Heijden, M.; Vermeulen, L. A Cancer Stem Cell Perspective on Minimal Residual Disease in Solid Malignancies. In *Cancer Stem Cell Resistance to Targeted Therapy*; Maccalli, C., Todaro, M., Ferrone, S., Eds.; Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; Volume 19, pp. 31–49. ISBN 978-3-030-16623-6.
8. Battle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1124–1134. [[CrossRef](#)]
9. Desbats, M.A.; Giacomini, I.; Prayer-Galetti, T.; Montopoli, M. Metabolic Plasticity in Chemotherapy Resistance. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Serpa, J. *Tumor Microenvironment: The Main Driver of Metabolic Adaptation*; Serpa, J., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; Volume 1219, ISBN 978-3-030-34024-7.
11. Jordan, C.T. Cancer Stem Cells. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1253–1261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bonnet, D.; Dick, J.E. Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737. [[CrossRef](#)]
13. Schwitalla, S.; Fingerle, A.A.; Cammareri, P.; Nebelsiek, T.; Göktuna, S.I.; Ziegler, P.K.; Canli, O.; Heijmans, J.; Huels, D.J.; Moreaux, G.; et al. Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell* **2013**, *152*, 25–38. [[CrossRef](#)]
14. Jahanafrooz, Z.; Mosafar, J.; Akbari, M.; Hashemzaei, M.; Mokhtarzadeh, A.; Baradaran, B. Colon Cancer Therapy by Focusing on Colon Cancer Stem Cells and Their Tumor Microenvironment. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 4153–4166. [[CrossRef](#)]
15. Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cancer Stem Cells (CSCs) in Cancer Progression and Therapy. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 8381–8395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mélin, C.; Perraud, A.; Akil, H.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P.; Mathonnet, M.; Battu, S. Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1549–1556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hirata, A.; Hatano, Y.; Niwa, M.; Hara, A.; Tomita, H. Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells. In *Stem Cells Heterogeneity in Cancer*; Birbrair, A., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; Volume 1139, pp. 115–126. ISBN 978-3-030-14365-7.
18. Akbarzadeh, M.; Maroufi, N.F.; Tazehkand, A.P.; Akbarzadeh, M.; Bastani, S.; Safdari, R.; Farzane, A.; Fattahi, A.; Nejabati, H.R.; Nouri, M.; et al. Current Approaches in Identification and Isolation of Cancer Stem Cells. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 14759–14772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ricci-Vitiani, L.; Lombardi, D.G.; Pilozzi, E.; Biffoni, M.; Todaro, M.; Peschle, C.; De Maria, R. Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells. *Nature* **2007**, *445*, 111–115. [[CrossRef](#)]
20. O'Brien, C.A.; Pollett, A.; Gallinger, S.; Dick, J.E. A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice. *Nature* **2007**, *445*, 106–110. [[CrossRef](#)]
21. Kemper, K.; Sprick, M.R.; de Bree, M.; Scopelliti, A.; Vermeulen, L.; Hoek, M.; Zeilstra, J.; Pals, S.T.; Mehmet, H.; Stassi, G.; et al. The AC133 Epitope, but Not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 719–729. [[CrossRef](#)]
22. Dalerba, P.; Dylla, S.J.; Park, I.-K.; Liu, R.; Wang, X.; Cho, R.W.; Hoey, T.; Gurney, A.; Huang, E.H.; Simeone, D.M.; et al. Phenotypic Characterization of Human Colorectal Cancer Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10158–10163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Barker, N.; Ridgway, R.A.; van Es, J.H.; van de Wetering, M.; Begthel, H.; van den Born, M.; Danenberg, E.; Clarke, A.R.; Sansom, O.J.; Clevers, H. Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer. *Nature* **2009**, *457*, 608–611. [[CrossRef](#)]
24. Sangiorgi, E.; Capecchi, M.R. Bmi1 Is Expressed in Vivo in Intestinal Stem Cells. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 915–920. [[CrossRef](#)]
25. Vermeulen, L.; Todaro, M.; de Sousa Mello, F.; Sprick, M.R.; Kemper, K.; Perez Alea, M.; Richel, D.J.; Stassi, G.; Medema, J.P. Single-Cell Cloning of Colon Cancer Stem Cells Reveals a Multi-Lineage Differentiation Capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13427–13432. [[CrossRef](#)]
26. Pang, R.; Law, W.L.; Chu, A.C.Y.; Poon, J.T.; Lam, C.S.C.; Chow, A.K.M.; Ng, L.; Cheung, L.W.H.; Lan, X.R.; Lan, H.Y.; et al. A Subpopulation of CD26+ Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity in Human Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2010**, *6*, 603–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Todaro, M.; Gaggianesi, M.; Catalano, V.; Benfante, A.; Iovino, F.; Biffoni, M.; Apuzzo, T.; Sperduti, I.; Volpe, S.; Cocorullo, G.; et al. CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 342–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Barker, N.; van Es, J.H.; Kuipers, J.; Kujala, P.; van den Born, M.; Cozijnsen, M.; Haegbarth, A.; Korving, J.; Begthel, H.; Peters, P.J.; et al. Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5. *Nature* **2007**, *449*, 1003–1007. [[CrossRef](#)]
29. Saito, S.; Okabe, H.; Watanabe, M.; Ishimoto, T.; Iwatsuki, M.; Baba, Y.; Tanaka, Y.; Kurashige, J.; Miyamoto, Y.; Baba, H. CD44v6 Expression Is Related to Mesenchymal Phenotype and Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 1570–1578. [[CrossRef](#)]
30. Ma, L.; Dong, L.; Chang, P. CD44v6 Engages in Colorectal Cancer Progression. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 30. [[CrossRef](#)]
31. Yanai, H.; Atsumi, N.; Tanaka, T.; Nakamura, N.; Komai, Y.; Omachi, T.; Tanaka, K.; Ishigaki, K.; Saiga, K.; Ohsugi, H.; et al. Intestinal Cancer Stem Cells Marked by Bmi1 or Lgr5 Expression Contribute to Tumor Propagation via Clonal Expansion. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Du, J.; Li, Y.; Li, J.; Zheng, J. Polycomb Group Protein Bmi1 Expression in Colon Cancers Predicts the Survival. *Med. Oncol.* **2010**, *27*, 1273–1276. [[CrossRef](#)]
33. Weichert, W. Cytoplasmic CD24 Expression in Colorectal Cancer Independently Correlates with Shortened Patient Survival. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 6574–6581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lam, C.S.-C.; Cheung, A.H.-K.; Wong, S.K.-M.; Wan, T.M.-H.; Ng, L.; Chow, A.K.-M.; Cheng, N.S.-M.; Pak, R.C.-H.; Li, H.-S.; Man, J.H.-W.; et al. Prognostic Significance of CD26 in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98582. [[CrossRef](#)]
35. Liu, Q.-Z.; Gao, X.-H.; Chang, W.-J.; Gong, H.-F.; Fu, C.-G.; Zhang, W. Expression of ITGB1 Predicts Prognosis in Colorectal Cancer: A Large Prospective Study Based on Tissue Microarray. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 12802.

36. Du, L.; Wang, H.; He, L.; Zhang, J.; Ni, B.; Wang, X.; Jin, H.; Cahuzac, N.; Mehrpour, M.; Lu, Y.; et al. CD44 Is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6751–6760. [[CrossRef](#)]
37. Leng, Z.; Xia, Q.; Chen, J.; Li, Y.; Xu, J.; Zhao, E.; Zheng, H.; Ai, W.; Dong, J. Lgr5+CD44+EpCAM+ Strictly Defines Cancer Stem Cells in Human Colorectal Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *46*, 860–872. [[CrossRef](#)]
38. Wang, Z.; Tang, Y.; Xie, L.; Huang, A.; Xue, C.; Gu, Z.; Wang, K.; Zong, S. The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 309. [[CrossRef](#)]
39. Zhu, L.; Gibson, P.; Currie, D.S.; Tong, Y.; Richardson, R.J.; Bayazitov, I.T.; Poppleton, H.; Zakharenko, S.; Ellison, D.W.; Gilbertson, R.J. Prominin 1 Marks Intestinal Stem Cells That Are Susceptible to Neoplastic Transformation. *Nature* **2009**, *457*, 603–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Glumac, P.M.; LeBeau, A.M. The Role of CD133 in Cancer: A Concise Review. *Clin. Transl. Med.* **2018**, *7*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Weichert, W. ALCAM/CD166 Is Overexpressed in Colorectal Carcinoma and Correlates with Shortened Patient Survival. *J. Clin. Pathol.* **2004**, *57*, 1160–1164. [[CrossRef](#)]
42. Han, S.; Zong, S.; Shi, Q.; Li, H.; Liu, S.; Yang, W.; Li, W.; Hou, F. Is Ep-CAM Expression a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer? A Systematic Meta-Analysis. *EBioMedicine* **2017**, *20*, 61–69. [[CrossRef](#)]
43. Han, Y.; Xue, X.; Jiang, M.; Guo, X.; Li, P.; Liu, F.; Yuan, B.; Shen, Y.; Guo, X.; Zhi, Q.; et al. LGR5, a Relevant Marker of Cancer Stem Cells, Indicates a Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2015**, *39*, 267–273. [[CrossRef](#)]
44. Cammareri, P.; Lombardo, Y.; Francipane, M.G.; Bonventre, S.; Todaro, M.; Stassi, G. Isolation and Culture of Colon Cancer Stem Cells. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; Volume 86, pp. 311–324. ISBN 978-0-12-373876-9.
45. Korkusuz, P.; Köse, S.; Yersal, N.; Önen, S. Magnetic-Based Cell Isolation Technique for the Selection of Stem Cells. In *Skin Stem Cells*; Turksen, K., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2018; Volume 1879, pp. 153–163. ISBN 978-1-4939-8869-3.
46. Mathonnet, M. Hallmarks in Colorectal Cancer: Angiogenesis and Cancer Stem-like Cells. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 4189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Mele, L.; Liccardo, D.; Tirino, V. Evaluation and Isolation of Cancer Stem Cells Using ALDH Activity Assay. In *Cancer Stem Cells*; Papaccio, G., Desiderio, V., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2018; Volume 1692, pp. 43–48. ISBN 978-1-4939-7400-9.
48. Huang, E.H.; Hynes, M.J.; Zhang, T.; Ginestier, C.; Dontu, G.; Appelman, H.; Fields, J.Z.; Wicha, M.S.; Boman, B.M. Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3382–3389. [[CrossRef](#)]
49. Golebiewska, A.; Brons, N.H.C.; Bjerkvig, R.; Niclou, S.P. Critical Appraisal of the Side Population Assay in Stem Cell and Cancer Stem Cell Research. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 136–147. [[CrossRef](#)]
50. Franken, N.A.P.; Rodermond, H.M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic Assay of Cells in Vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315–2319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Shaheen, S.; Ahmed, M.; Lorenzi, F.; Nateri, A.S. Spheroid-Formation (Colonsphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev. Rep.* **2016**, *12*, 492–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Borowicz, S.; Van Scoyk, M.; Avsarala, S.; Karuppusamy Rathinam, M.K.; Tauler, J.; Bikkavilli, R.K.; Winn, R.A. The Soft Agar Colony Formation Assay. *J. Vis. Exp.* **2014**, 51998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Costa, E.C.; Moreira, A.F.; de Melo-Diogo, D.; Gaspar, V.M.; Carvalho, M.P.; Correia, I.J. 3D Tumor Spheroids: An Overview on the Tools and Techniques Used for Their Analysis. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1427–1441. [[CrossRef](#)]
54. Relier, S.; Yazdani, L.; Ayad, O.; Choquet, A.; Bourgaux, J.-F.; Prudhomme, M.; Pannequin, J.; Macari, F.; David, A. Antibiotics Inhibit Sphere-Forming Ability in Suspension Culture. *Cancer Cell Int.* **2016**, *16*, 6. [[CrossRef](#)]
55. Visvader, J.E.; Lindeman, G.J. Cancer Stem Cells in Solid Tumours: Accumulating Evidence and Unresolved Questions. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 755–768. [[CrossRef](#)]
56. Nguyen, L.V.; Vanner, R.; Dirks, P.; Eaves, C.J. Cancer Stem Cells: An Evolving Concept. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 133–143. [[CrossRef](#)]
57. Aiken, C.; Werbowetski-Ogilvie, T. Animal Models of Cancer Stem Cells: What Are They Really Telling Us? *Curr. Pathobiol. Rep.* **2013**, *1*, 91–99. [[CrossRef](#)]
58. O'Brien, C.A.; Kreso, A.; Jamieson, C.H.M. Cancer Stem Cells and Self-Renewal. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3113–3120. [[CrossRef](#)]
59. Mélin, C.; Perraud, A.; Bounaix Morand du Puch, C.; Loum, E.; Giraud, S.; Cardot, P.; Jauberteau, M.-O.; Lautrette, C.; Battu, S.; Mathonnet, M. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of in Vitro Enrichment in Cancer Stem Cells by Specific Serum-Free Culture Medium. *J. Chromatogr. B* **2014**, *963*, 40–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lacroix, A.; Deluche, E.; Zhang, L.Y.; Dalmay, C.; Mélin, C.; Leroy, J.; Babay, M.; Morand Du Puch, C.; Giraud, S.; Bessette, B.; et al. A New Label-Free Approach to Glioblastoma Cancer Stem Cell Sorting and Detection. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 8948–8957. [[CrossRef](#)]
61. Vedrenne, N.; Sarrazy, V.; Battu, S.; Bordeau, N.; Richard, L.; Billet, F.; Coronas, V.; Desmoulière, A. Neural Stem Cell Properties of an Astrocyte Subpopulation Sorted by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Rejuvenation Res.* **2016**, *19*, 362–372. [[CrossRef](#)]

62. Faye, P.-A.; Vedrenne, N.; De la Cruz-Morcillo, M.A.; Barrot, C.-C.; Richard, L.; Bourthoumieu, S.; Sturtz, F.; Funalot, B.; Lia, A.-S.; Battu, S. New Method for Sorting Endothelial and Neural Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6696–6702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Mélin, C.; Perraud, A.; Christou, N.; Bibes, R.; Cardot, P.; Jauberteau, M.-O.; Battu, S.; Mathonnet, M. New Ex-Ovo Colorectal-Cancer Models from Different SdFFF-Sorted Tumor-Initiating Cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 8433–8443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Shmelkov, S.V.; Butler, J.M.; Hooper, A.T.; Hormigo, A.; Kushner, J.; Milde, T.; St. Clair, R.; Baljevic, M.; White, I.; Jin, D.K.; et al. CD133 Expression Is Not Restricted to Stem Cells, and Both CD133+ and CD133– Metastatic Colon Cancer Cells Initiate Tumors. *J. Clin. Investig.* **2008**, JCI34401. [[CrossRef](#)]
65. Ricci-Vitiani, L.; Fabrizio, E.; Palio, E.; De Maria, R. Colon Cancer Stem Cells. *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 1097–1104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Labianca, R.; Nordlinger, B.; Beretta, G.D.; Mosconi, S.; Mandalà, M.; Cervantes, A.; Arnold, D. Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, vi64–vi72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Costas-Chavarri, A.; Nandakumar, G.; Temin, S.; Lopes, G.; Cervantes, A.; Cruz Correa, M.; Engineer, R.; Hamashima, C.; Ho, G.F.; Huitzil, F.D.; et al. Treatment of Patients with Early-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *J. Glob. Oncol.* **2019**, 1–19. [[CrossRef](#)]
68. FOxTROT Collaborative Group Feasibility of Preoperative Chemotherapy for Locally Advanced, Operable Colon Cancer: The Pilot Phase of a Randomised Controlled Trial. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 1152–1160. [[CrossRef](#)]
69. André, T.; de Gramont, A.; Vernerey, D.; Chibaudel, B.; Bonnetain, F.; Tijeras-Raballand, A.; Scriver, A.; Hickish, T.; Tabernero, J.; Van Laethem, J.L.; et al. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to *BRAF* Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 4176–4187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. André, T.; Boni, C.; Navarro, M.; Tabernero, J.; Hickish, T.; Topham, C.; Bonetti, A.; Clingan, P.; Bridgewater, J.; Rivera, F.; et al. Improved Overall Survival with Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 3109–3116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Schmoll, H.-J.; Cartwright, T.; Tabernero, J.; Nowacki, M.P.; Figer, A.; Maroun, J.; Price, T.; Lim, R.; Van Cutsem, E.; Park, Y.-S.; et al. Phase III Trial of Capecitabine Plus Oxaliplatin as Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: A Planned Safety Analysis in 1,864 Patients. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *26*, 102–109. [[CrossRef](#)]
72. Twelves, C.; Wong, A.; Nowacki, M.; Abt, M.; Burris, H., 3rd; Carrato, A.; Cassidy, J.; Cervantes, A.; Fagerberg, J.; Georgoulas, V.; et al. Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2696–2704. [[CrossRef](#)]
73. Haller, D.G.; Tabernero, J.; Maroun, J.; de Braud, F.; Price, T.; Van Cutsem, E.; Hill, M.; Gilberg, F.; Rittweger, K.; Schmoll, H.-J. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared with Fluorouracil and Folinic Acid as Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 1465–1471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Marin, J.J.G.; Sanchez de Medina, F.; Castaño, B.; Bujanda, L.; Romero, M.R.; Martinez-Augustin, O.; Moral-Avila, R.D.; Briz, O. Chemoprevention, Chemotherapy, and Chemoresistance in Colorectal Cancer. *Drug Metab. Rev.* **2012**, *44*, 148–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chiorean, E.G.; Nandakumar, G.; Fadelu, T.; Temin, S.; Alarcon-Rozas, A.E.; Bejarano, S.; Croitoru, A.-E.; Grover, S.; Lohar, P.V.; Odhiambo, A.; et al. Treatment of Patients with Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Glob. Oncol.* **2020**, 414–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Atreya, C.E.; Yaeger, R.; Chu, E. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: From Current Standards to Future Molecular Targeted Approaches. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2017**, *37*, 246–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Van Cutsem, E.; Oliveira, J. Advanced Colorectal Cancer: ESMO Clinical Recommendations for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, iv61–iv63. [[CrossRef](#)]
78. Johnston, F.M.; Mavros, M.N.; Herman, J.M.; Pawlik, T.M. Local Therapies for Hepatic Metastases. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2013**, *11*, 153–160. [[CrossRef](#)]
79. Noshier, J.L.; Ahmed, I.; Patel, A.N.; Gendel, V.; Murillo, P.G.; Moss, R.; Jabbour, S.K. Non-Operative Therapies for Colorectal Liver Metastases. *Surg. Treat. Colorectal Liver Metastases* **2015**, *6*, 17.
80. Sveen, A.; Kopetz, S.; Lothe, R.A. Biomarker-Guided Therapy for Colorectal Cancer: Strength in Complexity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 11–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Advani, S.; Kopetz, S. Ongoing and Future Directions in the Management of Metastatic Colorectal Cancer: Update on Clinical Trials. *J. Surg. Oncol.* **2019**, *119*, 642–652. [[CrossRef](#)]
82. IMPACT Investigators. Efficacy of Adjuvant Fluorouracil and Folinic Acid in Colon Cancer. *The Lancet* **1995**, *345*, 939–944. [[CrossRef](#)]
83. Saltz, L.B.; Moore, M.J.; Pirota, N. Irinotecan plus Fluorouracil and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 905–914. [[CrossRef](#)]
84. André, T.; Boni, C.; Mounedji-Boudiaf, L.; Navarro, M.; Tabernero, J.; Hickish, T.; Topham, C.; Zaninelli, M.; Clingan, P.; Bridgewater, J.; et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2343–2351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Mayer, R.J.; Van Cutsem, E.; Falcone, A.; Yoshino, T.; Garcia-Carbonero, R.; Mizunuma, N.; Yamazaki, K.; Shimada, Y.; Tabernero, J.; Komatsu, Y.; et al. Randomized Trial of TAS-102 for Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1909–1919. [[CrossRef](#)]
86. Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335–2342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Grothey, A.; Cutsem, E.V.; Sobrero, A.; Siena, S.; Falcone, A.; Ychou, M.; Humblet, Y.; Bouché, O.; Mineur, L.; Barone, C.; et al. Regorafenib Monotherapy for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer (CORRECT): An International, Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet* **2013**, *381*, 303–312. [[CrossRef](#)]
88. Van Cutsem, E.; Tabernero, J.; Lakomy, R.; Prenen, H.; Prausová, J.; Macarulla, T.; Ruff, P.; van Hazel, G.A.; Moiseyenko, V.; Ferry, D.; et al. Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated with an Oxaliplatin-Based Regimen. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3499–3506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Tabernero, J.; Yoshino, T.; Cohn, A.L.; Obermannova, R.; Bodoky, G.; Garcia-Carbonero, R.; Ciuleanu, T.-E.; Portnoy, D.C.; Van Cutsem, E.; Grothey, A.; et al. Ramucirumab versus Placebo in Combination with Second-Line FOLFIRI in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma That Progressed during or after First-Line Therapy with Bevacizumab, Oxaliplatin, and a Fluoropyrimidine (RAISE): A Randomised, Double-Blind, Multicentre, Phase 3 Study. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 499–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Messersmith, W.A.; Ahnen, D.J. Targeting EGFR in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1834–1836. [[CrossRef](#)]
91. Le, D.T.; Uram, J.N.; Wang, H.; Bartlett, B.R.; Kemberling, H.; Eyring, A.D.; Skora, A.D.; Luber, B.S.; Azad, N.S.; Laheru, D.; et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2509–2520. [[CrossRef](#)]
92. Overman, M.J.; Lonardi, S.; Wong, K.Y.M.; Lenz, H.-J.; Gelsomino, F.; Aglietta, M.; Morse, M.A.; Van Cutsem, E.; McDermott, R.; Hill, A.; et al. Durable Clinical Benefit with Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 773–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Corcoran, R.B.; André, T.; Atreya, C.E.; Schellens, J.H.M.; Yoshino, T.; Bendell, J.C.; Hollebecque, A.; McRee, A.J.; Siena, S.; Middleton, G.; et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with *BRAF*^{V600E}-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 428–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Kopetz, S.; Grothey, A.; Yaeger, R.; Van Cutsem, E.; Desai, J.; Yoshino, T.; Wasan, H.; Ciardiello, F.; Loupakis, F.; Hong, Y.S.; et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in *BRAF* V600E–Mutated Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1632–1643. [[CrossRef](#)]
95. Meric-Bernstam, F.; Hurwitz, H.; Raghav, K.P.S.; McWilliams, R.R.; Fakih, M.; VanderWalde, A.; Swanton, C.; Kurzrock, R.; Burris, H.; Sweeney, C.; et al. Pertuzumab plus Trastuzumab for HER2-Amplified Metastatic Colorectal Cancer (MyPathway): An Updated Report from a Multicentre, Open-Label, Phase 2a, Multiple Basket Study. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 518–530. [[CrossRef](#)]
96. Sartore-Bianchi, A.; Trusolino, L.; Martino, C.; Bencardino, K.; Lonardi, S.; Bergamo, F.; Zagonel, V.; Leone, F.; Depetris, I.; Martinelli, E.; et al. Dual-Targeted Therapy with Trastuzumab and Lapatinib in Treatment-Refractory, KRAS Codon 12/13 Wild-Type, HER2-Positive Metastatic Colorectal Cancer (HERACLES): A Proof-of-Concept, Multicentre, Open-Label, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 738–746. [[CrossRef](#)]
97. Drilon, A.; Laetsch, T.W.; Kummar, S.; DuBois, S.G.; Lassen, U.N.; Demetri, G.D.; Nathenson, M.; Doebele, R.C.; Farago, A.F.; Pappo, A.S.; et al. Efficacy of Larotrectinib in *TRK* Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 731–739. [[CrossRef](#)]
98. Demetri, G.D.; Paz-Ares, L.; Farago, A.F.; Liu, S.V.; Chawla, S.P.; Tosi, D.; Kim, E.S.; Blakely, C.M.; Krauss, J.C.; Sigal, D.; et al. Efficacy and Safety of Entrectinib in Patients with NTRK Fusion-Positive Tumours: Pooled Analysis of STARTRK-2, STARTRK-1, and ALKA-372-001. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, ix175. [[CrossRef](#)]
99. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D.B.; Johnston, P.G. Cancer Drug Resistance: An Evolving Paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714–726. [[CrossRef](#)]
100. Li, Q.; Shu, Y. Role of Solute Carriers in Response to Anticancer Drugs. *Mol. Cell. Ther.* **2014**, *2*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Hu, T.; Li, Z.; Gao, C.-Y.; Cho, C.H. Mechanisms of Drug Resistance in Colon Cancer and Its Therapeutic Strategies. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 6876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Zhang, S.; Lovejoy, K.S.; Shima, J.E.; Lagpacan, L.L.; Shu, Y.; Lapuk, A.; Chen, Y.; Komori, T.; Gray, J.W.; Chen, X.; et al. Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8847–8857. [[CrossRef](#)]
103. Buck, E.; Sprick, M.; Gaida, M.; Grüllich, C.; Weber, T.; Herpel, E.; Bruckner, T.; Koschny, R. Tumor Response to Irinotecan Is Associated with CYP3A5 Expression in Colorectal Cancer. *Oncol. Lett.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Thomas, M.L.; Coyle, K.M.; Sultan, M.; Marcato, P. Cancer Stem Cells and Chemoresistance: Strategies to Overcome Therapeutic Resistance. In *Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and Future Perspectives in Translational Oncology*; Babashah, S., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 477–518. ISBN 978-3-319-21029-2.
105. Hoskins, J.M.; Goldberg, R.M.; Qu, P.; Ibrahim, J.G.; McLeod, H.L. UGT1A1*28 Genotype and Irinotecan-Induced Neutropenia: Dose Matters. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 1290–1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Stoehlmacher, J. Association between Glutathione S-Transferase P1, T1, and M1 Genetic Polymorphism and Survival of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 936–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

107. Ramos, P.; Bentires-Alj, M. Mechanism-Based Cancer Therapy: Resistance to Therapy, Therapy for Resistance. *Oncogene* **2015**, *34*, 3617–3626. [[CrossRef](#)]
108. Misale, S.; Yaeger, R.; Hobor, S.; Scala, E.; Janakiraman, M.; Liska, D.; Valtorta, E.; Schiavo, R.; Buscarino, M.; Siravegna, G.; et al. Emergence of KRAS Mutations and Acquired Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer. *Nature* **2012**, *486*, 532–536. [[CrossRef](#)]
109. Shirota, Y.; Stoehlmacher, J.; Brabender, J.; Xiong, Y.-P.; Uetake, H.; Danenberg, K.D.; Groshen, S.; Tsao-Wei, D.D.; Danenberg, P.V.; Lenz, H.-J. ERCC1 and Thymidylate Synthase MRNA Levels Predict Survival for Colorectal Cancer Patients Receiving Combination Oxaliplatin and Fluorouracil Chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 4298–4304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Valeri, N.; Gasparini, P.; Braconi, C.; Paone, A.; Lovat, F.; Fabbri, M.; Sumani, K.M.; Alder, H.; Amadori, D.; Patel, T.; et al. MicroRNA-21 Induces Resistance to 5-Fluorouracil by down-Regulating Human DNA MutS Homolog 2 (HMSH2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21098–21103. [[CrossRef](#)]
111. Hosoya, N.; Miyagawa, K. Targeting DNA Damage Response in Cancer Therapy. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 370–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Zhao, J. Cancer Stem Cells and Chemoresistance: The Smartest Survives the Raid. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *160*, 145–158. [[CrossRef](#)]
113. Nehls, O.; Okech, T.; Hsieh, C.-J.; Enzinger, T.; Sarbia, M.; Borchard, F.; Gruenagel, H.-H.; Gaco, V.; Hass, H.G.; Arkenau, H.T.; et al. Studies on P53, BAX and Bcl-2 Protein Expression and Microsatellite Instability in Stage III (UICC) Colon Cancer Treated by Adjuvant Chemotherapy: Major Prognostic Impact of Proapoptotic BAX. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1409–1418. [[CrossRef](#)]
114. Zhao, Y.; Dong, Q.; Li, J.; Zhang, K.; Qin, J.; Zhao, J.; Sun, Q.; Wang, Z.; Wartmann, T.; Jauch, K.W.; et al. Targeting Cancer Stem Cells and Their Niche: Perspectives for Future Therapeutic Targets and Strategies. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *53*, 139–155. [[CrossRef](#)]
115. Vermeulen, L.; De Sousa E Melo, F.; van der Heijden, M.; Cameron, K.; de Jong, J.H.; Borovski, T.; Tuynman, J.B.; Todaro, M.; Merz, C.; Rodermond, H.; et al. Wnt Activity Defines Colon Cancer Stem Cells and Is Regulated by the Microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 468–476. [[CrossRef](#)]
116. Borovski, T.; De Sousa E Melo, F.; Vermeulen, L.; Medema, J.P. Cancer Stem Cell Niche: The Place to Be. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 634–639. [[CrossRef](#)]
117. De Sousa e Melo, F.; Kurtova, A.V.; Harnoss, J.M.; Kljavin, N.; Hoeck, J.D.; Hung, J.; Anderson, J.E.; Storm, E.E.; Modrusan, Z.; Koeppen, H.; et al. A Distinct Role for Lgr5+ Stem Cells in Primary and Metastatic Colon Cancer. *Nature* **2017**, *543*, 676–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Fumagalli, A.; Oost, K.C.; Kester, L.; Morgner, J.; Bornes, L.; Bruens, L.; Spaargaren, L.; Azkanaz, M.; Schelfhorst, T.; Beerling, E.; et al. Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 569–578.e7. [[CrossRef](#)]
119. Medema, J.P. Targeting the Colorectal Cancer Stem Cell. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 888–890. [[CrossRef](#)]
120. Shimokawa, M.; Ohta, Y.; Nishikori, S.; Matano, M.; Takano, A.; Fujii, M.; Date, S.; Sugimoto, S.; Kanai, T.; Sato, T. Visualization and Targeting of LGR5+ Human Colon Cancer Stem Cells. *Nature* **2017**, *545*, 187–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Lenos, K.J.; Miedema, D.M.; Lodestijn, S.C.; Nijman, L.E.; van den Bosch, T.; Romero Ros, X.; Lourenço, F.C.; Lecca, M.C.; van der Heijden, M.; van Neerven, S.M.; et al. Stem Cell Functionality Is Microenvironmentally Defined during Tumour Expansion and Therapy Response in Colon Cancer. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 1193–1202. [[CrossRef](#)]
122. De Sousa e Melo, F.; de Sauvage, F.J. Cellular Plasticity in Intestinal Homeostasis and Disease. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 54–64. [[CrossRef](#)]
123. Li, Y.; Rogoff, H.A.; Keates, S.; Gao, Y.; Murikipudi, S.; Mikule, K.; Leggett, D.; Li, W.; Pardee, A.B.; Li, C.J. Suppression of Cancer Relapse and Metastasis by Inhibiting Cancer Stemness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 1839–1844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. ClinicalTrials.Gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/> (accessed on 7 October 2020).
125. Hubbard, J.M.; Grothey, A. Napabucasin: An Update on the First-in-Class Cancer Stemness Inhibitor. *Drugs* **2017**, *77*, 1091–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Langleben, A.; Supko, J.G.; Hotte, S.J.; Batist, G.; Hirte, H.W.; Rogoff, H.; Li, Y.; Li, W.; Kerstein, D.; Leggett, D.; et al. A Dose-Escalation Phase I Study of a First-in-Class Cancer Stemness Inhibitor in Patients with Advanced Malignancies. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 2542. [[CrossRef](#)]
127. Jonker, D.J.; Stephenson, J.; Edenfield, W.J.; Supko, J.G.; Li, Y.; Li, W.; Hitron, M.; Leggett, D.; Kerstein, D.; Li, C. A Phase I Extension Study of BBI608, a First-in-Class Cancer Stem Cell (CSC) Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 2546. [[CrossRef](#)]
128. Larson, T.; Ortuzar, W.F.; Bekaii-Saab, T.S.; Becerra, C.; Ciombor, K.K.; Hubbard, J.M.; Edenfield, W.J.; Shao, S.H.; Grothey, A.; Borodyansky, L.; et al. BBI608-224: A Phase Ib/II Study of Cancer Stemness Inhibitor Napabucasin (BBI-608) Administered with Panitumumab in KRAS Wild-Type Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 677. [[CrossRef](#)]
129. O’Neil, B.H.; Hubbard, J.M.; Starodub, A.; Jonker, D.J.; Edenfield, W.J.; El-Rayes, B.F.; Halfdanarson, T.R.; Ramanathan, R.K.; Pitot, H.C.; Britten, C.D.; et al. Phase 1b Extension Study of Cancer Stemness Inhibitor BB608 (Napabucasin) Administered in Combination with FOLFIRI +/- Bevacizumab (Bev) in Patients (Pts) with Advanced Colorectal Cancer (CRC). *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3564. [[CrossRef](#)]

130. Bendell, J.C.; Hubbard, J.M.; O'Neil, B.H.; Jonker, D.J.; Starodub, A.; Peyton, J.D.; Pitot, H.C.; Halfdanarson, T.R.; Nadeau, B.R.; Zubkus, J.D.; et al. Phase 1b/II Study of Cancer Stemness Inhibitor Napabucasin (BBI-608) in Combination with FOLFIRI +/- Bevacizumab (Bev) in Metastatic Colorectal Cancer (MCRC) Patients (Pts). *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3529. [[CrossRef](#)]
131. Jonker, D.J.; Nott, L.; Yoshino, T.; Gill, S.; Shapiro, J.; Ohtsu, A.; Zalberg, J.; Vickers, M.M.; Wei, A.; Gao, Y.; et al. A Randomized Phase III Study of Napabucasin [BBI608] (NAPA) vs Placebo (PBO) in Patients (Pts) with Pretreated Advanced Colorectal Cancer (ACRC): The CCTG/AGITG CO.23 Trial. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, vi150. [[CrossRef](#)]
132. Jonker, D.J.; Nott, L.; Yoshino, T.; Gill, S.; Shapiro, J.; Ohtsu, A.; Zalberg, J.; Vickers, M.M.; Wei, A.C.; Gao, Y.; et al. Napabucasin versus Placebo in Refractory Advanced Colorectal Cancer: A Randomised Phase 3 Trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *3*, 263–270. [[CrossRef](#)]
133. Grothey, A.; Shah, M.A.; Yoshino, T.; Van Cutsem, E.; Taieb, J.; Xu, R.; Tebbutt, N.C.; Falcone, A.; Cervantes, A.; Borodyansky, L.; et al. CanStem303C Trial: A Phase III Study of Napabucasin (BBI-608) in Combination with 5-Fluorouracil (5-FU), Leucovorin, Irinotecan (FOLFIRI) in Adult Patients with Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer (MCRC). *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, TPS3619. [[CrossRef](#)]
134. Sonbol, M.; Ahn, D.; Bekaii-Saab, T. Therapeutic Targeting Strategies of Cancer Stem Cells in Gastrointestinal Malignancies. *Biomedicines* **2019**, *7*, 17. [[CrossRef](#)]
135. Fischer, M.; Yen, W.-C.; Kapoun, A.M.; Wang, M.; O'Young, G.; Lewicki, J.; Gurney, A.; Hoey, T. Anti-DLL4 Inhibits Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency in Colorectal Tumors with Oncogenic KRAS Mutations. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1520–1525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Hoey, T.; Yen, W.-C.; Axelrod, F.; Basi, J.; Donigian, L.; Dylla, S.; Fitch-Bruhns, M.; Lazetic, S.; Park, I.-K.; Sato, A.; et al. DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency. *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 168–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Ridgway, J.; Zhang, G.; Wu, Y.; Stawicki, S.; Liang, W.-C.; Chanthery, Y.; Kowalski, J.; Watts, R.J.; Callahan, C.; Kasman, I.; et al. Inhibition of Dll4 Signalling Inhibits Tumour Growth by Dereglulating Angiogenesis. *Nature* **2006**, *444*, 1083–1087. [[CrossRef](#)]
138. Smith, D.C.; Eisenberg, P.D.; Manikhas, G.; Chugh, R.; Gubens, M.A.; Stagg, R.J.; Kapoun, A.M.; Xu, L.; Dupont, J.; Sikic, B. A Phase I Dose Escalation and Expansion Study of the Anticancer Stem Cell Agent Demcizumab (Anti-DLL4) in Patients with Previously Treated Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 6295–6303. [[CrossRef](#)]
139. Johnson, M.; Rasco, D.; Schneider, B.; Shu, C.; Jotte, R.; Parmer, H.; Stagg, R.; Lopez, J. Abstract A081: A Phase 1b, Open-Label, Dose Escalation and Expansion Study of Demcizumab plus Pembrolizumab in Patients with Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, A081. [[CrossRef](#)]
140. Quarni, W.; Dutta, R.; Green, R.; Katiri, S.; Patel, B.; Mohapatra, S.S.; Mohapatra, S. Mithramycin A Inhibits Colorectal Cancer Growth by Targeting Cancer Stem Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15202. [[CrossRef](#)]
141. Rao, M.; Atay, S.M.; Shukla, V.; Hong, Y.; Upham, T.; Ripley, R.T.; Hong, J.A.; Zhang, M.; Reardon, E.; Fetsch, P.; et al. Mithramycin Depletes Specificity Protein 1 and Activates P53 to Mediate Senescence and Apoptosis of Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1197–1210. [[CrossRef](#)]
142. Zhao, Y.; Zhang, W.; Guo, Z.; Ma, F.; Wu, Y.; Bai, Y.; Gong, W.; Chen, Y.; Cheng, T.; Zhi, F.; et al. Inhibition of the Transcription Factor Sp1 Suppresses Colon Cancer Stem Cell Growth and Induces Apoptosis in Vitro and in Nude Mouse Xenografts. *Oncol. Rep.* **2013**, *30*, 1782–1792. [[CrossRef](#)]
143. Grohar, P.J.; Glod, J.; Peer, C.J.; Sissung, T.M.; Arnaldez, F.I.; Long, L.; Figg, W.D.; Whitcomb, P.; Helman, L.J.; Widemann, B.C. A Phase I/II Trial and Pharmacokinetic Study of Mithramycin in Children and Adults with Refractory Ewing Sarcoma and EWS-FLI1 Fusion Transcript. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *80*, 645–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Sissung, T.M.; Huang, P.A.; Hauke, R.J.; McCrea, E.M.; Peer, C.J.; Barbier, R.H.; Strobe, J.D.; Ley, A.M.; Zhang, M.; Hong, J.A.; et al. Severe Hepatotoxicity of Mithramycin Therapy Caused by Altered Expression of Hepatocellular Bile Transporters. *Mol. Pharmacol.* **2019**, *96*, 158–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Takebe, N.; Miele, L.; Harris, P.J.; Jeong, W.; Bando, H.; Kahn, M.; Yang, S.X.; Ivy, S.P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt Pathways in Cancer Stem Cells: Clinical Update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 445–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Objectifs

Les résistances thérapeutiques et les rechutes sont responsables de la diminution considérable de la survie à 5 ans des patients atteints de CCR à un stade avancé, et ce malgré un traitement bien conduit. Une des explications de l'échec thérapeutique est la persistance de foyers infra-cliniques, non détectables, de cellules cancéreuses. Ces foyers contiennent des CSCC, résistantes aux thérapies systémiques, et donc susceptibles de provoquer des rechutes. Le principal défi de l'étude de ces cellules est leur identification et donc leur isolement. Historiquement, les marqueurs de surface ont été utilisés pour détecter et sélectionner les CSCC, mais leur utilisation est devenue controversée en raison de la plasticité de ces cellules. L'isolement des CSCC en fonction de leurs caractéristiques biophysiques, sans marquage préalable donc sans *a priori*, couplé à l'analyse de leurs capacités fonctionnelles semble mieux adapté et donc une solution prometteuse.

Des travaux antérieurs de notre équipe ont démontré la capacité de la technique de SdFFF à isoler des sous-populations cellulaires de nombreuses lignées cellulaires de CCR, indépendamment de l'expression de marqueurs de surface et de leurs stades (Mélin et al., 2012). De plus, cette précédente étude a montré que l'une des sous-populations cellulaires triées par SdFFF présentait des caractéristiques semblables aux CSCC, dans deux lignées cellulaires de stade précoce (Mélin et al., 2012, 2015). La tumorigénicité de cette sous-population cellulaire a été vérifiée grâce à un modèle de membrane chorioallantoïque de poulet (CAM) (Mélin et al., 2015). Dans l'ensemble, ces travaux ont mis en évidence des propriétés distinctes entre deux sous-populations cellulaires triées par SdFFF : l'une plutôt active et l'autre quiescente (Mélin et al., 2012, 2015). La transition entre un CCR localisé (stade précoce) et un CCR métastatique (stade avancé) étant particulièrement critique pour les patients, la comparaison de lignées cellulaires représentatives de différents stades semble indispensable.

L'ensemble de ces données a ainsi permis de définir l'objectif de mon projet de thèse : **étude comparative des CSC issues de tumeurs primitives et de métastases de CCR**. Ces travaux ont fait l'objet d'un article intitulé : « A label-free cell sorting approach to highlight the impact of intratumoral cellular heterogeneity and cancer stem cells on response to therapies », déposé sur la plateforme *Preprints* de MDPI, et qui sera très prochainement soumis dans le journal *Cells*.

Résultats

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de Carole Mélin, précédente doctorante des Pr. Muriel Mathonnet et Serge Battu, ayant soutenu sa thèse en octobre 2012.

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude et la comparaison des CSCC issues de cultures de CCR de stade précoce, et celles issues de métastases ganglionnaires ou pulmonaires de CCR. Dans ce but, la technique de SdFFF a été utilisée afin d'isoler les sous-populations cellulaires de ces cultures en fonction de leurs propriétés biophysiques. La première phase de ce projet a été la mise au point et l'optimisation des conditions d'éluion du tri cellulaire par la SdFFF. La séparation étant basée principalement sur la taille et la densité des cellules (mode « hyperlayer »), les cellules éluées en premier sont celles de grande taille et de faible densité contrairement à celles de petite taille et de haute densité éluées en dernier. Pour étudier la différence entre les stades du CCR, quatre lignées cellulaires ont été utilisées : deux lignées cellulaires de stades précoces (WiDr et SW480) et deux lignées de stades avancées, issues de métastases ganglionnaires (SW620) ou de métastases pulmonaires (T84) de CCR. Trois sous-populations cellulaires ont été isolées par la SdFFF : F1, F2 et F3, quels que soient la lignée cellulaire et le stade. L'efficacité du tri des fractions cellulaires est vérifiée en les comparant au contrôle, appelé TP pour « total peak », correspondant à l'intégralité du pic des cellules éluées. Une fois les sous-populations triées, une phase de caractérisation débute.

Dans un premier temps, une caractérisation phénotypique est réalisée, par l'analyse de l'expression des marqueurs de CSCC : CD44, Lgr5, CD133 et Bmi1. Jusqu'à présent, cette analyse n'avait été réalisée que par immunofluorescence, qui est une technique moins robuste et objective (Mélin et al., 2012) que la cytométrie en flux. La sous-population F3 de la lignée SW480 surexprime significativement les marqueurs CD44 et Lgr5 par rapport aux autres sous-populations. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment (Mélin et al., 2012). Pour les autres lignées cellulaires, cette tendance est plutôt observée en F1. Ces données préliminaires montrent que deux sous-populations se démarquent : F1 et F3, et confirment que le tri cellulaire par SdFFF ne dépend pas de l'expression des

marqueurs. La plasticité des CSCC, évoquée en introduction, souligne la nécessité d'une caractérisation fonctionnelle concomitante.

Dans un second temps, une caractérisation fonctionnelle est effectuée afin d'évaluer la distribution de ces sous-populations dans le cycle cellulaire, leur clonogénicité ainsi que leur capacité à initier des tumeurs chez des souris immunodéficientes. En accord avec les travaux antérieurs (Mélin et al., 2012), les résultats du cycle et de la clonogénicité ont mis en évidence deux sous-populations cellulaires distinctes, semblant s'opposer : F1 et F3. Pour l'ensemble des lignées cellulaires étudiées, la sous-population F3 est faiblement proliférative (quiescente) et clonogénique donc possède des caractéristiques de CSCC, alors que F1 est proliférative et moins clonogène. Pour la suite des expériences, nous avons choisi de nous focaliser sur les sous-populations cellulaires F1 et F3, en raison du caractère hétérogène et intermédiaire de la sous-population F2. Dans les travaux précédents, la tumorigénicité des sous-populations cellulaires F1 et F3 de la lignée cellulaire WiDr a été évaluée, grâce à un modèle de CAM, montrant leurs capacités à générer des tumeurs (Mélin et al., 2015). Le test de référence pour définir une CSCC étant la xénogreffe dans le modèle murin, pendant ma thèse, les sous-populations F1 et F3 de WiDr ont été inoculées en sous-cutané, en « dilution limite », chez des souris athymiques nude. Sept semaines après l'injection, le nombre de souris porteuses de tumeur, dont le volume était supérieur à 100 mm^3 , a été compté. Parmi les 15 souris transplantées avec la sous-population cellulaire F1, seules deux souris ont développé des tumeurs, contre huit souris avec F3. De plus, F3 a été la seule sous-population cellulaire capable de générer une tumeur après l'injection de 100 cellules seulement. La fréquence de cellules initiateuses de tumeurs dans la fraction F3 est estimée à une cellule pour 566 contre une pour 3611 dans F1. Donc, la sous-population F3 présente des propriétés de CSCC, dont la capacité d'initier des tumeurs, y compris à partir de 100 cellules injectées. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontrent que deux fractions cellulaires se distinguent : la sous-population quiescente F3 et celle active, F1, suggérant de potentielles sensibilités aux chimiothérapies différentes.

Dans un troisième temps, la réponse des sous-populations cellulaires aux chimiothérapies, couramment utilisées dans le traitement du CCR, a été examinée pour évaluer leur pertinence clinique. Les tests de chimio-sensibilités, en 2D, ont

montré une résistance de la sous-population F3 au 5-FU, à l'oxaliplatine ainsi qu'à l'irinotécan, soulignée par une augmentation de la prolifération après traitement, par rapport à la sous-population F1. Ces résultats ont été confirmés en 3D, à partir de colonosphères, pour les chimiothérapies seules et en combinaisons. Ainsi, notre approche permet l'isolement d'une sous-population présentant des caractéristiques de CSCC et une chimiorésistance, ce qui confirme leur intérêt d'un point de vue clinique.

Enfin, ces expériences ont été reproduites à partir de cultures primaires de CCR, plus représentatives de l'hétérogénéité et de la complexité des tumeurs, pour valider notre méthode de tri par SdFFF. Les résultats obtenus à partir de ces deux cultures primaires coïncident avec ceux des lignées cellulaires.

En conclusion, ces travaux de recherche confirment et approfondissent les résultats préalablement obtenus dans l'équipe (Mélin et al., 2012, 2015). L'ensemble de ces données démontre la faisabilité de notre approche « label-free » pour étudier la réponse individualisée de chaque sous-population tumorale. Dans notre étude, les caractéristiques des CSCC de stades précoces et de stades métastatiques ainsi que leur réponse aux chimiothérapies étaient similaires. La SdFFF permet ainsi d'étudier sans *a priori* l'hétérogénéité cellulaire intratumorale et les CSCC quel que soit le stade tumoral. De plus, ces travaux permettent une meilleure compréhension des mécanismes de résistances aux thérapies ainsi que l'impact de l'hétérogénéité et des CSCC dans ce processus. *In fine*, cette approche pourrait fournir des informations précieuses à partir d'échantillons de patients atteints de CCR et offrir de nouvelles pistes pour personnaliser les thérapies systémiques.

Article Hervieu *et al.*, 2022

Ces travaux ont fait l'objet d'un article intitulé : « A label-free cell sorting approach to highlight the impact of intratumoral cellular heterogeneity and cancer stem cells on response to therapies », déposé sur la plateforme *Preprints* de MDPI, et qui sera très prochainement soumis dans le journal *Cells*.

Article

A label-free cell sorting approach to highlight the impact of intratumoral cellular heterogeneity and cancer stem cells on response to therapies.

Céline Hervieu ¹, Mireille Verdier ¹, Gaëlle Bégaud ¹, Niki Christou ^{1,2}, Magali Sage ³, Julie Pannequin ⁴, Serge Battu ^{1,†} and Muriel Mathonnet ^{1,2,*}

¹ UMR INSERM 1308-CAPTUR "Control of Cell Activation in Tumor Progression and Therapeutic Resistance", Faculty of Medicine, Ω-Health Institute, University of Limoges, 87025 Limoges CEDEX, France; celine.hervieu@unilim.fr, mireille.verdier@unilim.fr, gaelle.begaud@unilim.fr, niki.christou@unilim.fr, serge.battu@unilim.fr, muriel.mathonnet@unilim.fr

² Department of General, Endocrine and Digestive Surgery, University Hospital of Limoges, 87025 Limoges CEDEX, France

³ BISCEM US42 INSERM / UAR 2015 CNRS "Integrative Biology Health Chemistry Environment", Ω-Health Institute, 87025 Limoges CEDEX, France; magali.sage@unilim.fr.

⁴ UMR 5203 CNRS, INSERM, Institute of Functional Genomics, University of Montpellier, Montpellier, France; julie.pannequin@igf.cnrs.fr.

* Correspondence: muriel.mathonnet@unilim.fr

† These authors equally contributed to this work.

Abstract: Cancer stem cells play a crucial role in tumor initiation, metastasis and therapy resistance. Cellular heterogeneity and plasticity challenge the isolation of cancer stem cells. The impact of intratumoral cellular heterogeneity in the context of treatment resistance using a label-free approach remains understudied. Here, we use the sedimentation field-flow fractionation technique to separate, without labeling, cell subpopulations of colorectal cancer cell lines and primary cultures according to their biophysical properties. One of the three cell subpopulations sorted by SdFFF exhibits cancer stem cell traits, including high tumorigenicity *in vivo*, and a higher frequency of tumor-initiating cells compared to the other subpopulations. *In vitro* two- and three-dimensional chemosensitivity assays emphasize the therapeutic relevance of this cancer stem cell-like subpopulation due to its chemoresistance. Therefore, our findings highlight a label-free cell sorting approach to reveal intratumoral cellular heterogeneity and its implication in therapy resistance. This approach enables the study of the individualized response of each sorted cell subpopulation by breaking down the tumor, thus offering new perspectives for personalized therapy.

Keywords: cancer stem cells; colorectal cancer; label-free cell sorting; chemoresistance; intratumoral cellular heterogeneity.

1. Introduction

Despite therapeutic advances, colorectal cancer (CRC) remains a major cause of mortality worldwide [1]. Early diagnosis plays a crucial role in the survival of CRC patients. At diagnosis, patients with localized CRC represent 37% of cases, while those with metastatic stage account for 22%, based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program [1]. Importantly, five-year survival is strongly related to CRC stage. Indeed, the 5-year survival is around 90% for localized CRC, whereas it decreases sharply for metastatic CRC with only 14% survival. A better understanding of the cells responsible for CRC progression, metastasis and treatment resistance is required. Although new treat-

ment options are available, chemotherapy remains a standard therapy for CRC after surgery [2]. Treatment regimens for patients with localized or advanced CRC include 5-fluorouracil (5-FU)-based chemotherapies, such as FOLFOX (5-FU, leucovorin, and oxaliplatin) or FOLFIRI (5-FU, leucovorin, and irinotecan) or FOLFIRINOX (5-FU, leucovorin, oxaliplatin and irinotecan) [3,4]. Therapeutic resistance and relapse are responsible for decreased 5-year survival in advanced CRC. One explanation for therapy failure is the presence of a minor cell subpopulation, cancer stem cells (CSCs), which are resistant to conventional therapies and therefore likely to cause tumor relapse [5]. CSCs are a small population of cancer cells endowed with self-renewal, multi-lineage differentiation, and tumor-initiating capacity in immunocompromised mice [6,7]. The main challenge for CSC study is their identification and isolation. Surface markers were originally and for a long time used to identify CSCs. However, due to CSC plasticity and the shared expression of certain markers by intestinal stem cells or cancer cells, the use of markers is no longer sufficient to define a CSC [8,9]. Nowadays, functional characteristics such as tumorigenic potential, relative quiescence and chemoresistance are more often used to identify CSCs. The CSC state is subject to cellular plasticity and is inherent to intratumoral cellular heterogeneity. A few years ago, our laboratory adapted the sedimentation field-flow fractionation (SdFFF) technique to separate cell subpopulations of cell lines [10]. SdFFF is a gentle, non-invasive method that does not require cell labeling or fixation [10]. Cell separation by SdFFF depends on the differential elution of cells subjected to both the action of a parabolic profile generated by the mobile phase in the channel and a multi-gravitational external field generated by the channel rotation [9]. Cell separation is based on their biophysical properties such as size and density using the hyperlayer elution mode of SdFFF [11].

In a previous work, our laboratory used SdFFF as a tool to isolate cell subpopulations independently of surface marker expression from CRC cell lines [10]. The results showed that one of the cell subpopulations sorted by SdFFF exhibited CSC-like features in two early-stage CRC cell lines [10,12]. However, the ability of this cell subpopulation to initiate tumors in mice, which is the gold standard for defining a CSC, remains to be determined. In our study, we therefore pursued phenotypic and functional characterization of the sorted cell subpopulations and evaluated their ability to generate tumors *in vivo*. Furthermore, due to the involvement of CSCs in tumor progression and metastasis, we performed these experiments using late-stage CRC cell lines, in addition to early-stage ones, as well as primary cultures. Finally, as CSCs play a key role in resistance to conventional therapies, we explored the response of SdFFF-sorted cell subpopulations to chemotherapies. Thus, our study aims to highlight the impact of intratumoral cellular heterogeneity in the context of treatment resistance in order to provide leads for a more personalized therapy. In agreement with previous results, we report here that SdFFF-sorted cell subpopulations have distinct phenotypic and functional characteristics [10]; nevertheless, in our study CSC marker expression does not necessarily correlate with CSC functional characteristics. Characterization results show that a cell subpopulation exhibits CSC functional hallmarks, including *in vivo* tumorigenicity and resistance to conventional therapies, for both early- and late-stage cell lines as well as for primary cultures. Therefore, we highlighted a label-free cell sorting approach to unravel intratumoral cellular heterogeneity and identify chemoresistance from the individualized response of each sorted cell subpopulation. In fine, this approach could provide valuable information from CRC patient samples, thus offering new perspectives for more personalized therapy.

2. Materials and Methods

Cell cultures

Four colorectal cancer cell lines were used. The two early stage CRC cell lines, WiDr (CCL-218TM) and SW480 (CCL-228TM), and the metastatic ones, SW620 (CCL-227TM) and T84 (CCL-248TM), were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC/LGC

Promochem, France). SW480 and SW620 were established from the same patient, SW480 is from the patient's primary tumor while SW620 is from lymph node metastases. T84 cell line is derived from lung metastasis of a CRC patient. Cells were maintained at 37 °C under humidified 5% CO₂ in MEM medium (#31095-029, Gibco™) for WiDr and RPMI GlutaMAX medium (#61870-010, Gibco™) for SW480, SW620 and T84 cell lines, both supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate (#11360-039, Gibco™), 100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (#15140-122, Gibco™), and only for WiDr 1% non-essential amino acids (#11140-035, Gibco™) [13].

Two primary cultures from CRC patients (CPP14 and CPP35) were obtained from the Institute of Functional Genomics (Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France), after informed consent of patients (Material Transfer Agreement CNRS 190287). The primary culture CPP14 is derived from a patient with T2N0M0 CRC, i.e. early stage (stage I), while CPP35 is derived from a patient with T4aN0M0 CRC, i.e. a stage at which the tumor has invaded the peritoneum (stage IIB), as indicated in Table 1 [14]. Both primary cultures are treatment-naive. The culture conditions for these primary cultures are DMEM GlutaMAX medium (#61965059, Gibco™) supplemented with 10% FBS, 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Table 1. Clinical data from colorectal cancer patients from whom primary cultures were established.

Primary cultures	CPP14	CPP35
pTNM	T2N0M0	T4aN0M0
Stages	Early-stage tumor Stage I	Tumor-invaded peritoneum Stage IIB
Primary location	Left colon	Transverse colon
Chemotherapy	No	No
Radiotherapy	No	No
Curative surgery	Yes	Yes

SdFFF cell sorting

The SdFFF technique used enables sorting of cell subpopulations as previously described and schematized [9,10]. Cell-solid phase interactions in SdFFF are limited due to the use of a ribbon-like empty channel with no stationary phase and a size/density-based separation mechanism through the hyperlayer elution mode. SdFFF parameters used during cell sorting are field (units of gravity, g), flow rate of the mobile phase which is sterile phosphate-buffered saline (PBS, #14190-094, Gibco™) and the rotation speed of the channel (revolutions per minute, rpm) which is related to the field. Adjustment steps were performed in order to choose the SdFFF parameters allowing a correct separation between the dead volume peak and the peak containing the cells, and to define the best elution conditions for the different cell lines and primary cultures used. The elution conditions are summarized in Table 2, with the parameters checked before and during each cell sorting.

Table 2. Optimal elution condition for cell sorting of CRC cell lines and primary cultures by SdFFF.

Cell lines and primary cultures	Cell concentrations (cells/mL)	Field (g)	Flow rate (mL/min)
WiDr	2x10 ⁶	8	0.8
SW480	2.5x10 ⁶	8	0.8
SW620	2.5x10 ⁶	8	0.8
T84	3x10 ⁶	15	0.8
CPP14	2.5x10 ⁶	10	0.8
CPP35	2.5x10 ⁶	8	1

The injected volume of the cell suspension, 100 μ L, as well as the detection wavelength, 254nm, are common for each cell line and primary culture. A cleaning and decontamination procedure is performed at the end of each cell sorting [15]. Once sorted, cells can be recultured in vitro and characterized, as no cell fixation or labeling is required for SdFFF. In order to perform experiments with the sorted cells, successive injections and collections of the same cell suspension are required to obtain a sufficient quantity of cells.

CSC marker expression

After cell sorting by SdFFF, cell subpopulation concentrations were standardized to the same amount of cells in each condition. Anti-CD44, anti-LGR5, anti-CD133/1 and viability marker antibodies were added to the cells and incubated for 30 minutes at 4°C and in the dark, antibody references are summarized in Table S1. The viability marker was used to exclude nonviable cells. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, #10231622, Fischer Scientific) for 10 minutes at room temperature and permeabilized with Perm Buffer III (#558050, BD Phosflow™) for 30 minutes at 4°C. Next, antibodies recognizing the intracellular marker BMI-1 were added and incubated for 30 minutes at 4°C in the dark (reference in Table S1). As reference controls, anti-IgG2b κ FITC, anti-IgG2b κ PE-Vio 770, anti-IgG1 PE-Vio 615 and mouse anti-IgG1 κ PE isotype controls were used under the same conditions and concentrations to ensure specific recognition of our antibodies of interest and to set gates (references in Table S1). Samples were analyzed by the CytoFlex LX and data analysis using Kaluza software.

Cell cycle analysis

Cell concentrations of SdFFF-sorted subpopulations were standardized in each condition. After a centrifugation step, the cells were resuspended with cold PBS, fixed with cold 96% ethanol added slowly and under shaking, and then placed at -20°C. After a few minutes at room temperature, the cells were washed and then resuspended with PBS and RNase A (#R6148, Sigma-Aldrich) for 20 minutes at room temperature. Next, propidium iodide was added 15 minutes before acquisition on the FACS Calibur. Data analysis was performed with ModFit LT™ software.

Clonogenic assay: soft agar assay

This assay is based on the use of two gels, the first is a 0.5% agar gel that prevents the cells from adhering to the culture plate and the second is a 0.7% agarose gel containing the cells. The agar (#A7002, Sigma-Aldrich) and agarose (#A9539, Sigma-Aldrich) solutions were prepared upstream with sterile PBS and autoclaved to limit potential contamination. Agar gel was prepared in advance and plated into wells of 24-well plates at room temperature and under the culture hood. Once agar gel solidified, the agarose gel was heated and then gently mixed with cell subpopulations sorted by SdFFF to have a cell concentration of 1 \times 10³ cells per well (12 wells/condition). As soon as the second gel solidified, culture medium was added on top to prevent evaporation and 24-well culture plates were incubated at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 30 days. Four weeks later, the formed colonies were fixed in 4% PFA (#10231622, Fischer Scientific) for 15 minutes and then stained with 0.1% crystal violet. Wells of the 24-well plates used were captured with the Leica DFC300 FX Digital Color Camera to allow colony quantification and analyzed by ImageJ software.

In vivo tumor initiation assay

SdFFF-sorted cell subpopulations of the WiDr cell line were injected subcutaneously into nude mice (Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu nu/nu, 6 weeks old, female, five mice per group) in decreasing amounts of cells (1000, 500, and 100) in Matrigel (#356237, Corning)-MEM medium (v:v). Mice weight and tumor size was measured three times a week for 7 weeks. After 50 days, mice were sacrificed and tumors were collected. The number of tumor-bearing mice with a tumor volume greater than 100mm³ was counted. The online software Extreme limiting dilution analysis (ELDA) was used from the in vivo results to determine the frequency of tumor occurrence and thus tumor initiating cells frequency

(<https://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) [16]. This animal experimentation protocol has been approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation n°33 and by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Cytotoxicity assay

To compare results between cell lines, we defined the same cell concentration for all cell lines: 1.5×10^3 cells per well of 96-well plate, after optimization. Once sorted and seeded, cells were then treated for 72 hours with 5-FU (provided by the anticancer preparation unit of the University Hospital of Limoges) using a range from 0.16 to 250 μ M. Three days later, the MTS reagent was added according to the manufacturer's instructions (#G3580, CellTiter96 AQueous One solution Cell Proliferation assay, Promega) and incubated for 3 hours at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂. Absorbance was then measured at 490nm with the Multiskan™ FC 96-well plate reader (Thermo scientific™) and the results were expressed as a percentage comparing the treated condition to the untreated condition defined as 100%. Generation of drug response curves and determination of IC50 values were performed using GraphPad Prism software. We compared the obtained IC50s with those reported at <https://www.cancerrxgene.org/>.

Proliferation assay

Once sorted by SdFFF, cells were seeded at the same concentration as for the MTS assay, 1.5×10^3 cells per well in 96-well plates. Cells were then treated for 72 hours with the average IC50 values obtained for 5-FU from the cell lines and primary cultures used. Cell proliferation was assessed using the BrdU cell proliferation assay kit (#6813, Cell signaling technology) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was then measured at 450nm with the Multiskan™ FC 96-well plate reader (Thermo scientific™) and the results were expressed as a ratio comparing the treated condition to the untreated condition defined as 1.

Cell death assay

From the same cell sorting by SdFFF as for the proliferation analysis, an apoptosis analysis was performed. Cell concentration and 5-FU dose and incubation time were the same as for the cell proliferation assay. Apoptosis rate was measured using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (#11774425001, Roche), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was then measured at 405nm with the Multiskan™ FC 96-well plate reader (Thermo scientific™) and the results were expressed as a ratio comparing the treated condition to the untreated condition defined as 1.

Tumorsphere assay

Five hundred cells were seeded in nonadherent 96-well culture plates previously coated with a 10% solution of poly-2-hydroxyethylmethacrylate (#P3932, Sigma Aldrich) in 95% ethanol and dried overnight at 56°C [17]. These cells were cultured in defined medium: with serum-free GlutaMAX-DMEM/F12 (#10565018, Gibco™) medium supplemented with 20 ng/ml epidermal growth factor (#PHG0314, Gibco™), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (#PHG0264, Gibco™), 0.3% glucose (#49163, Sigma-Aldrich), 20 μ g/ml insulin (#12585-014, Gibco™), 1:100 N2 supplement (#17502-001, Gibco™)[18] and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for one week. Seven days later, spheres larger than 50 μ m in diameter were counted using the Leica DMI8 microscope. Then, to study chemotherapy response in a 3D culture model, chemotherapies were added after the seven days of incubation that allow colonosphere formation, and incubated for 3 days. Colonospheres were counted three days after treatment, imaged using the Leica DMI8 microscope, and their size was measured using ImageJ software.

Statistical analysis

All bar plots are represented by the mean \pm S.E.M. of results obtained from at least three independent experiments. Flow cytometry results were represented as histograms from one representative biological replicate among the three independent experiments

performed (n=3). Significance of results was specified by stars: *p-value < 0.05, **p-value < 0.01, ***p-value < 0.001. The presence of a star without a bar below indicates that the result is significantly different from the control condition: TP. Significance between the three sorted cell subpopulations was represented using the star and a bar below to allow identification of the subpopulations involved in these significantly different results. Non-significance of results is indicated by ns for not significant. Results were analyzed by the Kruskal-Wallis test for clonogenicity assay because the results did not follow a normal distribution, verified using the Shapiro-Wilk test. Chi-squared test was used to identify the frequency of tumor-initiating cells from in vivo experiment results. The one-way ANOVA test was used for all other experiments because the results followed a normal distribution (Shapiro-Wilk test) and the comparison was between the three sorted cell subpopulations and the control. Statistical tests were performed using PAST software, version 2.17c.

3. Results

3.1. SdFFF technique sorts cell subpopulations expressing cancer stem cell markers from colorectal cancer cell lines.

Firstly, we optimized the sorting conditions for the different cell lines used, by modifying the elution parameters such as flow rate and field. The defined parameters are presented in Table 2. Using a hyperlayer elution mode, cells are eluted according to their biophysical properties, mainly their size and density [10,12,19]. This hyperlayer mode elutes the largest cells first and the densest cells last. Thus, the beginning of the elution peak is rather composed of large and low density cells, while the end of the peak contains small and high density cells [10]. Using SdFFF, we isolated three subpopulations of cells: F1, F2, and F3, as shown in the SW480 fractogram in Figure 1A, in addition to the control. The total peak (TP) is a control of cell sorting efficiency, corresponding to all cells eluted by the device from the beginning of the F1 collection to the end of the F3 collection (Figure 1A). Previous studies have shown comparable results between the TP control and the unsorted cell line that underwent the same conditions as the sorted subpopulations, called crude, so we decided to use the TP as a control in our following experiments [10,12]. The cell size of these subpopulations was monitored by a coulter counter and confirmed that the cells eluted first, i.e. F1, are larger than those eluted last, i.e. F3, with results comparable to those published in Mélin et al. [10].

Secondly, we phenotypically characterized these sorted cell subpopulations by analyzing for the first time the expression of CSC markers in the four cell lines by flow cytometry. In the publication of Mélin et al. and until now, the analysis of CSC marker expression from SdFFF-sorted cell subpopulations was only performed by immunofluorescence, which is a less robust and less objective technique than flow cytometry mainly due to the number of cells analyzed [10]. Using flow cytometry, we analyzed the expression of CD44, LGR5, BMI1, and CD133 markers within SdFFF-sorted cell subpopulations of both early-stage CRC cell lines, WiDr and SW480, and metastatic stage cell lines, SW620 and T84 (Figure 1B-F). Isotype controls with fluorochromes identical to our markers of interest were performed under the same experimental conditions to position the gates (Figure S1A). Initially, we compared the expression of these markers in the four cell lines. CSC markers are found in all cell lines but at different expression levels (Figure 1B-F). Looking at the TP values, we notice that LGR5 and CD133 markers are more highly expressed in the early stage cell lines while BMI1 marker expression is higher in the late stage cell lines (Figure 1D-F). CD44 marker expression is comparable between cell lines except for the SW620 cell line that has a lower expression (Figure 1C). Thus, these results show that these CSC markers are expressed in all four cell lines and interestingly, for three of the four markers, the expression levels appear to be correlated with CRC stages.

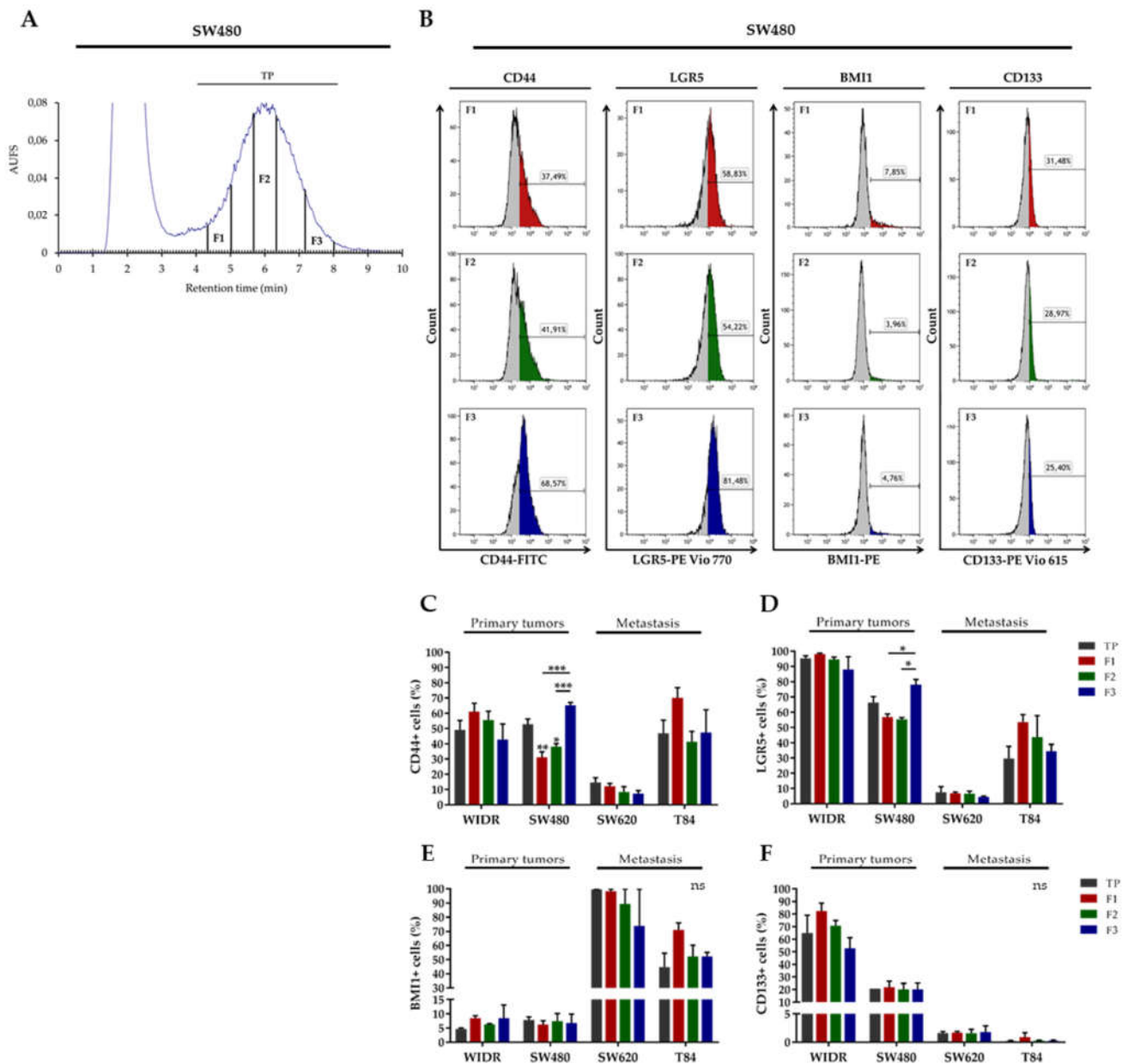


Figure 1. Phenotypic characterization of SdFFF-sorted cell subpopulations from CRC cell lines.

(A) Fractogram of the SW480 cell line obtained by SdFFF with the sorted cell subpopulations: total peak control (TP), F1, F2 and F3. AUFs: absorbance units full scale. (B) The expression level of CSC markers, CD44, LGR5, BMI1 and CD133, was assessed by flow cytometry and plotted as histograms for the SW480 cell line. CD44 and LGR5 markers are more expressed in SW480 F3 compared to other subpopulations. Graphs show one representative biological replicate (n=3). (C-F) Quantification of CD44 (C), LGR5 (D), BMI1 (E) and CD133 (F) positive cells was summarized in the bar plot for all cell lines. The results show variable expression levels of CSC markers between the sorted cell subpopulations, with significantly higher expression of the markers LGR5 and CD44 in F3 for SW480 and a trend rather in F1 for WiDr, SW620 and T84. All these results are represented as means \pm SEM and statistical differences with ns for not significant, *p-value < 0.05, **p-value < 0.01, ***p-value < 0.001 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test.

Next, we focused on flow cytometry results obtained from SdFFF-sorted cell subpopulations. Figure 1B contains the histograms acquired from the three-sorted subpopulations of the SW480 cell line. F3 subpopulation of SW480 has a significantly higher percentage of CD44-positive and LGR5-positive cells compared to F1 and F2 (Figure 1B-D). For BMI1 and CD133 markers, the expression levels are comparable between the sorted SW480 cell subpopulations (Figure 1E-F). For the WiDr, SW620 and T84 cell lines, the percentage of cells positive for all four markers seems to be higher in F1 compared to the other subpopulations but without significant difference (Figure 1C-F). Thus, flow cytometry results show a non-homogeneous distribution of the expression of these CSC markers in the sorted cell subpopulations of all cell lines. Indeed, the percentage of positive cells for these markers is predominant in F3 for SW480 while the trend seems to be in F1 for the WiDr, SW620 and T84 cell lines (Figure 1B-D).

Therefore, these phenotypic characterization results reveal two subpopulations that appear to be distinct: F1 and F3. Furthermore, we confirmed by these results that cell sorting by SdFFF is not dependent on marker expression, which provides new perspectives to study intratumoral cellular heterogeneity. Finally, phenotypic analysis provides interesting preliminary data on CSCs but needs to be completed by a functional analysis because of CSC plasticity [6,20].

3.2. F3 subpopulation has cancer stem cell functional features in colorectal cancer cell lines.

We further investigated SdFFF-sorted cell subpopulations by analyzing their functional properties. First, we examined the cell cycle distribution of the three cell subpopulations from cell lines by flow cytometry (Figure 2A-B). Comparing the TP values, we notice that the proportion of cells in G0/G1 decreases and seems to be correlated with the evolution of CRC stages (Figure 2B). Indeed, the percentage of cells in G0/G1 was significantly different between WiDr and the other three cell lines, as well as between SW480 and T84 (data not shown). Focusing on the flow cytometry histograms of the WiDr cell line, cells in G0/G1 represent approximately 43% for F1, 62% for F2 and 82% for F3 i.e. an almost two-fold difference from F1, while the percentage of cells in G2/M is approximately 27% for F1, 12% for F2 and 3.5% for F3 i.e. a seven-fold difference from F1 (Figure 2A). Cell proportion in each phase of the cell cycle is summarized in the bar plots (Figure 2B, S1B-C). The bar plot results indicate that the percentage of cells in G0/G1 is statistically different between the three WiDr cell subpopulations (Figure 2A-B). A similar observation could be made for all cell lines; the F3 subpopulation is significantly the one with the highest number of cells in G0/G1 phase (Figure 2B). In contrast, the percentage of cells in G2/M is significantly higher in F1 for all cell lines while the proportion of cells in S phase varies more slightly between cell subpopulations (Figure S1B-C). Therefore, F3 subpopulation appears to be more quiescent or poorly proliferative compared to the other sorted cell subpopulations, which is a feature of CSCs.

Subsequently, we assessed the clonogenic capacity of these SdFFF-sorted cell subpopulations by a soft agar assay (Figure 2C-D). Comparing the TP values, the late-stage cell lines seem to form slightly more colonies than the early-stage ones (Figure 2D). F3 subpopulation of the WiDr cell line produces significantly more colonies than F1 and TP, and a similar trend is observed for the other cell lines (Figure 2D). Interestingly, the colonies formed by the SW620 cell line, which is from the same patient as SW480 but at a more advanced stage, appear to be more numerous and larger than those obtained by SW480 (Figure 2C). Hence, the F3 subpopulation seems to be more clonogenic than F1.

Taken together, these functional characterization results highlight two cell subpopulations that seem to oppose each other: F1 and F3, as observed from the phenotypic characterization. The F3 subpopulation is relatively quiescent and clonogenic, which are features of CSCs, whereas F1 is proliferative and less clonogenic. Based on these results, F2 appears to be an intermediate cell subpopulation between F1 and F3, and we will now focus our study on the F1 and F3 subpopulations.

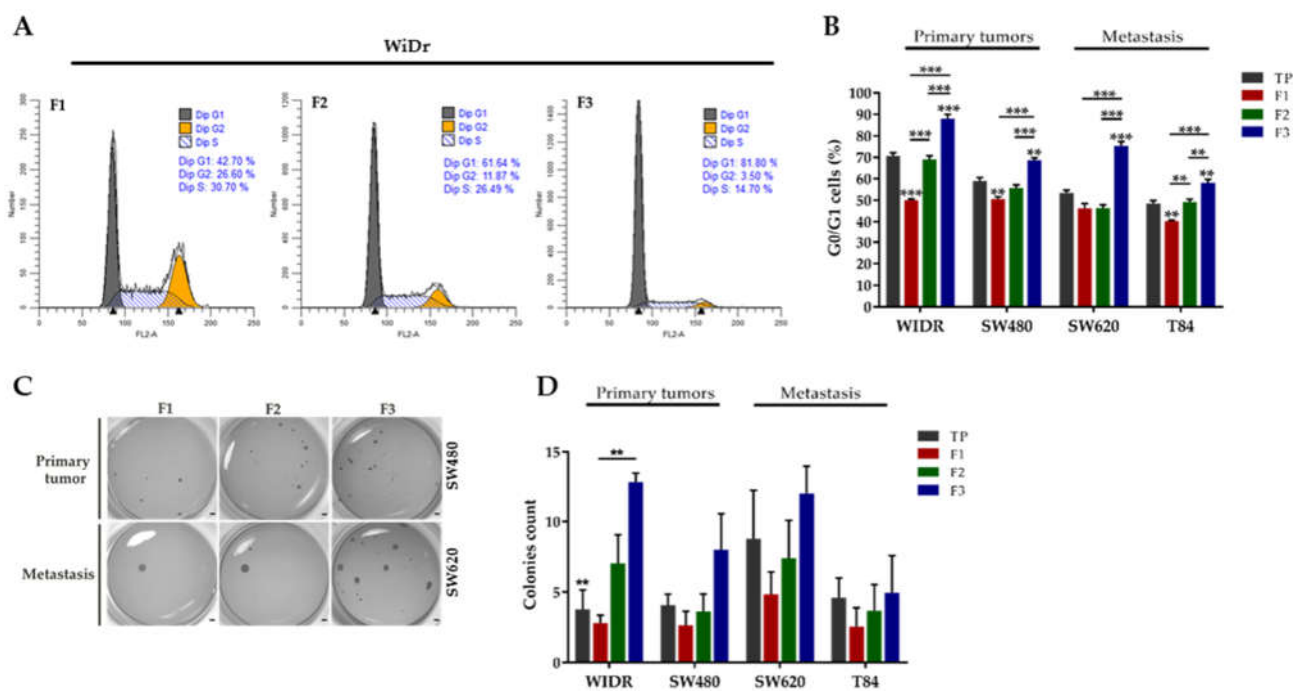


Figure 2. Functional characterization of SdFFF-sorted cell subpopulations from CRC cell lines highlighting a quiescent and clonogenic F3 subpopulation. (A) The distribution of the sorted cell subpopulations in the cell cycle was analyzed by flow cytometry and plotted as histograms using modfit software. The percentage of G0/G1 cells is two-fold higher and seven-fold lower for G2/M cells in the F3 subpopulation compared to F1 for the WiDr cell line. Graphs show one representative biological replicate ($n=3$). (B) Quantification of G0/G1 cells was performed for each sorted cell subpopulation and cell line, and presented in the bar plot from three biological replicates. For all cell lines, F3 subpopulation has the significantly highest number of cells in G0/G1 compared to the other cell subpopulations. (C-D) Cell clonogenicity was assessed by a soft agar assay. Images of the colonies formed (C) as well as the bar plot (D) show that F3 forms significantly more colonies than F1 for the WiDr cell line with a similar trend for SW480, SW620 and T84. From the colony images, we can notice that the F3 subpopulation of the SW480 and SW620 cell lines appear to form larger colonies compared to F1 and F2. Scale bar 1 mm. All these results are represented as means \pm SEM and statistical differences with ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test for cell cycle distribution analysis and Kruskal-Wallis test for clonogenicity.

The gold standard test for defining a CSC is the ability to initiate tumors as xenografts in immunocompromised mice [9]. Thus, for the first time, we subcutaneously inoculated the sorted cell subpopulations F1 and F3 at different cell concentrations into athymic nude mice, as illustrated in Figure 3A. We used a single cell line for the *in vivo* tumor initiation assay in order to meet the guidelines of the 3R rule, and we chose the WiDr cell line on the basis of previous results with the chick chorioallantoic membrane model [12]. The number of tumor-bearing mice with a volume larger than 100 mm³ was counted seven weeks after injection (Figure 3A). Interestingly, among the 15 mice transplanted with the F1 cell subpopulation only two mice developed tumors compared to eight mice with F3 (Figure 3B). Remarkably, F3 was the only cell subpopulation able to initiate tumor formation at the concentration of 100 injected cells (Figure 3B). Furthermore, F3 is the cell subpopulation with the highest average tumor volume, approximately 450 mm³ for F3 versus 360 mm³ for TP and 130 mm³ for F1, thereby a three-fold difference for F3 compared to F1 (Figure S1D). Importantly, a mean tumor volume above the 100mm³ threshold was obtained between 36 and 39 days for F3 and TP with the 1000 cells injected condition,

whereas it was only reached from 46 days for F1 (Figure S1E). Tumor size can be visualized from the photos of the tumors collected at the end of the experiment in Figure S1F. From these in vivo results, we performed a limiting dilution analysis (LDA) using the extreme LDA software [16]. The frequency of tumor-initiating cells is estimated at one cell in 566 for the F3 subpopulation, compared with one in 3611 for F1. Thus, the frequency is four-fold higher for the F3 subpopulation compared to F1, with a significant p-value ($p=0.00886$) (Figure 3C). Therefore, F3 subpopulation is more tumorigenic than F1 and has a significantly higher frequency of tumor-initiating cells (Figure 3).

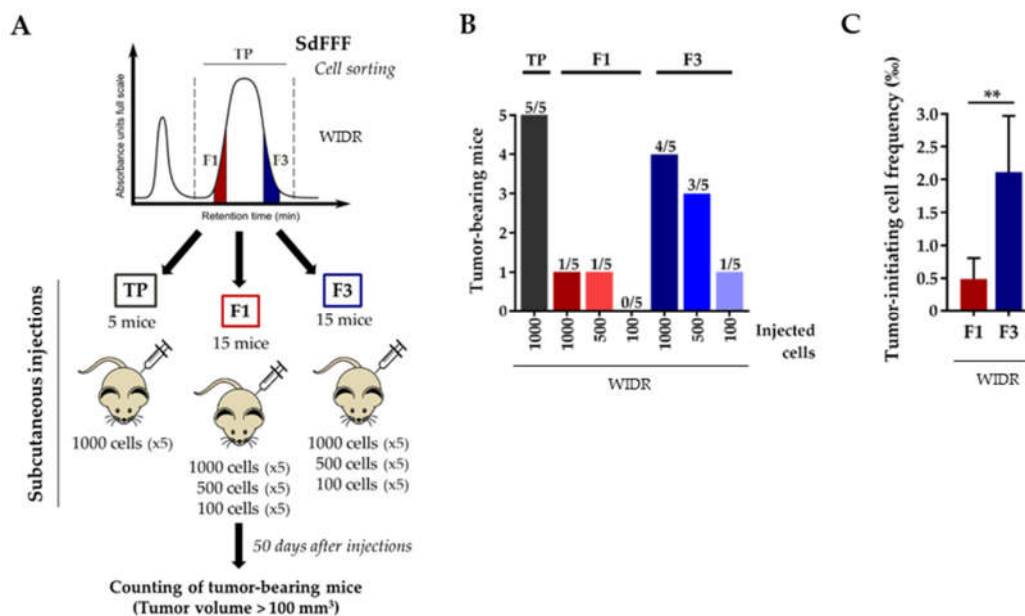


Figure 3. Tumorigenic capacity of the F3 subpopulation in immunodeficient mice, even after an injection of only 100 cells. (A) Schematic representation of the in vivo tumor initiation assay. Nude mice were injected subcutaneously with either 1000, 500 or 100 F1 and F3 cells of the WiDr cell line. (B) The number of tumor-bearing mice (tumor > 100 mm³) was evaluated 7 weeks after injection and summarized in the bar plot. F3 subpopulation is more tumorigenic than F1, for all cell concentrations. (C) Tumor-initiating cell frequency was determined from in vivo results using extreme limiting dilution analysis (ELDA) software. F3 has a significantly higher frequency of tumor-initiating cells than F1. Results are represented as means \pm SEM and statistical differences with **p value < 0.01 using chi-squared test of ELDA software.

Overall, our findings show that SdFFF-sorted cell subpopulations from cell lines exhibit distinct phenotypic and functional characteristics, particularly F1 and F3. Phenotypically, the F3 subpopulation expresses significantly more two of the four studied markers for the SW480 cell line while the expression tends rather in F1 for WiDr, SW620 and T84 (Figure 1). Functional analysis revealed a relatively quiescent, clonogenic and highly tumorigenic cell subpopulation in vivo: F3 (Figure 2 and 3). Thus, the F3 subpopulation exhibits CSC hallmarks including its ability to initiate tumors in vivo and an estimated four-fold higher frequency of tumor-initiating cells than F1 (Figure 3). This subpopulation could therefore be a relevant therapeutic target, which underlines the importance of studying its response to therapies commonly used in CRC treatment.

3.3. F3 subpopulation is resistant to 5-FU in colorectal cancer cell lines.

We then assessed the response to chemotherapy of cell subpopulations sorted by SdFFF. We treated these sorted subpopulations with the most commonly used chemotherapeutic molecule in CRC treatment, 5-FU, and assessed cell viability, proliferation, and apoptosis after treatment, as shown in Figure 4A. First, we applied a dose range of 5-FU

to obtain IC50s for each sorted cell subpopulation and cell line (Figure 4B-C). Comparing the TP values, we notice that the T84 cell line is the most resistant to 5-FU among the four cell lines, with an IC50 of about 13 μM , which may correlate with it being the most advanced cell line (Figure 4C). IC50 values are comparable between the two cell lines SW480 and SW620, and the IC50 of WiDr is approximately 5 μM , which is consistent with the results of the Genomics of Drug Sensitivity in Cancer study (Figure 4C) [21]. Next, focusing on the sorted cell subpopulations, we observe that the F3 subpopulation is significantly more resistant to 5-FU than TP and F1 for the SW480 cell line, with this similar trend for WiDr, SW620 and T84 (Figure 4B-C). Subsequently, we analyzed the impact of 5-FU treatment on cell proliferation. BrdU results show that proliferation is significantly increased after 5-FU treatment in the F3 subpopulation for SW620 and T84 cell lines compared with F1 (Figure 4D). For both early-stage cell lines, proliferation also appears to be higher in the F3 subpopulation in comparison to F1 (Figure 4D). Remarkably, F3 is the only cell subpopulation sorted by SdFFF to show increased proliferation compared to untreated conditions (dashed line). Therefore, 5-FU treatment mainly induces proliferation in the F3 cell subpopulation, whereas in the untreated condition the proliferation rate is higher in F1 (data not shown). In parallel to the proliferation analysis and from the same cell sorting, 5-FU-induced apoptosis was assessed by the cell death ELISA assay. No significant changes are visible between the sorted cell subpopulations for all cell lines (Figure 4E). Thus, these results highlight 5-FU resistance of the F3 subpopulation due to enhanced cell viability and proliferation after treatment (Figure 4).

We also performed these experiments after treatment with oxaliplatin and irinotecan, which are the other two chemotherapies commonly used in the treatment of CRC (Figure S2) [2,9]. The IC50 of oxaliplatin is significantly higher in the F3 subpopulation compared to F1 for the WiDr cell line, with a similar trend for SW480 and SW620 (Figure S2A). Post-treatment cell proliferation appeared to be slightly increased in the F3 subpopulation of these three cell lines compared with F1, without major changes in the apoptosis rate (Figure S2B-C). For the T84 cell line, cell viability is comparable between the sorted cell subpopulations, while proliferation appears to be slightly increased in F3 compared to F1 and apoptosis is significantly decreased in F1 in comparison to F3 (Figure S2A-C). Interestingly, the difference between the F1 and F3 subpopulations of T84 for proliferation and apoptosis rates is equivalent; there is a factor of 1.46 in both cases (Figure S2B-C). Focusing on the results with irinotecan, we note that the IC50 of irinotecan is significantly higher in the F3 subpopulation compared to TP for the T84 cell line, and that this trend is also noticeable for SW480 and SW620 (Figure S2D). Cell proliferation rate after irinotecan treatment appears to be increased in the F3 subpopulation for WiDr, SW480 and T84 cell lines compared to F1 (Figure S2E). Irinotecan-induced apoptosis is significantly decreased in F1 and F3 compared to TP for the T84 cell line, a similar trend is obtained for SW480 (Figure S2F).

Taken together, these results demonstrate that F3 is the most resistant to 5-FU among the cell subpopulations sorted by SdFFF for all cell lines (Figure 4). Similar results were obtained after treatment with oxaliplatin and irinotecan (Figure S2). Resistance to treatment is a fundamental characteristic of CSCs, so these results confirm that the F3 subpopulation has CSC-like properties, especially chemoresistance. These chemosensitivity experiments were performed in a two-dimensional (2D) culture model, however, we are aware that the tumor organization is more complex and this may impact the response to therapy. Thus, we will further investigate the response to therapies using a three-dimensional (3D) culture model.

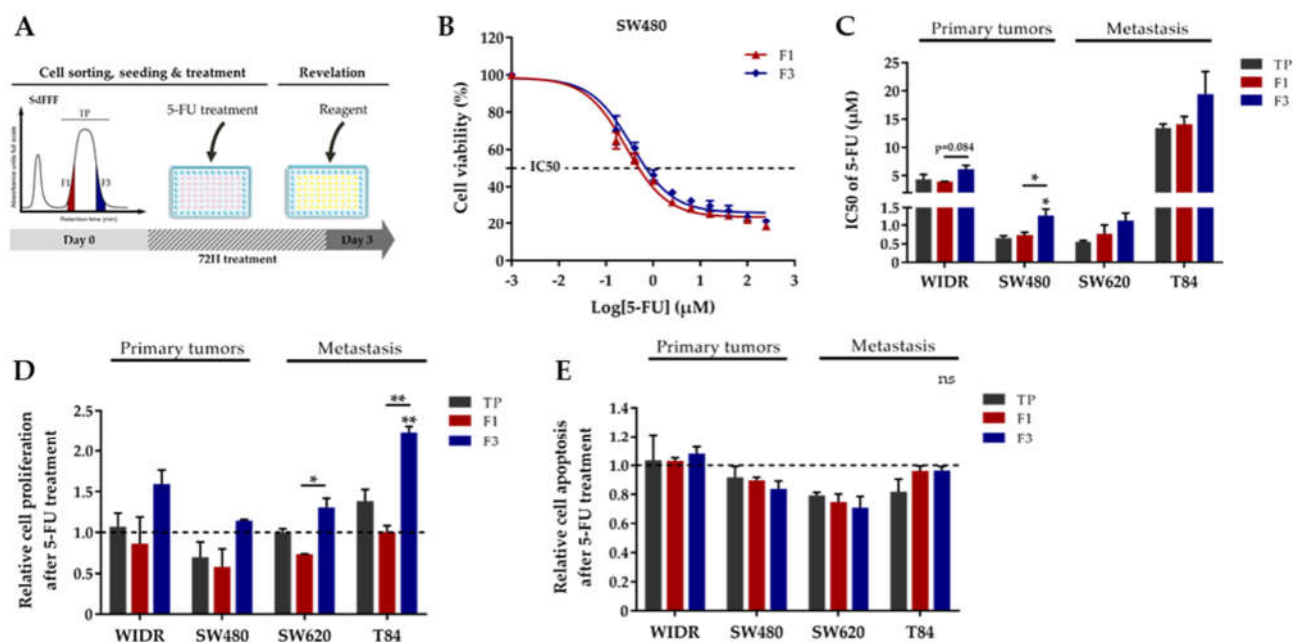


Figure 4. 5-FU resistance of F3 subpopulation from CRC cell lines. (A) Schematic representation of 5-FU response analysis performed. After cell sorting by SdFFF, cell subpopulations were treated with 5-FU for three days and then cell viability, proliferation and apoptosis analysis was performed. (B-C) After 5-FU treatment, cell viability analyzed by MTT assay was presented as a dose-response curve for the SW480 cell line (B) and a bar plot with IC50 values obtained from all cell lines (C). F3 subpopulation has significantly higher cell viability than F1 for the SW480 cell line after treatment, with a similar trend for WiDr, SW620 and T84. (D) Cell proliferation rate after 5-FU treatment was measured by BrdU assay and presented in the bar plot as a ratio between treated and untreated conditions (dashed line). Cell proliferation is significantly increased in F3 compared to F1 for the SW620 and T84 cell lines, with a similar trend for WiDr and SW480. (E) After 5-FU treatment, apoptosis rate was measured using ELISA cell death assay and compared with the untreated condition (dashed line). Apoptosis is comparable between cell subpopulations of all cell lines. All these results are represented as means \pm SEM and statistical differences with ns for not significant, *p-value < 0.05, **p-value < 0.01 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test.

3.4. F3 colonospheres are resistant to single and combination chemotherapies in colorectal cancer cell lines.

We next examined the impact of 5-FU-based chemotherapies on the colonospheres from the SdFFF-sorted cell subpopulations. To this end, we performed the sphere formation assay, a 3D cell culture model mimicking tumor organization in vitro. This test relies on the ability of cancer cells to form colonospheres, i.e. microtumor-like spheroids, from a single progenitor cell and is used to assess the tumorigenic potential of solid tumors in vitro [6]. Thus, we sorted and seeded the cell subpopulations in a defined medium for seven days for colonospheres to form, and then treated them with single chemotherapies, as illustrated in Figure 5A. First, all four cell lines have the ability to form colonospheres (Figure 5B). However, colonosphere morphology and size vary between cell lines, with colonosphere size appearing to correlate with the stage of CRC development (Figure 5B). After 5-FU treatment, the number of colonospheres was significantly increased in the F3 subpopulation compared with F1 for both advanced-stage lines, with a similar trend for SW480 (Figure 5C). Colonospheres were also more abundant in the F3 subpopulation than in TP for WiDr after oxaliplatin treatment, with similar observations for SW480 and SW620 (Figure S2G). The same experiment was carried out after treatment with irinotecan and the results showed that F3 was the most resistant of the sorted cell subpopulations for SW480 with a significant difference compared to TP and F1, and similar findings for

SW620 and T84 (Figure S2H). Chemotherapy is most often administered in combination to patients with late-stage CRC, but sometimes also to early-stage patients with risk factors for recurrence [9], in order to potentiate the anticancer effect and prevent recurrence. Accordingly, we evaluated the response of sorted cell subpopulations to chemotherapy combinations, such as FOLFOX, FOLFIRI, and FOLFIRINOX, in addition to the response analysis to single chemotherapies. Combinations of 5-FU-based chemotherapies mainly induce an increase in colonospheres in the F3 subpopulation, with a significant difference between F3 and TP and/or F1 for WiDr after FOLFOX and FOLFIRINOX treatments, as well as for WiDr, SW480 and T84 after FOLFIRI (Figure 5D-F).

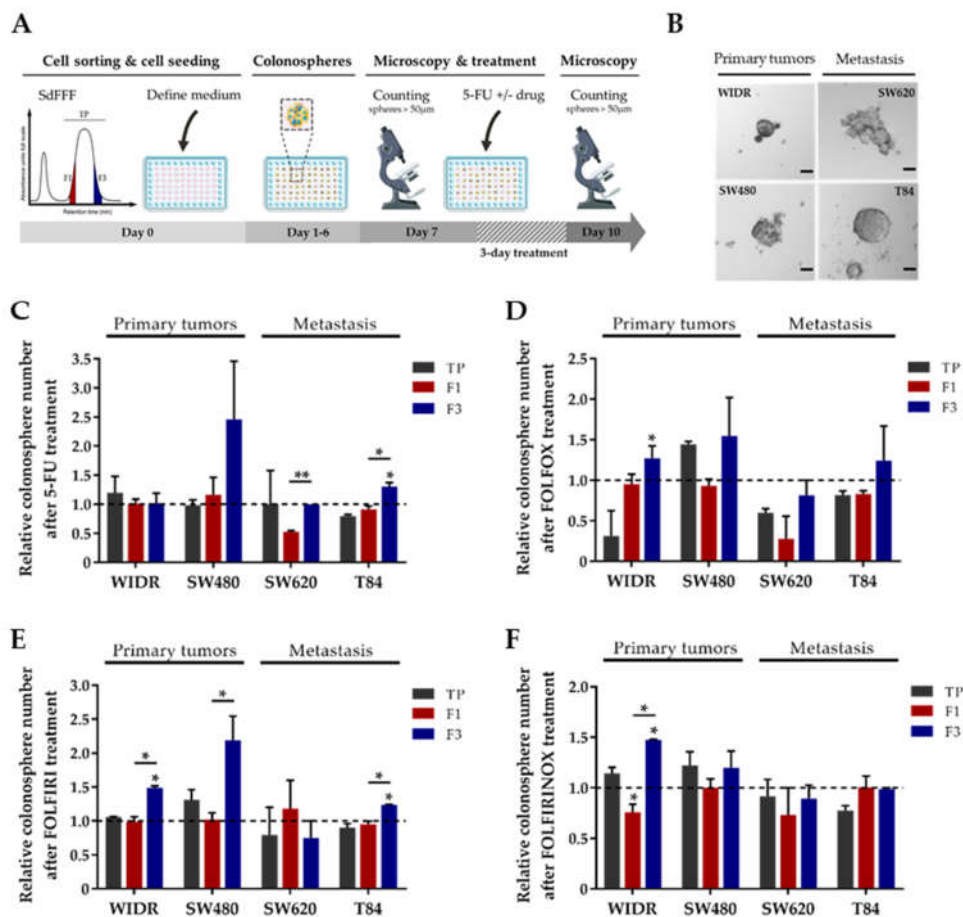


Figure 5. Chemoresistance of F3 colonospheres to 5-FU alone or combined with oxaliplatin and/or irinotecan from CRC cell lines. (A) Schematic representation of chemotherapy response analysis performed from colonospheres. SdFFF-sorted cell subpopulations are seeded at low density in defined medium for seven days and then treated with chemotherapy for three days. Colonospheres with a diameter larger than 50µm are counted before and after treatment. (B) The in vitro tumorigenic potential of cells was assessed by a sphere formation assay. Colonospheres obtained from the different CRC cell lines have distinct morphologies and their size appears to increase with CRC stage. Scale bar 50 µm. (C-F) The impact of chemotherapies on CSC tumorigenic properties in vitro was analyzed after treatment with 5-FU alone (C) or combined with either oxaliplatin (FOLFOX) (D), irinotecan (FOLFIRI) (E), or both (FOLFIRINOX) (F), comparing with the untreated condition (dashed line). Colonospheres obtained are significantly more abundant in the F3 subpopulation compared to TP or F1 after 5-FU treatment for SW620 and T84 cell lines, after FOLFOX and FOLFIRINOX treatment for WiDr, and after FOLFIRI treatment for WiDr, SW480 and T84. All these results are represented as means ± SEM and statistical differences with *p-value < 0.05, **p-value < 0.01 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test.

Overall, these results confirm those obtained in 2D, the F3 subpopulation is predominantly the most resistant to monochemotherapy and chemotherapy combinations among the sorted cell subpopulations. Thus, in our study, we identified two therapeutically relevant cell subpopulations: the F1 subpopulation that seems to be chemosensitive while F3 is chemoresistant, from both early and advanced CRC cell lines. Our results show that this approach based on SdFFF cell sorting allows to identify chemoresistance. Cell lines may be distant from the heterogeneity and complexity of tumors. Therefore, we will test our approach using primary colorectal cancer cultures.

3.5. F3 subpopulation exhibits CSC-like features and chemoresistance in primary colorectal cancer cultures.

To confirm the promising results obtained from the cell lines, we performed the same experiments using CRC primary cultures. The primary culture CPP14 was established from an early stage CRC while CPP35 was derived from a tumor that had invaded the peritoneum i.e. at a more advanced stage, with the clinical data summarized in Table 1. As previously conducted on cell lines, the SdFFF-sorted cell subpopulations were characterized at the phenotypic and functional levels. Phenotypically, both primary cultures express CSC markers but with higher levels of LGR5 and BMI1 markers in CPP35 compared with CPP14 (Figure S3A). Interestingly, we noticed the same expression pattern of CD44 and BMI1 markers between CPP14 and early stage cell lines, and CD44, BMI1 and CD133 markers between CPP35 and late stage cell lines (Figure S3A). No significant differences in marker expression are observed between the sorted cell subpopulations (Figure S3A). Next, we investigated the cell cycle distribution of these two primary cultures. G0/G1 cells are significantly more abundant in F3 compared to the other subpopulations for CPP35, with a similar trend for CPP14 (Figure S3B). Conversely, the number of cells in G2/M is significantly lower in F3 compared to the other subpopulations for both primary cultures (Figure S3C). Afterwards, clonogenicity results showed that the F3 subpopulation forms significantly more and larger colonies than F1 for CPP14, with a similar trend for CPP35 (Figure S3D-E). Thus, two sorted cell subpopulations emerge from the primary culture characterization results: F1 and F3, with CSC features for F3 such as quiescence and clonogenicity. Hereafter, we will focus on F1 and F3 for chemosensitivity testing. These results are consistent with those obtained from cell lines, demonstrating the ability of SdFFF to sort cell subpopulations from both cell lines and primary cultures.

Subsequently, the response of these sorted cell subpopulations to chemotherapies was evaluated in 2D and 3D cell culture models for each primary culture. In 2D, we analyzed cell viability after 5-FU treatment, as well as induced proliferation and apoptosis (Figure 6A-C). No significant difference is observed between the IC50 values of the cell subpopulations (Figure 6A). After 5-FU treatment, the proliferation rate appears to be higher in the F3 subpopulation of CPP35 compared to F1 while 5-FU induced apoptosis is significantly higher in the F1 subpopulation compared to F3 for both primary cultures (Figure 6B-C). Thus, the F1 subpopulation seems to be more sensitive to 5-FU due to its susceptibility to apoptosis compared to TP and F3 in both primary cultures (Figure 6C). The oxaliplatin IC50s of both primary cultures are very slightly higher in the F3 subpopulation compared to F1 (Figure S4A). After oxaliplatin treatment, proliferation is significantly increased in F3 compared to TP for CPP35 and apoptosis seems to decrease in F3 versus F1 (Figure S4B-C). Similar findings are observed after treatment with irinotecan (Figure S4D-F). Hence, the F3 subpopulation appears to be more resistant to monochemotherapy than F1, due to a susceptibility of F1 to 5-FU-induced apoptosis and significant proliferation of F3 after oxaliplatin treatment.

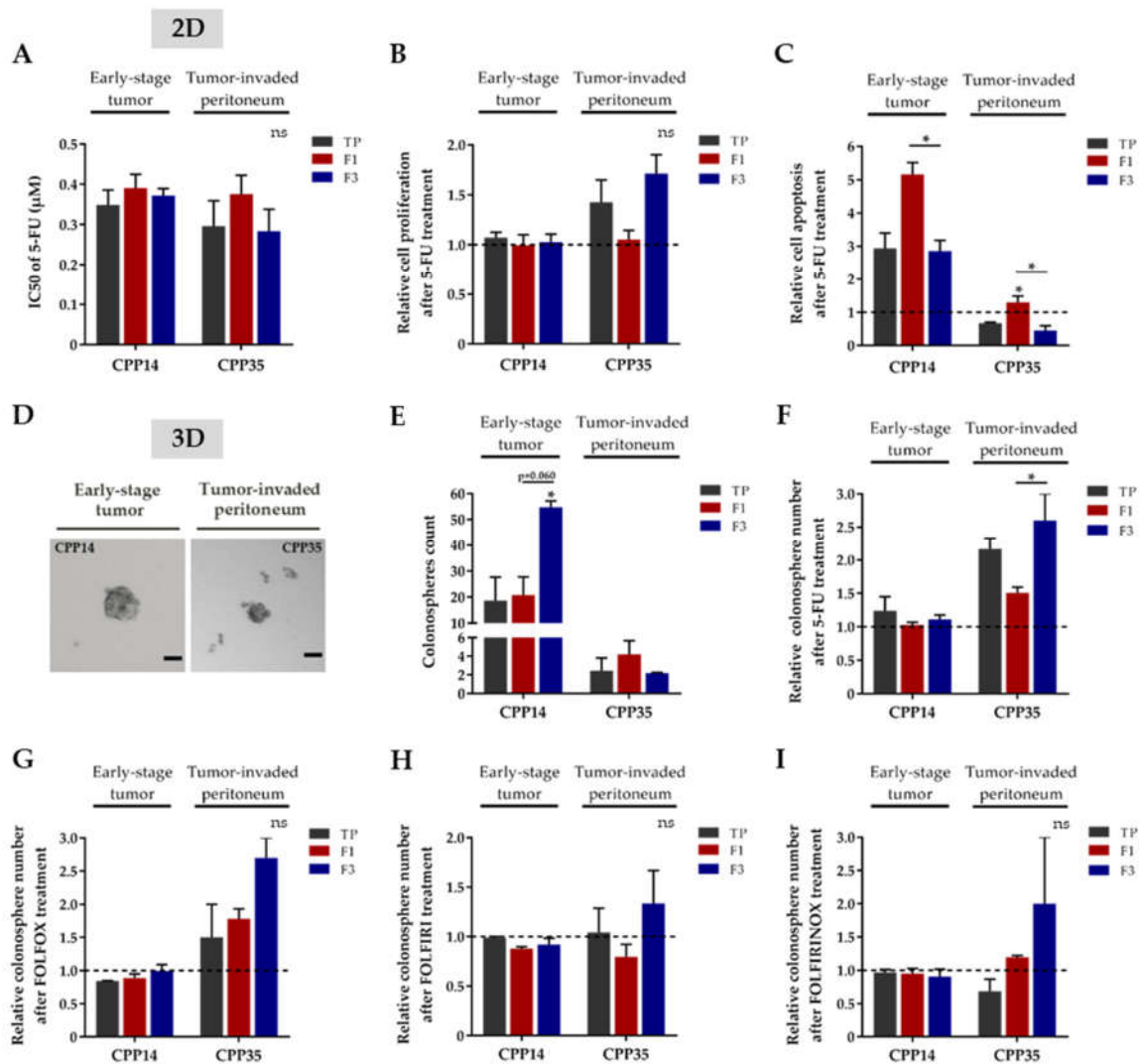


Figure 6. Chemoresistance of F3 subpopulation from both primary cultures. (A) The IC50 values obtained by the MTT assay show that the F1 subpopulation seems to have a slightly higher IC50 than the other cell subpopulations for the CPP35 primary culture. (B) After 5-FU treatment, cell proliferation assessed by BrdU assay appears to be enhanced for the F3 subpopulation compared to F1 and the untreated condition (dashed line) for CPP35. (C) Apoptosis rate analyzed by ELISA cell death assay is significantly decreased in F3 subpopulation compared to F1 for both primary cultures. (D) The tumorigenic potential of cells in vitro was evaluated by a sphere formation assay and showed that the colonospheres obtained from the two primary cultures had similar morphologies but different sizes. Scale bar 50 μm. (E) In untreated condition, F3 subpopulation has a significantly higher ability than F1 to form colonospheres for the CPP14 primary culture. (F-I) The impact of chemotherapies on CSC tumorigenic properties in vitro was investigated after treatment with 5-FU alone (F) or in combination: FOLFOX (G), FOLFIRI (H) or FOLFIRINOX (I). Colonospheres are significantly more abundant in F3 subpopulation after 5-FU treatment for CPP35, and the trend appears to be similar after FOLFOX, FOLFIRI, and FOLFIRINOX treatments. All these results are represented as means ± SEM and statistical differences with ns for not significant, *p-value < 0.05 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test.

Finally, we investigated the response of SdFFF-sorted cell subpopulations in a 3D culture model to 5-FU alone or in combination with other chemotherapies. In the absence of treatment, both primary cultures have the ability to form colonospheres, but with a larger size for CPP14 (Figure 6D). Quantitatively, CPP14 forms more colonospheres than

CPP35, with 18 and 2.5 colonospheres formed respectively when comparing TP values (Figure 6E). Remarkably, F3 generates significantly two-fold more colonospheres than the other cell subpopulations (Figure 6E). In the treated condition, the F3 subpopulation of CPP35 forms significantly more colonospheres than F1 after 5-FU treatment, with a similar trend after oxaliplatin and irinotecan treatment as well as chemotherapy combinations (Figure 6F-I and S4G-H). The significant difference in untreated condition between F1 and F3 of CPP14 could explain the minor differences observed in treated condition (Figure 6E-I). The colonosphere results are in agreement with those obtained for the cell lines, F3 is predominantly the most chemotherapy-resistant sorted cell subpopulation (Figure 4, 5 and 6). Therefore, our findings demonstrate that the study of the individualized response of each SdFFF-sorted cell subpopulation to chemotherapies is fully feasible from primary cultures.

4. Discussion

Our study addresses the impact of intratumoral cellular heterogeneity in the context of treatment resistance, without relying on surface marker expression for cell subpopulation sorting. Regardless of cell line and stage, the SdFFF technique allowed the isolation of three cell subpopulations based on their biophysical properties, with distinct phenotypic and functional characteristics. Compared to previous results [10], we show here the presence of two therapeutically relevant cell subpopulations based on CSCs characteristics: F1 and F3, thanks in particular to flow cytometry, *in vivo* tumor initiation assay and *in vitro* chemosensitivity tests. The F1 subpopulation is proliferative and chemosensitive, while the F3 subpopulation exhibits CSC functional hallmarks, especially the ability to initiate tumors in mice and chemoresistance. These two cell subpopulations of interest were identified from both early and late stage cell lines as well as from primary cultures. Therefore, using a label-free approach, we highlighted a cell subpopulation with a CSC-like phenotype that may play a crucial role in tumor progression and recurrence.

Initially identified in acute myeloid leukemia, CSCs were later discovered in many solid cancers such as CRC based on the expression of surface markers [22]. In CRC, early publications on CSCs used surface markers as a prerequisite to identify these cells [23–29]. Numerous CSC markers have been identified in CRC and are reviewed in Hervieu et al. [9]. Our phenotypic characterization results were initially underwhelming due to the lack of significant differences between the sorted cell subpopulations for three of the four cell lines studied although a trend did emerge. However, several publications have questioned the use of these markers because no CSC marker is 100% reliable as they are also expressed by intestinal stem cells and cancer cells [20,30,31]. Furthermore, Prasetyanti and Medema point out that CSC markers can be considered as a highly context-dependent property of cells [32]. Furthermore, the use of surface markers is hampered by the plasticity of CSCs, which is another obstacle to their identification and isolation. Both Shimokawa et al. and de Sousa e Melo et al. showed that ablation of LGR5⁺ CSCs limits tumor growth but does not prevent tumor regrowth due to re-emergence of LGR5⁺ CSCs from proliferating LGR5⁻ cells [33,34]. Intriguingly, another study demonstrated that dissemination and metastatic colonization were carried out by LGR5⁻ cells in CRC, with subsequent re-emergence of LGR5⁺ CSCs at the metastatic site [7]. Thus, the ability of CSCs and non-CSCs to switch from one state to another, known as cellular plasticity, appears to be crucial for primary tumor growth and metastasis. These results highlight the complexity of identifying and especially isolating these CSCs due to shared expression with non-CSCs and cellular plasticity. Accumulating evidence points out that stemness is not as hierarchical and fixed as originally thought, but rather dynamic and endowed with considerable plasticity. Our label-free cell sorting approach, based on the biophysical properties of the cells, provides new insights to isolate CSC-enriched subpopulations.

A consensus has emerged suggesting that functional capabilities, particularly tumorigenic potential and chemoresistance, are more reliable for identifying CSCs than surface markers [35]. Surprisingly, our results show that cells with the ability to initiate tumors in

mice and chemoresistance are not necessarily correlated with cells expressing CSC markers. The publication of Lenos et al. is in agreement with our observations, and demonstrates that there is a divergence between cells positive for CSC markers and cells with CSC functionality [36]. The previously proposed models of clonal evolution and CSCs are not mutually exclusive, and seem to be partly reconciled in the new emerging model: the plasticity model [32,37]. In the plasticity model, the conversion capacity is dynamic and bidirectional, from a non-CSC state to a CSC state and vice versa, and determined by various intrinsic and extrinsic signals such as the tumor microenvironment (TME) and therapy [32]. TME includes cancer and non-cancer cells including stromal cells, endothelial cells, immune cells and cancer-associated fibroblasts, as well as non-cellular components such as the extracellular matrix and cytokines. Accumulating evidence suggests that interaction and crosstalk within the TME can modulate the cellular state, stemness, plasticity, and many fundamental characteristics of CSC [32,37,38]. In our study, the *in vivo* tumor initiation assay results suggest cooperation of non-CSC cancer cells with CSCs. Indeed, we notice that for the control five mice carry tumors while the CSC-enriched subpopulation has only four, which may indicate that the presence of both CSCs and non-CSCs in TP promotes tumor development.

CSCs are particularly therapeutically attractive. Although chemotherapies eliminate most tumor cells, CSCs are able to escape the lethal effect of these drugs, which can lead to tumor recurrence. One of the main reasons for treatment failure is that anticancer drugs often only target actively cycling tumor cells and therefore do not affect CSCs, which are frequently in a quiescent or poorly proliferative state. Our study results support this explanation; the cell subpopulation enriched in CSC features is quiescent/poorly proliferative and chemoresistant, whereas the subpopulation of actively cycling cells is more sensitive. Similar findings were reported in Kreso et al. [39]. Remarkably, our study shows that only the CSC-enriched cell subpopulation escapes chemotherapy by significantly increasing treatment-induced cell proliferation without any change in cell death, demonstrating cell plasticity, as illustrated by the results obtained with the WiDr cell line in response to 5-FU-based chemotherapies in the 3D model. Furthermore, our results highlight that resistance and therapeutic escape are a functional property of CSCs, reinforcing the relevance of our approach based on label-free cell sorting by SdFFF. Collectively, our *in vitro* results reflect what frequently happens in CRC patients: chemotherapies kill proliferative cells, i.e. the F1 subpopulation, resulting in tumor regression, but fail to target CSCs, i.e. the F3 subpopulation, which are resistant and evade therapy leading to cancer relapse in patients. Therapies targeting CSCs are a promising therapeutic approach. However, the development of anticancer agents capable of specifically targeting CSCs has proven very difficult or has shown limited efficacy [40]. These disappointing results may be explained by the fact that the study models used often fail to recapitulate the patients' tumors [32]. One of our original hypotheses was that cell subpopulations isolated from early stage CRC cell lines might behave differently to chemotherapies than those from metastatic stages. Although one of the two metastatic cell lines had the highest IC50 for each of the chemotherapies tested, the results were not as pronounced as initially expected. Cancer cell lines grown in 2D have traditionally been used as a source to model cancer, but their inability to capture components of the microenvironment may impact response to treatment [32]. Cellular heterogeneity and plasticity may also compromise treatment efficacy, as highlighted in the studies of Shimokawa et al. and de Sousa e Melo et al. [32–34,38]. CRC patient-derived cultures, such as primary cultures, better model the heterogeneity and complexity of patient tumors, which are critical for treatment response. In our study, the IC50 differences are more pronounced between the two different stage primary cultures, especially for oxaliplatin and irinotecan, which may provide leads for more personalized therapy in patients from whom the primary cultures were derived. In addition to improving the biological material used, 3D cell culture models can improve chemotherapy response studies [32]. Our 3D chemosensitivity results from microtumor-

like spheroids confirmed those obtained in 2D. Importantly, the CSC-enriched subpopulation sorted by SdFFF has the ability to survive in serum-free and suspension media, and to proliferate even in the presence of chemotherapy. Thus, cell proliferation plays a crucial role for this cell subpopulation sorted by SdFFF in response to stress such as chemotherapies. Therefore, our study models based on label-free cell sorting provide new insights to study responses to therapies and resistance mechanisms developed by CSCs. Nevertheless, the main components of TEM need to be integrated into our model in order to be as close as possible to the patients' tumors [32]. Future cancer therapies will need to consider both the CSCs and non-CSCs that form the tumor mass as well as the surrounding TEM.

In summary, we have demonstrated the relevance of our label-free approach to identify a chemoresistant cell subpopulation with CSC hallmarks. The signaling pathways associated with therapeutic resistance in the CSC-enriched subpopulation need to be further explored. This approach allows to unravel intratumoral cellular heterogeneity and to study in an individualized way the response to therapies of each cellular subpopulation of a biological tumor sample. Therefore, our findings open new perspectives for a deeper understanding of CSC-related resistance and, more importantly, provide leads for a more personalized therapy by identifying through our approach the responses to therapies of each tumor compartment.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com. Figure S1: Phenotypic and functional characterization of sedimentation field-flow fractionation (SdFFF)-sorted cell subpopulations from colorectal cancer (CRC) cell lines; Figure S2: Response of SdFFF-sorted cell subpopulations to oxaliplatin and irinotecan from CRC cell lines; Figure S3: Phenotypic and functional characterization of SdFFF-sorted cell subpopulations from CRC primary cultures; Figure S4: Response of SdFFF-sorted cell subpopulations to oxaliplatin and irinotecan from CRC primary cultures.

Author Contributions: Conceptualization, C.H., S.B. and M.M.; methodology, C.H., M.V., M.S., J.P., S.B. and M.M.; writing—original draft preparation, C.H.; writing—review and editing, C.H., M.V., G.B., N.C., M.S., J.P., S.B. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the 'Comité Départemental de La Haute-Vienne de la Ligue Nationale Contre le Cancer', by the 'Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie' (CORC) of Limoges and received a donation from the family of Mr Ballihi.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation No. 33 and by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (protocol code APAFIS#3 1963-2021061014298122 v2, approved July 21, 2021). The animal experimentation project was carried out within the user establishment: the animal facility located at the Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Limoges (approval number B8708503).

Acknowledgments: We would like to thank the anticancer preparation unit of the Limoges University Hospital for the chemotherapies especially Dr Gaëlle Maillan, the animal facility of the BISCÉM platform for their help during the in vivo experimentation, Alice Hémarid for her help during her internship and the anatomo-pathology department of the Limoges University Hospital, in particular Sandrine Robert, Alain Chaunavel and Dr Aurélie Charissoux.

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. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33, doi:10.3322/caac.21708.
2. Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M.; Wallace, M.B. Colorectal Cancer. *The Lancet* **2019**, *394*, 1467–1480, doi:10.1016/S0140-6736(19)32319-0.

3. Labianca, R.; Nordlinger, B.; Beretta, G.D.; Mosconi, S.; Mandalà, M.; Cervantes, A.; Arnold, D. Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, vi64–vi72, doi:10.1093/annonc/mdt354.
4. Van Cutsem, E.; Cervantes, A.; Adam, R.; Sobrero, A.; Van Krieken, J.H.; Aderka, D.; Aranda Aguilar, E.; Bardelli, A.; Benson, A.; Bodoky, G.; et al. ESMO Consensus Guidelines for the Management of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 1386–1422, doi:10.1093/annonc/mdw235.
5. van der Heijden, M.; Vermeulen, L. Stem Cells in Homeostasis and Cancer of the Gut. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 66, doi:10.1186/s12943-019-0962-x.
6. Relier, S.; Ripoll, J.; Guillorit, H.; Amalric, A.; Achour, C.; Boissière, F.; Vialaret, J.; Attina, A.; Debart, F.; Choquet, A.; et al. FTO-Mediated Cytoplasmic M6Am Demethylation Adjusts Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cell. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1716, doi:10.1038/s41467-021-21758-4.
7. Fumagalli, A.; Oost, K.C.; Kester, L.; Morgner, J.; Bornes, L.; Bruens, L.; Spaargaren, L.; Azkanaz, M.; Schelfhorst, T.; Beerling, E.; et al. Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 569–578.e7, doi:10.1016/j.stem.2020.02.008.
8. Morral, C.; Stanisavljevic, J.; Hernando-Momblona, X.; Mereu, E.; Álvarez-Varela, A.; Cortina, C.; Stork, D.; Slebe, F.; Turon, G.; Whissell, G.; et al. Zonation of Ribosomal DNA Transcription Defines a Stem Cell Hierarchy in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 845–861.e12, doi:10.1016/j.stem.2020.04.012.
9. Hervieu, C.; Christou, N.; Battu, S.; Mathonnet, M. The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials. *Cancers* **2021**, *13*, 1092, doi:10.3390/cancers13051092.
10. Mélin, C.; Perraud, A.; Akil, H.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P.; Mathonnet, M.; Battu, S. Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1549–1556, doi:10.1021/ac202797z.
11. Mélin, C.; Lacroix, A.; Lalloué, F.; Pothier, A.; Zhang, L.Y.; Perraud, A.; Dalmay, C.; Lautrette, C.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P.; et al. Improved Sedimentation Field-Flow Fractionation Separation Channel for Concentrated Cellular Elution. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1302*, 118–124, doi:10.1016/j.chroma.2013.05.067.
12. Mélin, C.; Perraud, A.; Christou, N.; Bibes, R.; Cardot, P.; Jauberteau, M.-O.; Battu, S.; Mathonnet, M. New Ex-Ovo Colorectal-Cancer Models from Different SdFFF-Sorted Tumor-Initiating Cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 8433–8443, doi:10.1007/s00216-015-9029-z.
13. Akil, H.; Perraud, A.; Mélin, C.; Jauberteau, M.-O.; Mathonnet, M. Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25097, doi:10.1371/journal.pone.0025097.
14. Amin, M.B.; Edge, S.; Greene, F.; Byrd, D.R.; Brookland, R.K.; Washington, M.K.; Gershenwald, J.E.; Compton, C.C.; Hess, K.R.; Sullivan, D.C.; et al. *AJCC Cancer Staging Manual - 8th Edition* 2017.
15. Bégaud-Grimaud, G.; Battu, S.; Leger, D.; Cardot, P.J.P. Mammalian Cell Sorting with Sedimentation Field-Flow Fractionation. In *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis*; Williams, S.K.R., Caldwell, K.D., Eds.; Springer Vienna: Vienna, 2012; pp. 223–253 ISBN 978-3-7091-0153-7.
16. Hu, Y.; Smyth, G.K. ELDA: Extreme Limiting Dilution Analysis for Comparing Depleted and Enriched Populations in Stem Cell and Other Assays. *J. Immunol. Methods* **2009**, *347*, 70–78, doi:10.1016/j.jim.2009.06.008.
17. Giraud, J.; Molina-Castro, S.; Seeneevassen, L.; Sifré, E.; Izotte, J.; Tiffon, C.; Staedel, C.; Boeuf, H.; Fernandez, S.; Barthelemy, P.; et al. Verteporfin Targeting YAP1/TAZ-TEAD Transcriptional Activity Inhibits the Tumorigenic Properties of Gastric Cancer Stem Cells. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 2255–2267, doi:10.1002/ijc.32667.
18. Relier, S.; Yazdani, L.; Ayad, O.; Choquet, A.; Bourgaux, J.-F.; Prudhomme, M.; Pannequin, J.; Macari, F.; David, A. Antibiotics Inhibit Sphere-Forming Ability in Suspension Culture. *Cancer Cell Int.* **2016**, *16*, 6, doi:10.1186/s12935-016-0277-6.

19. Mélin, C.; Perraud, A.; Bounaix Morand du Puch, C.; Loum, E.; Giraud, S.; Cardot, P.; Jauberteau, M.-O.; Lautrette, C.; Battu, S.; Mathonnet, M. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of in Vitro Enrichment in Cancer Stem Cells by Specific Serum-Free Culture Medium. *J. Chromatogr. B* **2014**, *963*, 40–46, doi:10.1016/j.jchromb.2014.05.039.
20. Puglisi, M.A. Colon Cancer Stem Cells: Controversies and Perspectives. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 2997, doi:10.3748/wjg.v19.i20.2997.
21. Yang, W.; Soares, J.; Greninger, P.; Edelman, E.J.; Lightfoot, H.; Forbes, S.; Bindal, N.; Beare, D.; Smith, J.A.; Thompson, I.R.; et al. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): A Resource for Therapeutic Biomarker Discovery in Cancer Cells. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D955–D961, doi:10.1093/nar/gks1111.
22. Bonnet, D.; Dick, J.E. Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell. *Nat. Med.* **1997**.
23. Ricci-Vitiani, L.; Lombardi, D.G.; Pilozzi, E.; Biffoni, M.; Todaro, M.; Peschle, C.; De Maria, R. Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells. *Nature* **2007**, *445*, 111–115, doi:10.1038/nature05384.
24. O'Brien, C.A.; Pollett, A.; Gallinger, S.; Dick, J.E. A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice. *Nature* **2007**, *445*, 106–110, doi:10.1038/nature05372.
25. Dalerba, P.; Dylla, S.J.; Park, I.-K.; Liu, R.; Wang, X.; Cho, R.W.; Hoey, T.; Gurney, A.; Huang, E.H.; Simeone, D.M.; et al. Phenotypic Characterization of Human Colorectal Cancer Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 10158–10163, doi:10.1073/pnas.0703478104.
26. Barker, N.; van Es, J.H.; Kuipers, J.; Kujala, P.; van den Born, M.; Cozijnsen, M.; Haegerbarth, A.; Korving, J.; Begthel, H.; Peters, P.J.; et al. Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5. *Nature* **2007**, *449*, 1003–1007, doi:10.1038/nature06196.
27. Barker, N.; Ridgway, R.A.; van Es, J.H.; van de Wetering, M.; Begthel, H.; van den Born, M.; Danenberg, E.; Clarke, A.R.; Sansom, O.J.; Clevers, H. Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer. *Nature* **2009**, *457*, 608–611, doi:10.1038/nature07602.
28. Sangiorgi, E.; Capecchi, M.R. Bmi1 Is Expressed in Vivo in Intestinal Stem Cells. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 915–920, doi:10.1038/ng.165.
29. Vermeulen, L.; Todaro, M.; de Sousa Mello, F.; Sprick, M.R.; Kemper, K.; Perez Alea, M.; Richel, D.J.; Stassi, G.; Medema, J.P. Single-Cell Cloning of Colon Cancer Stem Cells Reveals a Multi-Lineage Differentiation Capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 13427–13432, doi:10.1073/pnas.0805706105.
30. Shmelkov, S.V.; Butler, J.M.; Hooper, A.T.; Hormigo, A.; Kushner, J.; Milde, T.; St. Clair, R.; Baljevic, M.; White, I.; Jin, D.K.; et al. CD133 Expression Is Not Restricted to Stem Cells, and Both CD133+ and CD133– Metastatic Colon Cancer Cells Initiate Tumors. *J. Clin. Invest.* **2008**, JCI34401, doi:10.1172/JCI34401.
31. Jahanafrooz, Z.; Mosafer, J.; Akbari, M.; Hashemzaei, M.; Mokhtarzadeh, A.; Baradaran, B. Colon Cancer Therapy by Focusing on Colon Cancer Stem Cells and Their Tumor Microenvironment. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 4153–4166, doi:10.1002/jcp.29337.
32. Prasetyanti, P.R.; Medema, J.P. Intra-Tumor Heterogeneity from a Cancer Stem Cell Perspective. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 41, doi:10.1186/s12943-017-0600-4.
33. Shimokawa, M.; Ohta, Y.; Nishikori, S.; Matano, M.; Takano, A.; Fujii, M.; Date, S.; Sugimoto, S.; Kanai, T.; Sato, T. Visualization and Targeting of LGR5+ Human Colon Cancer Stem Cells. *Nature* **2017**, *545*, 187–192, doi:10.1038/nature22081.
34. de Sousa e Melo, F.; Kurtova, A.V.; Harnoss, J.M.; Kljavin, N.; Hoek, J.D.; Hung, J.; Anderson, J.E.; Storm, E.E.; Modrusan, Z.; Koeppen, H.; et al. A Distinct Role for Lgr5+ Stem Cells in Primary and Metastatic Colon Cancer. *Nature* **2017**, *543*, 676–680, doi:10.1038/nature21713.
35. Visvader, J.E.; Lindeman, G.J. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 717–728, doi:10.1016/j.stem.2012.05.007.

-
36. Lenos, K.J.; Miedema, D.M.; Lodestijn, S.C.; Nijman, L.E.; van den Bosch, T.; Romero Ros, X.; Lourenço, F.C.; Lecca, M.C.; van der Heijden, M.; van Neerven, S.M.; et al. Stem Cell Functionality Is Microenvironmentally Defined during Tumour Expansion and Therapy Response in Colon Cancer. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 1193–1202, doi:10.1038/s41556-018-0179-z.
 37. Thankamony, A.P.; Saxena, K.; Murali, R.; Jolly, M.K.; Nair, R. Cancer Stem Cell Plasticity – A Deadly Deal. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 79, doi:10.3389/fmolb.2020.00079.
 38. Zheng, X.; Yu, C.; Xu, M. Linking Tumor Microenvironment to Plasticity of Cancer Stem Cells: Mechanisms and Application in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 678333, doi:10.3389/fonc.2021.678333.
 39. Kreso, A.; O'Brien, C.A.; van Galen, P.; Gan, O.I.; Notta, F.; Brown, A.M.K.; Ng, K.; Ma, J.; Wienholds, E.; Dunant, C.; et al. Variable Clonal Repopulation Dynamics Influence Chemotherapy Response in Colorectal Cancer. *Science* **2013**, *339*, 543–548, doi:10.1126/science.1227670.
 40. de Sousa e Melo, F.; de Sauvage, F.J. Cellular Plasticity in Intestinal Homeostasis and Disease. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 54–64, doi:10.1016/j.stem.2018.11.019.

Supplementary files

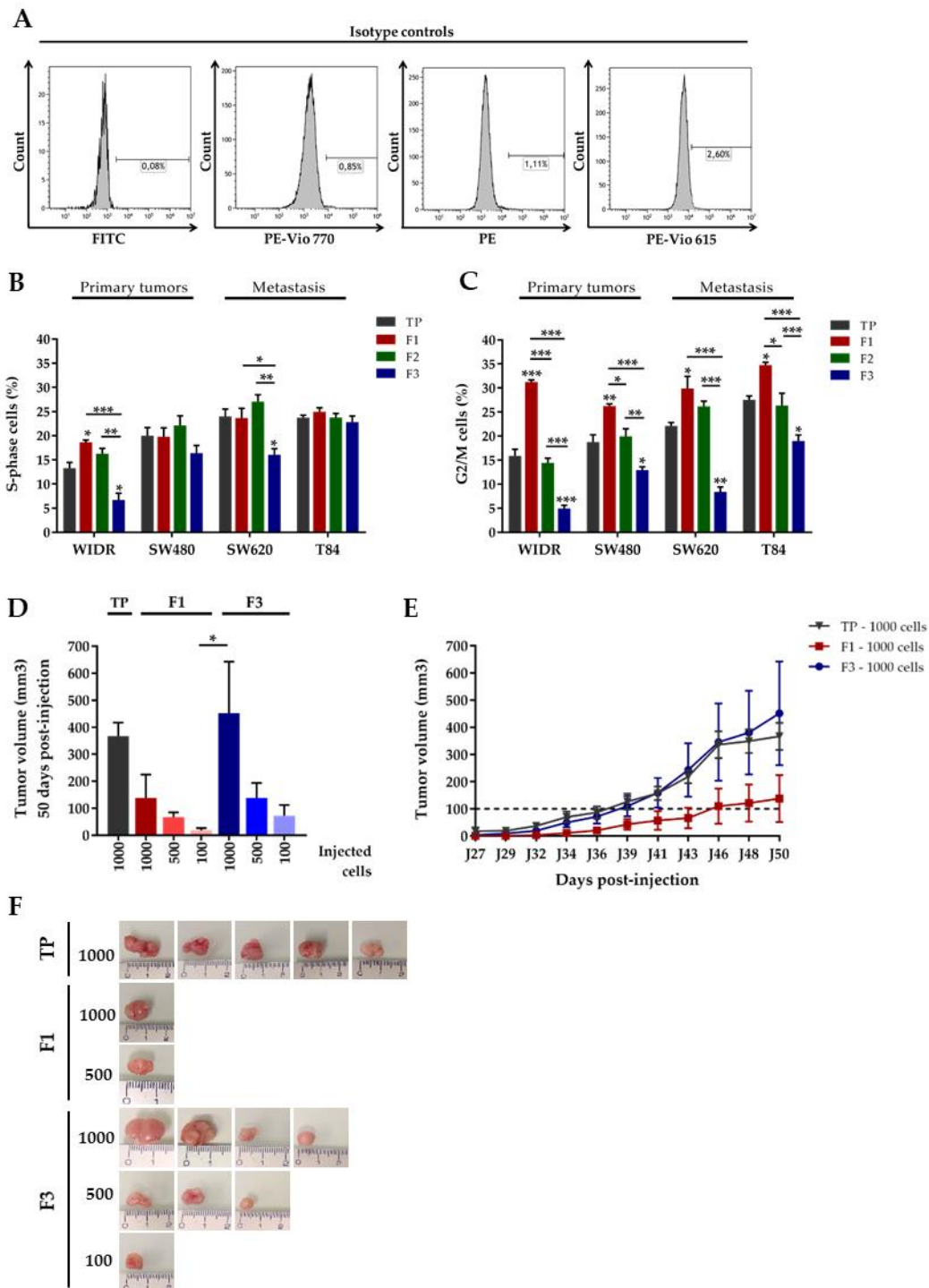


Figure S1. Phenotypic and functional characterization of sedimentation field-flow fractionation (SdFFF)-sorted cell subpopulations from colorectal cancer (CRC) cell lines. (A) Specificity of fluorescence emitted by flow cytometry was checked using isotype controls. The histograms obtained were used to position the positivity thresholds of our markers of interest. (B-C) The proportion of S-phase and G2/M cells in the cell cycle was analyzed by flow cytometry for each sorted cell subpopulation and presented in the bar plot from at least three biological replicates. F3 subpopulation has significantly fewer cells in S phase for WiDr and SW620 cell lines (B), and in G2/M phase for all cell lines (C) compared to the other subpopulations. (D-E) Tumor volume was measured throughout the in vivo tumor initiation assay using a caliper. (D) Fifty days after injection, the average tumor volume obtained in the five mice in each cell concentration group is summarized in the bar plot and reveals that it is highest in the F3 condition at 1000 cells. (E) The appearance of a tumor with a volume higher than 100 mm³ was obtained between 36 and 39 days for F3 and TP, whereas it was reached only after 46 days for F1, as shown in the tumor growth curves. (F) Collected tumors larger than 100 mm³ were photographed 50 days after injection. Scale in centimeters. All these results are represented as means \pm SEM and statistical differences with *p-value < 0.05, **p-value < 0.01, ***p-value < 0.001 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test.

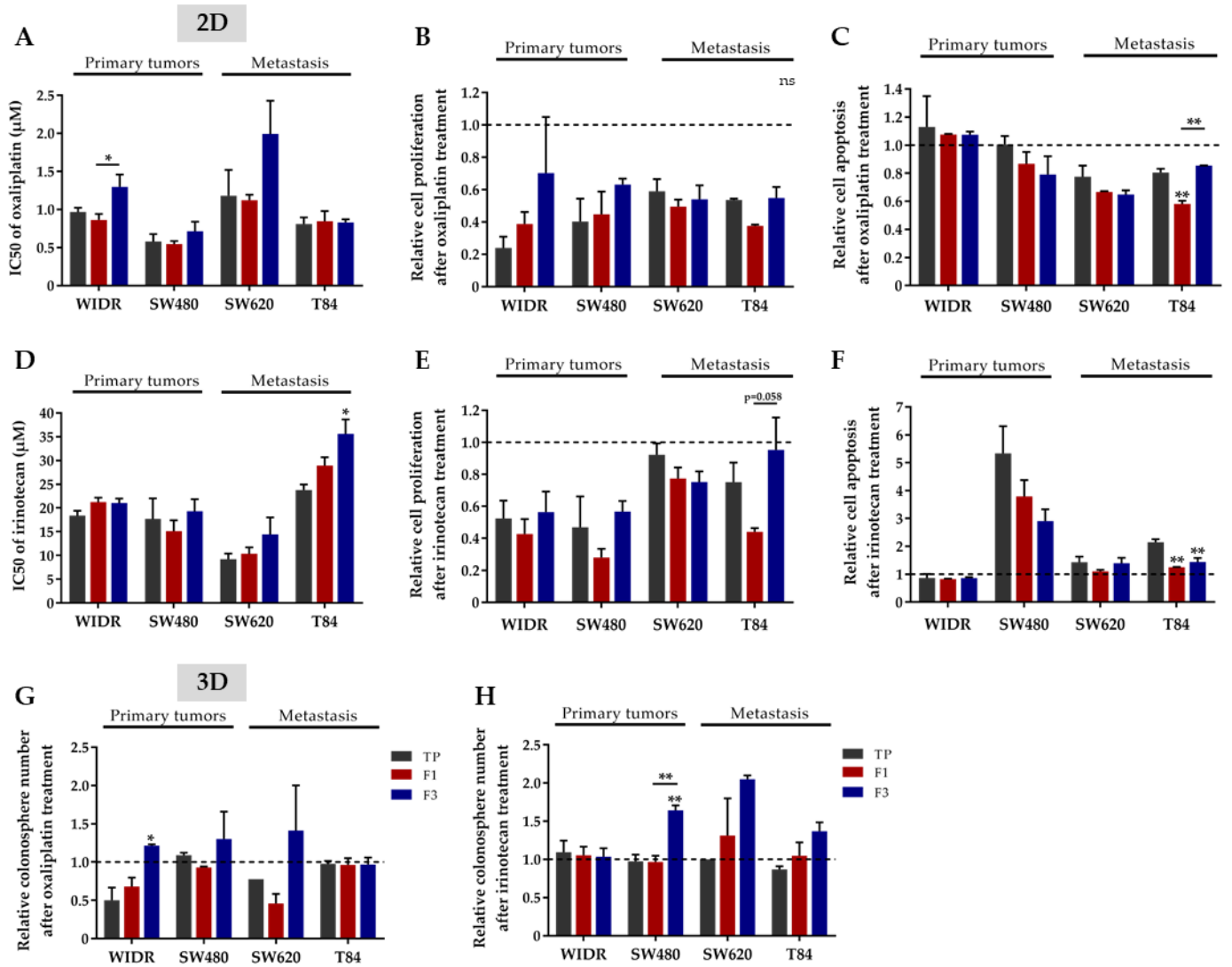


Figure S2. Response of SdFFF-sorted cell subpopulations to oxaliplatin and irinotecan from CRC cell lines. (A-F) Response to oxaliplatin and irinotecan was assessed in 2D culture. (A) After three days of oxaliplatin treatment, IC50 values were obtained by MTT assay from at least three biological replicates. F3 subpopulation has a significantly higher IC50 than F1 for the WiDr cell line and this trend is also observed for the SW480 and SW620 cell lines. (B) Cell proliferation rate after oxaliplatin treatment was measured by BrdU assay and presented in the bar plot as a ratio between treated and untreated conditions. After treatment, proliferation decreases in all cell subpopulations compared to the untreated condition (dashed line), but the rate appears to be higher in the F3 subpopulation for all cell lines. (C) Using the ELISA cell death assay, apoptosis rate after treatment was measured and compared to the untreated condition (dashed line). Apoptosis significantly increased in F3 compared to F1 for the T84 cell line. (D) The IC50 values obtained after three days of irinotecan treatment appear to be slightly higher in F3 for SW480, SW620, and T84 cell lines, with a significant difference between F3 and TP for T84, which is the most resistant of the four cell lines. (E) As with oxaliplatin, cell proliferation was assessed after irinotecan treatment and decreased in all cell lines compared with the untreated condition, but the rate remained higher in F3 versus F1 for WiDr, SW480 and T84. (F) Apoptosis was also assessed after irinotecan treatment and the rate is significantly decreased in F1 and F3 versus TP for T84, with a similar trend for SW480 and SW620. (G-H) Response to oxaliplatin and irinotecan was also investigated in 3D culture from colonospheres. (G) After oxaliplatin treatment, the number of colonospheres formed was significantly enhanced in F3 compared to TP for WiDr, with a similar trend for SW480 and SW620. (H) Colonospheres was significantly increased after irinotecan treatment in F3 compared to F1 for the SW480 cell line, with the same trend observed for SW620 and T84. All these results are represented as means \pm SEM and statistical differences with ns for not significant, *p-value < 0.05, **p-value < 0.01 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test.

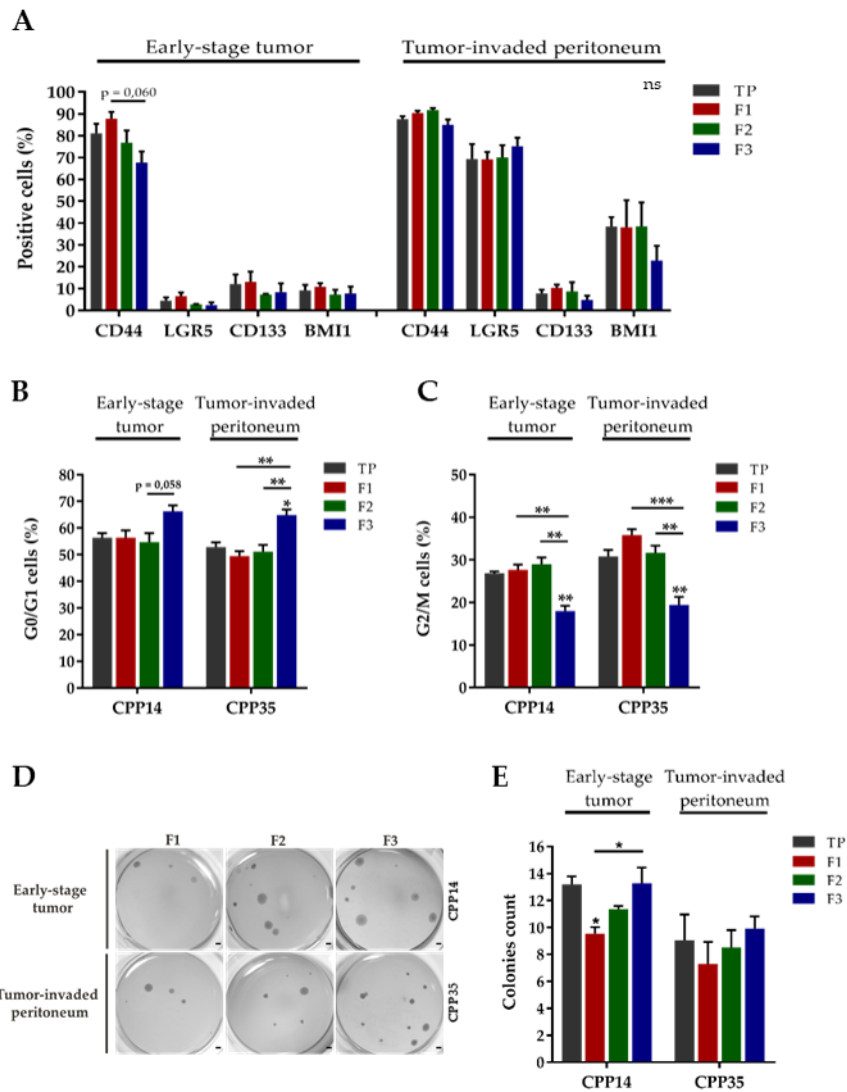


Figure S3. Phenotypic and functional characterization of SdFFF-sorted cell subpopulations from CRC primary cultures. (A) The expression level of CSC markers, CD44, LGR5, BMI1, and CD133, was assessed by flow cytometry and plotted as a bar plot from three biological replicates. The percentage of positive cells varied very slightly between the sorted cell subpopulations, with an expression level that appeared to be higher in F1 compared with F3, except for LGR5 in the tumor-invaded peritoneum primary culture. (B) G0/G1-phase cells, quantified by flow cytometry, are significantly higher in F3 compared to other subpopulations for the tumor-invaded peritoneum primary culture, with a similar trend for the early stage primary culture. (C) For both primary cultures, the percentage of cells in G2/M phase decreases significantly in F3 compared to F1 and F2. (D-E) Cell clonogenicity was assessed by a soft agar assay. Images of the colonies formed (D) as well as the bar plot (E) show that F3 forms more and larger colonies compared to the other subpopulations for both primary cultures. Scale bar 1 mm. All these results are represented as means \pm SEM and statistical differences with ns for not significant, *p-value < 0.05, **p-value < 0.01, ***p-value < 0.001 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test for analysis of CSC marker expression and cell cycle distribution, and Kruskal-Wallis test for clonogenicity.

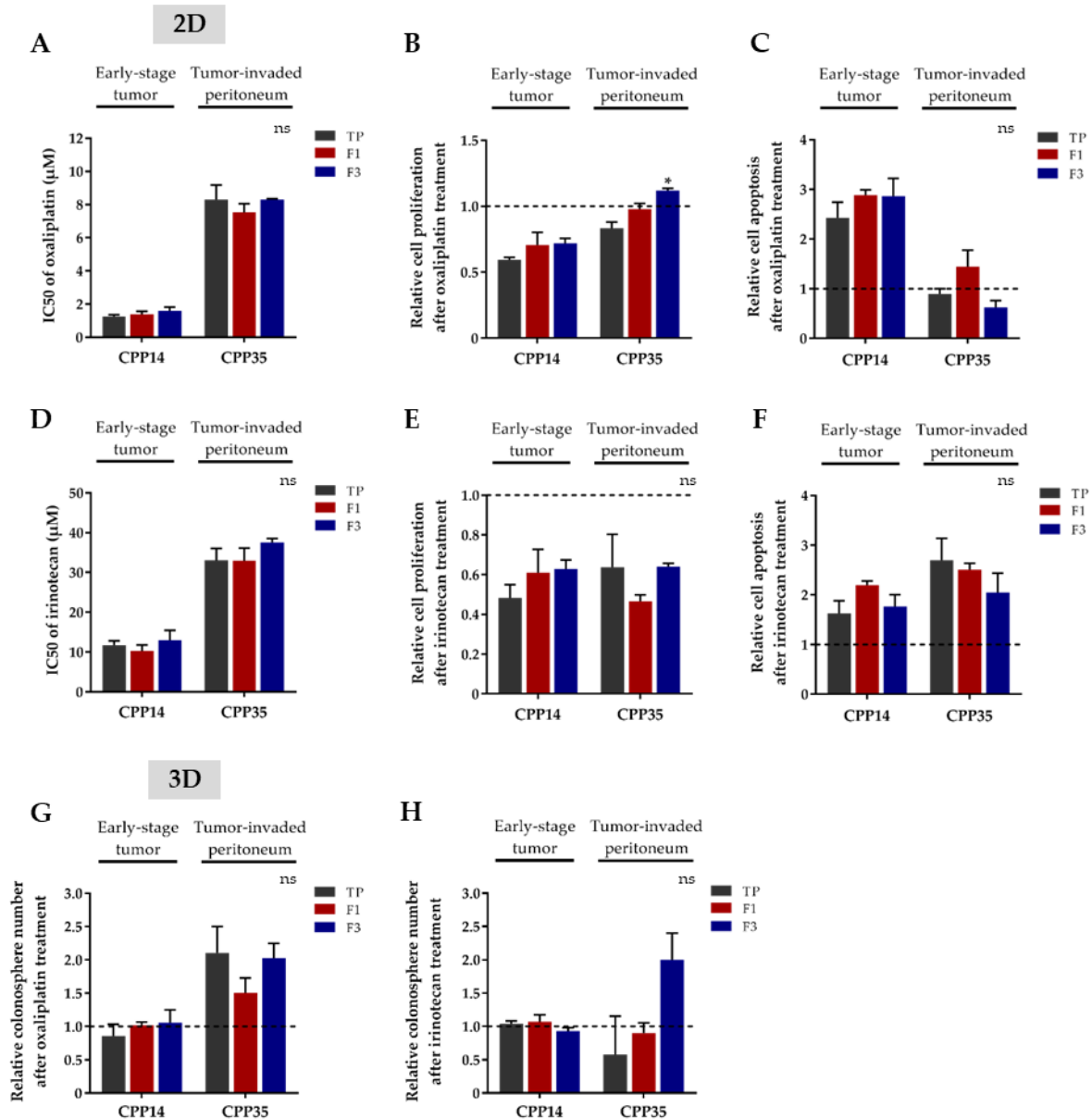


Figure S4. Response of SdFFF-sorted cell subpopulations to oxaliplatin and irinotecan from CRC primary cultures. (A-F) Response to oxaliplatin and irinotecan was assessed in 2D culture. (A) After treatment, the IC50 values obtained for oxaliplatin were comparable between the sorted cell subpopulations, but CPP35 was the more resistant of the two primary cultures. (B-C) Cell proliferation and apoptosis induced after oxaliplatin treatment were measured and presented as a ratio between treated and untreated conditions. Proliferation rate was significantly increased in F3 compared to TP for CPP35 primary culture (B) and apoptosis rate appeared slightly decreased in F3 compared to TP and F1 (C). For CPP14, proliferation and apoptosis rates were comparable between cell subpopulations. (D-F) Cell viability with IC50 values, proliferation and apoptosis were also evaluated after irinotecan treatment. (D) IC50 values are comparable between the sorted cell subpopulations for both primary cultures, with an IC50 that appears slightly higher in F3. No significant differences are observed for proliferation and apoptosis after irinotecan treatment; however it appears that the proliferation rate is slightly higher in F3 compared to F1 for CPP35 (E) and the apoptosis rate is slightly lower in F3 versus F1 for both primary cultures (F). (G-H) Response to oxaliplatin and irinotecan was also explored in 3D culture from colonospheres. Colonospheres are equivalent in number in CPP14 cell subpopulations after oxaliplatin (G) and irinotecan (H) treatment. For CPP35, the number of colonospheres seemed to be slightly higher in F3 compared to F1 for both chemotherapies. All these results are represented as means \pm SEM and statistical differences with ns for not significant, *p-value < 0.05 and *alone for significant results compared to TP using One-way ANOVA test.

Table S1. Lists of antibodies used for the analysis of CSC marker expression by flow cytometry.

Antibodies	Fluorescent dyes	References	Manufacturers
Anti-CD44 (G44-26)	FITC	555478	BD Pharmingen™
Anti-LGR5 (DA03-22H2.8)	PE-Vio 770	130-100-847	Miltenyi Biotec
Anti-CD133/1 (AC133)	PE-Vio 615	130-113-671	Miltenyi Biotec
Anti-BMI-1 (F-9)	PE	sc-390443	Santa Cruz
Viability™ 405/452		130-109-816	Miltenyi Biotec
Anti-IgG2bκ (27-35)	FITC	555742	BD Pharmingen™
Anti-IgG2bκ (ES26-5E12.4)	PE-Vio 770	130-102-656	Miltenyi Biotec
Anti-IgG1 (IS5-21F5)	PE-Vio 615	130-113-201	Miltenyi Biotec
Anti-IgG1κ (MOPC-21)	PE	400111	Biolegend

Discussion & perspectives

Des travaux antérieurs menés au sein de notre laboratoire ont montré le potentiel de la SdFFF pour isoler des sous-populations cellulaires, dans des domaines aussi variés que la neurologie, l'oncologie et les cellules souches (Faye et al., 2016; Lacroix et al., 2019; Mélin et al., 2012, 2015; Saydé et al., 2021; Vedrenne et al., 2016). Dans le cadre du CCR, les recherches effectuées par notre équipe ont permis l'identification d'une sous-population cellulaire présentant des caractéristiques de CSCC, notamment la surexpression de marqueurs de CSCC, la clonogénicité et la tumorigénicité, dans deux lignées cellulaires de stade précoce (Mélin et al., 2012, 2015). Lors de la cancérogénèse colorectale, l'évolution d'un stade précoce à un stade avancé est particulièrement critique pour la survie des patients atteints de CCR. Cette transformation est souvent accompagnée de résistances aux thérapies systémiques, notamment aux chimiothérapies, souvent attribuées aux sous-populations de CSCC.

Ainsi, l'objectif de mon projet de thèse a porté sur l'étude et la comparaison des CSCC issues de tumeurs primaires et de métastases de CCR, en termes de caractéristiques ainsi que de leur sensibilité aux chimiothérapies. En raison de l'implication des CSCC dans la progression tumorale et la survenue de métastases, quatre lignées cellulaires représentatives des différents stades de développement du CCR ont été triées par la SdFFF et leurs sous-populations cellulaires caractérisées phénotypiquement et fonctionnellement. La capacité de ces cellules à initier des tumeurs chez des souris immunodéficientes a été évaluée. De plus, étant donné l'implication des CSCC dans les résistances aux traitements, la sensibilité de ces sous-populations cellulaires aux chimiothérapies couramment administrées en clinique a été explorée. Enfin, afin de confirmer le potentiel de notre approche, ces expériences ont été reproduites à partir de deux cultures primaires de CCR, plus représentatives de l'hétérogénéité et de la complexité des tumeurs. Nos résultats ont mis en évidence une approche de tri cellulaire « label-free » permettant l'isolement d'une sous-population cellulaire avec des propriétés de CSCC et une chimiorésistance, quel que soit le stade tumoral (Hervieu et al., 2022). Nos travaux offrent ainsi de nouvelles perspectives pour étudier la réponse individualisée de chaque sous-population tumorale et personnaliser les stratégies thérapeutiques.

L'isolement des CSCC représente un réel challenge en raison de leur faible proportion au sein de la tumeur et de leur nature dynamique (Hirata et al., 2019). De nombreuses stratégies ont été proposées pour trier ces cellules, mais aucun consensus n'existe à l'heure actuelle. Plusieurs méthodes reposent sur une approche « rétrospective », notamment celles basées sur le tri à partir de caractéristiques fonctionnelles. En effet, les tests de formation de sphères *in vitro* ou de tumeurs *in vivo* permettent de confirmer, une fois l'expérience finie, que les cellules ayant réussi étaient, au moins en partie, des CSCC. Néanmoins, le délai d'expérience qui peut être de quelques semaines à plusieurs mois, du fait de la nature dynamique des CSCC, retarde l'interprétation ce qui complique l'étude de leur réponse aux traitements. Les approches « prospectives », incluant celles basées sur l'expression de marqueurs de surface ainsi que les propriétés biophysiques des cellules, permettent la réalisation des tests de sensibilité aux traitements immédiatement après leur isolement. Le comportement des cellules tumorales vis-à-vis des chimiothérapies est inhérent à l'hétérogénéité intratumorale. Pendant longtemps, l'utilisation de marqueurs de surface a été la technique de référence pour identifier les CSCC, avec un large panel de marqueurs décrits dans le CCR (Hervieu et al., 2021). Cette méthode sélectionne une sous-population cellulaire exprimant ce marqueur de surface afin de contourner l'hétérogénéité cellulaire intratumorale mais crée une sorte de « biais » par rapport à la population cellulaire globale. De plus, la plasticité et l'hétérogénéité de la population de CSCC compliquent leur isolement *via* des marqueurs de surface (Visvader and Lindeman, 2012). Les méthodes d'isolement basées sur les caractéristiques biophysiques des cellules, telles que la SdFFF, apportent quant à elles l'opportunité d'étudier l'intégralité de la population tumorale et d'isoler les CSCC sans *a priori*. Dans notre étude, nous avons caractérisé phénotypiquement les sous-populations triées par la SdFFF. Nos résultats ont montré des niveaux d'expression variables des marqueurs de CSCC entre les lignées cellulaires. Un « pattern » d'expression a été observé pour les marqueurs Lgr5 et CD133 qui sont surexprimés dans les lignées cellulaires de stade précoce, tandis que le marqueur Bmi1 est majoritairement retrouvé dans les lignées cellulaires de stade avancé. Les niveaux d'expression des marqueurs de CSCC changent en fonction des conditions environnementales ce qui pourrait expliquer cette différence (Vazquez-Iglesias et al., 2019). En ce qui concerne les sous-populations cellulaires triées, des différences significatives ont été obtenues pour une

seule des quatre lignées cellulaires, et pour deux des quatre marqueurs. Plus précisément, la sous-population F3 de la lignée SW480 surexprime les marqueurs CD44 et Lgr5 en comparaison des autres sous-populations alors que cette tendance est plutôt observée en F1 pour les autres lignées cellulaires. Ces résultats suggèrent que deux sous-populations se distinguent : F1 pour WiDr, SW620 et T84 vs F3 pour SW480, d'un point de vue phénotypique. Toutefois, il est important de prendre en compte que les marqueurs testés sont également exprimés par les cellules cancéreuses non CSCC et les cellules souches normales (Hirata et al., 2019). De plus, ces marqueurs sont considérés comme une propriété des cellules fortement dépendante du contexte (Prasetyanti and Medema, 2017). Enfin, bien que les CSC aient été initialement considérées comme des populations cellulaires aux caractéristiques phénotypiques et moléculaires bien définies, il a été démontré que les CSC sont des populations phénotypiquement hétérogènes et hautement dynamiques (Hirata et al., 2019). Ainsi, l'identification des CSCC à partir de leurs caractéristiques fonctionnelles est plus fiable que par des biomarqueurs de surface (Relier et al., 2021).

Grâce à notre approche « label-free », la nature des cellules peut être étudiée pour chaque sous-population, individuellement, ce qui constitue un immense avantage compte-tenu de l'hétérogénéité cellulaire intratumorale. Dans mes travaux de thèse, des tests de formation de colonies et de sphères ont été réalisés pour analyser la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation multi-lignée des sous-populations cellulaires triées. Ces tests évaluent l'aptitude des cellules cancéreuses à générer des colonies en culture 2D ou des colonosphères en culture 3D, à partir d'une cellule unique. Cette méthode est souvent utilisée pour estimer le potentiel tumorigène *in vitro* des tumeurs solides (Relier et al., 2021). Nos résultats montrent que F3 est la sous-population cellulaire qui a le potentiel « clonogène » et « sphérogène » le plus élevé. Toutefois, le maintien de ces capacités sur le long-terme reposant sur la dissociation des sphères et leur réensemencement en série reste à explorer. Un des points critiques de ces tests est la dissociation en cellule unique des échantillons biologiques. En réalisant ces expériences pendant ma thèse, la dissociation avant ensemencement a été vérifiée au microscope, néanmoins, l'utilisation d'un trieur de cellules pourrait être envisagé afin d'augmenter la rigueur de nos résultats. La quiescence étant un autre critère fréquemment attribué aux CSCC (Chen et al., 2021; Francescangeli et al., 2020), la distribution dans le cycle cellulaire a été analysée dans nos sous-

populations triées. La sous-population F3 présente une quiescence relative pour l'ensemble des lignées cellulaires, ce qui confirme le caractère « souche » de cette sous-population. Deux tests pourraient être réalisés afin de confirmer nos résultats : i) le double marquage du Hoechst 33342 et de la pyronine Y analysés par cytométrie en flux, permettant de dissocier les phases G0 et G1 du cycle cellulaire (Eddaoudi et al., 2018), et ii) l'analyse de marqueurs de différenciation du côlon, tels que la cytokératine 20 (Chan et al., 2009), pouvant mettre en évidence des différences entre les sous-populations cellulaires. Donc, la sous-population F3 présente des propriétés de CSCC *in vitro*. Nos données montrent que les cellules ayant des propriétés fonctionnelles de CSCC ne sont pas nécessairement corrélées aux cellules identifiées phénotypiquement, pour les lignées cellulaires WiDr, SW620 et T84. La publication de Lenos *et al.* démontre qu'il peut exister une divergence entre le phénotype et la fonctionnalité de CSCC (Lenos et al., 2018), ce qui est en accord avec ces observations. Un consensus émergent suggère que « l'état cellulaire » est plus important que le phénotype pour définir une CSC (Visvader and Lindeman, 2012), confirmant ainsi notre intérêt pour la sous-population F3. Dans ce projet, le potentiel tumorigénique des sous-populations cellulaires a été vérifié par un modèle murin *in vivo*, qui est la méthode de référence pour définir une CSC à l'heure actuelle. Nous avons prouvé que la sous-population F3 possède la capacité d'initier des tumeurs, même après une injection sous-cutanée de seulement 100 cellules. Ainsi, ces résultats ont mis en évidence une fréquence de cellules initiateuses de tumeurs significativement plus élevée dans la fraction F3 par rapport à la F1. Donc, ces résultats *in vivo* sont concordants avec ceux obtenus *in vitro*, et prouvent l'isolement d'une sous-population de CSCC en F3. Le modèle murin utilisé dans ces travaux est la souris athymique nude, dont l'immunodéficiência permet la greffe de cellules humaines et l'absence de poils facilite le suivi de la croissance tumorale (Szadvari et al., 2016). L'injection sous-cutanée ne permet que rarement le développement de métastases en raison de sa localisation. Les CSCC étant impliquées dans la survenue de métastases, il serait intéressant d'étudier le rôle de ces sous-populations cellulaires triées dans des modèles intra-spléniques, qui favorisent le développement de métastases chez les souris ; mais également dans des modèles orthotopiques intra-péritonéales, qui incluent l'environnement tumoral d'origine (Zhang and Bu, 2021). Toutefois, ces types d'injection, plus complexes et difficiles à mettre en œuvre, peuvent induire une

variabilité des résultats. De plus, le suivi en temps-réel de la tumeur primaire et des métastases nécessite l'utilisation de lignées modifiées pour ces modèles. La communication et les interactions au sein du MET peuvent moduler le caractère « souche » et la plasticité des CSCC (Prasetyanti and Medema, 2017; Thankamony et al., 2020; Zheng et al., 2021). Dans notre étude, les résultats du test d'initiation tumorale *in vivo* suggèrent une coopération des cellules cancéreuses non-CSCC avec les CSCC. En effet, nous avons remarqué que les cinq souris injectées par les cellules du contrôle TP sont porteuses de tumeurs alors que quatre des cinq souris injectées par la sous-population enrichie en CSCC ont développé des tumeurs. Ceci souligne que la présence à la fois de CSCC et de non-CSCC dans le TP favorise le développement tumoral. Enfin, le modèle animal offre également la possibilité de tester des thérapies, ce qui pourrait permettre dans notre projet de confirmer les résultats des tests de chimiosensibilité obtenus *in vitro*.

Notre approche de tri cellulaire « label-free » permet non seulement la caractérisation des sous-populations individualisées mais surtout l'analyse de leur sensibilité aux thérapies systémiques. Un des défis majeurs en cancérologie est le fait que toutes les cellules tumorales ne possèdent pas la même sensibilité aux thérapies (Lytle et al., 2018). Les agents cytotoxiques, tels que la chimiothérapie, sont couramment administrés aux patients atteints de CCR. Le plus souvent, ces molécules ciblent efficacement les cellules cancéreuses proliférantes de la masse tumorale mais n'atteignent pas les CSCC, qui sont souvent dans un état quiescent ou peu prolifératif. Ainsi, la maladie résiduelle peut être enrichie en CSCC susceptibles d'entraîner une maladie plus agressive et de conduire à une récurrence (Lytle et al., 2018). Les tests de sensibilité réalisés dans notre étude ont mis en évidence que les deux sous-populations cellulaires réagissent différemment aux chimiothérapies, uniques ou combinées. La sous-population cellulaire possédant des caractéristiques des CSC, dont la quiescence, est chimiorésistante (F3), tandis que la sous-population de cellules à cycle actif semble majoritairement sensible (F1) et ce, pour l'ensemble des lignées cellulaires étudiées. Ainsi, nos travaux démontrent que les cellules chimiorésistantes correspondent aux cellules possédant des propriétés de CSCC, ce qui est en accord avec la littérature (Batlle and Clevers, 2017; Prasetyanti and Medema, 2017; Visvader and Lindeman, 2012).

De plus et de manière remarquable, notre étude montre que seule la sous-population de cellules enrichies en CSCC, initialement quiescente, échappe aux chimiothérapies en augmentant de manière significative sa prolifération cellulaire après traitement et ce, sans modification du taux d'apoptose. Ces résultats soulignent que la résistance et l'échappement thérapeutique sont des propriétés fonctionnelles des CSCC, renforçant la pertinence de notre approche basée sur le tri cellulaire sans marquage par SdFFF. Cette chimiorésistance a été observée à la fois dans des modèles de culture 2D ainsi qu'en culture 3D, reflétant mieux l'organisation des tumeurs et facilitant les interactions entre cellules et leur communication par rapport à la 2D. L'utilisation de modèle 3D à partir des sous-populations cellulaires triées permet de créer des structures « microtumor-like » contenant des CSCC, indispensables pour reproduire les tumeurs humaines et obtenir des réponses thérapeutiques fiables. Une étude approfondie des voies de signalisation impliquées dans la résistance de la sous-population F3 est nécessaire et pourrait permettre d'identifier des cibles potentielles. Le MET peut activer des voies associées au caractère « souche » et favoriser l'échappement immunitaire (Zheng et al., 2021), ce qui peut impacter les réponses aux thérapies. Ainsi, il serait intéressant de confirmer nos résultats à partir de modèles incluant le microenvironnement, comme la technique « organ-on-a-chip », et l'organisation structurale complexe particulièrement importante dans le CCR en utilisant des organoïdes (Li and Izpisua Belmonte, 2019; Low et al., 2021; the Human Cell Atlas 'Biological Network' Organoids et al., 2021). Les tests d'agents thérapeutiques, à grande échelle, à partir de lignées cellulaires ont permis une meilleure compréhension des voies de signalisation cellulaires ainsi que les corrélations entre la sensibilité aux médicaments et le contexte mutationnel d'une tumeur donnée. Néanmoins, la culture classique de lignées cellulaires repose sur un système de monocouche adhérente utilisant des substrats plastiques planaires et des milieux supplémentés en sérum. Ces conditions très différentes de l'environnement tissulaire d'origine sont responsables du faible pourcentage d'efficacité d'établissement de lignées cellulaires (< 30%) et d'une faible hétérogénéité cellulaire, reflétant difficilement la tumeur d'origine (Fujii and Sato, 2021). Ces lignées peuvent également avoir dérivé par rapport aux cellules d'origine à cause de leur utilisation depuis plusieurs décennies pour certaines. L'ensemble de ces données indique la nécessité d'utiliser des modèles plus fidèles de l'hétérogénéité cellulaire intratumorale

une fois les démonstrations faites sur les cultures cellulaires en 2D. L'avantage des organoïdes est leur capacité à présenter une composition et des comportements cellulaires quasi physio-pathologiques incluant la niche des CSCC, et à maintenir une stabilité génomique d'origine manquant aux lignées cellulaires (Li and Izpisua Belmonte, 2019). Les organoïdes dérivés de tumeurs de patients pourraient devenir un outil majeur pour faciliter les décisions concernant la prise en charge thérapeutique des patients (Calandrini and Drost, 2022; Porter et al., 2020).

Le rôle des CSCC dans la progression tumorale et la survenue de métastases fait de ces cellules une cible thérapeutique particulièrement attractive. Le développement de thérapies anti-CSCC requière l'identification de cibles indispensables pour la survie de ces cellules mais pas ou peu nécessaires pour les cellules souches normales. Malheureusement, les CSCC partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules cancéreuses non CSCC et les cellules souches normales, ce qui complique leur ciblage. De plus, les thérapies anti-CSCC font face à la plasticité du compartiment souche intestinale. En effet, l'éradication des CSCC induit des processus permettant aux cellules cancéreuses non-CSCC d'acquérir des propriétés de CSCC pour compenser leur élimination (De Sousa e Melo et al., 2017; Fumagalli et al., 2020; Shimokawa et al., 2017). Le MET et la niche permettent aux tumeurs de s'adapter plus facilement à la perte de CSCC, compromettant ainsi l'efficacité de ces thérapies. En conclusion, afin d'obtenir une réponse thérapeutique à court et long termes, la stratégie idéale serait de cibler à la fois les cellules cancéreuses de la masse tumorale pour obtenir une régression de la tumeur, les CSCC pour prévenir les rechutes et les métastases, ainsi que les signaux du MET impliqués dans la plasticité cellulaire et la réapparition des CSCC après déplétion.

A long terme, cette approche de tri cellulaire « label-free » pourrait permettre d'isoler chaque sous-population cellulaire issue d'échantillons de patients afin de prédire leur réponse aux thérapies systémiques. Pour ce faire, de nombreuses procédures seront requises pour récupérer des prélèvements tumoraux de patients atteints de CCR, pour préparer l'échantillon et le trier pour isoler les sous-populations cellulaires. L'idéal serait de pouvoir récupérer des prélèvements de patients avant toute thérapie ainsi qu'au cours et après les résistances thérapeutiques afin de réaliser un « monitoring » de la tumeur et des sous-populations qui la composent. Cette

approche apporterait des données essentielles pour mieux comprendre la survenue de résistances et les mécanismes associés. *In fine*, ce projet pourrait permettre de personnaliser les thérapies systémiques, qui sont la base des premières lignes de traitement dans le CCR, afin d'optimiser leur efficacité et limiter les récurrences.

Conclusion

Mes travaux de thèse portant sur l'étude comparative des CSCC issues de tumeurs primaires et de métastases de CCR ont permis de mettre en évidence une approche de tri cellulaire « label-free » offrant l'opportunité d'isoler les sous-populations cellulaires tumorales, dont les CSCC, et de tester individuellement leur réponse aux thérapies, quel que soit le stade tumoral.

Tout d'abord, ce projet a nécessité la mise au point et l'optimisation des conditions de tri des lignées cellulaires et cultures primaires utilisées, représentatives des différents stades de CCR. Notre approche basée sur la technique de SdFFF a permis l'isolement de trois sous-populations cellulaires tumorales. Deux sous-populations cellulaires se démarquent : l'une possédant des caractéristiques de CSCC dont une quiescence, une clonogénicité et une tumorigénicité *in vivo* tandis que l'autre présente un cycle cellulaire actif et de faibles clonogénicité / tumorigénicité. L'étude de la pertinence thérapeutique de ces sous-populations a révélé que la fraction « CSCC-like » est chimiorésistante, grâce à une prolifération accrue spécifiquement dans ces cellules. Ainsi, ce projet a permis d'étudier l'impact de l'hétérogénéité cellulaire intratumorale et des CSCC dans le contexte des thérapies, quels que soient la matrice cellulaire et le stade tumoral, ce qui confirme la pertinence de notre approche.

Les voies de signalisation impliquées dans l'augmentation de la prolifération associée à la chimiorésistance de la sous-population « CSCC-like » restent à élucider. Ces travaux apportent la preuve de concept de notre approche « label-free » pour tester des thérapies sur la population cellulaire globale ainsi que sur chaque compartiment cellulaire tumoral, à partir de lignées cellulaires et de cultures primaires. Par la suite, la valorisation de ce projet repose sur l'application du tri cellulaire par SdFFF à des prélèvements de patients, afin de contrôler la concordance entre nos tests de sensibilité *in vitro* et la réponse des patients au cours de leur prise en charge thérapeutique. Pour se faire, le perfectionnement de nos modèles de culture est nécessaire afin d'obtenir une réponse thérapeutique la plus fidèle des tumeurs de patients, en incluant la complexité structurelle intestinale et le MET. A terme, ce projet ouvre de nouvelles perspectives pour améliorer notre compréhension des mécanismes de résistance attribués aux CSCC et pour personnaliser les stratégies thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Amin, M.B., Greene, F.L., Edge, S.B., Compton, C.C., Gershenwald, J.E., Brookland, R.K., Meyer, L., Gress, D.M., Byrd, D.R., and Winchester, D.P. (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: The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.
- André, T., de Gramont, A., Vernerey, D., Chibaudel, B., Bonnetain, F., Tijeras-Raballand, A., Scriver, A., Hickish, T., Tabernero, J., Van Laethem, J.L., et al. (2015). Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to *BRAF* Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J. Clin. Oncol.* 33, 4176–4187. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.4238>.
- André, T., Shiu, K.-K., Kim, T.W., Jensen, B.V., Jensen, L.H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., et al. (2020). Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 383, 2207–2218. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2017699>.
- Atreya, C.E., Yaeger, R., and Chu, E. (2017). Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: From Current Standards to Future Molecular Targeted Approaches. 11. .
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611. <https://doi.org/10.1038/nature07602>.
- Barresi, V., Bonetti, L.R., Ieni, A., Branca, G., Baron, L., and Tuccari, G. (2014). Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. *Hum. Pathol.* 45, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.07.046>.
- Barresi, V., Reggiani Bonetti, L., Ieni, A., Domati, F., and Tuccari, G. (2015). Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* 46, 1722–1729. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.07.013>.
- Battle, E., and Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* 23, 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>.
- Beck, B., and Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. *Nat. Rev. Cancer* 13, 727–738. <https://doi.org/10.1038/nrc3597>.
- Benson, A.B., Venook, A.P., Al-Hawary, M.M., Cederquist, L., Chen, Y.-J., Ciombor, K.K., Cohen, S., Cooper, H.S., Deming, D., Engstrom, P.F., et al. (2018). NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 16, 359–369. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0021>.

Bibeau, F., and Martineau, P. (2016). Classifications moléculaires du cancer colorectal en 2016. 6. .

Bibeau, F., Léger, A., Bazille, C., and Selves, J. (2020). Les cancers colorectaux héréditaires vus par le pathologiste. *Ann. Pathol.* 40, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2020.02.017>.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116, 7–14. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70222-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70222-2).

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.*

Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K., and Winn, R.A. (2014). The Soft Agar Colony Formation Assay. *J. Vis. Exp.* 51998. <https://doi.org/10.3791/51998>.

Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., and Wittekind, C. (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours* (John Wiley & Sons).

Budinska, E., Popovici, V., Tejpar, S., D'Ario, G., Lapique, N., Sikora, K.O., Di Narzo, A.F., Yan, P., Hodgson, J.G., Weinrich, S., et al. (2013). Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J. Pathol.* 231, 63–76. <https://doi.org/10.1002/path.4212>.

Buecher, B. (2010). Quoi de neuf dans les formes héréditaires des cancers digestifs ? – Hereditary digestive cancer: what's new? *Lett. Cancérologie XIX*, 3. .

Calandrini, C., and Drost, J. (2022). Normal and tumor-derived organoids as a drug screening platform for tumor-specific drug vulnerabilities. *STAR Protoc.* 3, 101079. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101079>.

Cammareri, P., Lombardo, Y., Francipane, M.G., Bonventre, S., Todaro, M., and Stassi, G. (2008). Isolation and Culture of Colon Cancer Stem Cells. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 311–324.

Chan, C.W.M., Wong, N.A., Liu, Y., Bicknell, D., Turley, H., Hollins, L., Miller, C.J., Wilding, J.L., and Bodmer, W.F. (2009). Gastrointestinal differentiation marker Cytokeratin 20 is regulated by homeobox gene CDX1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1936–1941. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812904106>.

Chen, K., Zhang, C., Ling, S., Wei, R., Wang, J., and Xu, X. (2021). The metabolic flexibility of quiescent CSC: implications for chemotherapy resistance. *Cell Death Dis.* 12, 835. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04116-6>.

Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* 141, 537–561. <https://doi.org/10.1002/aja.1001410407>.

Chiorean, E.G., Nandakumar, G., Fadelu, T., Temin, S., Alarcon-Rozas, A.E., Bejarano, S., Croitoru, A.-E., Grover, S., Lohar, P.V., Odhiambo, A., et al. (2020). Treatment of Patients With Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Glob. Oncol.* 414–438. <https://doi.org/10.1200/JGO.19.00367>.

Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* 154, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>.

Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., et al. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 10158–10163. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703478104>.

Davies, R.J., Miller, R., and Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 199–209. <https://doi.org/10.1038/nrc1569>.

De Sousa E Melo, F., and de Sauvage, F.J. (2019). Cellular Plasticity in Intestinal Homeostasis and Disease. *Cell Stem Cell* 24, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.019>.

De Sousa E Melo, F., Wang, X., Jansen, M., Fessler, E., Trinh, A., de Rooij, L.P.M.H., de Jong, J.H., de Boer, O.J., van Leersum, R., Bijlsma, M.F., et al. (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* 19, 614–618. <https://doi.org/10.1038/nm.3174>.

De Sousa e Melo, F., Kurtova, A.V., Harnoss, J.M., Kljavin, N., Hoeck, J.D., Hung, J., Anderson, J.E., Storm, E.E., Modrusan, Z., Koepfen, H., et al. (2017). A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* 543, 676–680. <https://doi.org/10.1038/nature21713>.

Dekker, E., Tanis, P.J., Vleugels, J.L.A., Kasi, P.M., and Wallace, M.B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet* 394, 1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0).

Diaz, L.A., Shiu, K.-K., Kim, T.-W., Jensen, B.V., Jensen, L.H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., et al. (2022). Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 23, 659–670. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00197-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00197-8).

Dienstmann, R., Salazar, R., and Tabernero, J. (2018). Molecular Subtypes and the Evolution of Treatment Decisions in Metastatic Colorectal Cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 231–238. https://doi.org/10.1200/EDBK_200929.

Dieu-Nosjean, M.-C., and Caux, C. (2019). La biologie des cibles PD-1 et CTLA-4 et la question des biomarqueurs. *médecine/sciences* 35, 957–965. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019192>.

Eddaoudi, A., Canning, S.L., and Kato, I. (2018). Flow Cytometric Detection of G0 in Live Cells by Hoechst 33342 and Pyronin Y Staining. In *Cellular Quiescence*, H.D. Lacorazza, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 49–57.

Faye, P.-A., Vedrenne, N., De la Cruz-Morcillo, M.A., Barrot, C.-C., Richard, L., Bourthoumiou, S., Sturtz, F., Funalot, B., Lia, A.-S., and Battu, S. (2016). New Method for Sorting Endothelial and Neural Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal. Chem.* 88, 6696–6702. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00704>.

Fearon, E.R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 479–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>.

- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I).
- Ferron, M., Praz, F., and Pocard, M. (2005). Génétique du cancer colorectal. *Ann. Chir.* 130, 602–607. <https://doi.org/10.1016/j.anchir.2005.02.014>.
- Francescangeli, F., Contavalli, P., De Angelis, M.L., Careccia, S., Signore, M., Haas, T.L., Salaris, F., Baiocchi, M., Boe, A., Giuliani, A., et al. (2020). A pre-existing population of ZEB2+ quiescent cells with stemness and mesenchymal features dictate chemoresistance in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 39, 2. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1505-4>.
- Fujii, M., and Sato, T. (2021). Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nat. Mater.* 20, 156–169. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0754-0>.
- Fumagalli, A., Oost, K.C., Kester, L., Morgner, J., Bornes, L., Bruens, L., Spaargaren, L., Azkanaz, M., Schelfhorst, T., Beerling, E., et al. (2020). Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell* 26, 569-578.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.02.008>.
- Gehart, H., and Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 19–34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>.
- Goldstraw, P. (2013). New TNM classification: achievements and hurdles. *Transl. Lung Cancer Res.* 2, 9. .
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A.C., and Grundy, D. (2017). Gastrointestinal Physiology and Function. In *Gastrointestinal Pharmacology*, B. Greenwood-Van Meerveld, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–16.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21, 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Herath, M., Hosie, S., Bornstein, J.C., Franks, A.E., and Hill-Yardin, E.L. (2020). The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 248. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00248>.
- Hervieu, C., Christou, N., Battu, S., and Mathonnet, M. (2021). The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials. *Cancers* 13, 1092. <https://doi.org/10.3390/cancers13051092>.
- Hervieu, C., Verdier, M., Bégaud, G., Christou, N., Sage, M., Pannequin, J., Battu, S., and Mathonnet, M. (2022). A Label-Free Cell Sorting Approach to Highlight the Impact of Intratumoral Cellular Heterogeneity and Cancer Stem Cells on Response to Therapies. Preprints <https://doi.org/10.20944/preprints202205.0201.v1>.
- Hirata, A., Hatano, Y., Niwa, M., Hara, A., and Tomita, H. (2019). Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells. In *Stem Cells Heterogeneity in Cancer*, A. Birbrair, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 115–126.

- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 13, 714–726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>.
- Jass, J.R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>.
- Jordan, C.T. (2006). Cancer Stem Cells. *N. Engl. J. Med.* 9. .
- Kanthan, R., Senger, J.-L., and Kanthan, S.C. (2012). Molecular Events in Primary and Metastatic Colorectal Carcinoma: A Review. *Pathol. Res. Int.* 2012, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/597497>.
- Koessler, D.T., Bichard, P., Lepilliez, V., Puppa, G., and Ris, F. (2016). Epidémiologie, prise en charge et suivi des polypes colorectaux. *Rev. MÉDICALE SUISSE* 7. .
- Kopetz, S., Grothey, A., Yaeger, R., Van Cutsem, E., Desai, J., Yoshino, T., Wasan, H., Ciardiello, F., Loupakis, F., Hong, Y.S., et al. (2019). Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in *BRAF* V600E–Mutated Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 381, 1632–1643. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908075>.
- Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., van de Velde, C.J.H., and Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>.
- Lacroix, A., Deluche, E., Zhang, L.Y., Dalmay, C., Mélin, C., Leroy, J., Babay, M., Morand Du Puch, C., Giraud, S., Bessette, B., et al. (2019). A New Label-Free Approach to Glioblastoma Cancer Stem Cell Sorting and Detection. *Anal. Chem.* 91, 8948–8957. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00913>.
- Laplagne, C., Domagala, M., Le Naour, A., Quemerais, C., Hamel, D., Fournié, J.-J., Couderc, B., Bousquet, C., Ferrand, A., and Poupot, M. (2019). Latest Advances in Targeting the Tumor Microenvironment for Tumor Suppression. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4719. <https://doi.org/10.3390/ijms20194719>.
- Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 372, 2509–2520. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>.
- Lenos, K.J., Miedema, D.M., Lodestijn, S.C., Nijman, L.E., van den Bosch, T., Romero Ros, X., Lourenço, F.C., Lecca, M.C., van der Heijden, M., van Neerven, S.M., et al. (2018). Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer. *Nat. Cell Biol.* 20, 1193–1202. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0179-z>.
- Li, M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2019). Organoids — Preclinical Models of Human Disease. *N. Engl. J. Med.* 380, 569–579. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1806175>.
- Low, L.A., Mummery, C., Berridge, B.R., Austin, C.P., and Tagle, D.A. (2021). Organs-on-chips: into the next decade. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 345–361. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0079-3>.

Lytle, N.K., Barber, A.G., and Reya, T. (2018). Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* 18, 669–680. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0056-x>.

Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.-C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., et al. (2013). Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Med.* 10, e1001453. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001453>.

Markowitz, S.D., and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 12. .

Mathonnet, M. (2014). Hallmarks in colorectal cancer: Angiogenesis and cancer stem-like cells. *World J. Gastroenterol.* 20, 4189. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4189>.

Medema, J.P. (2017). Targeting the Colorectal Cancer Stem Cell. *N. Engl. J. Med.* 377, 888–890. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1706541>.

Mélin, C., Perraud, A., Akil, H., Jauberteau, M.-O., Cardot, P., Mathonnet, M., and Battu, S. (2012). Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal. Chem.* 84, 1549–1556. <https://doi.org/10.1021/ac202797z>.

Mélin, C., Perraud, A., Christou, N., Bibes, R., Cardot, P., Jauberteau, M.-O., Battu, S., and Mathonnet, M. (2015). New ex-ovo colorectal-cancer models from different SdFFF-sorted tumor-initiating cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 8433–8443. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9029-z>.

Meran, L., Baulies, A., and Li, V.S.W. (2017). Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem Cells Int.* 2017, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/7970385>.

Meyerhardt, J.A. (2005). Systemic Therapy for Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 12. .

Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E.G., Henderson, D.E., Baffour-Awuah, N.Y., Ambruzs, D.M., Fogli, L.K., Algra, S., et al. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 179–184. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013004108>.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106–110. <https://doi.org/10.1038/nature05372>.

O'Neil, N.J., Bailey, M.L., and Hieter, P. (2017). Synthetic lethality and cancer. *Nat. Rev. Genet.* 18, 613–623. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.47>.

Onfroy-Roy, L., Hamel, D., Foncy, J., Malaquin, L., and Ferrand, A. (2020). Extracellular Matrix Mechanical Properties and Regulation of the Intestinal Stem Cells: When Mechanics Control Fate. *Cells* 9, 2629. <https://doi.org/10.3390/cells9122629>.

Onfroy-Roy, L., Hamel, D., Malaquin, L., and Ferrand, A. (2021). Colon Fibroblasts and Inflammation: Sparring Partners in Colorectal Cancer Initiation? *Cancers* 13, 1749. <https://doi.org/10.3390/cancers13081749>.

Overman, M.J., McDermott, R., Leach, J.L., Lonardi, S., Lenz, H.-J., Morse, M.A., Desai, J., Hill, A., Axelson, M., Moss, R.A., et al. (2017). Nivolumab in patients with metastatic DNA

mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 18, 1182–1191. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30422-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30422-9).

Overman, M.J., Lonardi, S., Wong, K.Y.M., Lenz, H.-J., Gelsomino, F., Aglietta, M., Morse, M.A., Van Cutsem, E., McDermott, R., Hill, A., et al. (2018). Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 36, 773–779. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9901>.

Ozcan, M., Janikovits, J., von Knebel Doeberitz, M., and Kloor, M. (2018). Complex pattern of immune evasion in MSI colorectal cancer. *Oncolimmunology* 7, e1445453. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1445453>.

Phelip, J.-M. (2018). Cancer du côlon : classification moléculaire et anatomique nécessaire à la décision thérapeutique. *POST'U* 8. .

Porter, R.J., Murray, G.I., and McLean, M.H. (2020). Current concepts in tumour-derived organoids. *Br. J. Cancer* 123, 1209–1218. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0993-5>.

Potten, C.S., Hume, W.J., Reid, P., and Cairns, J. (1978). The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell* 15, 899–906. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90274-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90274-X).

Potten, C.S., Owen, G., and Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell Sci.* 115, 2381–2388. <https://doi.org/doi.org/10.1242/jcs.115.11.2381>.

Prasetyanti, P.R., and Medema, J.P. (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol. Cancer* 16, 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0600-4>.

Reggiani Bonetti, L., Barresi, V., Bettelli, S., Domati, F., and Palmiere, C. (2016). Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known. *Diagn. Pathol.* 11, 31. <https://doi.org/10.1186/s13000-016-0481-7>.

Relier, S., Ripoll, J., Guillorit, H., Amalric, A., Achour, C., Boissière, F., Vialaret, J., Attina, A., Debart, F., Choquet, A., et al. (2021). FTO-mediated cytoplasmic m6Am demethylation adjusts stem-like properties in colorectal cancer cell. *Nat. Commun.* 12, 1716. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21758-4>.

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>.

Ricci-Vitiani, L., Fabrizi, E., Palio, E., and De Maria, R. (2009). Colon cancer stem cells. *J. Mol. Med.* 87, 1097–1104. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0518-4>.

Roepman, P., Schlicker, A., Tabernero, J., Majewski, I., Tian, S., Moreno, V., Snel, M.H., Chresta, C.M., Rosenberg, R., Nitsche, U., et al. (2014). Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer* 134, 552–562. <https://doi.org/10.1002/ijc.28387>.

Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homicsko, K., Collisson, E.A., Gibb, W.J., Wullschleger, S., Ostos, L.C.G., Lannon, W.A., Grotzinger, C., Del Rio, M., et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.* 19, 619–625. <https://doi.org/10.1038/nm.3175>.

Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* 40, 915–920. <https://doi.org/10.1038/ng.165>.

Saydé, T., Manczak, R., Saada, S., Bégaud, G., Bessette, B., Lespes, G., Le Coustumer, P., Gaudin, K., Dalmay, C., Pothier, A., et al. (2021). Characterization of Glioblastoma Cancer Stem Cells Sorted by Sedimentation Field-Flow Fractionation Using an Ultrahigh-Frequency Range Dielectrophoresis Biosensor. *Anal. Chem.* 93, 12664–12671. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02466>.

Schlicker, A., Beran, G., Chresta, C.M., McWalter, G., Pritchard, A., Weston, S., Runswick, S., Davenport, S., Heathcote, K., Castro, D.A., et al. (2012). Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med. Genomics* 5, 66. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-66>.

Schmitt, M., and Greten, F.R. (2021). The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 653–667. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00534-x>.

Selves, J. (2009). Aspects histologiques et critères d'évaluation pronostique. *médecine/sciences* 25, 9–12. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009251s9>.

Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M., Date, S., Sugimoto, S., Kanai, T., and Sato, T. (2017). Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature* 545, 187–192. <https://doi.org/10.1038/nature22081>.

Siri, S., Zhao, Y., Maier, F., Pierce, D.M., and Feng, B. (2020). The Macro- and Micro-Mechanics of the Colon and Rectum I: Experimental Evidence. *Bioengineering* 7, 130. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040130>.

Sonbol, M., Ahn, D., and Bekaii-Saab, T. (2019). Therapeutic Targeting Strategies of Cancer Stem Cells in Gastrointestinal Malignancies. *Biomedicines* 7, 17. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010017>.

Szadvari, I., Krizanova, O., and Babula, P. (2016). Athymic Nude Mice as an Experimental Model for Cancer Treatment. 65, 13. .

Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M.R., Wang, Q., Lu, M.M., and Epstein, J.A. (2011). Interconversion Between Intestinal Stem Cell Populations in Distinct Niches. *Science* 334, 1420–1424. <https://doi.org/10.1126/science.1213214>.

Thankamony, A.P., Saxena, K., Murali, R., Jolly, M.K., and Nair, R. (2020). Cancer Stem Cell Plasticity – A Deadly Deal. *Front. Mol. Biosci.* 7, 79. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00079>.

The Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>.

the Human Cell Atlas 'Biological Network' Organoids, Bock, C., Boutros, M., Camp, J.G., Clarke, L., Clevers, H., Knoblich, J.A., Liberali, P., Regev, A., Rios, A.C., et al. (2021). The Organoid Cell Atlas. *Nat. Biotechnol.* 39, 13–17. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00762-x>.

Tong, G.-J., Zhang, G.-Y., Liu, J., Zheng, Z.-Z., Chen, Y., Niu, P.-P., and Xu, X.-T. (2018). Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World J. Clin. Oncol.* 9, 148–161. <https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i7.148>.

Tosi, D., Pérez-Gracia, E., Atis, S., Vié, N., Combès, E., Gabanou, M., Larbouret, C., Jarlier, M., Mollevi, C., Torro, A., et al. (2018). Rational development of synergistic combinations of chemotherapy and molecular targeted agents for colorectal cancer treatment. *BMC Cancer* 18, 812. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4712-z>.

Turner, R.R., Li, C., and Compton, C.C. (2007). Newer Pathologic Assessment Techniques for Colorectal Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 6871s–6876s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1151>.

Twelves, C., Wong, A., Nowacki, M., Abt, M., Burris, H. 3rd, Carrato, A., Cassidy, J., Cervantes, A., Fagerberg, J., Georgoulas, V., et al. (2005). Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* 9. .

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J.H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., et al. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 27, 1386–1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>.

Van der Heijden, M., and Vermeulen, L. (2019a). Stem cells in homeostasis and cancer of the gut. *Mol. Cancer* 18, 66. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0962-x>.

Van der Heijden, M., and Vermeulen, L. (2019b). A Cancer Stem Cell Perspective on Minimal Residual Disease in Solid Malignancies. In *Cancer Stem Cell Resistance to Targeted Therapy*, C. Maccalli, M. Todaro, and S. Ferrone, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 31–49.

Vazquez-Iglesias, L., Barcia-Castro, L., Rodriguez-Quiroga, M., Paez de la Cadena, M., Rodriguez-Berrocal, J., and Cordero, O. (2019). Surface expression marker profile in colon cancer cell lines and sphere-derived cells suggests complexity in CD26+ cancer stem cells subsets. *Biol. Open* 10. .

Vedrenne, N., Sarrazy, V., Battu, S., Bordeau, N., Richard, L., Billet, F., Coronas, V., and Desmoulière, A. (2016). Neural Stem Cell Properties of an Astrocyte Subpopulation Sorted by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Rejuvenation Res.* 19, 362–372. <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1776>.

Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M.R., Kemper, K., Perez Alea, M., Richel, D.J., Stassi, G., and Medema, J.P. (2008). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 13427–13432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805706105>.

Vessoni, A.T., Filippi-Chiela, E.C., Lenz, G., and Batista, L.F.Z. (2020). Tumor propagating cells: drivers of tumor plasticity, heterogeneity, and recurrence. *Oncogene* 39, 2055–2068. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1128-4>.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8, 755–768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>.

Weiser, M.R., and Garcia-Aguilar, J. (2019). Basic Principles of the Operative Treatment of Colorectal Cancer. In *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set*, (Elsevier), pp. 1981–1991.

Winton, D.J., Blount, M.A., and Ponder, B.A.J. (1988). A clonal marker induced by mutation in mouse intestinal epithelium. *Nature* 333, 463–466. <https://doi.org/10.1038/333463a0>.

Wong, V.W.Y., Stange, D.E., Page, M.E., Buczacki, S., Wabik, A., Itami, S., van de Wetering, M., Poulsom, R., Wright, N.A., Trotter, M.W.B., et al. (2012). Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat. Cell Biol.* 14, 401–408. <https://doi.org/10.1038/ncb2464>.

Zhang, L., and Bu, P. (2021). Generation of an orthotopic mouse model to study colorectal cancer metastasis. *STAR Protoc.* 2, 100792. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100792>.

Zheng, X., Yu, C., and Xu, M. (2021). Linking Tumor Microenvironment to Plasticity of Cancer Stem Cells: Mechanisms and Application in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* 11, 678333. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.678333>.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde. L'évolution d'un stade localisé en un stade métastatique est particulièrement critique pour la survie des patients. Cette transition est souvent associée au développement de résistances thérapeutiques, attribuées aux cellules souches cancéreuses (CSC), à l'origine des récurrences et de la survenue de métastases. Ainsi, les CSC représentent une cible thérapeutique prometteuse. L'étude de ces cellules nécessite leur identification et leur isolement, qui constituent un réel défi en raison de leur faible proportion au sein de la tumeur et de leur nature dynamique. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude comparative des CSC issues de tumeurs primaires et de métastases de CCR, en terme de caractéristiques et de réponse aux chimiothérapies. La plasticité des CSC, notamment phénotypique, complique leur isolement *via* des marqueurs de surface. Dans ce projet, nous avons utilisé la technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation pour trier les cellules en fonction de leurs propriétés biophysiques. Trois sous-populations cellulaires ont été isolées à partir de lignées cellulaires et de cultures primaires, représentatives des différents stades de CCR. Les caractérisations phénotypiques et fonctionnelles des sous-populations triées ont révélé que l'une d'entre elles possède des propriétés de CSC, en particulier une quiescence, une clonogénicité et une capacité à générer des tumeurs *in vivo*. De plus, les tests de sensibilité ont mis en évidence le caractère chimiorésistant de cette sous-population. Ainsi, cette approche « label-free » permet d'étudier l'impact de l'hétérogénéité cellulaire intratumorale et des CSC sur les réponses aux chimiothérapies, utilisées en clinique, quel que soit la matrice cellulaire et le stade tumoral. Ces travaux ouvrent donc de nouvelles perspectives pour étudier la réponse individualisée de chaque compartiment cellulaire tumoral et les résistances thérapeutiques. *In fine*, ce projet pourrait permettre la personnalisation des thérapies systémiques, afin d'optimiser leur efficacité et prévenir les récurrences.

Mots-clés : Cellules souches cancéreuses, tri cellulaire, cancer colorectal, chimiorésistance.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer deaths worldwide. The progression from a localized stage to a metastatic stage is critical for patient survival. This transition is often associated with the development of therapeutic resistance, attributed to cancer stem cells (CSCs), which lead to recurrence and metastasis. Thus, CSCs represent a promising therapeutic target. The study of these cells requires their identification and isolation, which is a challenge due to their low proportion within the tumor and their dynamic nature. My research project focused on the comparative study of CSCs from primary tumors and metastases of CRC, in terms of features and response to chemotherapies. The plasticity of CSCs, especially phenotypic, complicates their isolation using surface markers. In this study, we used the sedimentation field-flow fractionation technique to sort cells according to their biophysical properties. Three cell subpopulations were isolated from cell lines and primary cultures, representative of different CRC stages. Phenotypic and functional characterizations of the sorted subpopulations revealed that one of them possesses CSC properties, in particular quiescence, clonogenicity and the ability to generate tumors *in vivo*. Moreover, sensitivity tests have highlighted the chemoresistant nature of this subpopulation. Thus, this "label-free" approach enables us to study the impact of intratumoral cellular heterogeneity and CSCs on the responses to chemotherapies used in the clinic, regardless of cell matrix and tumor stage. This work opens new perspectives to study the individualized response of each tumor cell compartment and chemoresistance. Ultimately, this project could allow the personalization of systemic therapies in order to optimize their efficacy and prevent recurrence.

Keywords: cancer stem cells, label-free cell sorting, colorectal cancer, chemoresistance.

