

# Thèse de Doctorat

Simon VALES

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de  
Nantes sous le sceau de l'Université Bretagne  
Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie cellulaire*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : *UMR Inserm 1235*

Soutenue le 7 Novembre 2017

## Impact des cellules gliales entériques sur les cellules souches cancéreuses coliques et processus de carcinogenèse associés

### JURY

Président du jury :	<b>Dr François VALLETTE</b> , Directeur de recherche, UMR Inserm 1232, Nantes
Rapporteurs :	<b>Dr Béatrice ROMAGNOLO</b> , Directeur de recherche, Institut Cochin Inserm 1016 - CNRS 8104, Paris <b>Dr Isabelle GROSS</b> , Chargé de recherche, UMR Inserm 1113, Strasbourg
Examineur :	<b>Dr Muriel JACQUIER-SARLIN</b> , Maître de conférence, UMR Inserm 1216, Grenoble
Directeur de Thèse :	<b>Dr Michel NEUNLIST</b> , Directeur de recherche, UMR Inserm 1235, Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Dr Laurianne VAN LANDEGHEM</b> , Professor Assistant, NC State University, Raleigh

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier chaleureusement Mme Romagnolo et Mme Gross, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également les membres du jury, M. Vallette et Mme Jacquier-Sarlin, d'avoir accepté d'assister à la soutenance de ce mémoire.*

*Je tiens également à remercier les membres du comité de suivi de thèse, M. Heymann et M. Vallette, qui ont été d'un grand soutien et de bons conseils.*

*Un grand merci à Michel, pour m'avoir accueilli dans ce labo extraordinaire, qui est très vite devenu ma deuxième maison. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce projet dont je suis fier et d'avoir cru en moi et en mes capacités.*

*Un grand merci à Laurianne, pour m'avoir supporté pendant 5 ans. Tu m'as donné goût au travail et tu m'as transmis ta passion pour la science. Merci m'avoir apporté ce soutien sans faille, quel que soit l'heure du jour ou de la nuit, ou que tu sois et quoi que tu fasses.*

*Merci à tous les membres du labo. Merci à Julie et à Philippe pour ces longues conversations en L2. Merci à Tony, dont les blagues et les chansons sont encore présentes dans ma tête. Merci à Camille, avec qui on a passé toutes les épreuves : les soutenances de stage, le concours de l'Ecole doctorale, les premières présentations en congrès, ...*

*Merci à Jacques, PA, Alice, Elodie, Tiphaine, Thomas et tous les autres pour cette ambiance magnifique au labo, et pour la petite bière de fin de journée qui se finissait au milieu de la nuit.*

*Merci à tous ceux de NC state, qui m'ont accueilli malgré mon anglais déplorable, et qui m'ont fait sentir comme chez moi. Un grand merci à Greg pour toute son aide.*

*Merci à mes amis, qui m'ont fait comprendre que toutes les difficultés de la science n'avaient aucune importance à côté d'une amitié véritable.*

*Merci à mes parents, qui n'ont pas cessé de me soutenir, même lorsque je leur ai annoncé que je partais vivre sur un autre continent.*

*Et enfin Merci à Melissa. Je ne sais pas où j'en serai sans toi.*

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	6
1. L'épithélium colique.....	9
1.1. Présentation générale du côlon.....	9
1.2. Organisation tissulaire du côlon .....	10
1.3. Organisation cellulaire de l'épithélium colique .....	11
1.3.1. Les cellules différenciées de l'épithélium colique .....	12
1.3.1.1. Les cellules absorbantes .....	12
1.3.1.2. Les cellules sécrétrices .....	13
1.3.2. Les autres populations cellulaires différenciées.....	14
1.4. Les cellules souches coliques .....	15
1.4.1. Mise en évidence et techniques d'étude des CS coliques .....	15
1.4.2. Hétérogénéité et plasticité des CS coliques.....	17
1.5. Le microenvironnement des CS coliques.....	20
1.5.1. Le microenvironnement moléculaire.....	21
1.5.1.1. La voie Wnt .....	21
1.5.1.2. La voie Notch.....	23
1.5.1.3. La voie des BMP .....	25
1.5.2. Le microenvironnement cellulaire .....	26
2. Le système nerveux entérique.....	28
2.1. Généralités sur le système nerveux entérique .....	28
2.1.1. Organisation du système nerveux entérique.....	28
2.1.2. Innervation extrinsèque du tube digestif .....	29
2.1.2.1. Innervation parasymphatique.....	30
2.1.2.2. Innervation sympathique .....	30
2.2. Les neurones entériques.....	31
2.2.1. Classification .....	31

2.2.1.1.	Classification électrophysiologique.....	31
2.2.1.2.	Classification par codage neurochimique .....	32
2.2.2.	Fonctions des neurones entériques.....	32
2.2.2.1.	Classification morphologique.....	33
2.2.2.2.	Les neurones afférents primaires intrinsèques .....	34
2.2.2.3.	Les interneurones .....	34
2.2.2.4.	Les neurones moteurs.....	35
2.2.3.	Rôle des neurones entériques dans le contrôle des fonctions gastro-intestinales .....	36
2.2.3.1.	Contrôle de la motricité digestive.....	36
2.2.3.2.	Contrôle des fonctions de l'épithélium intestinal et colique.....	37
2.2.3.2.1.	Contrôle de la sécrétion d'ions et d'électrolytes.....	37
2.2.3.2.2.	Contrôle de la perméabilité intestinale .....	37
2.2.3.2.3.	Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales coliques .....	39
2.3.	Les cellules gliales entériques .....	40
2.3.1.	Généralités sur les cellules gliales entériques .....	40
2.3.2.	Marqueurs des CGE.....	43
2.3.3.	Hétérogénéité gliale.....	45
2.3.4.	Fonctions des CGE.....	46
2.3.4.1.	Rôle des CGE dans la régulation des fonctions des neurones entériques .....	47
2.3.4.2.	Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale .....	49
2.3.4.3.	Contrôle des fonctions immunitaires et inflammation.....	52
2.3.5.	Rôle des CGE dans les maladies digestives .....	53
2.3.5.1.	CGE et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	54
2.3.5.2.	Cellules gliales entériques et cancers colorectaux.....	55
3.	Le cancer colorectal .....	57
3.1.	Présentation générale du cancer colorectal .....	57
3.1.1.	Epidémiologie .....	57
3.1.2.	Définition de la maladie .....	57

3.1.3.	Stades de la maladie .....	58
3.1.4.	Localisation .....	61
3.1.5.	Carcinogénèse colique .....	61
3.1.6.	Instabilité génétique des CCR .....	63
3.1.6.1.	L'instabilité chromosomique.....	63
3.1.6.2.	L'instabilité microsatellitaire.....	64
3.1.6.3.	Phénotype d'hyperméthylation des ilots CpG .....	64
3.1.7.	Les formes héréditaires du CCR .....	65
3.1.8.	Traitements du CCR .....	66
3.1.8.1.	La chirurgie.....	66
3.1.8.2.	La radiothérapie .....	67
3.1.8.3.	La chimiothérapie .....	67
3.1.8.3.1.	Généralités.....	67
3.1.8.3.2.	5-Fluorouracil.....	68
3.1.8.3.3.	Oxaliplatine .....	69
3.1.8.3.4.	Irinotécan.....	70
3.1.9.	La chimiorésistance des CCR.....	70
3.1.9.1.	L'efflux des molécules de chimiothérapie .....	71
3.1.9.2.	Mécanismes de dégradation ou d'inactivation des molécules de chimiothérapie.....	73
3.1.9.3.	L'altération des cibles moléculaires .....	74
3.1.9.4.	Les voies de réparation de l'ADN .....	75
3.1.9.4.1.	La voie BER.....	75
3.1.9.4.2.	La voie NER.....	75
3.1.9.4.3.	La voie MMR .....	76
3.1.9.4.4.	Les voies HR et NHEJ.....	76
3.1.9.4.5.	Réparation de l'ADN et chimiothérapies des CCR .....	78
3.1.9.5.	Altération des points de contrôle du cycle cellulaire.....	79

3.1.9.6.	Résistance à l'apoptose.....	80
3.2.	Les cellules souches cancéreuses.....	81
3.2.1.	Le modèle des cellules souches cancéreuses .....	81
3.2.2.	Découverte des CSC .....	82
3.2.3.	Modèles d'études des CSC.....	83
3.2.4.	Marqueurs des CSC.....	86
3.2.4.1.	Le marqueur CD133 .....	86
3.2.4.2.	Le marqueur CD44 .....	87
3.2.4.3.	Le marqueur CD24 .....	88
3.2.4.4.	Le marqueur CD166 .....	88
3.2.4.5.	Les autres marqueurs des CSC.....	89
3.2.5.	Propriétés des CSC .....	90
3.2.5.1.	Capacités d'invasion et de métastase.....	90
3.2.5.2.	Chimiorésistance et radiorésistance .....	91
3.2.6.	Origine des CSC .....	93
3.3.	Microenvironnement tumoral .....	95
3.3.1.	Composition du microenvironnement tumoral.....	95
3.3.1.1.	Cancer-associated fibroblasts (CAF).....	96
3.3.1.2.	Tumor-associated macrophages (TAM).....	97
3.3.1.3.	Cytokines pro-inflammatoires.....	98
3.3.1.4.	Les prostaglandines et la PGE2 .....	100
3.3.1.4.1.	De l'acide arachidonique aux prostaglandines .....	100
3.3.1.4.2.	La voie PGE2.....	103
3.3.1.4.3.	Régulation des fonctions digestives par la PGE2 .....	105
3.3.1.4.4.	Prostaglandines, PGE2 et CCR.....	106
3.3.2.	Microenvironnement et cellules souches cancéreuses .....	109
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	.....	<b>111</b>
<b>RESULTATS</b>	.....	<b>113</b>

<b>ARTICLE 1 : TUMOR CELLS HIJACK ENTERIC GLIA TO ACTIVATE COLON CANCER STEM CELLS AND STIMULATE TUMORIGENESIS.....</b>	<b>113</b>
<b>ARTICLE 2 : ENTERIC GLIAL CELLS STIMULATE COLON CANCER STEM CELL CHEMORESISTANCE VIA AN ATM-DEPENDENT PATHWAY .....</b>	<b>157</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>187</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>194</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>196</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

15dPGJ2 : 15-déoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandine-J2  
15-HETE : 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid  
5-FU : 5-Fluorouracil  
5-HT : Sérotonine  
AA : Acide arachidonique  
ABC : ATP-binding cassette transporters  
AC : Adenylyl cyclase  
Ach : Acetylcholine  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADP : Adenosine diphosphate  
AGPI : Acide gras polyinsaturé  
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens  
AOM : Azoxyméthane  
APC : Adenomatous polyposis coli  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
Ascl2 : Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2  
ATM : Ataxia telangiectasia-mutated  
ATP : Adenosine triphosphate  
BEI : Barrière épithéliale intestinale  
BER : Base Excision Repair  
Bmi1 : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog  
BMP : Bone morphogenetic protein  
BMPR2 : bone morphogenetic protein receptor type 2  
BRCA1 : Breast cancer genes 1  
CAF : Cancer-associated fibroblasts  
CBC : Crypt based columnar cells  
CCK : Cholécystokinine  
CCL2 : C-C motif chemokine ligand 2  
CCR : Cancer colorectal  
CGE : Cellule gliale entérique



CGRP : Calcitonin gene-related peptide  
CHK2 : Checkpoint Kinase 2  
CIMP : CpG island methylator phenotype  
CIN : Chromosomal instability  
CK1 : Casein kinase 1  
CK-18 : cytokeratin 18  
COX- 1 : Cyclooxygenase 1  
COX-2 : Cyclooxygenase 2  
CS : Cellule souche  
CSC : Cellule souche cancéreuse  
Dcamkl-1 : Doublecortin Like Kinase 1  
DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma  
Dclk1 : Doublecortin Like Kinase 1  
DHFU : Dihydrofluorouracil  
DKK1 : Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1  
Dl11 : Delta-like ligand protein 1  
Dl14 : Delta-like ligand protein 4  
DPD : Dihydropyrimidine dehydrogenase  
DSS : Dextran Sodium Sulfate  
dTMP : Désoxythimidine monophosphate  
dUMP : Désoxyuridine monophosphate  
Dvl : Disheveled  
EGF : Epidermal growth factor  
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein  
EGFR : Epidermal growth factor receptor  
EPHB2 : Ephrin type-B receptor  
ERCC1 : Excision repair cross-complementation group 1  
FdUMP : Fluorodeoxyuridine  
FdUTP : Fluorodeoxyuridine triphosphate  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
FOLFIRI : Acide folinique, fluorouracil et irinotécan  
FOLFOX : Acide folinique, fluorouracil et oxaliplatine

FUTP : Fluorouridine triphosphate  
GAT : GABA Transporter  
GDNF : Glial cell-derived neurotrophic factor  
GFAP : Glial fibrillary acidic protein  
GIP : Gastric inhibitory polypeptide  
GLP-2 : Glucagon-like peptide 2  
GSK-3 $\beta$  : Glycogen synthase kinase 3 beta  
GSNO : S-Nitrosoglutathione  
GST : Glutathione S-transferase  
GTP : Guanosine-5'-triphosphate  
HGF : Hepatocyte growth factor  
Hopx : HOP Homeobox  
HR : Homologous Recombination  
HSV-TK : Thymidine kinase du virus de l'herpes simplex  
IFN- $\gamma$  : Interferon gamma  
IGF : Insulin-like growth factor  
IL : Interleukin  
Lgr5 : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5  
LPS : Lipopolysaccharides  
LRC : Label-retaining cells  
Lrig1 : Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1  
LRP : Lipoprotein receptor related protein  
M-CSF : macrophage colony-stimulating factor  
MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin  
MMR : Mismatch repair  
MSI : Microsatellite instability  
mTert : Mouse telomerase reverse transcriptase  
NER : Nucléotide Excision Repair  
NGF : Nerve growth factor  
NHEJ : Non Homologous End Joining  
NICD : Notch intracellular domain  
NO : Monoxyde d'azote

NOS : Neuronal nitric oxide  
OLFM4 : Olfactomedin 4  
PA : potentiels d'action  
PACAP : Pituitary adenylate cyclase-activating peptide  
PAF : Polypose adénomateuse familiale  
PCP : Planar Cell Polarity  
PDGF : Platelet-derived growth factor  
PGD2 : Prostaglandine D2  
PGE2 : Prostaglandine E2  
PGF2  $\alpha$  : Prostaglandine F2  $\alpha$   
PGG2 : Prostaglandine G2  
PGH2 : Prostaglandine H2  
PGI2 : Prostaglandine I2  
PGP 9.5 : Protein Gene Product 9.5  
PHLDA1 : Pleckstrin homology-like domain family A member 1  
PIKK : Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases  
PKA : Protein kinase A  
PKC : Protein kinase C  
PLP1 : Protéine protéolipide 1  
PTK7 : Protein tyrosine kinase 7  
PYY : Peptide YY  
RCH : Rectocolite hémorragique  
Reg4 : Regenerating Family Member 4  
Smoc2 : SPARC Related Modular Calcium Binding 2  
SNC : Système nerveux central  
SNE : Système nerveux entérique  
Sox 10 : SRY-related HMG-box 10  
Sox9 : SRY-related HMG-box 9  
SP : Substance P  
TAM : Tumor-associated macrophages  
TCF/LEF : T-cell factor/lymphoid enhancer factor  
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor beta

TLR : Toll Like Receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

TNM : Tumor, Nodes, Metastasis

TS : Thymidylate synthase

TX : Thromboxanes

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

ZO : Zonula occludens

## INTRODUCTION GENERALE

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde et la troisième cause de décès par cancer chez l'homme et la femme. En 2015, environ 1,5 million de nouveaux cas ont été recensés et plus de 750 000 personnes sont mortes des suites de cette maladie dans le monde. Malgré les avancées majeures de ces 20 dernières années dans le dépistage et le traitement du CCR, les récurrences et les formes métastatiques de ce cancer restent un problème de santé publique majeur associé à un taux de mortalité global encore élevé. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'initiation, de la progression, de la résistance aux traitements, des récurrences et des métastases des CCR est nécessaire à l'amélioration de l'efficacité des thérapies actuelles ainsi qu'au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Depuis 2007, plusieurs travaux en cancérologie digestive ont mis en évidence au sein des tumeurs colorectales l'existence d'une population de cellules appelées cellules initiatrices de tumeur ou cellules souches cancéreuses (CSC) possédant des caractéristiques réminiscentes des cellules souches multipotentes adultes, à savoir la capacité d'auto-renouvellement et la capacité de générer tous les types de cellules composant la tumeur. Les études menées sur les CSC ont montré que cette population était capable de reformer *de novo* des tumeurs identiques à la tumeur primaire dans des modèles de souris immunodéficientes. Outre leur fort potentiel tumorigénique, des études récentes ont également montré que les CSC possèdent un fort pouvoir métastatique, ainsi qu'une résistance accrue aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie. Ainsi, les CSC sont donc considérées comme responsables de l'initiation, de la récurrence et des métastases des CCR. Il apparaît donc crucial de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant les fonctions des CSC.

Il est désormais bien établi que le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans les processus de carcinogenèse colique. Ce microenvironnement tumoral est composé de molécules et de cellules résidentes ou recrutées, remodelé par la tumeur afin de promouvoir sa croissance et sa dissémination. L'étude de l'impact du microenvironnement tumoral sur les propriétés des CSC est devenue depuis quelques années un axe de recherche en plein essor. Si les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires, les adipocytes ou encore le microbiote font actuellement l'objet de nombreux travaux, une composante du microenvironnement tumoral colique a très peu été étudiée jusqu'à maintenant : le système nerveux entérique (SNE).

Le SNE est le système nerveux intrinsèque du tube digestif. Il s'agit d'un système nerveux autonome et intégratif, présent tout le long du tractus digestif et composé de neurones entériques et de cellules gliales entériques (CGE). Le rôle du SNE a été particulièrement étudié dans l'intestin et le côlon sain, où il régule l'ensemble des fonctions motrices, de sécrétion et d'absorption, ainsi que les fonctions de barrière de l'épithélium. Outre les neurones entériques dont le rôle est bien établi, les CGE, longtemps considérées comme de simples cellules de soutien des neurones, font l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années. Elles forment un réseau dense qui s'étend dans toute l'épaisseur de la paroi intestinale et colique, de la séreuse jusqu'à la muqueuse où les CGE entourent intimement les cryptes intestinales et coliques et sont situées à proximité immédiate des cellules épithéliales. L'ensemble des travaux de la dernière décennie démontrent ainsi que les CGE sont un régulateur clé des fonctions de l'épithélium intestinal et colique *via* la libération de facteurs solubles spécifiques. Notamment, les CGE inhibent la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal *via* la libération de TGF- $\beta$ 1 et de 15d-PGJ2. Les CGE renforcent et protègent également l'intégrité de l'épithélium intestinal qui forme une barrière entre l'organisme et l'environnement extérieur. Ainsi, les CGE diminuent la perméabilité intestinale et protègent l'épithélium contre l'invasion de pathogènes *via* la sécrétion de GSNO. De plus, les CGE stimulent les

processus de réparation de l'épithélium *via* la libération de proEGF. Outre leur impact sur les fonctions de l'épithélium intestinal dans un contexte physiologique, les CGE interviennent également dans le contrôle de l'immunité du tube digestif et dans les processus inflammatoires. Ainsi, de nombreuses études s'intéressent aujourd'hui au rôle des CGE dans les pathologies digestives, notamment dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Malgré l'ensemble des travaux démontrant que les CGE sont des régulateurs clés des cellules de l'épithélium intestinal en situation physiologique, et suggérant également leur implication dans plusieurs pathologies digestives, ***l'impact des CGE sur les CSC coliques et les processus de carcinogenèse associés n'a pas encore été étudié.***

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse était de déterminer l'impact des CGE sur les propriétés des CSC, en s'appuyant sur les deux hypothèses suivantes :

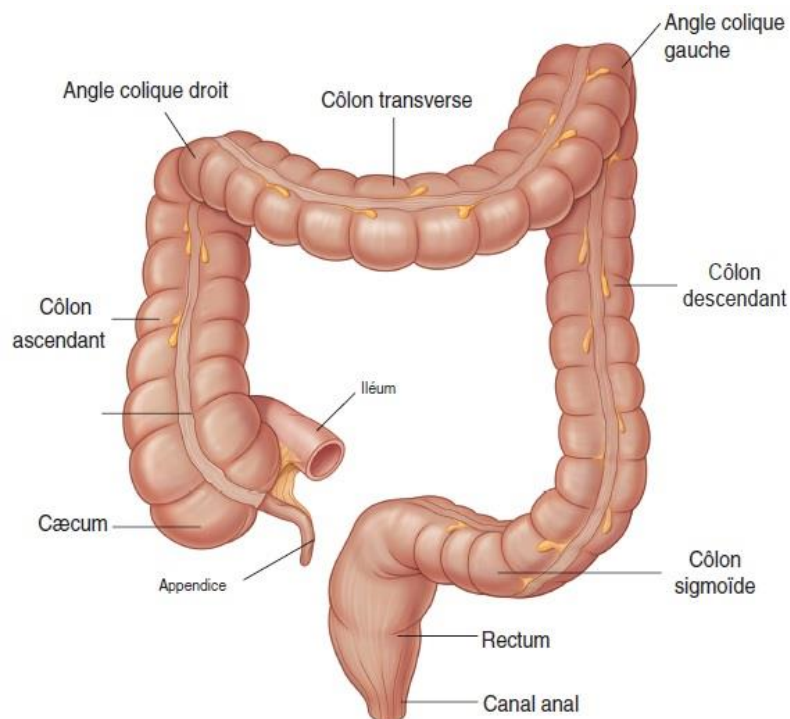
- Les CGE régulent la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs,
- Les CGE régulent les mécanismes de chimiorésistance des CSC.

Ces deux hypothèses ont fait l'objet de deux articles dont l'un est soumis et l'autre est en cours de préparation. L'étude bibliographique qui précède vise à introduire brièvement l'épithélium colique en condition physiologique, puis à introduire les deux composantes du système nerveux entérique, à savoir les neurones entériques et les cellules gliales entériques, et enfin à introduire le cancer colorectal et le modèle des cellules souches cancéreuses.

## 1. L'épithélium colique

### 1.1. Présentation générale du côlon

Chez l'Homme, le côlon mesure en moyenne 1,50m de long et se décompose en différentes parties qui sont, de la partie proximale à la partie distale, le cæcum, le côlon ascendant (ou côlon droit), le côlon transverse, le côlon descendant (ou côlon gauche) et le côlon sigmoïde qui débouche sur le rectum puis l'anus (Figure 1). Le côlon a pour fonction principale d'absorber l'eau et les électrolytes du bol alimentaire ainsi que la formation des fèces pour permettre leur expulsion par l'anus.

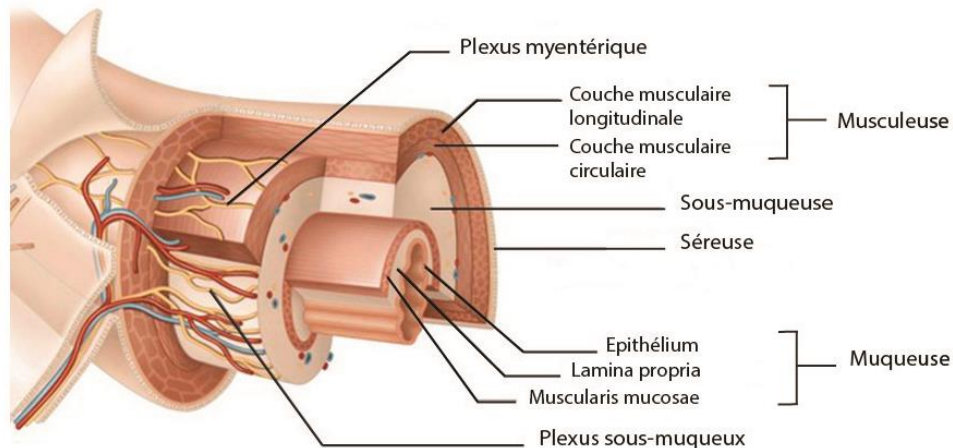


**Figure 1 : Organisation anatomique du côlon :** Le côlon est composé, de sa partie proximale à sa partie distale, du cæcum, du côlon ascendant, du côlon transverse, du côlon descendant et du côlon sigmoïde qui débouche sur le rectum puis l'anus. D'après Gray's Anatomie pour les étudiants, Elsevier Masson, 2e édition, 2011.



## 1.2. Organisation tissulaire du côlon

La paroi du tube digestif se compose de 4 couches histologiques qui sont, de la couche externe périphérique à la couche interne qui borde la lumière colique : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (Figure 2).



**Figure 2 : Organisation tissulaire du côlon :** La paroi du côlon se compose de 4 couches histologiques qui sont, de la couche externe périphérique à la couche interne qui borde la lumière colique : la séreuse, la musculuse au sein de laquelle se situe le plexus myentérique, la sous-muqueuse au sein de laquelle se situe le plexus sous-muqueux et la muqueuse comprenant la musculaire muqueuse (*muscularis mucosae*), la lamina propria et l'épithélium colique.

La séreuse se compose d'un tissu adipeux et vascularisé, bordée par le feuillet viscéral du péritoine. Au niveau du moyen et du bas rectum, il n'existe pas à proprement parler de séreuse puisqu'il n'y a pas de péritoine. Le tissu adipeux péirectal au-delà de la musculuse est alors nommé mésorectum.

La musculuse est formée de deux couches musculaires lisses : la couche longitudinale externe, dont la contraction permet le raccourcissement local du tube digestif, et la couche circulaire interne, permettant de moduler le diamètre de la lumière du tube digestif. Entre ces deux couches musculaires se situe le plexus myentérique, aussi appelé plexus d'Auerbach.

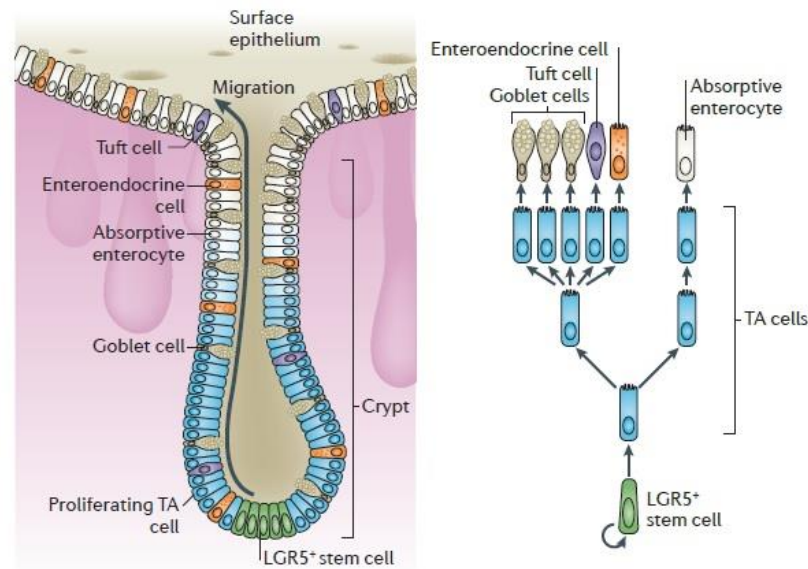
La sous-muqueuse est composée d'un tissu conjonctif contenant de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que le plexus sous-muqueux, aussi appelé plexus de Meissner.

La muqueuse colique est séparée de la sous-muqueuse par une fine couche de fibres musculaires appelée musculaire muqueuse. La muqueuse se compose d'un tissu conjonctif lâche appelé lamina propria ou chorion, contenant un tissu lymphoïde diffus et des follicules lymphoïdes, ainsi que des capillaires sanguins et des fibres nerveuses. La lamina propria est tapissée sur sa face interne d'une monocouche de cellules épithéliales qui reposent sur une lame basale constituée de protéines et de glycoprotéines. Les cellules épithéliales sont en contact direct avec la lumière du tube digestif et forment la barrière épithéliale colique, organisée en surfaces planes ponctuées d'invaginations cryptiques.

### 1.3. Organisation cellulaire de l'épithélium colique

L'épithélium colique est formé d'une monocouche de cellules épithéliales qui s'organise en une succession d'invaginations appelées cryptes et de surfaces planes. Au fond des cryptes se trouvent les cellules souches (CS) épithéliales coliques capables d'auto-renouvellement et de multipotence. Les CS coliques se divisent pour donner naissance à des cellules progénitrices (transit-amplifying cells) qui vont se diviser activement et se différencier en progéniteurs du lignage absorbant ou sécrétoire tout en migrant vers le sommet des cryptes, afin de générer l'ensemble des types cellulaires différenciés post-mitotiques qui compose la partie haute des cryptes et les surfaces planes de l'épithélium (Barker, 2013). Au niveau des surfaces planes et du sommet des cryptes, les cellules entrent en anoikis, qui est une forme de mort cellulaire programmée provoquée par le détachement de la cellule à la matrice extracellulaire (Kaeffer, 2011).

Il existe différents types de cellules différenciées au sein de l'épithélium colique que l'on peut regrouper en deux catégories basées sur leurs fonctions : les cellules absorbantes et les cellules sécrétrices (Figure 3).



**Figure 3 : Organisation cellulaire de l'épithélium colique.** Les cellules souches intestinales (en vert) sont localisées dans le fond de la crypte et donnent naissance aux cellules progénitrices ou transit-amplifying cells (en bleu) qui se multiplient puis se différencient afin de donner naissance à l'ensemble des cellules épithéliales intestinales différenciées des lignages absorbatif et sécrétoire. D'après Barker et al, 2013.

### 1.3.1. Les cellules différenciées de l'épithélium colique

#### 1.3.1.1. Les cellules absorbantes

Les cellules absorbantes, appelées cœlonocytes, sont les cellules majoritaires de l'épithélium colique. Elles sont caractérisées par leur forme cylindrique et par la présence à leur pôle apical de microvillosités constituant une bordure en brosse. Ces cellules ont pour fonction d'absorber de manière sélective l'eau et les électrolytes, ainsi que certains nutriments non absorbés par l'intestin grêle.

### 1.3.1.2. Les cellules sécrétrices

Les cellules sécrétrices de l'épithélium colique correspondent aux cellules de Goblet et aux cellules entéroendocrines.

Les cellules de Goblet, aussi appelées cellules muco-sécrétantes ou caliciformes, sont présentes au sein de l'épithélium intestinal en proportion croissante depuis le duodénum jusqu'au côlon distal, conjointement avec l'augmentation du nombre d'organismes microbiens présents dans la lumière digestive (Barker, 2013). Les cellules de Goblet se caractérisent par la présence à leur pôle apical d'un grand nombre de granules contenant des glycoprotéines appelées mucines. La libération des mucines dans la lumière colique par exocytose permet la formation d'une couche de mucus à la surface de l'épithélium. La couche de mucus joue un rôle important dans la protection de l'épithélium face aux éléments potentiellement pathogènes présents dans la lumière du tube digestif, et permet également la lubrification des parois de l'intestin pour faciliter le passage du bol alimentaire et l'évacuation des fèces.

Les cellules entéroendocrines représentent moins d'1% des cellules épithéliales coliques. Elles sont caractérisées par la présence de nombreux granules de sécrétion au niveau baso-latéral. Il existe plus d'une dizaine de sous-types différents, selon la nature des substances qu'elles libèrent telles que la cholécystokinine, la sécrétine, le GIP (gastric inhibitory polypeptide), la motiline ou encore la neurotensine. Les trois sous-types prédominants sont : les cellules entérochromaffines qui produisent de la sérotonine (5-HT), les cellules entéroendocrines de type D dont le principal produit de sécrétion est la somatostatine, et les cellules entéroendocrines de type L produisant le PYY (PP-like peptide with N-terminal tyrosine amide). Le nombre et la proportion relative de ces différents sous-types varient le long de l'intestin. Ainsi, la variété de cellules entéroendocrines est moins importante dans le côlon que dans l'intestin grêle. Les cellules entéroendocrines les plus abondantes au sein de l'épithélium colique sont les cellules entérochromaffines. Les cellules sécrétrices de cholécystokinine, de sécrétine, de GIP (gastric inhibitory polypeptide), de motiline ou encore de neurotensine ne sont en revanche pas présentes dans

le côlon (Rindi et al., 2004). Les cellules entéroendocrines ont pour fonction de détecter le contenu luminal ainsi que des distorsions mécaniques et d'y répondre *via* la sécrétion de différentes substances qui peuvent avoir une action paracrine ou endocrine, participant ainsi au contrôle des fonctions digestives et aux communications entre le tube digestif et le système nerveux central (Gunawardene et al., 2011).

### 1.3.2. Les autres populations cellulaires différenciées

Trois autres types cellulaires à activité sécrétoire sont également présents dans l'épithélium colique : les cellules Tuft, les cellules M (Microfold) et les cellules « crypt base secretory cells ».

Les cellules Tuft représentent moins d'1% des cellules de l'épithélium (Gerbe et al., 2011). Elles expriment les marqueurs Dcl1, CK-18, COX-2 et possèdent des neurofilaments (Gerbe et al., 2012). Elles présentent une morphologie particulière caractérisée par la présence de microvillosités apicales qui se projettent dans la lumière intestinale. Les cellules Tuft semblent être impliquées dans la chimio-réception, la production d'opioïdes (Gerbe et al., 2011), ainsi que dans la réponse immunitaire, notamment face aux infections parasitaires (Gerbe and Jay, 2016).

Les cellules M (Microfold cells) ont également un rôle important dans l'immunité intestinale. En effet, elles ont pour fonction de phagocyter les bactéries et les antigènes de la lumière du tube digestif pour les transporter à travers la barrière épithéliale et les présenter aux cellules immunitaires sous-jacentes au niveau des agrégats de follicules lymphoïdes que sont les plaques de Peyer (Mabbott et al., 2013; Ohno, 2016).

Récemment, deux études ont mis en évidence la présence d'un type cellulaire différencié présent au fond des cryptes coliques et intercalées entre les CS coliques. Ces cellules, exprimant les marqueurs cKit et Reg4, sont appelées « crypt base secretory cells » ou « Paneth-like cells » et semblent promouvoir le maintien des fonctions souches au niveau des cryptes coliques, d'une manière similaire au rôle des cellules

de Paneth sur le maintien des fonctions souches de la crypte intestinale, notamment via l'expression des ligands Notch Dll1 et Dll4 (Rothenberg et al., 2012; Sasaki et al., 2012).

#### 1.4. Les cellules souches coliques

L'épithélium colique se renouvelle entièrement tous les 3 à 7 jours en fonction des espèces (Barker, 2013). Ce rapide renouvellement est permis par les CS coliques, localisées au fond des cryptes. Les CS coliques sont définies fonctionnellement par deux caractéristiques : leur capacité d'auto-renouvellement, permettant le maintien d'un pool de CS tout au long de la vie de l'individu, et leur multipotence, permettant la formation de tous les différents types cellulaires différenciés qui composent l'épithélium colique.

##### 1.4.1. Mise en évidence et techniques d'étude des CS coliques

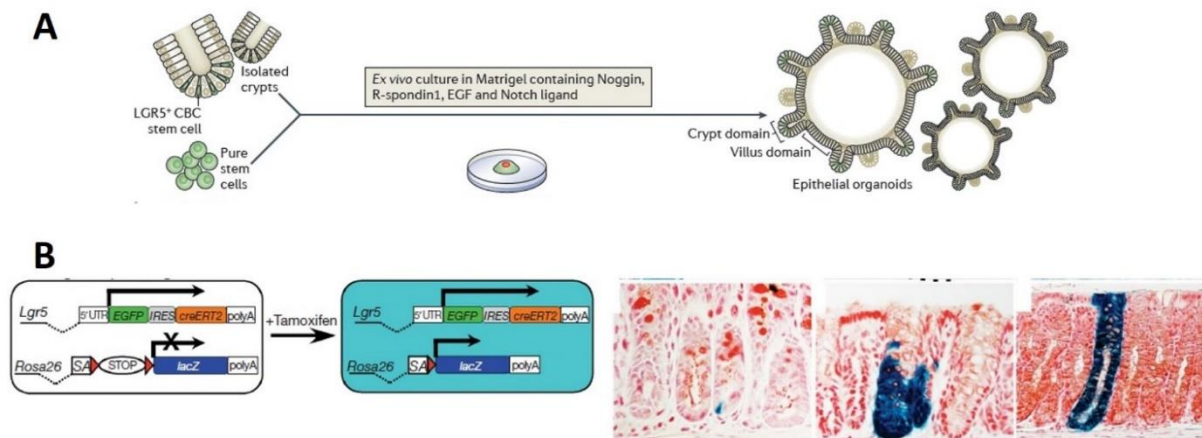
La présence d'un compartiment souche au fond des cryptes coliques a été mise en évidence dans les années 1950 et 1960 par des expériences utilisant la thymidine tritiée. Cette technique a permis de décrire la présence d'une zone proliférative au fond des cryptes, visualisée par la néosynthèse d'ADN, et une zone de cellules différenciées en haut des cryptes et au niveau des surfaces planes coliques et des villosités intestinales (Lipkin and Quastler, 1962; Lipkin et al., 1963; Quastler and Sherman, 1959). Ces études ont servi de base pour formuler l'hypothèse selon laquelle l'ensemble des cellules différenciées de l'épithélium intestinal provient d'un petit nombre de cellules multipotentes localisées au niveau des cryptes intestinales et coliques (Cheng and Leblond, 1974; Potten, 1977).

Cette hypothèse a depuis été validée par différentes études montrant que l'ensemble des cellules épithéliales coliques provient d'un petit nombre de CS présentes au niveau des cryptes (Barker et al., 2007; Powell et al., 2012; Schepers et al., 2011).

Aujourd'hui, les deux techniques principales pour la mise en évidence et l'étude des propriétés des CS coliques sont *in vitro* la culture en 3 dimensions de cryptes ou de CS isolées et *in vivo* les modèles génétiques de lineage tracing.

Les modèles de culture en 3 dimensions de cryptes coliques ou de CS isolées permettent de maintenir les capacités d'auto-renouvellement et de multipotence des CS qui forment des structures multicellulaires, souvent appelées « organoïdes », composées de zones « cryptiques » contenant les CS et de zones intercryptes composées de cellules différenciées. Ces modèles de culture utilisent principalement comme matrice du Matrigel, composé de laminine, de collagène IV et entactine, associé à un milieu de culture contenant différents facteurs de croissance (Figure 4A).

L'étude des CS intestinales et coliques *in vivo* peut se faire *via* l'utilisation de modèles génétiques de lineage tracing. Cette technique se base sur une construction génétique permettant d'induire l'expression d'un gène rapporteur stable et héréditaire au sein d'une sous population cellulaire définie. Ce gène rapporteur est alors transmis à l'ensemble des cellules filles issues de cette sous-population, permettant de visualiser les capacités d'auto-renouvellement et de multipotence de cette sous-population cellulaire étudiée (Figure 4B). Ces cellules peuvent également être isolées et cultivées en 3 dimensions pour des études de lineage tracing *in vitro*.



**Figure 4 : Techniques d'études des cellules souches intestinales et coliques. A)** Les cellules souches peuvent être cultivées in vitro dans un système de culture en 3 dimensions en Matrigel, permettant la formation de structures tridimensionnelles appelées organoïdes. D'après Barker et al, 2014. **B)** Les cellules souches peuvent être étudiées in vivo par des modèles transgéniques de lineage tracing. Exemple de lineage tracing dans l'épithélium colique, utilisant le gène rapporteur Rosa26-LacZ et une cre-recombinase inducible par injection de tamoxifène sous contrôle du promoteur Lgr5 (Lgr5-EGFP-IRES-creERT2). D'après Barker et al, 2007.

#### 1.4.2. Hétérogénéité et plasticité des CS coliques

A partir du début des années 2000, des marqueurs du compartiment prolifératif des cryptes coliques ont été décrits. C'est le cas de Musashi-1 (Nishimura et al., 2003) ou encore des marqueurs Ephrin type-B receptor 2 (EPHB2) et SRY-related HMG-box 9 (Sox9) (Jung et al., 2011; Ramalingam et al., 2012). En 2007, le groupe de Clevers publie la première étude identifiant un marqueur « spécifique » des CS coliques. En utilisant un modèle murin de lineage tracing pour étudier le marqueur Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5), ces travaux montrent que l'expression de Lgr5 est spécifique d'une population cellulaire présente au fond des cryptes coliques et capable de générer l'ensemble des cellules différenciées qui compose l'épithélium (Barker et al., 2007). L'étude du transcriptome des cellules Lgr5<sup>+</sup> a permis de mettre en évidence OLFM4 comme marqueur des CS coliques humaines (van der Flier et al., 2009a). En 2012, un autre modèle de lineage tracing a également identifié Lrig1 comme marqueur des CS



coliques (Powell et al., 2012). D'autres marqueurs des CS coliques ont aussi été identifiés, tels que PHLDA1 (Sakthianandeswaren et al., 2011), ou plus récemment PTK7 (Jung et al., 2015).

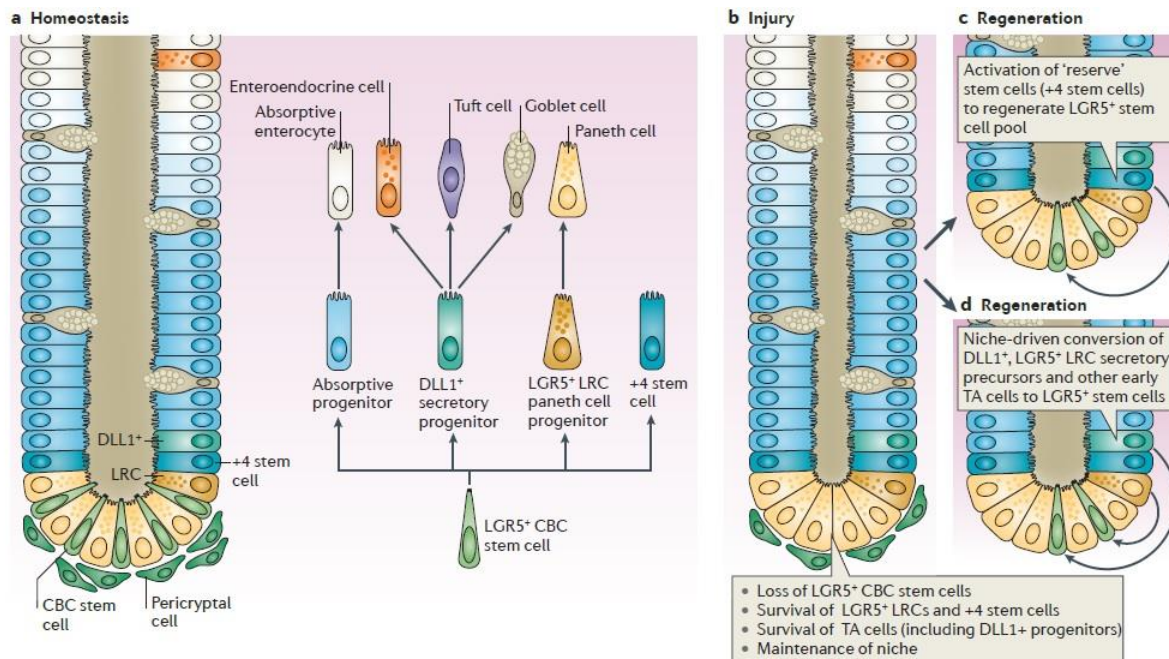
De manière intéressante, les marqueurs Lgr5 et Lrig1 sont rarement co-localisés dans les mêmes CS coliques (Powell et al., 2012). De plus, les CS coliques Lrig1<sup>+</sup> possèdent une fréquence de division cellulaire plus lente que les CS coliques Lgr5<sup>+</sup> et ont également des différences de niveaux d'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou dans la réponse au stress oxydatif. Ces données suggèrent une hétérogénéité au sein des CS coliques. Cette potentielle hétérogénéité est à mettre en parallèle avec l'état des connaissances actuelles concernant les CS intestinales et leur interprétation.

En effet, dans l'épithélium intestinal, deux modèles de CS ont été proposés. Le premier correspond aux CS intestinales appelées « crypt based columnar cells » (CBC), décrites à l'origine par les travaux de Cheng et Leblond (Cheng and Leblond, 1974). Cette population de CS intestinales est présente au fond des cryptes, intercalée entre les cellules de Paneth. Elle est identifiée par les marqueurs Lgr5 (Barker et al., 2007), Ascl2 (van der Flier et al., 2009b), Olfm4 (van der Flier et al., 2009a) et Smoc2 (Muñoz et al., 2012).

Le deuxième modèle de CS intestinales, appelée « label-retaining cells » (LRC) et originellement décrit par les travaux de Potten (Potten, 1977), est localisé en position +4 sur l'axe crypto-villositaire (la position 0 correspondant à la cellule présente au plus profond dans la crypte). Différents marqueurs des CS intestinales de la position +4 ont été proposés tels que Bmi1 (Sangiorgi and Capecchi, 2008), mTert (Montgomery et al., 2011), Lrig1 (Schepers et al., 2011), Hopx (Takeda et al., 2011) ou encore Dcamkl-1 (May et al., 2008). Ces deux populations, toutes deux possédant des propriétés souches démontrées par lineage tracing et/ou culture de CS isolées *in vitro*, interviennent dans le maintien de l'homéostasie épithéliale et dans les processus de réparation consécutifs à un endommagement de la crypte. Les CBC, possèdent un rythme de prolifération relativement rapide (Schepers et al., 2011) et sont considérées

comme les CS intestinales à l'origine du renouvellement continu physiologique des cellules de l'épithélium. Les LRC, également appelées CS intestinales facultatives ou de réserve, possèdent une vitesse de prolifération plus lente. Cependant, après endommagement des cryptes intestinales, ces cellules se divisent plus fréquemment afin de participer à la régénération des cryptes. En effet, des études ont suggéré que les LRC étaient plus résistantes que les CBC à l'irradiation et qu'elles étaient capables, après l'ablation des CBC par irradiation ou par délétion génétique, de reformer les cryptes intestinales et de maintenir le renouvellement continu de l'épithélium (Tian et al., 2011; Yan et al., 2012). Ces études ont également permis de démontrer que chacun des types de CS intestinales peut donner naissance à l'autre (Takeda et al., 2011; Tian et al., 2011; Yan et al., 2012). De manière intéressante, les études de régénération des cryptes intestinales après irradiation ont montré que certaines cellules de l'épithélium considérées jusque-là comme des cellules différenciées post-mitotiques étaient capables d'acquérir un phénotype de CS active. Ainsi, en utilisant le modèle murin transgénique Sox9-EGFP, où l'EGFP est exprimée sous le contrôle de séquences régulatrices du promoteur de Sox9, une étude a montré que les cellules Sox9-EGFP<sup>High</sup> de l'épithélium intestinal, exprimant les marqueurs des cellules entéroendocrines et des cellules LRC, étaient capables d'acquérir un phénotype de CS active après irradiation (Van Landeghem et al., 2012). Un mécanisme similaire a également été mis en évidence dans les cellules Dll1<sup>High</sup>, qui correspondent à des progéniteurs précurseurs du lignage sécrétoire, et étaient ainsi capables de réacquérir un phénotype de CS active après irradiation (van Es et al., 2012a). D'autres études ont également mis en évidence ce phénomène à partir de cellules précurseurs des entérocytes ou des cellules de Paneth et des cellules entéroendocrines (Buczacki et al., 2013; Tetteh et al., 2016). L'ensemble de ces études suggère ainsi que les cellules épithéliales intestinales, ou tout du moins les progéniteurs des lignages absorbant et sécrétoire, possèdent une certaine plasticité, et peuvent ainsi réacquérir un phénotype souche afin d'assurer le maintien constant de l'homéostasie de l'épithélium intestinal et colique (Figure 5). De manière plus générale, ces données suggèrent que l'état souche ou différencié d'une

cellule n'est pas une propriété intrinsèque des cellules mais est régulé de façon dynamique par des signaux externes issus du microenvironnement qui entoure les CS intestinales et coliques.



**Figure 5: Organisation cellulaire des cryptes intestinales. A)** A l'état physiologique, les cryptes intestinales contiennent deux populations de CS intestinales : les CBC présentes au fond des cryptes, qui sont à la base du renouvellement continu de l'épithélium et les LRC présentes en position +4 sur l'axe crypto-villositaire. **B,C)** Lors d'un endommagement de la crypte intestinale, les LRC acquièrent un phénotype de CS actives et participent à la régénération de la crypte intestinale. Ce phénomène peut également faire intervenir d'autres cellules de la crypte qui réacquièrent des propriétés souches pour permettre la réparation de la crypte. D'après Barker et al, 2014.

### 1.5. Le microenvironnement des CS coliques

Le microenvironnement de l'épithélium colique se compose de l'ensemble des éléments cellulaires et moléculaires situé à proximité de l'épithélium. Ce microenvironnement intervient dans le contrôle des fonctions de l'épithélium. Au niveau des cryptes coliques, ce microenvironnement forme une niche qui régule les fonctions des CS coliques. On peut distinguer deux composantes principales de cette niche : le microenvironnement moléculaire et le microenvironnement cellulaire.

### 1.5.1. Le microenvironnement moléculaire

Les CS coliques sont régulées par un grand nombre de signaux moléculaires extrinsèques présents au sein du microenvironnement. Ces signaux activent ou inhibent notamment les voies de signalisation régulatrices de l'activité des CS coliques, dont les voies Wnt, Notch et BMP.

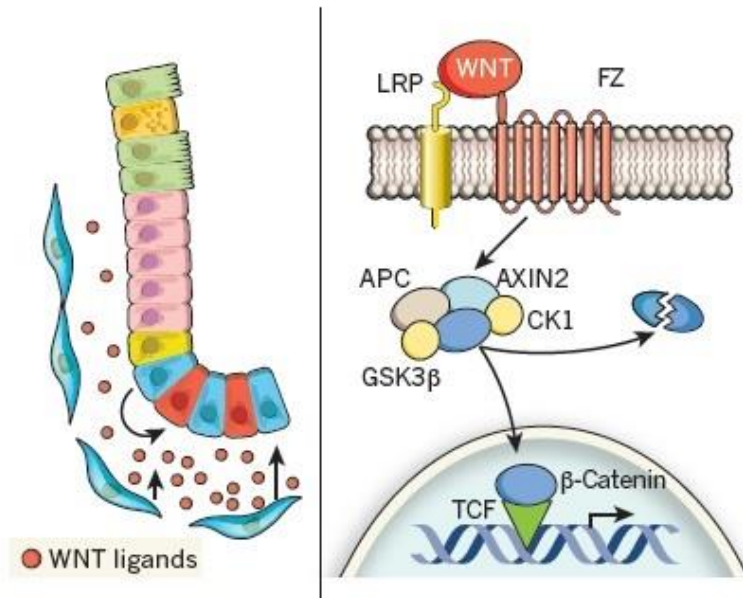
#### 1.5.1.1. La voie Wnt

Il existe des voies Wnt canoniques et non canoniques. La composante moléculaire principale de la voie Wnt canonique est la protéine  $\beta$ -caténine. Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la  $\beta$ -caténine est séquestrée dans le cytoplasme par un complexe multimérique composé des protéines kinases CK1 et GSK-3 $\beta$ , ainsi que des protéines d'échafaudage Axin et APC. Ce complexe de séquestration provoque la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur sa partie N-terminale, permettant son ubiquitination et entraînant sa dégradation par le protéasome. L'activation de la voie Wnt se fait par la liaison d'un ligand de la voie Wnt sur un récepteur membranaire Frizzled et co-récepteur Lipoprotein receptor related protein 5/6 (LRP 5/6). Cette liaison entraîne la phosphorylation du co-récepteur, provoquant le recrutement de l'axine à la membrane, ainsi que l'activation de la protéine Disheveled (Dvl). Ce phénomène entraîne la dissociation du complexe de dégradation, et ainsi la libération de la  $\beta$ -caténine qui va alors se transloquer dans le noyau. La  $\beta$ -caténine nucléaire va s'associer au facteur de transcription TCF/LEF afin d'activer la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et le maintien des fonctions souches tels que c-myc, cyclin D1, Ascl2, EphB2 ou encore Lgr5 (Krausova and Korinek, 2014).

Les ligands de la voie Wnt canonique, tels que Wnt-2b et Wnt-3a, sont présents dans le microenvironnement de l'épithélium selon un gradient de concentration croissant vers la base des cryptes. Ainsi l'activation de la voie Wnt ou « l'activité Wnt » est très marquée au niveau du compartiment souche des cryptes coliques (Gregorieff et al., 2005) (Figure 6). La voie Wnt a pour rôle de stimuler la

prolifération et de maintenir l'état souche des cellules souches intestinales et coliques. En effet, la délétion conditionnelle de la  $\beta$ -caténine chez des souris adultes entraîne une disparition des cryptes intestinales (Fevr et al., 2007; Ireland et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus suite à la délétion de l'effecteur TCF4 (van Es et al., 2012b), ou la surexpression de Dkk1, un antagoniste de Wnt (Kuhnert et al., 2004). Les ligands Wnt peuvent être produits par les cellules stromales et épithéliales. De manière intéressante, il a été montré, dans un modèle murin où la production épithéliale des ligands Wnt est inhibée, que les ligands Wnt produits par les cellules stromales de la niche permettent le maintien de l'homéostasie de l'épithélium (Kabiri et al., 2014). De plus, une autre étude a montré que l'inhibition de la sécrétion des ligands Wnt au sein de l'épithélium et/ou dans les myofibroblastes de la niche n'avait pas d'impact sur l'épithélium, suggérant que plusieurs types cellulaires participent à la production des ligands Wnt dans la niche (San Roman et al., 2014). Ces études montrent ainsi que la niche a un rôle majeur dans le maintien de l'activité de la voie Wnt au niveau des cryptes, et que la voie Wnt est essentielle au maintien des propriétés souches des cellules de la crypte.

Il existe également des voies Wnt non canoniques qui sont indépendantes de l'activité de la  $\beta$ -caténine. Parmi ces voies non canoniques, les mieux caractérisées sont les voies Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ . La voie Wnt/PCP fait intervenir les GTPases Rac1 et RhoA et les protéines kinases ROCK et JNK. La voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  passe par l'activation de la phospholipase C et l'activation de kinases calcium dépendantes (Krausova and Korinek, 2014). Ces voies peuvent avoir des effets antagonistes à la voie Wnt canonique (Miyoshi, 2017) et leurs ligands tels que Wnt-5a ou Wnt-5b sont généralement présents en haut des cryptes (Miyoshi, 2017). Cependant, des études ont montré que les voies Wnt non canoniques pouvaient être impliquées dans la régénération des cryptes après irradiation en stimulant les propriétés souches des CS coliques (Sémont et al., 2013).



**Figure 6 : Régulation de l'activité de la voie Wnt.** La fixation d'un ligand Wnt sur son récepteur Frizzled, et son corécepteur LRP induit la libération de la  $\beta$ -caténine, jusqu'ici séquestrée par un complexe multiprotéique de dégradation composé des protéines APC, Axin, GSK3 $\beta$  et CK1. La  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis est transloquée dans le noyau où elle se lie avec le facteur de transcription TCF pour induire la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. Les ligands de la voie Wnt sont présents dans le microenvironnement à proximité des CS coliques. L'activité de la voie Wnt dans les CS coliques stimule la prolifération et le maintien de leur état souche. D'après Medema et Vermeulen, 2011.

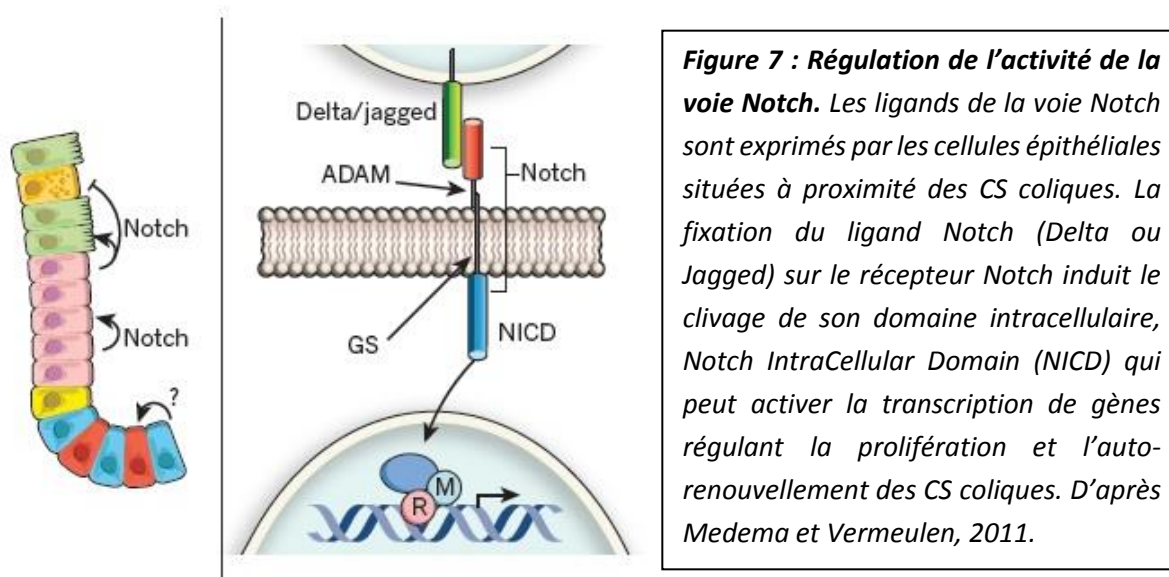
#### 1.5.1.2. La voie Notch

L'activité de la voie Notch repose sur des interactions cellule/cellule entre les récepteurs Notch et des ligands membranaires (bien qu'il existe également des formes solubles) qui sont les ligands Delta-like (Dll) et les ligands Jagged (Jagged-1 et Jagged-2).

L'activation du récepteur Notch par un ligand conduit à un changement conformationnel du récepteur. Il en résulte un clivage de sa partie extracellulaire qui est libérée dans le milieu extracellulaire, et de son domaine intracellulaire NICD qui va alors se transloquer dans le noyau. Dans le noyau, NICD interagit avec le facteur de transcription CBF1/CSL ainsi que des co-activateurs et active la transcription

de différents gènes (Figure 7). La voie Notch présente un gradient d'activité croissant vers le fond de la crypte induit par une forte expression des ligands de la voie Notch par les cellules épithéliales qui entourent les CS coliques. Plus spécifiquement, les cellules de Paneth dans l'intestin et les cellules « Paneth-like cells » au fond des cryptes coliques expriment les ligands Notch Dll1 et Dll4 (Rothenberg et al., 2012; Sasaki et al., 2012).

En utilisant des modèles génétiques de délétion inductible sous contrôle du promoteur du gène Villin exprimé dans tout l'épithélium intestinal et colique (El Marjou et al., 2004), des études ont montré que l'inactivation de la voie Notch dans l'épithélium intestinal conduit à la perte des cellules souches et des cellules progénitrices et provoque une augmentation du nombre de cellules sécrétrices (Carulli et al., 2015; van Es et al., 2005). L'inhibition de la voie Notch dans l'épithélium colique a un effet similaire. En effet, la délétion inductible des ligands Dll1 et Dll4 provoque une perte totale des cellules en phase active du cycle cellulaire ainsi qu'une conversion intégrale des cellules progénitrices en cellules de Goblet (Pellegrinet et al., 2011). Ces résultats montrent que la voie Notch a un rôle essentiel dans le maintien de l'auto-renouvellement et de la prolifération des cellules souches intestinales et coliques, mais également dans la spécification des cellules progénitrices vers le lignage absorbant.

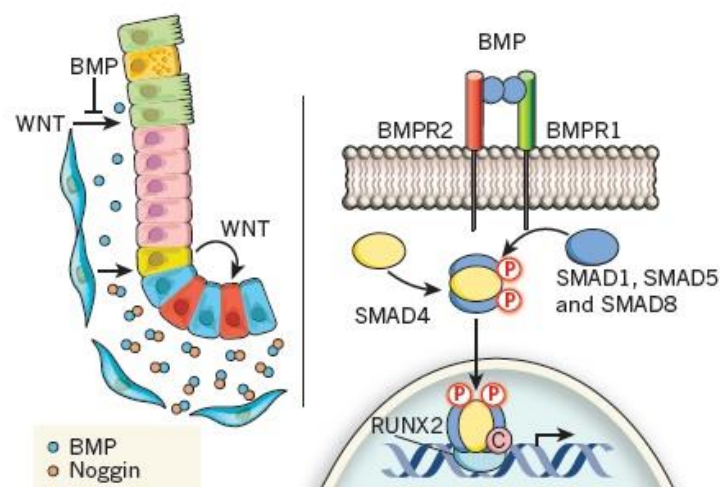


### 1.5.1.3. La voie des BMP

Les protéines BMP (Bone morphogenetic proteins) sont des facteurs solubles appartenant à la famille du TGF- $\beta$ . Elles se lient au récepteur sérine thréonine kinase BMPR2, provoquant le recrutement du récepteur BMP de type 1 (BMPR1) et la phosphorylation de BMPR1 par BMPR2. BMPR1 ainsi activé phosphoryle des protéines cytoplasmiques de type SMAD (SMAD1/5/8), formant un complexe dimérique avec SMAD4 qui transloque dans le noyau pour interagir avec des co-activateurs ou des co-répresseurs afin d'activer l'expression de gènes cibles intervenant dans l'inhibition de l'auto-renouvellement et de la prolifération des CS. Des études menées *in vivo* ont montré que l'inhibition de la voie des BMP provoque une expansion des cellules souches et des cellules progénitrices, ainsi que la formation de cryptes ectopiques dans l'épithélium intestinal (Haramis et al., 2004; He et al., 2004). De plus, BMP2 inhibe la prolifération et stimule la différenciation des cellules épithéliales coliques *in vitro* (Hardwick et al., 2004), et l'inhibition de BMP2 stimule la prolifération des cellules épithéliales coliques (Jin et al., 2013). La voie des BMP suit un gradient d'activité décroissant vers le fond de la crypte. Les ligands de la voie des BMP



interviennent dans la différenciation des cellules épithéliales situées en haut des cryptes. (Kosinski et al., 2007). En revanche, au fond des cryptes, la voie des BMP est inhibée par la présence d'antagonistes solubles des BMP, parmi lesquels Gremlin1 et 2, Chordin-like1 et Noggin qui sont produits par différentes cellules de la niche dont les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes (He et al., 2004; Kosinski et al., 2007) (Figure 8). Ces inhibiteurs de la voie des BMP permettent ainsi le maintien de la fonction souche et l'inhibition des processus de différenciation au sein du compartiment souche.



**Figure 8 : Régulation de l'activité de la voie des BMP.** La liaison d'un ligand BMP à son récepteur provoque la phosphorylation et l'activation des protéines SMAD 1, 5 ou 8, qui se lie à la protéine SMAD4 et provoque l'activation de gènes cibles de la voie. La voie des BMP est inhibée au fond des cryptes via la présence dans le microenvironnement d'inhibiteurs de cette voie, parmi lesquels Noggin, Gremlin1 et 2 ou encore Chordin-like1. L'inhibition de la voie des BMP permet le maintien de la fonction souche et l'inhibition des processus de différenciation au sein du compartiment souche. D'après Medema et Vermeulen, 2011.

### 1.5.2. Le microenvironnement cellulaire

Le microenvironnement cellulaire se compose de l'ensemble des cellules présentes à proximité directe des CS. Au sein de cette composante cellulaire, on retrouve les fibroblastes et myofibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules de l'immunité innée, les

cellules épithéliales, les cellules neurales ainsi que le microbiote. L'ensemble des données de la littérature montre que les cellules du microenvironnement jouent un rôle important dans le maintien des fonctions de l'épithélium et dans la régulation des fonctions des CS coliques *via* des communications bidirectionnelles paracrines ou juxtacrines (Meran et al., 2017; Owens, 2015; Powell, 2005).

Parmi les nombreux types cellulaires qui composent le microenvironnement cellulaire, l'impact des fibroblastes sur les CS intestinales et coliques a particulièrement été étudié. Des expériences ont en effet montré que les fibroblastes étaient capables de stimuler la formation et la croissance d'organoïdes produits à partir de cryptes intestinales cultivées en Matrigel, en absence de certains facteurs essentiels à la culture d'organoïdes tels que le FGF, Wnt3a ou encore la R-Spondin (Lahar et al., 2011; Lei et al., 2014). Une étude réalisée à partir de cryptes coliques a également montré que les fibroblastes étaient capables de stimuler la formation d'organoïdes par les cryptes coliques cultivées en Matrigel (Hirokawa et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les fibroblastes libèrent des facteurs paracrines intervenant dans la régulation des propriétés des CS intestinales et coliques.

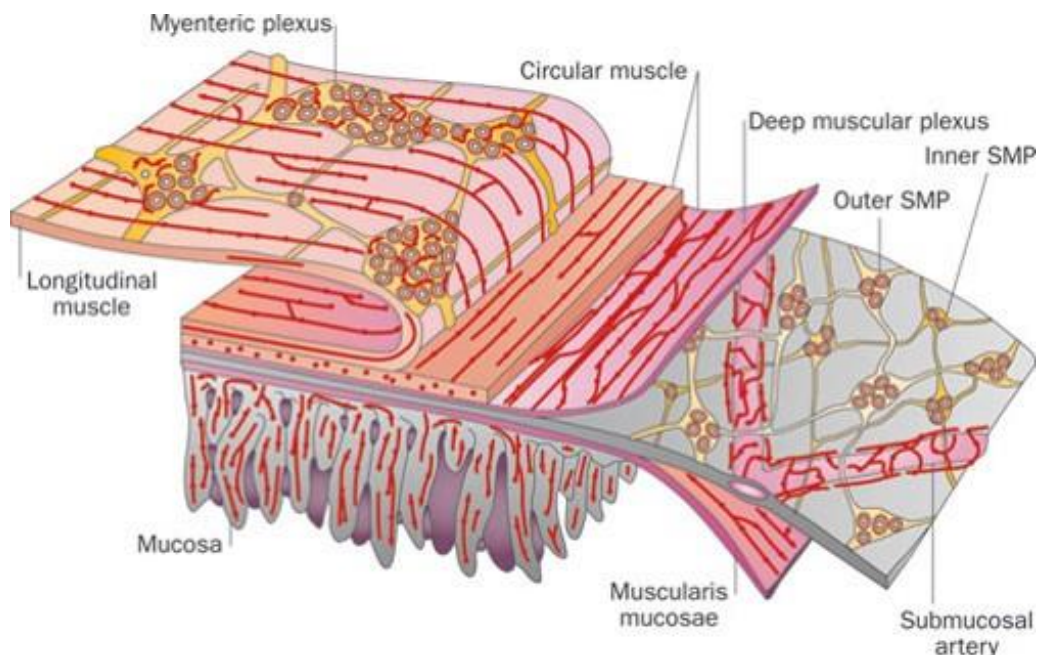
L'ensemble de ces résultats montre que les propriétés des CS coliques sont finement régulées par les différentes composantes du microenvironnement tumoral. Depuis une vingtaine d'années, un nombre croissant d'études montre qu'une autre composante du microenvironnement intervient dans la régulation des fonctions de l'épithélium intestinal et colique en situation physiologique et lors de pathologies du système digestif : le système nerveux entérique.

## 2. Le système nerveux entérique

### 2.1. Généralités sur le système nerveux entérique

#### 2.1.1. Organisation du système nerveux entérique

Le système nerveux entérique (SNE) est un système nerveux autonome et intégratif présent dans la paroi du tube digestif, du tiers inférieur de l'œsophage jusqu'au rectum, ainsi que dans les glandes digestives annexes, à savoir les glandes salivaires, le pancréas ou encore la vésicule biliaire. Le SNE contrôle l'ensemble des fonctions intestinales telles que la motricité, la sécrétion de mucus, d'électrolytes et de sucs digestifs, l'absorption des nutriments et de l'eau, le flux sanguin, ainsi que les fonctions immunitaires et des processus inflammatoires (Goyal and Hirano, 1996). Le SNE est composé de plusieurs centaines de millions de neurones entériques, et 5 à 10 fois plus de cellules gliales entériques (CGE) selon les espèces (Furness, 2012). Anatomiquement, le SNE s'organise en deux plexus principaux correspondant à des structures ganglionnaires reliées entre elles par des fibres inter-ganglionnaires. Le plexus myentérique, également appelé plexus d'Auerbach, est localisé entre les couches musculaires lisses longitudinale et circulaire, et a pour rôle principal de réguler les fonctions motrices du tube digestif. Le plexus sous-muqueux, ou plexus de Meissner, est situé dans la sous-muqueuse, et régule notamment les fonctions d'absorption et de sécrétion de la muqueuse intestinale (Figure 9). Contrairement au plexus myentérique, le plexus sous-muqueux n'est présent que dans l'intestin et le côlon, et est subdivisé chez l'Homme en trois plexus distincts (Timmermans et al., 1997) : le plexus de Meissner à proprement parler, proche de la musculature muqueuse, le plexus de Schabadasch, proche de la couche musculaire lisse circulaire, et un plexus intermédiaire situé entre les deux premiers.



**Figure 9 : Organisation du système nerveux entérique.** Le SNE entérique est composé de deux plexus principaux : le plexus myentérique, localisé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire, et le plexus sous-muqueux, présent au sein de de la couche sous-muqueuse. D'après Furness et al., 2012.

### 2.1.2. Innervation extrinsèque du tube digestif

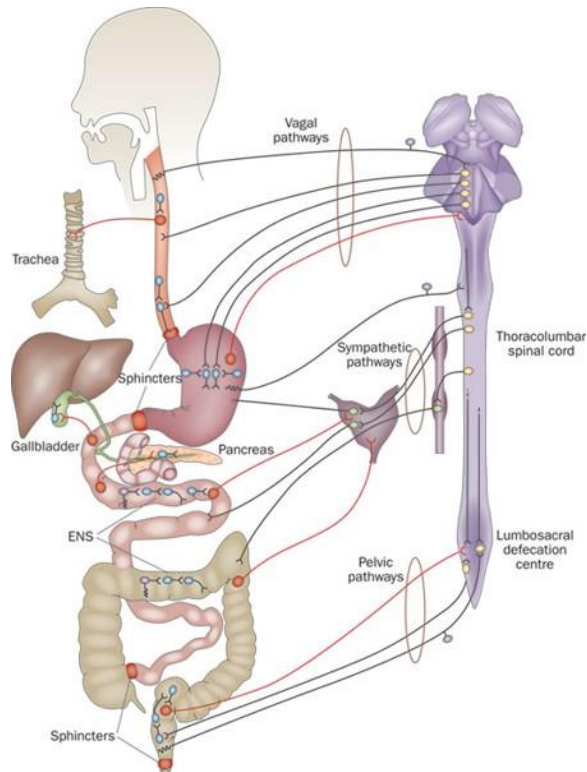
Le SNE communique avec le système nerveux central (SNC) par l'intermédiaire d'afférences et d'efférences du système nerveux autonome (Wilhelmsen, 2000). Cette innervation extrinsèque intervient dans le contrôle des fonctions motrices et sécrétoires du tractus digestif, mais également dans le contrôle de la satiété ou encore de la défécation (Furness, 2016). L'innervation extrinsèque du tube digestif comprend des innervations parasympathiques et sympathiques (Figure 10).

#### 2.1.2.1. Innervation parasympathique

Les neurones afférents parasympathiques proviennent du nerf vague. Ils innervent la muqueuse, les plexus entériques et les couches musculaires lisses de la paroi digestive, et sont sensibles aux distensions mécaniques de l'intestin ainsi qu'aux concentrations luminales en glucose, acides aminés ou acides gras à chaîne longue (Berthoud and Neuhuber, 2000). Ces afférences vagales communiquent avec le SNE *via* la libération d'acétylcholine (ACh). Les voies parasympathiques efférentes proviennent du nerf vague pour l'innervation de l'estomac au côlon transverse et du nerf sacré pour l'innervation du côlon distal au rectum. L'activation du système nerveux parasympathique conduit à une augmentation de l'excitabilité des neurones entériques qui contrôlent les fonctions motrices et sécrétoires.

#### 2.1.2.2. Innervation sympathique

Les neurones afférents sympathiques proviennent des nerfs splanchniques et sont principalement des nocicepteurs impliqués dans la détection de la douleur digestive en réponse à différents médiateurs inflammatoires tels que l'histamine ou la PGE2 (Grundy, 2002). Les neurones efférents sympathiques proviennent des ganglions coeliaques et mésentériques, et ont comme effet global d'induire une inhibition de l'excitabilité des neurones entériques (Iomax et al., 2009).



**Figure 10 : Innervation extrinsèque du tube digestif.** Le SNE communique avec le SNC par l'intermédiaire d'afférences et d'efférences du système nerveux sympathique et parasympathique. Les informations sensibles en provenance du tube digestif partent vers le SNC via des neurones extrinsèques primaires afférents. Les informations en provenance du SNC rejoignent le SNE via les voies vagues, sympathiques et les voies sacrées. D'après Furness et al., 2012.

## 2.2. Les neurones entériques

Le SNE contient plusieurs centaines de millions de neurones, qui peuvent être classés en différents sous-types en fonction de leur morphologie, leurs propriétés électrophysiologiques et leur codage neurochimique.

### 2.2.1. Classification

#### 2.2.1.1. Classification électrophysiologique

Outre leurs caractéristiques morphologiques, les neurones entériques peuvent être classés en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques, c'est-à-dire leur réponse aux stimuli électriques ou pharmacologiques. Deux classes de neurones ont ainsi été définies : les neurones S (Synaptic) et les neurones AH (After Hyperpolarisation). Les neurones S ont une morphologie de type Dogiel I ou III et

sont caractérisés par des potentiels d'action (PA) brefs suivis d'une phase d'hyperpolarisation courte. Les neurones AH ont une morphologie de type Dogiel II et sont caractérisés par une longue phase d'hyperpolarisation suivant le PA (Furness et al., 2004).

### 2.2.1.2. Classification par codage neurochimique

L'étude du codage neurochimique des neurones entériques a permis d'identifier une très grande diversité de neuromédiateurs sécrétés par les neurones entériques. En effet, plus d'une trentaine ont été recensés (Furness, 2000). Chaque neurone entérique exprime une combinaison de neuromédiateurs définissant son « codage neurochimique ». Les neuromédiateurs sont classés selon leur effet inhibiteur ou activateur sur les cellules cibles (Tableau 1).

Effet	Stimulation	Inhibition
Substances	Ach, ATP, 5-HT, Histamine, neurokinine A, SP, CCK, GRP, motiline, bombésine, opioïdes, TRH, PGE2	NO, VIP, SOM, GABA, CGRP, NPY, galanine, glucagon, neurotensine, PACAP, PHI, PYY, sérotonine, dopamine

*Ach (acétylcholine), ATP (Adénosine 5'-Triphosphate), CCK (Cholécystokinine), CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), GABA ( $\gamma$ -Amino-Butyric Acid), GRP (Gastrin Releasing Peptide), NO (Nitric Oxide), NPY (NeuroPeptide Y), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), PGE2 (Prostaglandine E2), PHI (Peptide Histidine Isoleucine), PYY (Peptide YY), SOM (Somatostatine), SP (Substance P), TRH (Thyrotropin Releasing Hormone), VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), 5-HT (ou sérotonine)*

**Tableau 1** : Diversité du codage neurochimique des neurones entériques classés selon leur fonction activatrice ou inhibitrice (D'après Hansen et al, 2003)

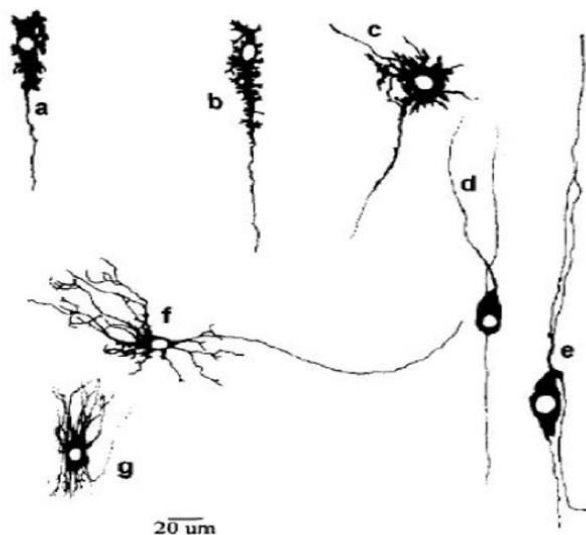
### 2.2.2. Fonctions des neurones entériques

D'un point de vue fonctionnel, les neurones entériques sont regroupés en trois catégories : les neurones afférents primaires intrinsèques qui détectent les modifications de l'environnement et les

transmettent à des voies réflexes, les interneurons qui intègrent et relayent l'information, et les neurones moteurs qui transmettent l'information aux cellules effectrices.

### 2.2.2.1. Classification morphologique

La plus ancienne classification des neurones entériques a été initiée par les travaux de Dogiel en 1899. Cette classification se base sur les caractéristiques morphologiques des neurones entériques (Figure 11). Dans cette classification, Dogiel décrit trois types de neurones dans l'intestin grêle du cobaye. Les neurones de type I sont caractérisés par un axone et de plusieurs dendrites courtes et lamellaires. Les neurones de type II possèdent un ou plusieurs axones mais pas de dendrites. Les neurones de type III sont uni-axonaux et disposent de plusieurs dendrites longues et/ou filamenteuses (Timmermans et al., 1997). Cette classification morphologique a ensuite été complétée pour répertorier 7 sous-types de neurones, les neurones de type I, II et III étant néanmoins les neurones majoritaires du SNE (Furness et al., 1988; Timmermans et al., 1997).



**Figure 11 : Classification morphologique de Dogiel des neurones entériques.** Les neurones entériques peuvent être classés en 3 types morphologiques majoritaires. (a-c) les neurones de type I, uni-axonaux à plusieurs dendrites courtes et lamellaires, ((d-e) les neurones de type II, adendritiques multi-axonaux, (f-g) les neurones de type III, uni-axonaux à plusieurs dendrites longues ou filamenteuses. D'après Timmermans et al, 1997.



### 2.2.2.2. Les neurones afférents primaires intrinsèques

Les neurones afférents primaires intrinsèques (de type Dogiel II et AH) représentent environ 20% des neurones du SNE. Ce sont les neurones initiateurs des boucles réflexes intrinsèques intervenant dans le contrôle des fonctions intestinales. Ce sont des neurones chimio- et mécano-sensibles qui détectent les changements chimiques de la lumière intestinale ou des distorsions mécaniques. Leur excitation peut être médiée par les cellules entérochromaffines (5-HT) ou d'autres cellules entéroendocrines sécrétant de la CCK ou de la motiline (Ahlman and Nilsson, 2001). Ils transmettent ces informations au circuit intégratif afin de modifier le flux sanguin, la motricité ou encore la sécrétion d'électrolytes. Ils expriment différents neuromédiateurs tels que l'Ach, la calbindine, la substance P ou encore la CGRP (Furness et al., 2004).

### 2.2.2.3. Les interneurones

Les interneurones (de type Dogiel III et AH ou S) sont les neurones majoritaires du SNE. Leur rôle est d'intégrer et de transmettre l'information sensitive relayée par les neurones afférents primaires intrinsèques aux neurones moteurs. Il existe des interneurones ascendants qui transmettent l'influx nerveux dans le sens oral, et les interneurones descendants qui transmettent l'influx nerveux dans le sens anal. L'étude du codage chimique des interneurones chez le cobaye a montré l'existence d'au moins un type d'interneurones ascendant et trois types d'interneurones descendants dans l'intestin grêle. Les interneurones ascendants communiquent entre eux *via* la libération d'Ach, et communiquent avec les neurones moteurs par libération d'Ach, de calrétinine et de Substance P (Bornstein et al., 2004). Les interneurones descendants de type Ach/5-HT sont impliqués dans les réflexes locaux moteurs et sécréto-moteurs. Les interneurones descendants de type Ach/somatostatine sont impliqués dans la propagation du complexe moteur myoélectrique migrant, correspondant à une succession de contractions qui se produisent à jeun pour permettre une vidange gastrique totale. Enfin, les neurones

descendants de type Ach/NO/VIP sont impliqués dans le réflexe péristaltique. Dans le côlon du cobaye, il existe 3 types d'interneurones ascendants et 4 types d'interneurones descendants de codages neurochimiques différents (Tableau 2). Le rôle précis de ces 7 types d'interneurones reste encore à définir (Smith et al., 2007).

Interneurones ascendants	Interneurones descendants
Type 1 : ACh/SOM/Calretinine/VIP	Type 1: ACh/VIP
Type 2: ACh/TK/ENK	Type 2: ACh/VIP/GRP/NOS/Calbindine
Type 3: ACh/NPY/±TK/±SOM	Type 3: ACh/5-HT/CGRP/Calbindine/Calretinine.
	Type 4 : NOS

**Tableau 2 :** Diversité du codage neurochimique des interneurones présents dans le côlon du cobaye. D'après Smith et al, 2007.

#### 2.2.2.4. Les neurones moteurs

Les neurones moteurs (de type Dogiel I et S) sont les effecteurs de la boucle réflexe. Il existe 5 types de neurones moteurs : les neurones excitateurs du muscle, les neurones inhibiteurs du muscle, les neurones sécréto-moteurs/vasodilatateurs, les neurones sécréto-moteurs/non vasodilatateurs et les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac. Ces derniers ne seront pas décrits ici. Les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs contrôlent la motricité du tube digestif en innervant les muscles circulaires et longitudinaux ainsi que la musculaire muqueuse. Les neurones excitateurs sont principalement de type cholinergique, et les neurones inhibiteurs sécrètent principalement du NO, du VIP et de l'ATP (Furness, 2000). Les neurones sécréto-moteurs innervent les artérioles de la muqueuse intestinale afin de réguler le flux sanguin et innervent la muqueuse pour réguler la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. Ils sont divisés en trois groupes : les neurones sécréto-moteurs/vasodilatateurs non cholinergiques co-exprimant le VIP, les neurones sécréto-

moteurs/vasodilatateurs cholinergiques co-exprimant la calrétinine, et les neurones sécréto-moteurs/non vasodilatateurs cholinergiques co-exprimant le neuropeptide Y (NPY) (Furness et al., 2003).

### 2.2.3. Rôle des neurones entériques dans le contrôle des fonctions gastro-intestinales

#### 2.2.3.1. Contrôle de la motricité digestive

La motricité digestive correspond à un ensemble de contractions/relaxations musculaires synchronisées qui permet le mélange, la progression et la fragmentation du bol alimentaire dans le tractus digestif. Au niveau intestinal et colique, deux mouvements moteurs principaux existent : le péristaltisme et la segmentation. Le péristaltisme correspond à un ensemble de contractions et relaxations musculaires synchronisées, comprenant des mouvements propulsifs, réalisés par la contraction circulaire du tube digestif en amont du bol alimentaire et une relaxation en aval empêchant le reflux, associés à des mouvements longitudinaux pour permettre la progression du bol alimentaire. La segmentation correspond à des mouvements de brassages du bol alimentaire avec les enzymes digestives, par des contractions annulaires oscillantes dues à l'activité « pacemaker » des cellules de Cajal. Les cellules de Cajal jouent un rôle de « pacemaker » en générant spontanément et à un rythme régulier des ondes électriques lentes qu'elles transmettent aux cellules musculaires lisses *via* des gap junctions, activant ainsi la contraction musculaire (Al-Shboul, 2013). Elles sont présentes dans toute la paroi du tube digestif au sein de la séreuse, des couches musculaires lisses longitudinales et circulaires ainsi que dans les plexus myentérique et sous-muqueux (Komuro, 2006).

Le réflexe péristaltique peut être déclenché sous l'effet d'un stimulus mécanique (provoqué par le déplacement du bol alimentaire) ou chimique (variation du pH, de l'osmolarité ou présence d'acides gras ou de lipides). Ces stimuli provoquent l'activation des neurones afférents primaires intrinsèques qui vont libérer des neuromédiateurs dont l'Ach, la Substance P ou la CGRP activant les interneurons ascendants

et descendants. Les interneurons ascendants sont connectés à des neurones moteurs excitateurs de type cholinergique induisant une contraction du muscle en amont du stimulus. Les interneurons descendants sont connectés aux neurones moteurs inhibiteurs qui provoquent une relaxation du muscle en aval *via* la libération de NOS et de VIP (Porter et al., 1997; Spencer et al., 1999).

### 2.2.3.2. Contrôle des fonctions de l'épithélium intestinal et colique

#### 2.2.3.2.1. Contrôle de la sécrétion d'ions et d'électrolytes

Les fonctions de sécrétion sont un processus essentiel permettant le maintien d'un équilibre entre l'absorption et la sécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau du tube digestif. Le contrôle de la sécrétion d'ions et d'électrolytes s'effectue *via* l'activation d'un arc réflexe sécréto-moteur. Les neurones afférents primaires intrinsèques qui initient cet arc réflexe peuvent être activés par différents stimuli tels que la 5-HT, libérée par les cellules entérochromaffines en réponse à une stimulation mécanique, ou le GLP-2, libéré par les cellules entéroendocrines à la suite d'une variation de la concentration de glucose (Shirazi-Beechey et al., 2011; Young, 2011). Les neurones afférents primaires intrinsèques vont ensuite activer *via* les interneurons les neurones sécréto-moteurs ascendants et/ou descendants, libérant respectivement de l'Ach et du VIP (Neunlist et al., 1998). Ces deux neuromédiateurs vont ensuite stimuler la sécrétion d'ions chlore et d'eau dans la lumière digestive et inhiber l'absorption d'ions sodium par les cellules épithéliales (Cooke, 2000).

#### 2.2.3.2.2. Contrôle de la perméabilité intestinale

La monocouche de cellules épithéliales intestinales forme une barrière physique entre la lumière du tube digestif et l'organisme. Cette barrière épithéliale intestinale (BEI) a une double fonction : assurer le

passage des nutriments et d'électrolytes et protéger l'organisme en limitant le passage d'agents pathogènes ou toxiques. Ces deux fonctions sont assurées par le contrôle de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire de la BEI. La perméabilité paracellulaire permet le passage de molécules entre les cellules épithéliales. Elle est contrôlée principalement par les jonctions cellule-cellule appelées jonctions serrées, dont la taille et composition des pores définissent la taille et la charge des protéines qui les traversent. Les jonctions serrées sont constituées de protéines membranaires telles que les occludines, claudines, ou JAM connectées au cytosquelette par un complexe multi-protéique composé de protéines de la famille des zonula occludens (ZO-1,2,3) et de la cinguline. Quant à la perméabilité transcellulaire, elle permet le passage de nutriments, d'eau et d'électrolytes à travers les entérocytes, de manière passive ou active, par diffusion, par l'intermédiaire de transporteurs ou par endocytose pour les grosses molécules.

Différentes études ont montré que les neurones entériques régulent la perméabilité paracellulaire et transcellulaire de la BEI. En effet, il a été montré *in vitro* dans un modèle de co-culture de plexus sous-muqueux humain et d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales que la stimulation électrique de neurones entériques induisait une diminution de la perméabilité paracellulaire de la BEI en augmentant l'expression de la protéine ZO1 *via* la libération de VIP (Neunlist et al., 2003). Il a également été montré que le VIP prévenait l'augmentation de la perméabilité de la BEI provoquée par la translocation cytoplasmique des protéines ZO-1, Occludine et Claudin-3 induite par *Citrobacter rodentium* (Conlin et al., 2009). Des études *in vivo* ont également montré par délétion constitutive des récepteurs à l'ocytocine que les neurones ocytocinergiques réduisaient la perméabilité paracellulaire intestinale chez la souris (Welch et al., 2014). D'autre part, des études menées chez le cochon ont montré qu'une stimulation électrique des racines sacrées induisait une diminution de la perméabilité paracellulaire (Meurette et al., 2012), suggérant que l'activation des neurones entériques par les racines sacrées régule la perméabilité de la BEI. D'autres neuromédiateurs semblent également réguler la perméabilité de la BEI. Des travaux *in vitro* réalisés à partir de segments d'intestin ont montré que l'Ach ou la substance P augmentait la perméabilité

paracellulaire et transcellulaire (Cameron and Perdue, 2007; Hayden and Carey, 2000). Ces résultats suggèrent que les neurones entériques augmentent ou diminuent la perméabilité de la BEI *via* la sécrétion de neuromédiateurs spécifiques.

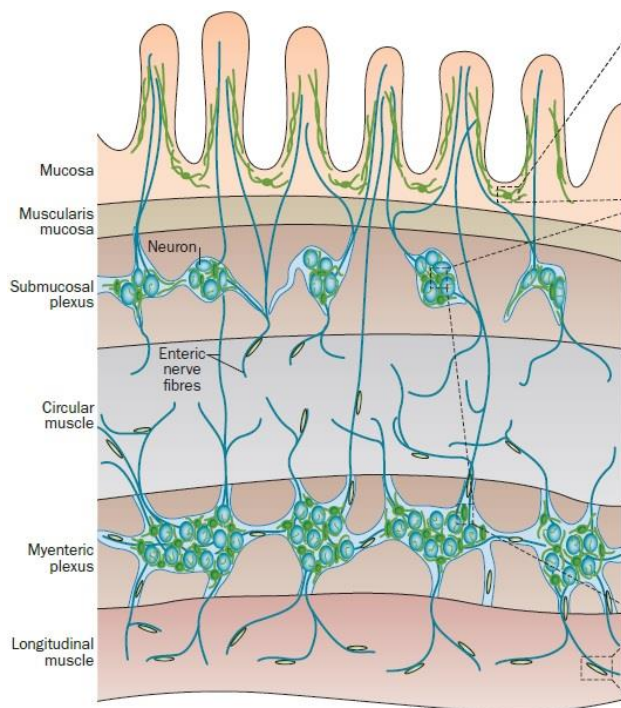
#### 2.2.3.2.3. Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales coliques

Les neurones entériques régulent les mécanismes de prolifération cellulaire au sein de l'épithélium intestinal et colique *via* la sécrétion de neuromédiateurs. En effet, l'ablation chimique partielle du plexus myentérique dans le côlon de rat induit une hyperplasie et une hyperprolifération des cellules épithéliales intestinales (See et al., 1990; Zucoloto et al., 1988). Dans un modèle *in vitro* de co-culture de plexus sous-muqueux avec une monocouche de cellules épithéliales intestinales, une étude a montré que l'activation électrique des neurones entériques diminue la prolifération des cellules épithéliales *via* une voie VIPergique (Toumi et al., 2003). De plus, l'étude de l'effet de différents neuromédiateurs sur la prolifération des cellules épithéliales ont montré que le VIP, le PACAP, l'ATP et l'ADP diminuent la prolifération des cellules épithéliales intestinales *in vitro* (Dignass et al., 1998; Lelièvre et al., 1998), tandis que la substance P et le neuropeptide Y stimulent leur prolifération (Goode et al., 2003; Jeppsson et al., 2017). Une étude *in vivo* a également montré que la 5-HT produite par les neurones entériques stimulait la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Gross et al., 2012). Ces études suggèrent que les neurones entériques ont la capacité de stimuler ou d'inhiber la prolifération des cellules épithéliales intestinales et coliques, participant ainsi au contrôle du renouvellement de l'épithélium.

## 2.3. Les cellules gliales entériques

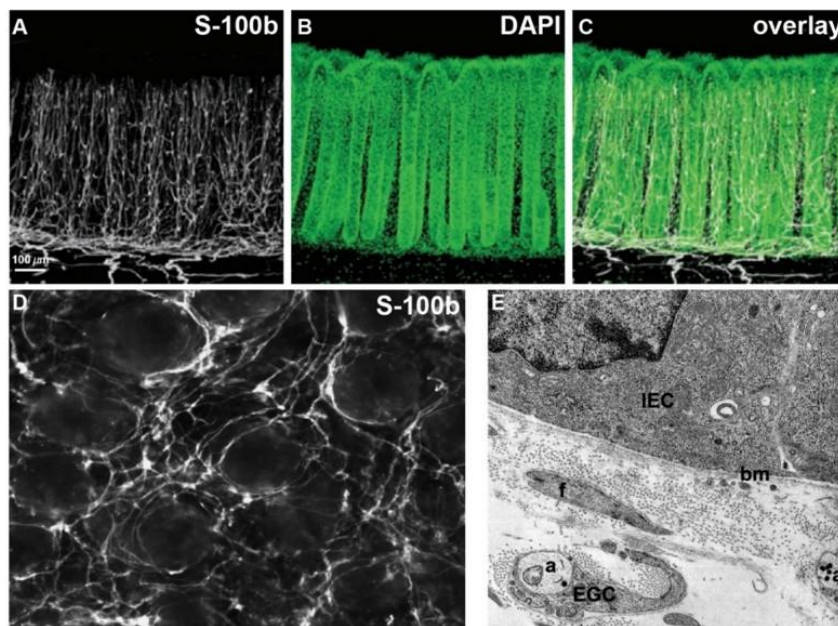
### 2.3.1. Généralités sur les cellules gliales entériques

Les CGE sont des cellules de morphologie irrégulière, présentant un petit corps cellulaire et des extensions de taille et de forme variées (Boesmans et al., 2015; Yu, 2014). Au niveau de l'intestin et du côlon, les CGE forment un réseau qui s'étend dans toute la paroi digestive. Ainsi les CGE sont présentes au sein des ganglions des plexus myentérique et sous muqueux, mais également dans les plexus secondaires, au niveau des faisceaux de fibres inter-ganglionnaires associées aux fibres nerveuses innervant les couches musculaires lisses, le long des fibres nerveuses extrinsèques, et au sein de la muqueuse (Neunlist et al., 2014; ruhl, 2005) (Figure 12).



**Figure 12 : Localisation des cellules gliales entériques au sein de la paroi intestinale.** Les CGE sont présentes au niveau des ganglions des plexus myentérique et sous-muqueux, ainsi que dans toutes les couches de la paroi intestinale, de la séreuse à la muqueuse. D'après Gulbransen et Sharkey, 2012.

Au sein de la muqueuse, les CGE forment un réseau très dense entourant étroitement les cryptes épithéliales et se prolongent dans la lamina propria jusqu'au sommet des cryptes coliques et des villosités intestinales (Liu et al., 2013). Des études de microscopie électronique ont montré que les CGE peuvent se situer à moins d'un micron des cellules épithéliales intestinales (Van Landeghem et al., 2011) (Figure 13). La lame basale crée une séparation physique entre les CGE de la lamina propria et la couche de cellules épithéliales. Cependant, une étude récente a montré que les CGE pouvaient traverser la lame basale et créer des contacts physiques directs avec les cellules entéroendocrines (Bohórquez et al., 2014).



**Figure 13 : Localisation des cellules gliales entériques au sein de la muqueuse intestinale. A-D)** Les CGE visualisées avec le marqueur S-100B (blanc) sont présentes dans la muqueuse intestinale où elles forment un réseau dense étroitement associé aux cryptes (vert, DAPI). **E)** Les CGE sont distantes de moins d'1µm des cellules épithéliales intestinales. D'après Liu et al, 2013 et Van Landeghem et al, 2011.



La première description des CGE a été réalisée en 1899 par Dogiel. En utilisant des techniques de coloration au bleu de méthylène, Dogiel a décrit la présence de cellules satellites nucléées entourant les cellules nerveuses au sein des ganglions entériques. Ces cellules étaient alors considérées comme des cellules de Schwann. Néanmoins, des études approfondies immuno-histochimiques et de microscopie électronique ont démontré que les CGE possédaient en réalité une morphologie différente des cellules de Schwann (Gabella, 1972), amenant à considérer les CGE comme une population unique de cellules gliales périphériques (Gabella, 1981). Les CGE sont relativement similaires aux astrocytes du système nerveux central (SNC). En effet, ces deux types cellulaires ont de nombreuses similitudes d'un point de vue morphologique et fonctionnel. A l'instar des astrocytes du SNC, les CGE possèdent de nombreuses extensions qui entourent les corps neuronaux des ganglions et les fibres inter-ganglionnaires (Boesmans et al., 2015; Yu, 2014). D'autre part, les CGE forment un syncytium fonctionnel car elles peuvent communiquer entre elles *via* des gap junctions de façon similaire aux astrocytes (Maudlej and Hanani, 1992). Elles expriment également des marqueurs cellulaires communs aux astrocytes tels que la GFAP, la vimentine ou encore S-100 $\beta$ . Cependant, des analyses transcriptionnelles récentes indiquent que les CGE ont une similarité transcriptionnelle plus importante avec les cellules de Schwann et les oligodendrocytes qu'avec les astrocytes, bien que les CGE ne soient pas des cellules myélinisantes (Rao et al., 2015). De plus les CGE possèdent des marqueurs communs avec ces cellules gliales myélinisantes tels que Sox10 et PLP1.

Les CGE représentent le type cellulaire majoritaire du SNE. Elles sont en effet plus nombreuses que les neurones entériques. Cependant, le ratio CGE/neurones entériques varie selon les plexus et également selon les espèces (Tableau 3). Chez l'Homme, le ratio CGE/neurones entériques est de 1,3 à 1,9 dans le plexus sous-muqueux et de 5,9 à 7,0 dans le plexus myentérique (Hoff et al., 2008).

Espèce	Plexus myentérique	Plexus sous-muqueux
Souris	1	0,64
Cobaye	1,7-2,7	0,71-1
Lapin	2,6	1
Mouton	4,5	1,5
Homme	6-7	1,3-1,9

**Tableau 3** : Ratio CGE/neurones chez différentes espèces animales. D'après Gulbransen, 2014.

### 2.3.2. Marqueurs des CGE

Trois marqueurs cellulaires sont majoritairement utilisés pour l'étude des CGE : la GFAP (Jessen and Mirsky, 1980), S-100 $\beta$  (Ferri et al., 1982) et Sox10 (ruhl, 2005).

La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) est une protéine des filaments intermédiaires du cytosquelette présente dans tout le cytoplasme cellulaire. Sa fonction et son implication dans la physiologie de la cellule restent aujourd'hui mal connues. Cependant, l'expression de cette protéine est dynamique. En effet l'expression de la GFAP est notamment augmentée lors de stress inflammatoires (von Boyen et al., 2011). La GFAP est exprimée dans d'autres types de cellules gliales périphériques et centrales tels que les cellules de Schwann (Triolo, 2006) ou encore les astrocytes. Par ailleurs, des travaux récents suggèrent également que la GFAP peut être exprimée par quelques rares cellules épithéliales dans l'intestin de souris adulte (Rao et al., 2017).

S-100 $\beta$  est un autre marqueur astrocytaire exprimé par les CGE. S-100 $\beta$  est une calcium-binding protéine localisée dans le cytoplasme et le noyau des CGE intervenant dans la régulation du cytosquelette et le maintien de l'homéostasie calcique. Dans le système nerveux central, S-100 $\beta$  a une activité neurotrophique et module également la prolifération cellulaire et la différenciation (ruhl, 2005). En plus

d'être exprimée dans les astrocytes et les CGE, S-100 $\beta$  est également exprimée par de nombreux types cellulaires dans des tissus nerveux et non nerveux tels que les cellules de Schwann, les chondrocytes ou les adipocytes (Haimoto et al., 1987). Cependant, S-100 $\beta$  est considéré comme un marqueur spécifique des CGE dans la paroi intestinale et colique (ruhl, 2005).

Sox10 est un facteur de transcription de la famille des SRY-related HMG-box (Sox). Sox10 possède un rôle important dans le développement du SNE (Bondurand and Sham, 2013). Il est en effet exprimé par les cellules de la crête neurale qui sont les précurseurs embryologiques du SNE et intervient dans leur prolifération ainsi que dans leur différenciation. La mutation du gène codant pour Sox10 est notamment une des mutations associées à la maladie de Hirschsprung, provoquant un défaut de formation du SNE dans le côlon (Paratore et al., 2002; Sánchez-Mejías et al., 2010). Sox10 est également exprimé par les CGE dans le SNE adulte (Boesmans et al., 2015).

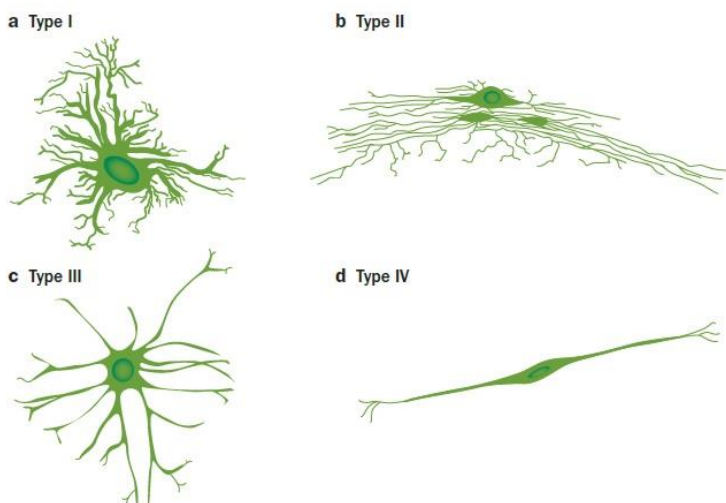
D'autres marqueurs des CGE ont été décrits. C'est notamment le cas de la glutamine synthétase (Jessen and Mirsky, 1983), ou encore l'antigène de surface Ran-2 (Jessen and Mirsky, 1985). Récemment, la protéine protéolipide 1 (PLP1) a également été identifiée comme un marqueur des CGE. En effet des techniques d'immunohistochimie ainsi qu'un modèle génétique murin PLP1-eGFP ont montré que PLP1 est exprimée par les CGE dans toutes les couches de la paroi de l'intestin et du côlon chez la souris (Rao et al., 2015). Il est intéressant de noter que PLP1 est une protéine impliquée dans la production de myéline, bien que les CGE soient des cellules gliales non myélinisantes.

Bien que les trois marqueurs les plus couramment utilisés pour identifier les CGE soient Sox10, S-100 $\beta$  et GFAP, toutes les CGE n'(ne) (co-)expriment pas ces trois marqueurs (Boesmans et al., 2015). Cette différence d'expression des marqueurs gliaux est notamment un des arguments démontrant l'hétérogénéité des CGE qui fait l'objet du sous-chapitre suivant.

### 2.3.3. Hétérogénéité gliale

Les CGE ne correspondent pas à une population homogène. Au contraire, les CGE présentent des différences au niveau de leur morphologie et de l'expression des différents marqueurs gliaux en fonction de leur localisation dans la paroi intestinale. Cette hétérogénéité est notamment à l'origine de différentes vagues successives de classification des CGE.

En 1994, une classification des CGE basée sur leurs différences morphologiques a été réalisée en relation avec la classification existante pour les astrocytes. Les CGE ont ainsi été classées en 4 groupes de morphologies différentes, associés chacun à une localisation particulière dans la paroi du tube digestif. Le sous-type I, alors qualifié de protoplasmique, correspond aux CGE intra-ganglionnaires caractérisées par des extensions courtes, nombreuses et irrégulières. Le sous-type II, appelé fibreux, correspond aux CGE situées au niveau des fibres inter-ganglionnaires et possédant de multiples extensions longeant les fibres neuronales. Le sous-type III, ou muqueux, fait référence aux CGE localisées dans la muqueuse présentant de longues extensions. Enfin, le sous-type IV, ou intramusculaire, correspond aux CGE allongées longeant les fibres musculaires des couches musculaires (Hanani and Reichenbach, 1994) (Figure 14).



**Figure 14 : Classification morphologique des CGE.** Les CGE sont classées en 4 types morphologiques : Type 1 protoplasmique, Type 2 fibreux, Type 3 muqueux et Type 4 intramusculaire.  
D'après Gulbransen et Sharkey, 2012.

En 2015, le groupe de Pachnis a montré à partir de l'étude de plexus myentériques contenant les sous-types I, II et III, que ces différents types morphologiques étaient également associés à des différences d'expression des marqueurs gliaux (Boesmans et al., 2015). Ainsi, cette étude a montré que la majorité des CGE de type I résidant dans le plexus myentérique co-expriment les marqueurs GFAP, S-100 $\beta$  et Sox10. En revanche, seul un faible pourcentage des CGE de type II et III expriment la GFAP, mais une majorité co-exprime les marqueurs S-100 $\beta$  et Sox10. Cette étude montre également qu'il existe des CGE qui n'expriment qu'un seul des trois marqueurs gliaux, montrant que, chez la souris adulte, aucun marqueur glial ne permet d'identifier la totalité des CGE présentes dans la paroi intestinale.

Par ailleurs, cette même étude a mis en évidence certaines différences fonctionnelles dans les différentes populations gliales. En effet, ces travaux indiquent que les CGE de type I, II et III présentent une amplitude de réponse calcique différente suite à une stimulation à l'ATP, qui est un test fonctionnel couramment utilisé comme marqueur de l'activité gliale. Ainsi, l'amplitude de la réponse calcique est plus élevée pour le type I par rapport aux types II et III.

Malgré l'absence de démonstration directe, l'ensemble de ces données suggèrent fortement qu'il existerait différents sous-types de CGE associés à des rôles spécifiques dans le contrôle des fonctions gastro-intestinales selon notamment leur localisation dans la paroi intestinale.

#### 2.3.4. Fonctions des CGE

Pendant longtemps, les CGE ont été considérées comme ayant seulement un rôle passif de soutien structural des neurones entériques, ce qui leur a valu leur nom de glie, voulant dire glue en grec. Suite aux recherches des deux dernières décennies dans le domaine, il est dorénavant bien accepté que les CGE forment un réseau vaste et dense s'étendant dans toute la paroi intestinale et participent directement au contrôle des fonctions gastro-intestinales *via* des interactions bidirectionnelles avec l'ensemble des types

cellulaires présents dans l'intestin tels que les neurones, les cellules épithéliales ou encore les cellules immunitaires.

#### 2.3.4.1. Rôle des CGE dans la régulation des fonctions des neurones entériques

Les CGE participent activement à la survie et la neurotransmission neuronale au sein de la paroi du tube digestif.

La première étude suggérant un rôle important des CGE dans la survie des neurones entériques a été réalisée en 1998 en utilisant un modèle murin transgénique exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV-TK) sous contrôle du promoteur GFAP afin de permettre une délétion spécifique des cellules GFAP<sup>+</sup> suite à l'injection de ganciclovir. Ces expériences ont montré que l'ablation des CGE GFAP<sup>+</sup> était accompagnée d'une dégénérescence neuronale au niveau du plexus myentérique. Néanmoins cette étude ne permettait pas de conclure si la perte neuronale était la conséquence directe de l'ablation du réseau glial ou de la réponse inflammatoire massive et létale se produisant 9 à 14 jours après l'injection de ganciclovir (Bush et al., 1998). L'impact des CGE sur la survie neuronale a depuis été démontré *in vitro*. Ainsi, dans un modèle de cultures primaires de SNE, les CGE diminuent la mort neuronale induite par un stress oxydatif *via* la sécrétion de 15-déoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandine-J2 (15dPGJ2) et de dérivés du glutathion (Abdo et al., 2010, 2012). Le GDNF produit par les CGE a également été décrit comme un facteur neuroprotecteur en diminuant notamment la mort neuronale *in vitro* induite par une hyperglycémie (Anitha, 2006). Les CGE expriment également d'autres molécules ayant des effets neuroprotecteurs telles que le NGF (nerve growth factor) ou encore la neurotrophine-3 (von Boyen et al., 2006; Hoehner et al., 1996).

Les CGE participent aussi à la détoxification du milieu extracellulaire de certains composés neuroactifs pouvant être toxiques pour les neurones. Ainsi, les CGE expriment la glutamine synthase

(Jessen and Mirsky, 1983; Kato et al., 1990) responsable de la conversion du glutamate en glutamine, dont l'effet peut être excito-toxique. Les CGE expriment également le transporteur GABA Transporter (GAT) 2, permettant l'élimination du GABA de l'espace extracellulaire (Fletcher et al., 2002). Le transporteur d'oligopeptides PEPT-2, exprimé par les CGE, leur permet d'éliminer du milieu extracellulaire les produits de dégradation de certains neuropeptides comme le VIP (ruhl, 2005).

Outre leur rôle dans la survie neuronale, les CGE interviennent dans la synthèse des neurotransmetteurs ainsi que dans les processus de neurotransmission. Les CGE sont en effet une des principales sources de L-arginine, précurseur du monoxyde d'azote (NO), pour les neurones entériques (Nagahama et al., 2001). De plus et comme évoqué précédemment, les CGE expriment la glutamine synthase responsable de la synthèse de glutamine, qui est nécessaire à la production de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). Les CGE ont également un impact sur le codage neurochimique des neurones entériques. Ainsi, dans un modèle murin de délétion des CGE GFAP<sup>+</sup> exprimant l'hémagglutinine (HA) *via* l'injection de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> réactifs à l'HA, une étude a montré que l'ablation des CGE provoquait une diminution des neurones positifs pour le VIP et la substance P dans le plexus sous-muqueux ainsi qu'une diminution des neurones exprimant la NOS et une augmentation des neurones ChAT dans le plexus myentérique (Aube, 2006).

Les CGE sont capables de détecter certains neuromédiateurs et en réponse de moduler l'activité des neurones entériques. Ainsi les CGE expriment les récepteurs purinergiques P2X7, P2Y1, P2Y2 et P2Y4 et répondent à l'ATP sécrété par les neurones entériques *via* une augmentation de calcium intracellulaire. Cette réponse calcique se propage aux CGE voisines connectées entre elles *via* des gap junctions formées de connexine 43 (Gulbransen and Sharkey, 2009; Ochoa-Cortes et al., 2016). De plus, il a été montré qu'une réponse calcique peut également être initiée dans les CGE par d'autres neuromédiateurs excitateurs tels que l'Ach et la 5-HT (Boesmans et al., 2013). De façon importante, les ondes calciques induites au niveau des CGE sont capables de moduler l'activité des neurones entériques (Gulbransen,

2014; McClain et al., 2015). Ainsi, des études ont montré que l'inhibition pharmacologique ou la délétion des connexines 43 dans les CGE entraîne une diminution de l'activité des neurones sécréto-moteurs et une diminution de la motricité colique *in vivo* chez la souris (Grubišić and Gulbransen, 2017; McClain et al., 2014). De plus, l'utilisation d'un modèle murin transgénique GFAP-hM3Dq receptor (exprimant dans les cellules GFAP<sup>+</sup> un récepteur couplé à une protéine G conçu pour être activé par une molécule exogène, dans ce modèle du clozapine-N-oxide (CNO), et dont l'activation provoque une réponse calcique dans les CGE GFAP<sup>+</sup>) a montré que l'activation gliale provoquait des contractions neurogéniques dans l'iléum et le colon (McClain et al., 2015). Cependant le mécanisme précis par lequel la réponse calcique gliale régule l'activité neuronale reste à définir. Outre l'ATP, l'Ach et le 5-HT, les CGE peuvent détecter un grand nombre de substances neuro-actives telles que la norépinephrine, le glutamate, la thrombine, la sérotonine, la bradykinine, l'histamine ou encore les endothélines (Gulbransen, 2014).

#### 2.3.4.2. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale

Comme évoqué précédemment, les CGE forment un réseau dense autour des cryptes intestinales et coliques, et sont situées à une très faible distance, de l'ordre du  $\mu\text{m}$ , des cellules épithéliales. Cette proximité étroite entre les cellules épithéliales intestinales et les CGE leur permet d'interagir de façon paracrine (Neunlist et al., 2013).

En 1998, le groupe de Sofroniew a caractérisé un modèle murin transgénique exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV-TK) sous le contrôle du promoteur de la GFAP (Bush et al., 1998). A partir du 12<sup>e</sup> jour après l'injection de ganciclovir, les souris succombaient d'une jéjuno-iléite fulminante associée à une délétion des CGE GFAP<sup>+</sup>, une perte de l'intégrité de la BEI ainsi qu'une désorganisation et une hyperplasie des cryptes. Cette étude fut ainsi la première à suggérer le rôle crucial des CGE dans le maintien de l'intégrité de la BEI. Ces souris présentaient également une augmentation de la perméabilité

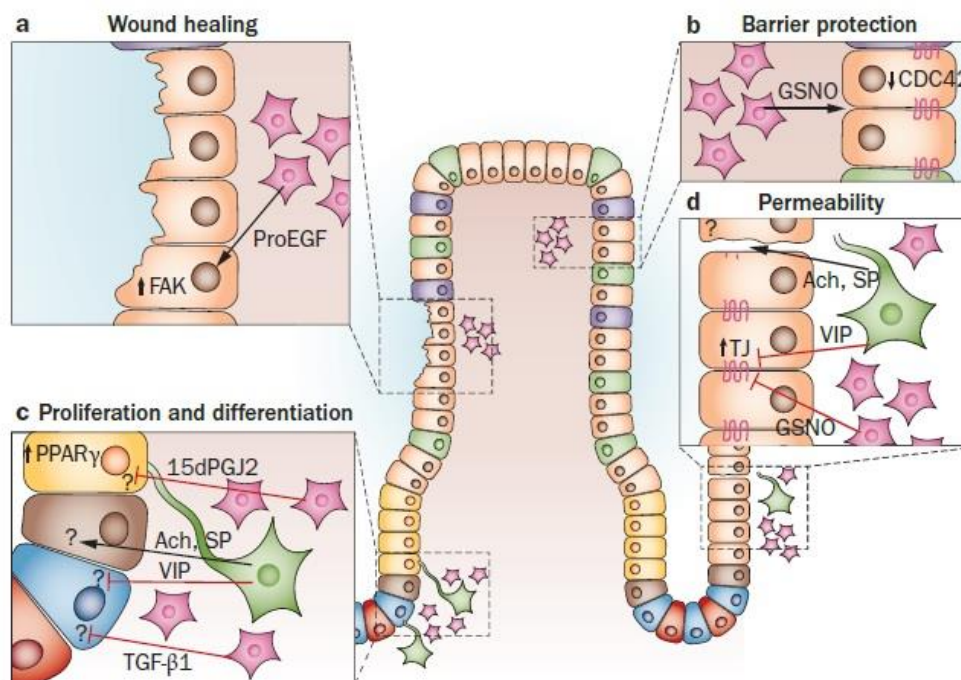


intestinale précédant l'inflammation. D'autres modèles d'ablation des CGE GFAP<sup>+</sup> ont reproduit ces résultats en utilisant le modèle murin de délétion des CGE GFAP<sup>+</sup> exprimant l'hémagglutinine (HA), *via* l'injection de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> réactifs à l'HA, ou *via* un croisement avec un modèle de souris immunoréactives pour l'HA. La perte des CGE provoquait alors une altération de l'intégrité de la BEI ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale (Aube, 2006; Cornet et al., 2001).

De manière intéressante, des travaux récents utilisant le modèle de délétion gliale GFAP-HSV-TK a reproduit les résultats obtenus par le groupe de Sofroniew. Cependant, cette même étude n'a pas détecté d'impact majeur de la délétion gliale sur la perméabilité et la prolifération de l'épithélium intestinal en utilisant un nouveau modèle murin transgénique provoquant la perte des CGE PLP1<sup>+</sup> par induction de l'expression de la toxine diphtérique. Ainsi ces travaux suggèrent que la perte du réseau de CGE a des effets différents en fonction du type de séquences régulatrices utilisées, autrement dit en fonction des CGE ciblées et/ou de la stratégie d'ablation choisie (Rao et al., 2017). Ceci est en accord avec les travaux du groupe de Sharkey qui rapportent également une absence d'altération macroscopique au niveau de l'épithélium suite à une inhibition du métabolisme des CGE induite par un traitement au fluorocitrate (Nasser et al., 2006).

De nombreuses études *in vitro*, dans des modèles de co-culture permettant des échanges paracrines entre les CGE et les cellules épithéliales intestinales, ont mis en évidence l'impact des CGE sur les fonctions de la BEI (Figure 15). Ainsi, les CGE diminuent la perméabilité de la BEI *via* la sécrétion 15-HETE et de S-Nitroso-Glutathion (GSNO) (Pochard et al., 2016; Savidge et al., 2007), GSNO qui protège également la BEI contre l'invasion par le pathogène *Shigella flexneri* (Flamant et al., 2011). Les CGE inhibent également la prolifération des cellules épithéliales intestinales *via* la libération de TGF- $\beta$ 1 et de la prostaglandine 15d-PGJ2 (Bach-Ngohou et al., 2010; Neunlist et al., 2006). La 15d-PGJ2 induit également la différenciation des cellules épithéliales intestinales. De plus, les CGE stimulent les mécanismes de réparation de la BEI en produisant du proEGF ainsi que du 11 $\beta$ PGF2 (Coquenlorge et al., 2016; Van Landeghem et al., 2011).

Des études transcriptomiques utilisant des microarrays ont également montré que les CGE régulent dans les cellules épithéliales intestinales l'expression de nombreux gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la motilité ou encore le métabolisme (Van Landeghem et al., 2009). Ces études montrent que les CGE interagissent avec les cellules épithéliales intestinales *via* la sécrétion de médiateurs gliaux spécifiques. Cependant une étude a également montré que les CGE pouvaient créer des contacts cellulaires directs avec les neuropodes des cellules entéroendocrines de l'épithélium. Cette étude suggère que ces interactions directes se forment par le biais de facteurs neurotrophiques dérivés des CGE tels que du GDNF qui stimule la formation de neuropodes. Les conséquences fonctionnelles de ces interactions glie-cellule entéroendocrine restent peu connues mais suggèrent que les CGE régulent les fonctions sensibles et sécrétrices des cellules entéroendocrines.



**Figure 15 : Rôle des cellules gliales entériques dans la régulation des fonctions de la barrière épithéliale intestinale.** Les CGE régulent les fonctions des cellules épithéliales intestinales de manière paracrine. Ainsi, les CGE interviennent dans la réparation et la perméabilité de la barrière, la prolifération, la différenciation et la survie des cellules épithéliales intestinales par l'intermédiaire de facteurs gliaux spécifiques. D'après Neunlist et al., 2013.

### 2.3.4.3. Contrôle des fonctions immunitaires et inflammation

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des CGE dans la réponse immunitaire et inflammatoire du tube digestif. Dans le système nerveux central, les astrocytes ont un rôle important dans la réponse inflammatoire et immunitaire en adoptant en particulier un phénotype qualifié de « réactif ». Ainsi, cette « glie réactive » ou « astroglie » se caractérise par une augmentation de la prolifération cellulaire, des modifications morphologiques et des modifications du protéome dont notamment une surexpression de la GFAP (Sofroniew, 2015). Cette glie réactive produit alors de nombreuses cytokines, chemokines, facteurs de croissances, ou molécules intervenant dans le remodelage de la matrice extra cellulaire, et participent ainsi à la réponse inflammatoire, à la réparation et à la protection du tissu.

A l'instar des astrocytes du SNC, les CGE semblent également subir des modifications phénotypiques en cas d'infection et d'inflammation et être impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire du tube digestif par un phénomène similaire. En effet, les CGE expriment des récepteurs aux cytokines tels que le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 ainsi que les Toll Like Receptor (TLR) 2, 3, 4 et 7 (Barajon et al., 2009; Brun et al., 2013), permettant aux CGE d'être sensible aux infections et à l'inflammation. De plus, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  provoquent une augmentation de l'expression de la GFAP dans les CGE (von Boyen, 2004). Cette surexpression est également observée en réponse aux lipopolysaccharides (LPS) bactériens ou à l'IFN- $\gamma$  (Cirillo et al., 2011). Au-delà de la modulation de l'expression de la GFAP, les signaux pro-inflammatoires tels que le LPS ou l'IFN- $\gamma$  ont aussi pour conséquence de stimuler la prolifération des CGE (Cirillo et al., 2011).

Outre les modifications phénotypiques des CGE en réponse à un stress inflammatoire, les CGE participent directement à la réponse immunitaire et au contrôle des processus inflammatoires. En effet, les CGE détectent certains pathogènes *via* les TLR, et en réponse, sécrètent des molécules pro-inflammatoires telles que le NO (Turco et al., 2014). De manière intéressante, cette libération de NO n'est pas observée en présence de probiotiques, suggérant une réponse différentielle des CGE en fonction de

l'identité de la bactérie. De plus, les LPS bactériens et l'IFN- $\gamma$  activent dans les CGE l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de type II impliqué dans la réponse immunitaire adaptative (Cirillo et al., 2011). Par ailleurs, les CGE sont capables en réponse à un stress inflammatoire de sécréter un grand nombre de facteurs impliqués dans l'inflammation tels que l'IL-6 (Rühl et al., 2001), l'IL-1 $\beta$  (Murakami et al., 2009), ou encore des métalloprotéases (Lin et al., 2007). Néanmoins, si les CGE sont capables de sécréter plusieurs facteurs pro-inflammatoires, des études récentes suggèrent que les CGE ont aussi un rôle immunosuppresseur. En effet, les CGE sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes activés dans le cadre d'une inflammation chronique (Kermarrec et al., 2016), ainsi que de réguler la production de l'IL-22 par les lymphocytes T3 en sécrétant du GDNF (Ibiza et al., 2016).

Ces données montrent que les CGE ont un rôle actif dans le contrôle de l'immunité et des processus inflammatoires.

Le rôle fondamental des CGE dans le maintien de l'intégrité et des fonctions de la muqueuse intestinale, *via* des interactions bidirectionnelles avec l'ensemble des composantes du microenvironnement développées dans les chapitres ci-dessus, a suscité un intérêt croissant concernant l'implication des CGE dans les mécanismes physiopathologies des maladies digestives, définissant ainsi le nouveau concept de « gliopathie entérique ».

### 2.3.5. Rôle des CGE dans les maladies digestives

Les CGE ont été impliquées dans un grand nombre de pathologies digestives, parmi lesquelles certaines pathologies motrices comme la dysplasie intestinale neuronale, des pathologies inflammatoires de bas et haut garde telles que le syndrome de l'intestin irritable, le diabète, l'obésité ou les maladies intestinales chroniques de l'intestin (MICI), mais aussi des maladies extradigestives telles que la maladie

de Parkinson (Bassotti, 2006; Clairembault et al., 2015; Fujikawa et al., 2015; Neunlist et al., 2014; Stenkamp-Strahm et al., 2013). Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser brièvement aux MICI, qui présentent un risque élevé de CCR, ainsi qu'aux CCR qui sont le sujet de cette thèse.

#### 2.3.5.1. CGE et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

L'étude des CGE dans les maladies digestives a notamment été réalisée dans les MICI. Ces études ont montré que la GFAP et S-100 $\beta$  sont surexprimés dans le côlon des patients souffrant de rectocolite hémorragique (RCH), suggérant un phénotype de « glie réactive » dans cette maladie (Cirillo et al., 2009). De manière intéressante, des études ont montré une réduction globale du nombre de CGE GFAP<sup>+</sup> dans la maladie de Crohn (Cornet et al., 2001). Néanmoins, dans les zones inflammées, une augmentation de l'expression de ce marqueur est tout de même observée mais à des niveaux inférieurs que dans la RCH (von Boyen et al., 2011), suggérant un état différent des CGE dans ces deux MICI.

L'impact fonctionnel des CGE a été plus particulièrement étudié dans la maladie de Crohn. Ainsi, une étude récente a montré que les CGE de patients atteints de la maladie de Crohn avaient une expression réduite de 15-HETE, réduisant ainsi leur capacité à diminuer la perméabilité de la BEI (Pochard et al., 2016). Une autre étude a également montré que les CGE de patients atteints de la maladie de Crohn avaient également des capacités réduites à promouvoir la réparation de l'épithélium intestinal, due à une diminution de l'expression de 11 $\beta$ PGF2 gliale (Coquenlorge et al., 2016). Ces études suggèrent que l'altération des CGE dans la maladie de Crohn diminue leur capacité à réguler les fonctions de l'épithélium, pouvant participer ainsi au développement et au maintien de cette pathologie.

### 2.3.5.2. Cellules gliales entériques et cancers colorectaux

Il n'existe qu'un nombre limité d'études portant sur les CGE, et plus largement sur le SNE, au sein des tumeurs coliques. De plus, les études disponibles dans la littérature sont majoritairement descriptives. En ce qui concerne la composante neuronale du SNE, quelques études ont montré une altération du réseau neuronal dans la zone tumorale. En effet des travaux rapportent une faible expression du marqueur neuronal PGP9.5 au sein du tissu tumoral par rapport au tissu sain (Kozłowska et al., 2015). Cependant, d'autres travaux contredisent ces données. Une étude a ainsi mis en évidence une augmentation globale de l'intensité et de la surface d'expression de PGP9.5 au sein des adénocarcinomes colorectaux par rapport aux zones saines (Albo et al., 2011). Bien que ces travaux apportent des observations différentes, ils suggèrent tous deux une modification du réseau neuronal dans les CCR. Une première étude a mis en évidence un rôle fonctionnel des neurones entériques au sein du CCR. En effet, cette étude a montré que les cellules tumorales issues de lignées cellulaires ou de tumeurs primaires coliques adhéraient préférentiellement aux structures nerveuses contenues dans des cultures primaires de plexus sous-muqueux. De plus, cette étude a montré que les cellules cancéreuses étaient capables de migrer le long de ces structures nerveuses, suggérant ainsi que les neurones entériques favorisent et guident la dissémination tumorale dans le microenvironnement des CCR (Duchalais et al., 2017).

Outre les neurones entériques, une altération du réseau glial au sein des adénomes et des adénocarcinomes coliques primaires a également été décrite (Liu et al., 2013; Neunlist et al., 2006, 2008), pouvant être en partie liée à la désorganisation tissulaire de la tumeur. Cette altération du réseau glial a également été associée à une diminution de l'ARNm de S-100 $\beta$  en zone tumorale par rapport aux zones saines (Liu et al., 2013; Neunlist et al., 2006). Par ailleurs, une étude récente suggère que les adénocarcinomes colorectaux bien et moyennement différenciés présentent une plus forte expression de la GFAP que ceux faiblement différenciés (Târtea et al., 2017).

Toutefois, si ces études rapportent une désorganisation du réseau glial et une altération de l'expression de certains marqueurs gliaux dans les cancers colorectaux, les interactions bi-directionnelles entre les CGE et les cellules épithéliales (souches) cancéreuses et leurs conséquences sur les processus de tumorigenèse colique n'ont jamais été étudiées.

### 3. Le cancer colorectal

#### 3.1. Présentation générale du cancer colorectal

##### 3.1.1. Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde et la troisième cause de décès par cancer chez l'homme et la femme avec 1,5 millions de nouveaux cas et plus de 750 000 décès en 2015 (Siegel et al., 2016) (WHO statistics 2017). La prévalence de la maladie est plus importante dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (GLOBOCAN 2012). En France, 37 413 nouveaux cas ont été recensés en 2015, et 17 833 décès dus à la maladie ont été estimés (Institut national du cancer). L'âge médian du diagnostic est de 72 ans chez l'homme et de 75 ans chez la femme.

##### 3.1.2. Définition de la maladie

Le CCR est une tumeur maligne qui se développe dans le côlon ou le rectum. Il existe différents types de CCR. Dans plus de 90% des cas, les CCR sont des adénocarcinomes (Fleming et al., 2012). Les autres types de cancers sont rares et regroupent les lymphomes ou encore les tumeurs non-épithéliales dont les tumeurs stromales gastro-intestinales, les leiomyosarcomes ou encore les mélanomes (Kang et al., 2006; Stewart et al., 2006).

Les adénocarcinomes coliques se développent à partir de cellules épithéliales coliques ou rectales, et peuvent présenter différents états de différenciation déterminés par le nombre de structures cryptiques observables dans la tumeur qui ressemblent à l'organisation du tissu sain. L'adénocarcinome peut ainsi être bien différencié, moyennement différencié ou peu différencié. Outre les stades de différenciation, il existe aussi différents types d'adénocarcinomes coliques. La majorité des adénocarcinomes (environ 80%) sont de type lieberkühnien ou commun, et sont généralement bien ou moyennement différenciés. Dans



les autres cas, il s'agit adénocarcinomes de type mucineux caractérisés par une présence abondante de mucus au sein de la tumeur. Ces types d'adénocarcinomes sont généralement peu différenciés et synonymes de mauvais pronostic. Dans cette thèse, nous n'aborderons que les adénocarcinomes de type commun.

La très grande majorité des adénocarcinomes coliques se développent à partir d'une lésion précancéreuse, appelée adénome. Un adénome se définit comme un foyer circonscrit d'épithélium dysplasique non invasif, qui peut être de type vilieux, tubuleux, tubulovilleux ou plan en fonction de son architecture :

- L'adénome vilieux présente un aspect « velu » et est constitué de projections vilieuses centrées par un axe conjonctif digitiforme et une implantation large dite sessile.
- L'adénome tubuleux est constitué de cryptes allongées formant des « tubes », avec une implantation le plus souvent pédiculée.
- L'adénome tubulovilleux présente à la fois des caractéristiques de l'adénome vilieux et de l'adénome tubuleux.
- L'adénome plan se définit comme une lésion adénomateuse qui ne dépasse pas deux fois la hauteur de la muqueuse normale.

Seule une faible proportion d'adénomes coliques (10-15%) évoluent en adénocarcinomes (Stryker et al., 1987) suivant un processus qui peut prendre 10 à 15 ans (Hill et al., 1978).

### 3.1.3. Stades de la maladie

Au cours du développement tumoral, le CCR envahit progressivement les différentes couches de la paroi colique. Il existe 5 stades d'envahissement de la paroi colique :

TIS : Le stade TIS est le stade le plus précoce de la maladie. Il correspond au cancer *in situ*. A ce stade, la tumeur est restreinte à l'épithélium colique ou s'étend dans la muqueuse colique, sans destruction de la lame basale.

T1 : Le stade T1 correspond au cancer intra-muqueux. Les cellules cancéreuses ont dépassé la lame basale et peuvent s'étendre jusque dans la sous-muqueuse.

T2 : Le stade T2 correspond à l'invasion tumorale de la couche musculuse de la paroi colique.

T3 : Au stade T3, la tumeur est présente sur toute l'épaisseur de la paroi colique jusqu'à la séreuse.

T4 : Le stade T4 est le stade le plus avancé de l'invasion localisée du cancer. A ce stade, les cellules cancéreuses ont pénétré le péritoine viscéral et envahissent progressivement les organes voisins.

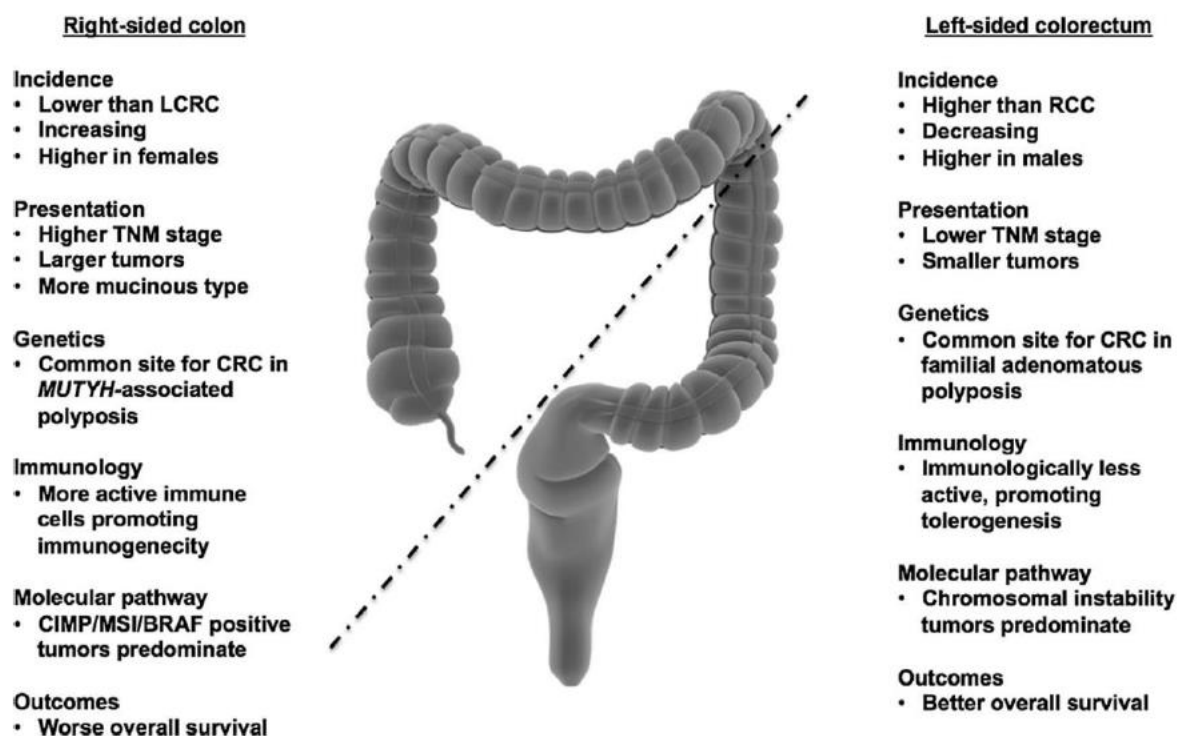
Outre le degré d'invasion de la paroi colique ou rectale, le stade de la maladie est également défini par le niveau d'invasion des ganglions lymphatiques périphériques ainsi que par la présence éventuelle de métastases cancéreuses. Ces trois paramètres sont regroupés sous la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) qui définit 4 stades distincts de la maladie avec certaines subdivisions (Compton and Greene, 2004) (Tableau 4).

Tumeur primaire	
TIS	Cancer in situ ou intra-muqueux
T1	La tumeur envahit la sous-muqueuse
T2	La tumeur envahit la musculuse
T3	La tumeur envahit l'ensemble de la paroi
T4	La tumeur perfore le péritoine viscéral
Ganglions lymphatiques	
N0	Pas d'envahissement ganglionnaire
N1	La tumeur envahit 1 à 3 ganglions régionaux
N2	La tumeur envahit plus de 4 ganglions régionaux
Métastases	
M0	Pas de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance
Stades de la maladie	Taux de survie à 5 ans
Stade 0	TIS N0 M0
Stade I	T1 N0 M0 / T2 N0 M0 93%
Stade II-A	T3 N0 M0 85%
Stade II-B	T4 N0 M0 72%
Stade III-A	T1-2 N1 M0 83%
Stade III-B	T3-4 N1 M0 64%
Stade III-C	T1-4 N2 M0 44%
Stade IV	T1-4 N1-2 M1 Moins de 10%

**Tableau 4 : Classification TNM des cancers colorectaux.**

### 3.1.4. Localisation

Le CCR se localise pour 70% dans le côlon et pour 30% dans le rectum. Une majorité des tumeurs du côlon se trouve dans le côlon proximal ou côlon droit (Li and Lai, 2009; Tamas et al., 2015). Outre ces différences anatomiques, les cancers du côlon gauche et du côlon droit présentent également des différences histologiques, génétiques ou encore pronostiques (Figure 16) (Lee et al., 2015a).



**Figure 16 : Représentation schématique des différences épidémiologiques, cliniques, génétiques, immunologiques, moléculaires et pronostiques des cancers colorectaux en fonction de leur localisation proximale ou distale dans le côlon. D'après Lee et al, 2015.**

### 3.1.5. Carcinogénèse colique

En 2000, Hanahan et Weinberg définissent dans leur article intitulé *the Hallmarks of Cancer* les caractéristiques qui distinguent une cellule cancéreuse de son homologue saine. Ils définissent ainsi 6

propriétés spécifiques des cellules cancéreuses qui sont : une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, une résistance accrue à l'apoptose, un potentiel illimité de réplication, une capacité à stimuler l'angiogenèse ainsi qu'un pouvoir d'invasion et de dissémination (Hanahan and Weinberg, 2000). En 2011, deux nouvelles caractéristiques sont ajoutées aux *Hallmarks of cancer* : la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et l'échappement au contrôle du système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). L'acquisition de ces propriétés se fait par une accumulation progressive de mutations génétiques ou d'altérations épigénétiques, provoquant un gain de fonction d'oncogènes, généralement impliqués dans la stimulation des voies pro-prolifératives et anti-apoptotiques, et une perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs, qui à l'inverse inhibent des voies pro-prolifératives et anti-apoptotiques.

L'accumulation de mutations génétiques au cours du développement tumoral a été conceptualisée en 1990 par Fearon et Vogelstein dans un modèle appelé « séquence adénome-carcinome ». Ce modèle propose que chaque étape de la carcinogénèse soit associée à l'acquisition d'une mutation génétique supplémentaire. La première de ces mutations, provoquant le passage d'un tissu épithélial sain à un tissu dysplasique, est définie dans ce modèle comme étant une mutation entraînant une perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *APC*, qui intervient dans le complexe de séquestration de la  $\beta$ -caténine inhibant la voie Wnt. En effet, le gène *APC* est muté dans 90% des CCR, et cette mutation est retrouvée à des temps très précoces de la maladie. La transformation en adénome tardif puis en adénocarcinome est ensuite provoquée selon ce modèle par des mutations touchant les gènes *KRAS*, *DCC*, *SMAD4* et *SMAD2* puis *P53* (Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle de mutations séquentielles a été récemment testé *in vitro* en utilisant la technologie CRISPR/Cas9. En provoquant l'accumulation de mutations couramment retrouvées dans les CCR (tel que *APC*, *P53*, *KRAS* ou encore *SMAD4*) dans des organoïdes humains, ces études ont montré que ces organoïdes possédaient la capacité à former des tumeurs après injection dans des souris immunodéficientes (Drost et al., 2015; Matano et al., 2015). Bien que l'accumulation de

mutations au cours du développement tumoral soit aujourd'hui largement admise, il a été montré que la séquence précise des mutations génétiques intervenant dans la carcinogenèse dépendait de nombreux paramètres, et notamment du type d'instabilité génétique associé à chaque cancer.

### 3.1.6. Instabilité génétique des CCR

L'étude des altérations génétiques dans les CCR a permis de définir trois mécanismes majeurs d'instabilité génétique responsables du fort taux de mutations au sein des tumeurs : l'instabilité chromosomique (CIN, Chromosomal INstability), l'instabilité microsatellitaire (MSI, Microsatellite instability), et le phénotype d'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP, CpG island methylator phenotype).

#### 3.1.6.1. L'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est la forme d'instabilité génétique la plus fréquemment retrouvée dans les CCR sporadiques (environ 85% des cas). Elle se définit par la présence d'altérations du nombre et de la structure des chromosomes. Ces altérations peuvent être des gains ou des pertes de bras chromosomiques, des amplifications de segments chromosomiques ou encore des phénomènes de translocations, ayant pour conséquence une aneuploïdie ainsi qu'une perte d'hétérozygotie (Carethers and Jung, 2015). Les mutations les plus fréquemment retrouvées associées à ce type d'instabilité génétiques sont les mutations du gène APC, KRAS, TP53, ou encore la perte du chromosome 18q provoquant la délétion des gènes SMAD4 et SMAD2. Différents mécanismes moléculaires responsables de ce type d'altération génétique ont été décrits, parmi lesquels un défaut de ségrégation chromosomique lors de la division cellulaire, une dysfonction des points de contrôle de la mitose, une dysfonction des télomères, ou encore une dysfonction des voies de réparation de l'ADN (Pino and Chung, 2010; Tanaka and Hirota, 2016).

### 3.1.6.2. L'instabilité microsatellitaire

L'instabilité microsatellitaire (MSI) est retrouvée dans 15-20% des CCR sporadiques. Les cancers possédant ce type d'instabilité sont situés principalement dans le côlon proximal, sont plutôt de type mucineux et sont associés à un meilleur pronostic clinique (Boland and Goel, 2010).

La MSI doit son nom à la découverte de nombreuses mutations dans les séquences microsatellites de certaines tumeurs coliques (Ionov et al., 1993). Les microsatellites sont des séquences d'ADN constituées d'une répétition de motifs de 1 à 6 nucléotides, présentes dans tout le génome dans les régions codantes et non codantes. Les mutations provoquées par la MSI sont le plus souvent des délétions ou insertions de nucléotides retrouvées principalement sur les gènes ACVR2A, APC, TGFBR2 ou encore BRAF. La MSI provient d'un défaut de fonctionnement de la voie des Mismatch Repair (MMR). Le système MMR a pour fonction de reconnaître et de réparer les mésappariements de l'ADN. Il se compose principalement des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 (Gelsomino et al., 2016). Dans le cas des formes sporadiques du CCR, le défaut de fonctionnement du système MMR est principalement lié à une hyperméthylation du gène codant pour MLH1 entraînant une perte d'expression (Carethers and Jung, 2015).

### 3.1.6.3. Phénotype d'hyperméthylation des îlots CpG

Une troisième forme d'instabilité génétique a été décrite en 1999 et correspond à des modifications épigénétiques du génome (Toyota et al., 1999). Ces altérations épigénétiques, appelées phénotype d'hyperméthylation des îlots CpG (CpG island methylator phenotype, CIMP), se caractérisent par un fort taux de méthylation des îlots CpG provoquant l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeur. Le CIMP est retrouvé dans 20 à 30% des CCR, et est majoritairement associé aux tumeurs de type MSI,

bien qu'une relation de causalité n'a pas été démontrée entre la MSI et le CIMP (Curtin et al., 2011). Les causes du CIMP restent encore à décrire.

### 3.1.7. Les formes héréditaires du CCR

Bien que la très grande majorité des CCR soient sporadiques, il existe également des formes héréditaires, aussi appelées formes familiales, qui représentent environ 5% des CCR. Deux syndromes principaux sont à l'origine des CCR héréditaires : la polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch.

La polypose adénomateuse familiale (PAF) est un syndrome provoqué par une mutation germinale au niveau du gène APC. Il s'agit d'une maladie autosomique dominante provoquant l'apparition de dizaines ou centaines de polypes dans le côlon et le rectum entre l'âge de 20 et 40 ans. Le traitement de cette maladie consiste en une résection de l'ensemble des polypes par colectomie. Sans traitement, la maladie évolue dans 100% des cas en CCR (Rustgi, 2007). Des polypes se développent également dans l'estomac ou l'intestin grêle, mais en nombre moins important que dans le côlon, limitant le risque de cancer dans ces zones. La PAF représente 1% des cancers colorectaux.

Il existe des variantes de la PAF, également provoquées par une mutation germinale au niveau du gène APC et associées à des risques d'apparition d'un CCR similaire à la PAF. Ces syndromes sont :

- Le syndrome de Gardner, caractérisé par la présence de nombreux polypes coliques et rectaux, est associé à la présence additionnelle de tumeurs bénignes en dehors du tube digestif, dans le tissu osseux ou certains tissus mous et endocriniens (Fearon, 2011).
- Le syndrome de Turcot provoque les mêmes atteintes digestives que la PAF mais également la formation de tumeurs dans le cerveau (glioblastome multiforme ou blastome médullaire) (Fearon, 2011).



Le syndrome de Lynch, aussi appelé HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer), est la forme la plus fréquente de CCR héréditaires, représentant entre 3 et 5% des CCR. Les personnes atteintes de ce syndrome ont entre 60 à 80 % de risque de développer un CCR au cours de leur vie. Il est provoqué par une mutation germinale touchant un des gènes impliqués dans la voie des MMR. La mutation peut toucher les gènes MSH2, MLH1, PMS2 ou MSH6. Environ 70 à 90% des personnes atteintes du syndrome de Lynch ont une mutation du gène MLH1 ou MSH2, et 10 à 30% des cas sont liés à une mutation de PMS2 ou MSH6 (Cohen and Leininger, 2014). Ce syndrome provoque l'apparition d'un CCR en majorité dans la partie proximale du côlon à un âge plus précoce que pour un cancer sporadique, puisqu'environ 50% des CCR liés au syndrome de Lynch se développent avant 50 ans.

### 3.1.8. Traitements du CCR

#### 3.1.8.1. La chirurgie

La résection chirurgicale correspond au seul traitement du CCR permettant la guérison. Elle est utilisée pour permettre une résection tumorale complète, c'est-à-dire pour extraire la tumeur primaire ainsi que les tissus et les ganglions lymphatiques environnants affectés (appelé curage ganglionnaire). L'acte chirurgical diffère en fonction du stade et de la localisation de la tumeur. Il peut aller de l'exérèse locale pour des stades très précoces (Althumairi and Gearhart, 2015) à la résection totale ou partielle de différentes sections du côlon et/ou du rectum (colectomie totale ou hémicolectomie droite, transverse, gauche, sigmoïdienne, protolectomie, résection abdominopérinéale) jusqu'à la chirurgie des zones métastasées, notamment au niveau du foie ou des poumons. A des stades précoces de la maladie (cancers localisés), la résection chirurgicale peut être envisagée seule sans traitement additionnel. En effet, pour des stades peu avancés, le risque de métastases ou de récurrence locale est faible.

### 3.1.8.2. La radiothérapie

La radiothérapie est préconisée à partir du stade II de la maladie et uniquement pour les tumeurs rectales. Elle n'est pas utilisée pour les tumeurs situées dans le côlon afin d'éviter l'irradiation des organes voisins. La radiothérapie est le plus souvent administrée avant une chirurgie (appelée radiothérapie néoadjuvante) afin de réduire la taille de la tumeur pour la rendre plus facilement opérable. La radiothérapie peut également être administrée en situation palliative, principalement dans le but de limiter la douleur. Il est possible d'avoir recours à une radiothérapie néoadjuvante interne, appelée curithérapie ou brachythérapie. La curithérapie consiste à insérer une substance radioactive, généralement de l'iridium contenue dans un applicateur, directement au sein ou à proximité de la tumeur (Webster et al., 2013). Ce traitement est généralement délivré après l'irradiation externe en complément de traitement, si la taille et la position de la tumeur le permettent.

### 3.1.8.3. La chimiothérapie

#### 3.1.8.3.1. Généralités

La chimiothérapie est utilisée dans le traitement des CCR de stades II à IV. Elle peut être administrée en pré-opératoire (traitement néoadjuvant) afin de réduire la taille de la tumeur pour faciliter ou rendre la résection chirurgicale possible. Elle peut également être administrée en post-opératoire, notamment chez des patients possédant des risques élevés de récurrences locales et/ou de métastases (atteinte ganglionnaire, présence d'envahissements périnerveux, tumeur peu différenciée ou tumeur primaire de stade T4).

La chimiothérapie dans les CCR utilise principalement le 5-Fluorouracil (5-FU) associé à l'acide folinique ou leucovorin qui en potentialise les effets (Morgan, 1989) et en combinaison avec d'autres

molécules cytotoxiques telles que l'oxaliplatine (combinaison FOLFOX) ou l'irinotécan (combinaison FOLFIRI). Les combinaisons FOLFOX et FOLFIRI semblent avoir une efficacité équivalente sur les CCR (Sobrero and Bennicelli, 2010), et le choix entre les deux combinaisons peut se faire en fonction des effets secondaires attendus. Les doses administrées ainsi que le rythme des cures varient en fonction des caractéristiques du cancer et de la tolérance au traitement. Le choix du traitement est ainsi déterminé au cas par cas. Pour les cancer métastatiques, ces chimiothérapies conventionnelles peuvent également être associées à des thérapies ciblées qui correspondent à des anticorps monoclonaux ciblant des molécules favorisant la croissance tumorale telles que l'EGFR ou la néo-angiogenèse tumorale telles que le VEGF (Ciombor et al., 2015).

#### 3.1.8.3.2. 5-Fluorouracil

Le 5-Fluorouracil (5-FU) peut être administré par injection intraveineuse en bolus, en perfusion continue ou par voie orale. Plus de 80% du 5-FU administré est dégradé au niveau du foie qui exprime abondamment la dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) responsable du catabolisme du 5-FU en dihydrofluorouracil (DHFU), éliminé par l'organisme (Longley et al., 2003). Le 5-FU est un analogue de la pyrimidine et appartient ainsi à la classe des antimétabolites qui ont pour mode d'action d'inhiber la réplication de l'ADN (Cheung-Ong et al., 2013). Suite à son entrée dans la cellule, le 5-FU est converti par une cascade enzymatique en différents métabolites actifs, à savoir le fluorodeoxyuridine (FdUMP), le fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) et le fluorouridine triphosphate (FUTP). Le FdUMP se lie à la thymidylate synthase (TS), qui a pour rôle de convertir le désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP). Cette liaison inhibe l'activité enzymatique de la TS, ce qui a pour conséquence de bloquer la réplication de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire en diminuant la concentration de dTMP disponible et en augmentant la concentration de dUMP. L'excès de dUMP



#### 3.1.8.3.4. Irinotécan

L'irinotécan est administré par perfusion. Il s'agit d'un dérivé semi-synthétique de la camptothécine. L'irinotécan, aussi appelé CPT-11, est un précurseur non actif qui est converti par une carboxylestérase en composé actif, nommé 7-ethyl-10-hydroxycamptothécine ou SN-38, dans le foie ou au sein des cellules cibles (Fujita, 2015). Il s'agit d'un inhibiteur de la réplication de l'ADN qui se lie au complexe topoisomérase I/ADN, provoquant des cassures simple- et double-brins de l'ADN et la mort cellulaire par autophagie et apoptose (Rivory, 1996; Stanislav et al., 2013; Xu, 2002).

#### 3.1.9. La chimiorésistance des CCR

La résistance des cellules cancéreuses aux molécules de chimiothérapie reste aujourd'hui un problème majeur dans la prise en charge des CCR, associé à une diminution de l'efficacité des traitements et une augmentation des risques de récurrences et de métastases. La résistance d'une tumeur aux molécules de chimiothérapie est généralement associée à une sélection progressive des cellules cancéreuses les plus résistantes de la tumeur au cours du traitement. Au niveau cellulaire, la chimiorésistance peut être intrinsèque aux cellules cancéreuses ou acquise en réponse aux traitements (Kachalaki et al., 2016). Une des techniques principales utilisées *in vitro* pour l'étude des mécanismes moléculaires de chimiorésistance consiste à produire des cellules cancéreuses résistantes en les cultivant pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois avec des doses croissantes d'une molécule de chimiothérapie, puis d'identifier le mécanisme moléculaire responsable. Il sera question de ce type d'études dans les paragraphes suivants.

Il existe un grand nombre de mécanismes moléculaires qui participent à la résistance des cellules cancéreuses aux molécules de chimiothérapie que l'on peut regrouper en 6 catégories principales : l'efflux des molécules de chimiothérapie, la dégradation ou l'inactivation des molécules actives, l'altération des

cibles moléculaires des agents de chimiothérapie, les voies de réparation de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire et la résistance à l'apoptose.

### 3.1.9.1. L'efflux des molécules de chimiothérapie

L'efflux des molécules de chimiothérapie est un mécanisme par lequel la cellule cancéreuse expulse la (les) molécule(s) de chimiothérapie afin d'en diminuer sa concentration intracellulaire et donc son efficacité. Ce mécanisme est réalisé par des transporteurs transmembranaires, majoritairement de la famille des transporteurs ABC. Les transporteurs ABC sont une superfamille regroupant 49 membres divisés en 7 sous-familles allant d'ABCA à ABCG en fonction de leur séquence et de leur homologie de structure. Ils possèdent un ou plusieurs domaines transmembranaires permettant le transport des molécules à travers la membrane, et un ou plusieurs domaines cytoplasmiques qui lient l'ATP (ter Beek et al., 2014). Les transporteurs ABC sont exprimés dans de nombreux tissus et ont pour rôle de permettre l'efflux de molécules endogènes et exogènes néfastes pour la cellule contre leur gradient de concentration *via* l'hydrolyse d'ATP. Ainsi les transporteurs ABC sont capables d'expulser diverses molécules de chimiothérapie et jouent un rôle central dans la chimiorésistance de nombreux cancers dont le CCR (Pan et al., 2016). Trois récepteurs ABC ont été particulièrement étudiés : ABCB1 (ou P-gp), ABCC1 (ou MRP1), et ABCG2 (ou BCRP).

Le transporteur ABCB1 est capable d'utiliser comme substrat de très nombreuses molécules de chimiothérapie telles que la doxorubicine, le docetaxel, la vinblastine ou encore l'actinomycine-D (Hodges et al., 2011). L'expression de ce transporteur a notamment été associée à une faible réponse aux traitements et est un facteur de mauvais pronostic dans la leucémie myéloïde aiguë (Shaffer et al., 2012) et dans le cancer du sein (Mittal et al., 2016). ABCB1 est également exprimé dans le CCR (Ding et al., 2010). L'expression d'ABCB1 a été impliquée dans la résistance des tumores issues de tumeurs coliques

primaires à l'irinotécan (Bitarte et al., 2011; Emmink et al., 2011). De plus, en utilisant la lignée de CCR SW620 Ad300 qui est résistante à la doxorubicine et surexprime ABCB1, des études *in vitro* ont montré que l'inhibition d'ABCB1 augmente leur sensibilité à l'irinotécan (Hu et al., 2014, 2016). Cependant, il n'existe pas, à ce jour, de données cliniques démontrant directement l'implication d'ABCB1 dans la résistance des CCR à l'irinotécan. Par ailleurs, l'étude *in vitro* de lignées cellulaires de CCR résistantes au 5-FU ont également montré que ces cellules résistantes surexprimaient ABCB1 par rapport à la lignée initiale (Wang et al., 2015). Cependant, le rôle du transporteur ABCB1 dans la résistance des CCR au 5-FU reste à confirmer en clinique (De Iudicibus et al., 2008).

Le transporteur ABCC1 est exprimé dans différents cancers tels que le CCR, le cancer du poumon, le cancer de l'œsophage, ainsi que certaines leucémies. Sa forte expression est associée à une résistance aux traitements et est un facteur de mauvais pronostic (Hopper-Borge, 2013; Meijer et al., 1999; Munoz et al., 2007). Les études menées à partir de lignées cellulaires résistantes ont montré que la surexpression du transporteur ABCC1 est associée à une résistance à l'oxaliplatine ainsi qu'au 5-FU (Cao et al., 2017; Montazami et al., 2015).

Le transporteur ABCG2 est également associé à une chimiorésistance et à un mauvais pronostic dans différents cancers tels que la leucémie myéloïde aiguë, le cancer du sein ou encore le cancer du poumon (Mao and Unadkat, 2015). Dans le CCR, le transporteur ABCG2 a été particulièrement associé à une résistance accrue à l'irinotécan. En effet, de nombreuses études *in vitro* ont montré une corrélation positive entre l'acquisition d'une résistance à l'irinotécan ou son composé actif, le SN-38, et l'expression d'ABCG2 dans les lignées cellulaires de CCR (Candeil et al., 2004; Mazard et al., 2013; Zhu et al., 2012). Une étude réalisée à partir de cellules cancéreuses issues de résections de patients atteints d'un CCR et traités au FOLFIRI, a montré une corrélation entre une surexpression du transporteur ABCG2 et la résistance des cellules cancéreuses à l'irinotécan *in vitro*. De plus, les auteurs ont montré que les patients

dont les cellules cancéreuses étaient les plus résistantes à l'irinotécan, avaient le plus faible taux de survie sans aggravation (Tuy et al., 2016).

### 3.1.9.2. Mécanismes de dégradation ou d'inactivation des molécules de chimiothérapie

La résistance des cellules cancéreuses aux molécules de chimiothérapie peut être la conséquence d'une augmentation de la dégradation ou de l'inactivation des molécules actives chimiothérapeutiques. La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) est une enzyme provoquant la dégradation intracellulaire du 5-FU en dihydrofluorouracil (DHFU), empêchant ainsi sa conversion en molécules actives. Des études *in vitro* ont montré que la surexpression de la DPD dans les cellules cancéreuses coliques provoquait une augmentation de la résistance au 5-FU (Chai et al., 2015; Nita et al., 1998). De plus, il existe une corrélation négative entre le niveau d'expression de la DPD dans les tumeurs coliques et la réponse des patients aux traitements de chimiothérapie (Salonga et al., 2000; Terashima et al., 2003), appuyant l'hypothèse que la DPD est directement impliquée dans la résistance cellulaire au 5-FU.

Les Glutathione S-transferases (GST), sont une famille d'enzymes intervenant dans la détoxification cellulaire en catalysant des réactions de conjugaison du glutathion à certains xénobiotiques (Sheehan et al., 2001). Parmi les différentes enzymes appartenant aux GST (Alpha, Pi, Mu, Theta, Zeta), la Glutathione S-transferase Pi (GST- $\pi$ ) a été associée à une augmentation de la résistance des cellules cancéreuses aux platines. Ainsi, la GST- $\pi$  forme des adduits platine-glutathion qui provoquent l'inactivation des sels de platine et favorisent leur excrétion en dehors de la cellule (Zaman et al., 1995). La corrélation entre la surexpression de la GST- $\pi$  et une résistance accrue aux sels de platine a été mise en évidence *in vitro* dans le cancer du sein et dans le mésothéliome (Chen et al., 2014; Sawers et al., 2014). Cependant, il n'existe pas, à ce jour, d'études démontrant directement l'implication de la GST- $\pi$  dans la résistance des cellules cancéreuses coliques à l'oxaliplatine.



Enfin, le composé actif issu du métabolisme de l'irinotécan, le SN-38, est aussi inactivé par voie enzymatique, et plus spécifiquement par l'uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 (UGT1A1). En effet, une étude *in vitro* a montré que l'expression d'UGT1A1 dans les cellules épithéliales tumorales était associée à une augmentation de l'inactivation de SN-38 (Gagnon, 2006), suggérant un rôle potentiel joué par UGT1A1 dans la résistance des CCR à l'irinotécan.

### 3.1.9.3. L'altération des cibles moléculaires

Comme indiqué précédemment, le 5-FU inhibe la réplication de l'ADN en partie *via* l'inhibition de la thymidine synthase (TS). Ceci suggère que la résistance des cellules cancéreuses au 5-FU pourrait être directement liée au niveau d'expression de la TS. Ainsi, *in vitro*, des lignées cellulaires de CCR résistantes au 5-FU surexpriment la TS (Copur et al., 1995), et l'inhibition de son expression augmente la sensibilité des cellules au 5-FU (Ahn et al., 2015; Li et al., 2015; Sun et al., 2015), indiquant un rôle clé du niveau d'expression de la TS dans la réponse cellulaire au 5-FU.

D'une façon similaire, la topoisomérase I, cible du SN-38, est associée à la résistance des cellules cancéreuses à l'irinotécan. De manière intéressante, cette résistance a été associée à une diminution de l'expression et/ou de l'activité de la topoisomérase I (Arakawa, 2006; Bandyopadhyay and Gjerset, 2011; Boyer et al., 2004; Jansen et al., 1997). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que cette diminution limite la liaison du SN-38 au complexe topoisomérase I/ADN qui provoque des cassures de l'ADN. Récemment, une étude menée *in vitro* à partir de lignées cellulaires de CCR a montré que la résistance au SN-38 pouvait également être liée à la présence de mutations génétiques provoquant une diminution de sa capacité de liaison avec le SN-38 (Jensen et al., 2016).

#### 3.1.9.4. Les voies de réparation de l'ADN

Il existe 5 voies majeures de réparation de l'ADN qui sont activées en fonction du type de lésions de l'ADN. La voie BER, NER et MMR interviennent dans le cas de lésions simple-brin, et les voies HR et NHEJ prennent en charge les cassures double-brin.

##### 3.1.9.4.1. La voie BER

La voie de réparation par excision de bases (BER pour Base Excision Repair) est une voie de réparation de l'ADN impliquée dans la réparation d'une lésion provoquée par un seul nucléotide. Le mécanisme moléculaire mis en jeu repose sur différentes étapes. Tout d'abord, une glycosylase élimine la base altérée ou modifiée. Ensuite, une endonucléase (APE1) clive le brin d'ADN au niveau du site abasique. L'ADN polymérase  $\beta$  réinsère le nucléotide manquant en utilisant le brin complémentaire intact comme matrice. Enfin, une ligation du brin d'ADN par le complexe XRCC1-ligase III permet une restauration de la continuité du brin d'ADN (Kim and Wilson, 2012).

##### 3.1.9.4.2. La voie NER

La réparation par excision de nucléotides (NER pour Nucleotide Excision Repair) est impliquée dans la réparation d'une lésion de plusieurs dizaines de nucléotides. Cette voie est activée par la détection d'une déformation de la double hélice d'ADN engendrée par ce type de lésion. En fonction de la zone dans laquelle se trouve la lésion, deux voies de détection sont possibles. D'une part, la voie TC-NER (transcription-coupled NER) est responsable des régions transcrites du génome et fait intervenir l'ARN-polymérase II. D'autre part, la voie GG-NER (global genome NER) est responsable du reste du génome et implique le complexe RPA, XPA et XPC. Le brin d'ADN est alors coupé de part et d'autre de la lésion par

les endonucléases XPG et XPF-ERCC1 pour être éliminé, puis la partie excisée est resynthétisée par les ADN polymérasés  $\delta/\epsilon$  et remise en continuité de l'ADN par les ligases I et XRCC1-ligase III (Scharer, 2013).

#### 3.1.9.4.3. La voie MMR

La voie de réparation des mésappariements (MMR pour Mismatch Repair) intervient dans les lésions de l'ADN causées par la présence de bases mal appariées issues de phénomènes de substitutions, d'insertions ou de délétions provoqués pendant la réplication de l'ADN. Les complexes de détection de ces mésappariements post-réplication varient en fonction du nombre de bases impliquées. Le complexe formé par les protéines MSH2–MSH6 reconnaît les mésappariements d'une base, tandis que le complexe MSH2–MSH3 reconnaît les mésappariements survenant sur plusieurs bases. Ces complexes permettent ensuite le recrutement du complexe MLH1 et PMS2, initiant la réparation des lésions par le recrutement des molécules impliquées dans l'excision et la resynthèse de l'ADN (EXO1, RPA, RFC, ADN polymérasés et ligase I) (Li and Martin, 2016).

#### 3.1.9.4.4. Les voies HR et NHEJ

La recombinaison homologue (HR pour Homologous Recombination) et la recombinaison non homologue (NHEJ pour Non Homologous End Joining) sont deux voies impliquées dans la réparation des cassures double-brin.

La HR est un processus de réparation de l'ADN qui a lieu pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire, et est basée sur l'utilisation de la chromatide sœur pour remplacer la portion d'ADN lésée. Cette voie implique le recrutement et la fixation du complexe MRN formé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1, aux extrémités de la cassure. Le complexe MRN génère la formation d'une extrémité 3' sur le simple brin

sortant de la cassure qui est immédiatement recouverte par la Replication protein A (RPA). Les étapes suivantes correspondent à la recherche de la séquence homologue présente sur la chromatide sœur afin de créer un hétéroduplex, appelé D-loop, entre le brin complémentaire et l'extrémité 3' du brin à réparer faisant intervenir notamment la protéine Rad54. Cette structure permet ensuite la synthèse de l'ADN manquant par une ADN polymérase en utilisant le brin complémentaire comme substrat, et donc la ré-acquisition de l'information perdue par le brin lésé.

La NHEJ intervient dans la réparation des cassures double-brin en dehors des phases S et G2 du cycle cellulaire. Ainsi, sans chromatide sœur comme support pour resynthétiser la partie manquante de l'ADN, elle correspond à la ligation des deux extrémités de la cassure double-brin. Ainsi les extrémités de la lésion sont prises en charge par l'hétérodimère KU70-KU80, suivi par le recrutement de la kinase DNA-PKcs, ce qui permet d'activer le complexe de ligation XRCC4/Ligase IV afin de restaurer la continuité de l'ADN.

Les cassures double-brin provoquent également l'activation de la serine-thréonine kinase *ataxia telangiectasia-mutated* (ATM) qui appartient à la famille des PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase). Suite aux cassures double-brin, ATM est recruté au niveau de la lésion par le complexe MRN, s'autophosphoryle au niveau des sérines 367, 1893 et 1981 et se monomérisse (Kozlov et al., 2011). ATM, ainsi activé, phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans différentes voies participant aux mécanismes de réparation des cassures double-brin. ATM phosphoryle notamment l'histone H2AX sur le résidu serine 139 dont la forme phosphorylée  $\gamma$ H2AX joue un rôle clé dans le remodelage de la chromatine, ainsi que dans la formation de foci permettant le recrutement de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Rothkamm et al., 2015; Turinetto and Giachino, 2015).

Outre sa fonction dans la réparation de l'ADN, il est à noter que ATM est également impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire ou encore de l'apoptose (Smith et al., 2010; Stracker et al., 2013). Notamment, ATM active la Checkpoint Kinase 2 (Chk2), qui phosphoryle CDC25A et CDC25C, provoquant un arrêt du cycle cellulaire en phase S ou G2. ATM peut également, directement ou *via* l'intermédiaire de Chk2,

phosphoryler la protéine p53, qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2/M et l'activation de voies pro-apoptotiques. ATM peut aussi activer BRCA1 qui joue un rôle central dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire (Wu et al., 2010).

#### 3.1.9.4.5. Réparation de l'ADN et chimiothérapies des CCR

Le 5-FU, l'oxaliplatine et l'irinotécan engendrent des lésions au niveau de l'ADN. De par leur mode d'action (cf. Chapitre 3.1.8.3.), l'oxaliplatine et l'irinotécan provoquent des cassures double-brin, et activent les voies de réparation de l'ADN HR et NHEJ ainsi qu'ATM (Chiu et al., 2008, 2009; Haug et al., 2008; Tomicic and Kaina, 2013). Le 5-FU provoque des dommages simple-brin et des cassures double-brin, et active donc plus largement les voies BER, MMR et les voies liées aux cassures double-brin, ainsi qu'ATM (De Angelis, 2011; Srinivas et al., 2015; Wyatt and Wilson, 2009). En réalité, il semblerait que chacune des 5 voies de réparation de l'ADN puisse intervenir dans la réponse cellulaire à ces 3 molécules, et que ces voies puissent dans certains cas promouvoir la résistance ou la mort des cellules cancéreuses. Ainsi, bien qu'il n'existe que peu de données montrant un lien direct entre l'activité d'une voie de réparation de l'ADN et une résistance accrue à ces molécules de chimiothérapie dans le CCR, une étude a notamment montré que la diminution de l'expression de MSH2 dans les cellules cancéreuses coliques induite par miR-21, diminue la sensibilité au 5-FU en empêchant l'arrêt du cycle cellulaire et le processus d'apoptose *in vitro* ou *in vivo* dans un modèle de xénogreffes (Valeri et al., 2010). Un résultat similaire avait également décrit qu'une lignée de cellules cancéreuses coliques mutées pour MLH1, étaient plus résistantes au 5-FU que les cellules proficientes pour cette molécule (Meyers et al., 2001). Ces données suggèrent que la voie MMR participe aux effets létaux du 5-FU en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et en promouvant l'entrée des cellules en apoptose. Cependant, une autre étude a montré que la surexpression de Rad18, intervenant dans la voie HR, augmentait la résistance des cellules cancéreuses coliques au 5-

FU *in vitro* et *in vivo* (Liu et al., 2015). Ces études suggèrent ainsi que la voie HR est impliquée dans la résistance au 5-FU des cellules du CCR. Il a également été montré que des lignées de cellules cancéreuses coliques résistantes à l'oxaliplatine surexpriment les protéines ERCC1 and XPA, impliquées dans la voie NER (Arnould et al., 2003; Boyer et al., 2004), indiquant un rôle de la voie NER dans la résistance à l'oxaliplatine.

#### 3.1.9.5. Altération des points de contrôle du cycle cellulaire

Les points de contrôle ou de surveillance (checkpoint) du cycle cellulaire permettent notamment, de contrôler l'intégrité de l'ADN avant, pendant et après sa réplication, ainsi que pendant la mitose. En cas d'anomalie, la progression du cycle cellulaire est interrompue afin de permettre la réparation de l'ADN ou d'engager la mort cellulaire par voie apoptotique si les anomalies sont trop importantes. Plusieurs études suggèrent que la perturbation des points de surveillance peut provoquer une augmentation de la résistance aux molécules de chimiothérapie dans les cellules cancéreuses, et ce principalement *via* des mécanismes moléculaires mettant en jeu la voie p53 qui contrôle la progression du cycle cellulaire et l'activation des voies apoptotiques (O'Connor et al., 1997). En effet, des mutations dans le gène codant pour p53, qui sont présentes dans 40 à 50% des CCR, sont un évènement majeur dans les processus de carcinogénèse (Li, 2015). De plus, une étude *in vitro* utilisant des lignées de cellules de CCR a montré que la perte d'expression de p53 induisait une résistance au 5-FU et à l'oxaliplatine (Boyer et al., 2004). Par ailleurs, une expérience réalisée sur différentes lignées cancéreuses coliques mutées ou non (WT) pour p53 ont montré que l'oxaliplatine provoquait une diminution du nombre de cellules en phase S dans les lignées p53 WT par rapport aux lignées mutées pour p53 (Toscano et al., 2007). L'ensemble de ces travaux suggère que l'inhibition de p53 dans les cellules cancéreuses stimule leur chimiorésistance en empêchant l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation des voies pro-apoptotiques.

### 3.1.9.6. Résistance à l'apoptose

Un des mécanismes clés impliqués dans la chimiorésistance est la résistance à l'apoptose qui est régulée par de nombreuses voies de signalisation dont notamment p53 cité dans le paragraphe précédent ou encore la famille des protéines Bcl-2. Cette famille comprend les protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, Bcl-XL ou encore Mcl-1, ainsi que les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bad, Bcl-2 et Bak. Ainsi, plusieurs études indiquent que les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la résistance à l'apoptose des cellules des CCR. Notamment, *in vitro*, la résistance au 5-FU de différentes lignées cellulaires cancéreuses coliques est associée à une surexpression des gènes codants pour les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL, et une sous-expression des gènes codants pour les molécules pro-apoptotiques Bax et Bid (Konishi et al., 2006; Manoochehri et al., 2014; Violette et al., 2002). Une étude a également mis en évidence une mutation dans le gène codant pour Bax dans une lignée de cellules cancéreuses coliques résistantes à l'oxaliplatine (Gourdier et al., 2002).

Tous ces résultats montrent une très grande diversité dans les mécanismes cellulaires liés à la chimiorésistance. De plus, il existe différentes sous-populations de cellules cancéreuses au sein de la tumeur possédant des capacités de chimiorésistance différentes. Parmi ces sous-populations, l'une d'entre elles possède un potentiel de chimiorésistance accrue mais également de fortes capacités tumorigéniques et métastatiques : les cellules souches cancéreuses.

### 3.2. Les cellules souches cancéreuses

#### 3.2.1. Le modèle des cellules souches cancéreuses

Deux modèles distincts ont été proposés pour expliquer l'initiation et la progression d'un cancer. Le premier modèle à avoir été établi est le modèle stochastique ou de l'évolution clonale. Selon ce modèle, toute cellule cancéreuse peut contribuer à la formation et au développement d'une tumeur par accumulation de mutations génétiques lui conférant un avantage sélectif sur d'autres clones en matière de prolifération et/ou de survie (Caiado et al., 2016). Dans ce modèle, les tumeurs évolueraient au cours du temps suivant un principe de « sélection naturelle », permettant une adaptation constante de la tumeur à la pression de son environnement.

A partir des années 2000, un nouveau modèle a émergé pour expliquer l'initiation et la progression du cancer. Ce modèle propose l'existence d'une hiérarchie cellulaire au sein de la tumeur, avec au sommet de cette hiérarchie une sous-population de cellules appelées cellules initiatrices de tumeur ou cellules souches cancéreuses (CSC). Les CSC possèdent les caractéristiques spécifiques des cellules souches adultes à savoir la capacité d'auto-renouvellement et la capacité de générer tous les types de cellules composant la tumeur. Ainsi, les CSC seraient la seule sous-population tumorale capable d'initier la formation d'une tumeur.

Le concept des CSC apporte aussi un élément nouveau pour expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale, correspondant à la présence de différentes sous-populations de cellules cancéreuses avec des morphologies, des mutations génétiques, un métabolisme, ainsi que des phénotypes distincts (Tellez-Gabriel et al., 2016). Cette intra-hétérogénéité tumorale ne serait pas uniquement due aux phénomènes d'instabilité génétique, de modifications épigénétiques et d'interactions cellulaires avec le microenvironnement tumoral (Caiado et al., 2016; Melo et al., 2013), mais serait également issue d'une



diversité dans les états de différenciation des cellules cancéreuses provoquée par les capacités des CSC à donner l'ensemble des types cellulaires différenciés qui composent la tumeur (Kozovska et al., 2014).

### 3.2.2. Découverte des CSC

La première expérience mettant en évidence l'existence de CSC a été réalisée en 1997 par Bonnet et Dick dans la leucémie myéloïde aiguë. Cette étude a démontré qu'une sous-population de cellules cancéreuses exprimant le marqueur CD34 et négatives pour le marqueur CD38 était capable de reconstituer l'hétérogénéité phénotypique du cancer dont elles étaient issues après avoir été injectées dans la veine de la queue de souris immunodéficientes (Bonnet and Dick, 1997). L'existence de CSC dans les tumeurs solides a été démontrée pour la première fois en 2003 dans le cancer du sein. Cette étude montre en particulier que l'injection de 100 cellules CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> isolées de tumeurs primaires au niveau des glandes mammaires de souris immunodéficientes provoquait la formation d'une tumeur présentant une hétérogénéité phénotypique comparable à la tumeur initiale. En revanche, 10 000 cellules CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> n'étaient pas capables d'initier la formation d'une tumeur, démontrant ainsi que seule une sous-population de cellules cancéreuses, définies comme étant les CSC CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, était capable d'initier la formation d'une tumeur (Al-Hajj et al., 2003). La même année, une étude *in vitro* utilisant un modèle de culture de cellules issues de tumeurs cérébrales en condition non-adhérente a permis de mettre en évidence que seule une partie des cellules cancéreuses mises en culture avait la capacité à former des colonies flottantes, appelées sphères. Ces cellules exprimaient le marqueur CD133 et possédaient les deux caractéristiques fondamentales d'une cellule souche, à savoir la capacité de s'auto-renouveler et de donner naissance à tous les types de cellules plus différenciées présents dans la tumeur initiale (Singh et al., 2003). Une seconde étude du même groupe a par la suite montré que cette sous-population de cellules cancéreuses CD133<sup>+</sup> était capable de former une tumeur identique à la tumeur

primaire lorsqu'elles étaient injectées dans la boîte crânienne de souris immunodéficientes (Singh et al., 2004).

La présence de CSC a été mise en évidence dans le CCR en 2007 (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Deux études publiées dans le même numéro de *Nature* ont mis en évidence la présence de CSC exprimant le marqueur CD133 dans des tumeurs coliques primaires humaines. Plus spécifiquement, l'étude de Ricci-Vitiani a montré que l'injection de 3 000 cellules CD133<sup>+</sup> dans des souris immunodéficientes provoquait la formation de tumeurs, alors que 100 000 cellules CD133<sup>-</sup> n'en étaient pas capables. De plus, cette étude a montré que les cellules CD133<sup>+</sup> étaient capables de former des sphères dans un modèle de culture non-adhérente *in vitro*, et qu'elles conservaient leur capacité à former des tumeurs identiques à la tumeur d'origine *in vivo* même après plusieurs passages. L'étude d'O'Brien a déterminé par des expériences de xénogreffes en dilution limite que l'injection de 262 cellules CD133<sup>+</sup> était suffisante à la formation d'une tumeur, alors que 50 000 cellules CD133<sup>-</sup> en étaient incapables.

Les CSC ont désormais été mises en évidence dans de nombreux cancers tels que le cancer de la prostate (Collins et al., 2005), de l'ovaire (Zhang et al., 2008), du pancréas (Li et al., 2009), ou encore du poumon (Eramo et al., 2008).

### 3.2.3. Modèles d'études des CSC

Il existe deux techniques principales pour mettre en évidence et étudier les propriétés des CSC : les techniques de xénogreffe *in vivo* et de culture en 3 dimensions (3D) *in vitro*.

Le modèle de xénogreffe correspond à l'injection de CSC dans des modèles de souris immunodéficientes. Les souris utilisées sont généralement « sévèrement » immunodéficientes pour faciliter la prise de greffe et la pousse tumorale. Elles peuvent être notamment de type NOD-SCID ou SCID

Beige caractérisées par une absence de lymphocytes B, T et de cellules NK (Natural Killer). Les SCID Beige possèdent en plus une mutation affectant les macrophages.

L'utilisation du modèle de xénogreffe permet notamment de déterminer le potentiel tumorigénique d'une population cellulaire correspondant à sa capacité à initier la formation d'une tumeur à travers des expériences de dilution limite. Ces expériences consistent à injecter un nombre de plus en plus faible de CSC afin de déterminer le nombre minimum théorique nécessaire de cellules permettant la formation d'une tumeur. C'est ainsi que, l'étude d'O'Brien évoqué dans le paragraphe précédent, a déterminé que les cellules CD133<sup>+</sup> avait un potentiel tumorigénique nettement plus élevé que les cellules CD133<sup>-</sup>, étant donné que 262 cellules CD133<sup>+</sup> étaient suffisantes à la formation d'une tumeur, alors que 50 000 cellules CD133<sup>-</sup> en étaient incapables (O'Brien et al., 2007).

Le modèle de xénogreffe est le modèle de référence *in vivo* pour étudier les mécanismes de carcinogénèse associés aux CSC, tels que la réponse à la chimiothérapie ou la radiothérapie, la formation de métastases, ou encore pour étudier les interactions entre les CSC et d'autres types cellulaires *via* des techniques d'injections concomitantes (Kang, 2009). La croissance des tumeurs peut être mesurée *in situ* en injectant des CSC exprimant un gène marqueur entraînant une émission d'un signal fluorescent ou bioluminescent, tel que le gène codant pour la luciférase, catalysant une réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine administrée aux souris. L'injection des CSC se fait le plus souvent en sous-cutanée au niveau des flancs ou en orthotopique, c'est-à-dire au sein de l'organe dont les cellules cancéreuses sont issues. Elle peut également se faire dans la circulation sanguine ou en intrapéritonéal pour l'étude des propriétés métastatiques des CSC.

Bien que ce modèle soit couramment utilisé pour l'étude des CSC, il possède néanmoins certaines limites. Dans le cas de l'injection en sous-cutanée, les CSC ne sont pas dans le lieu de développement « naturel » de la tumeur, posant le problème d'un microenvironnement différent de celui associé à la tumeur initiale (Clevers, 2011). L'injection orthotopique de CSC permet un développement tumoral dans

le tissu correspondant au tissu originel de la tumeur primaire (Kreso and Dick, 2014; Tseng et al., 2007). Cependant, l'absence de système immunitaire reste un problème majeur dans ce modèle car le système immunitaire est une composante importante du microenvironnement tumoral. Ainsi, des modèles de souris humanisées se développent pour permettre d'intégrer la composante immunitaire au microenvironnement tumoral (Morton et al., 2016). Une autre limite à ce modèle d'injection de CSC de tumeurs humaines chez la souris est également la faible analogie de séquence de certaines molécules et certains récepteurs (Kreso and Dick, 2014).

Les modèles d'études des CSC *in vitro* utilisent, comme pour l'étude des cellules souches normales intestinales ou coliques, des systèmes de culture en 3 dimensions. Ces modèles permettent la formation de structures multicellulaires tridimensionnelles avec une exposition hétérogène à l'oxygène et aux nutriments ainsi que des interactions cellulaires plus proches des conditions présentes *in situ* qu'une culture en 2 dimensions (Weiswald et al., 2015). La culture des CSC en 3 dimensions utilise principalement deux méthodes : en culture flottante ou en matrice. La culture flottante consiste à cultiver les CSC dans des flasques, des boîtes ou des plaques de culture n'autorisant pas l'adhésion des cellules. Ce modèle permet la formation de structures tridimensionnelles appelées sphères. Une des limites de ce modèle est que les CSC et/ou les sphères peuvent s'agréger entre elles, ce qui n'autorise ainsi pas le dénombrement du nombre de sphères formées à partir du nombre de CSC initialementensemencées. D'autre part, ce modèle ne permet également pas de réaliser des expériences de co-culture pour étudier les communications paracrines entre les CSC et d'autres types cellulaires, étant donné que les sphères peuvent adhérer au pôle baso-latéral des filtres Transwell communément utilisés dans ce type d'expériences. Une des alternatives aux cultures flottantes est la culture des CSC ensemencées à faible densité à l'intérieur d'une matrice telle que le Matrigel, ce qui permet non seulement les études de co-culture mais aussi le dénombrement des sphères formées à partir du nombre de CSC initialement ensemencées (Weiswald et al., 2015).

### 3.2.4. Marqueurs des CSC

De nombreux marqueurs, dont la majorité correspond à des protéines membranaires, ont été décrits pour permettre la visualisation directe, la quantification et/ou l'isolation des CSC coliques. Il convient de noter que la plupart des marqueurs des CSC sont exprimés dans le tissu sain et notamment dans les CS « normales », rendant ces marqueurs inadaptés pour différencier une CSC d'une CS normale (Huang et al., 2009; King et al., 2012; Smith et al., 2017; Snippert et al., 2009; Zeilstra et al., 2008).

L'utilisation de marqueurs pour étudier les CSC est généralement basée sur un principe de gradient d'expression. En effet, la majorité des marqueurs utilisés, si ce n'est tous, ne sont pas exclusivement exprimés dans les CSC. A l'inverse, ils sont exprimés par la totalité ou une partie des cellules de la tumeur, mais selon des niveaux d'expression distincts. Le plus souvent, les CSC présentent les niveaux d'expression les plus élevés. Néanmoins, il est à noter que les CSC correspondent parfois aux cellules exprimant des niveaux intermédiaires (voire négatifs) d'un marqueur. L'expression des marqueurs des CSC varie également en fonction des lignées cellulaires et des patients limitant la possibilité de n'utiliser qu'un seul marqueur. Ainsi on utilise aujourd'hui préférentiellement des combinaisons de différents marqueurs pour isoler les CSC des CCR (Dalerba et al., 2007; Yeung et al., 2010; Zhou et al., 2016). Les marqueurs les plus couramment utilisés dans le CCR sont les marqueurs CD133, CD44, CD24, CD166 ou encore ALDH1.

#### 3.2.4.1. Le marqueur CD133

Le marqueur CD133, ou prominin-1, est une glycoprotéine transmembranaire de 120 kDa contenant 5 domaines transmembranaires (Catalano et al., 2012) et dont la fonction précise n'est pas définie. CD133 est un marqueur très largement utilisé pour l'isolation et la caractérisation des CSC, et notamment les CSC coliques. Comme énoncé dans les paragraphes précédents, plusieurs études ont en effet montré la capacité des cellules CD133<sup>+</sup> à initier la formation de tumeurs *in vivo* et de sphères *in vitro* identiques à la

tumeur d'origine contrairement aux cellules CD133<sup>-</sup> (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Todaro et al., 2007). Cependant, une étude a montré que les niveaux d'expression du gène codant pour CD133 ne permettent pas d'identifier les CSC (Shmelkov et al., 2008). Il semblerait que l'accessibilité de l'épitope reconnu par les anticorps utilisés pour isoler les CSC, et non le niveau d'expression de la glycoprotéine, soit le véritable marqueur des CSC (Kemper et al., 2010). En effet, l'épitope de ces anticorps est masqué lors de la différenciation des cellules par un changement conformationnel. L'accessibilité de l'épitope serait donc corrélée à l'état souche de la cellule cancéreuse. Ainsi, le marqueur CD133 ne semble pas être approprié pour des études par immunohistochimie ou par analyse de l'expression génétique (Kemper et al., 2010). Cela rend également difficile l'analyse de ce marqueur comme facteur pronostique potentiel dans le CCR (Chen et al., 2013; Fathi et al., 2017; Mia-Jan et al., 2013).

#### 3.2.4.2. Le marqueur CD44

Le marqueur CD44 est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans les processus d'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice. Il s'agit d'un récepteur à l'acide hyaluronique qui peut également interagir avec d'autres composants de la matrice extracellulaire tels que l'ostéopontine, le collagène, ou encore la fibronectine (Ponta et al., 2003). Le gène codant pour CD44 est composé de 20 exons dont 10, nommés de v1 à v10, peuvent subir des épissages alternatifs (Orian-Rousseau and Sleeman, 2014). Les différentes isoformes de CD44 sont impliquées dans les processus d'adhésion, de différenciation, de motilité, de migration ou encore d'angiogenèse dans de nombreux types cellulaires. Certaines isoformes sont également des co-récepteurs pour de nombreux facteurs de croissance. C'est notamment le cas de l'isoforme v6 qui agit comme co-récepteur de l'HGF ou du VEGF (Orian-Rousseau and Sleeman, 2014). De nombreuses études ont montré que les CSC coliques expriment des niveaux très élevés de CD44 (Chu et al., 2009; Dalerba et al., 2007; Du et al., 2008; Fan et al., 2011). De plus, certains variants de CD44, tels

que CD44v9 (Kimura et al., 2013) et CD44v6 (Todaro et al., 2014) semblent être des marqueurs de mauvais pronostic chez les patients (Fan et al., 2012a).

#### 3.2.4.3. Le marqueur CD24

Le marqueur CD24 est une petite protéine de surface ancrée à la membrane par le biais d'un glycosyl-phosphatidyl-inositol, et est impliquée dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice. CD24 est un ligand alternatif aux P-selectin (Aigner et al., 1998), et est également impliqué dans les mécanismes d'adhésion des cellules tumorales à la fibronectine, au collagène et à la laminine, stimulant la prolifération et la motilité cellulaire (Baumann et al., 2005). L'expression du marqueur CD24 dans les CSC semble être dépendante du type de tumeur. En effet, la première étude mettant en évidence la présence de CSC dans le cancer du sein s'est basée sur l'expression du marqueur CD44 et l'absence d'expression du marqueur CD24 (Al-Hajj et al., 2003). L'association CD44<sup>Hi/+</sup> / CD24<sup>Lo/-</sup> est depuis communément utilisée pour isoler les CSC du cancer du sein (Blick et al., 2010; Marotta et al., 2011; Nami et al., 2016). En revanche, la forte expression du marqueur CD24 est utilisée pour isoler les CSC à partir des cancers de l'ovaire ou du pancréas (Gao et al., 2010; Li et al., 2007). Dans le CCR, de nombreuses études ont montré que la forte expression du marqueur CD24 permet d'isoler les CSC (Ke et al., 2012; Yeung et al., 2010). Cependant, l'utilisation du marqueur CD24 comme facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints d'un CCR est débattu (Choi, 2009; Weichert, 2005).

#### 3.2.4.4. Le marqueur CD166

Le marqueur CD166, aussi appelé Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM), est une molécule d'adhésion cellulaire de type glycoprotéine appartenant à la superfamille des

immunoglobulines. La forte expression du marqueur CD166 est utilisée pour l'isolation des CSC coliques (Levin et al., 2010), notamment en combinaison du marqueur CD44 (Dalerba et al., 2007). De plus, la forte expression de CD166 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un CCR (Weichert, 2004).

#### 3.2.4.5. Les autres marqueurs des CSC

D'autres marqueurs membranaires ont été proposés pour identifier les CSC coliques. C'est le cas du marqueur CD29 (Vermeulen et al., 2008), du marqueur CD66c (Gemei et al., 2013), ou encore du marqueur Lgr5 (Kobayashi et al., 2012; Shimokawa et al., 2017). Cependant, il n'existe pas d'anticorps valides pour Lgr5, ce qui limite son utilisation pour l'isolation des CSC.

Des protéines non-membranaires peuvent aussi être utilisées pour isoler et étudier les CSC. C'est notamment le cas d'ALDH1 qui est une enzyme cytosolique de détoxification impliquée dans l'oxydation des aldéhydes. L'isolation des CSC à partir de ce marqueur se fait *via* l'utilisation de dansyl aminoacetaldehyde qui diffuse dans les cellules et est converti par ALDH1 en dansyl aminoacetate fluorescent. Le dansyl aminoacetate est alors retenu dans les cellules et permet l'isolation des CSC par tri cellulaire (Shenoy et al., 2012). L'utilisation d'ALDH1 comme marqueur des CSC coliques a été proposée pour la première fois dans une étude de 2009 montrant que l'injection de cellules cancéreuses coliques ALDH1<sup>+</sup> dans des souris immunodéficientes provoque la formation de tumeurs contrairement aux cellules ALDH1<sup>-</sup> (Huang et al., 2009).

Un autre modèle d'isolation des CSC ne faisant pas intervenir de protéines membranaires a également été décrit. Ce modèle est basé sur les capacités d'une cellule à expulser le colorant Hoechst dues notamment à une forte expression de certains transporteurs ABC dont ABCG2. En effet, des études ont montré que la faible rétention du colorant Hoechst 3334 permettait d'isoler une sous-population de



cellules cancéreuses, appelée Side Population (SP), possédant les caractéristiques de CSC (Feng et al., 2015; Xiong et al., 2014).

### 3.2.5. Propriétés des CSC

Outre leurs capacités à s'auto-renouveler et à donner naissance à tous les types cellulaires qui composent la tumeur, de nombreuses études ont montré que les CSC possèdent également un fort potentiel invasif et métastatique, ainsi qu'une résistance accrue à la chimiothérapie et radiothérapie.

#### 3.2.5.1. Capacités d'invasion et de métastase

L'invasion tumorale correspond à la propagation des cellules tumorales au sein d'un tissu adjacent à la tumeur par des mécanismes de dégradation de la matrice extracellulaire et de migration cellulaire. La formation de métastases correspond à l'initiation et au développement d'une nouvelle tumeur à distance du foyer primaire, et inclut les étapes d'invasion tumorale, du passage dans la circulation sanguine ou lymphatique (intravasation), de la sortie de la circulation (extravasation) et du développement d'une tumeur secondaire.

Dans le cas du CCR, des expériences menées *in vitro* montrent que les CSC isolées à partir du marqueur CD133 ont des capacités accrues de migration (déterminées par la capacité des cellules à migrer au travers d'un filtre) et d'invasion (déterminées par la capacité des cellules à migrer au travers d'un filtre recouvert d'une couche de matrice protéique mimant la matrice extracellulaire) (Elsaba et al., 2010; Ieta et al., 2008). Des travaux ont également montré que l'injection de sphères enrichies en CSC CD133<sup>+</sup> en intra-splénique aboutissait à la formation de métastases hépatiques chez des souris BALB/c Nude, contrairement à des cellules cancéreuses adhérentes non enrichies en CSC (Han et al., 2013). Le potentiel

invasif et métastatique élevé des CSC est associé à une suractivation du programme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), qui joue un rôle clé dans les processus de métastases. La TEM est un processus au cours duquel les cellules épithéliales qui sont, en situation physiologique, polarisées et liées entre elles et à la matrice extracellulaire par le biais de plusieurs complexes jonctionnels multiprotéiques, sont reprogrammées sur le plan transcriptionnel provoquant notamment une rupture des liaisons cellule-cellule et cellule-matrice, une perte de polarité, un remodelage du cytosquelette, une résistance au processus d'anoikis et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux caractérisé par de fortes capacités d'invasion et de migration (Cao et al., 2015). Ainsi, il a été montré que les CSC possèdent des capacités migratoires et invasives accrues, caractéristiques de la TEM (Ghuwalewala et al., 2016). De plus, il a été montré que l'expression ectopique des facteurs de transcription clés de la TEM, Twist ou Snail, dans des cellules épithéliales mammaires différenciées induit l'acquisition d'un phénotype de CSC (déterminée par l'expression des marqueurs des CSC et la capacité à former des sphères) (Mani et al., 2008). Des résultats similaires ont été obtenus dans le CCR *in vitro* et *in vivo* (Fan et al., 2012b; Kim et al., 2015). Ces données montrent que l'activation du programme de TEM est directement impliquée dans l'acquisition d'un phénotype de CSC par les cellules cancéreuses. Le concept selon lequel les CSC seraient responsables de la formation de métastases est renforcé par certaines études montrant une corrélation positive entre l'expression des marqueurs des CSC et un risque accru d'envahissement ganglionnaire et de métastases (Lim and Oh, 2005; Pilati et al., 2012).

#### 3.2.5.2. Chimiorésistance et radiorésistance

Les CSC sont également caractérisées par une résistance accrue à la chimiothérapie et à la radiothérapie. En effet, une étude *in vitro* a montré que les CSC CD133<sup>+</sup> issues de tumeurs primaires coliques étaient plus résistantes à l'apoptose induite par un traitement au 5-FU et à l'oxaliplatine que les

cellules CD133<sup>-</sup> (Todaro et al., 2007). De plus, dans un modèle murin de xénogreffe, le traitement des souris avec de l'irinotécan provoquait un enrichissement des tumeurs en CSC CD44<sup>+</sup>/CD166<sup>+</sup> (Dylla et al., 2008). Ce résultat a été confirmé par des études *in vitro* montrant qu'un traitement de longue durée au 5-FU ou à l'oxaliplatine provoquait un enrichissement de la population cellulaire en CSC CD133<sup>+</sup> et CD44<sup>+</sup> dans des lignées de cellules cancéreuses coliques (Dallas et al., 2009; Touil et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les CSC ont une résistance aux molécules de chimiothérapie plus élevée que les populations cellulaires plus différenciées. Par ailleurs, chez les patients atteints de CCR, la surexpression du marqueur CD133 dans les tumeurs est corrélée à une plus forte résistance à un traitement au 5-FU (Ong et al., 2010). Enfin, des données suggèrent également que les CSC CD133<sup>Hi</sup>/CD44<sup>Hi</sup> issues de plusieurs lignées cancéreuses coliques sont plus résistantes à la radiation comparées à des cellules cancéreuses coliques plus différenciées CD133<sup>Lo</sup>/CD44<sup>Lo</sup> (Sahlberg et al., 2014). Certains mécanismes moléculaires ont été décrits pour expliquer la résistance accrue à la chimiothérapie et à la radiothérapie des CSC. Ainsi, des études ont montré que les CSC CD133<sup>+</sup> possédaient une résistance accrue au 5-FU et à l'oxaliplatine par rapport aux cellules CD133<sup>-</sup> *via* une surexpression de la survivine ou de BCL-XL (Colak et al., 2014; Lee et al., 2015b). De plus, il semble que la chimiorésistance des CSC puisse également être médiée par la surexpression des transporteurs ABC. En effet, une étude a montré que la résistance au 5-FU des CSC CD133<sup>+</sup> était associée à une surexpression du transporteur ABCG2 (Lou et al., 2014).

Ces résultats montrent que les propriétés des CSC, à savoir la capacité d'auto-renouvellement et la capacité de générer tous les types de cellules composant la tumeur, sont également associées à d'autres fonctions que sont les capacités métastatiques et la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Cependant, les différents mécanismes par lesquels les CSC possèdent ou acquièrent des capacités métastatiques et de résistance accrues ne sont pas spécifiques des CSC mais semblent plutôt être associés à un certain état souche. Cette hypothèse s'appuie en particulier sur les nombreuses données montrant un

enrichissement en marqueurs des CSC dans les populations cellulaires résistantes aux traitements de chimiothérapie, ainsi qu'au lien existant entre la TEM et l'acquisition de propriétés de CSC. Ces données suggèrent également qu'il pourrait y avoir une sélection de certaines CSC en fonction des mécanismes de chimiorésistance et de métastase qui leur sont associés, telle que le conçoit le modèle stochastique.

### 3.2.6. Origine des CSC

Deux hypothèses pour expliquer l'origine des CSC ont été avancées. La première hypothèse est que les CSC proviennent de l'altération génétique ou épigénétique des CS coliques saines. En effet, les CSC et les CS de l'épithélium colique sain ont de nombreuses similitudes sur le plan phénotypique. Outre leur capacités « souches », les CSC et les CS coliques « normales » possèdent également des signatures génétiques très similaires (Merlos-Suárez et al., 2011), et ainsi ont de nombreux marqueurs cellulaires communs. Bien qu'il n'existe pas de démonstration directe permettant d'affirmer que les CSC proviennent de la cancérisation des CS coliques, certaines études fournissent cependant plusieurs arguments soutenant cette hypothèse. Ces travaux sont notamment basés sur l'utilisation de modèles génétiques permettant d'activer un proto-oncogène ou de déléter un gène suppresseur de tumeur dans différentes populations de cellules épithéliales intestinales et coliques. En 2009, une première étude a montré que la délétion du gène suppresseur de tumeur APC dans les cellules souches intestinales et coliques Lgr5<sup>+</sup> provoquait la formation d'adénomes chez la souris, alors que cette même délétion dans les progéniteurs ne provoquait pas d'altérations macroscopiques de l'épithélium (Barker et al., 2009). Une seconde étude également basée sur l'induction d'une mutation APC dans les cellules Lgr5<sup>+</sup> a montré par lineage tracing que les cellules Lgr5<sup>+</sup> représentaient entre 5 et 10% des cellules des adénomes formés et étaient capables de s'auto-renouveler ainsi que de donner naissance aux différents types cellulaires qui composaient cette tumeur (Schepers et al., 2012). Cette étude suggère que les cellules Lgr5<sup>+</sup> puissent être les CSC de ces

adénomes. D'autres études ont également montré que l'induction d'une mutation dans le gène APC ou d'une mutation provoquant l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans les cellules exprimant les marqueurs des CS coliques Lrig1<sup>+</sup> ou CD133<sup>+</sup> provoquait également la formation d'adénomes (Powell et al., 2012; Zhu et al., 2009).

Une autre hypothèse suggère que les CSC auraient pour origine certaines cellules « plus différenciées » de l'épithélium. En 2013, une première étude a montré que des cellules épithéliales intestinales différenciées post-mitotiques dans lesquelles la voie Wnt était constitutivement suractivée pouvaient initier la formation de tumeurs suite à l'activation de la voie NF $\kappa$ B (Schwitalla et al., 2013). En 2014, une autre étude a montré que les cellules Tuft coliques délétées pour le gène APC étaient capables d'initier la formation de tumeur colique chez la souris après un traitement au DSS (Westphalen et al., 2014). Ces deux études montrent que des cellules différenciées de l'épithélium peuvent être à l'origine de la formation de tumeurs lorsqu'une mutation entraînant la suractivation de la voie Wnt est associée à un deuxième stimulus pro-tumorigénique. Une autre étude a montré que l'expression aberrante de GREM1, un antagoniste de la voie des BMP, dans l'épithélium intestinal provoquait la formation de cryptes néoplasiques au niveau des villosités (Davis et al., 2014). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les CSC peuvent provenir de cellules épithéliales différenciées *via* la réacquisition de propriétés « souches cancéreuses ».

Ces deux hypothèses concernant l'origine des CSC ne sont pas mutuellement exclusives. En effet, il semble que l'organisation hiérarchique présente au sein de la tumeur ainsi que dans les cryptes coliques en situation physiologique ne soit pas une hiérarchie statique mais dynamique, renforçant ainsi le concept d'« état souche » par opposition au modèle de « cellule souche ». Selon ce concept, l'état « souche cancéreux » d'une cellule serait fonction de l'accumulation d'altérations génétiques associée à certains signaux extrinsèques provenant du microenvironnement et pourrait ainsi être activé dans toute cellule sans distinction.

### 3.3. Microenvironnement tumoral

En 1889, Stephen Paget propose le concept de « seed and soil » (de la graine et du sol). En observant les sites métastatiques de patientes atteintes du cancer du sein, Paget détermine que la distribution des sites métastatiques n'est pas aléatoire et en conclut que les cellules cancéreuses (les graines) ne se multiplient que dans un site (le sol) qui leur est favorable. Cette théorie suggère un rôle déterminant du microenvironnement dans l'initiation et le développement tumoral. L'étude du microenvironnement tumoral a depuis permis d'identifier et de mieux comprendre le phénotype et/ou l'organisation des différents éléments moléculaires et cellulaires qui le composent, ainsi que de mettre en évidence son rôle clé dans le contrôle des processus de carcinogénèse (Hui and Chen, 2015; Quail and Joyce, 2013).

#### 3.3.1. Composition du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est défini comme l'ensemble des éléments cellulaires et moléculaires situés à proximité immédiate des cellules tumorales. Ces composantes cellulaires et moléculaires peuvent être résidentes ou avoir été recrutées par la tumeur. Dans le cas du CCR, les éléments de la composante cellulaire correspondent en particulier aux cellules endothéliales, aux fibroblastes, aux adipocytes, aux cellules immunitaires, aux cellules neurales ou encore au microbiote. Les éléments moléculaires regroupent les facteurs solubles, c'est-à-dire des facteurs de croissance, des médiateurs chimiques de l'immunité et de l'inflammation ou encore des nutriments ainsi que des macromolécules et des protéines structurales qui composent la matrice extracellulaire (Crotti et al., 2017; Murgai et al., 2015). Dans cette partie, nous allons présenter quelques acteurs clés du microenvironnement tumoral dont deux acteurs cellulaires, les cancer-associated fibroblasts et les tumor-

associated macrophages, ainsi que certains acteurs moléculaires dont les cytokines pro-inflammatoires et les prostaglandines.

### 3.3.1.1. Cancer-associated fibroblasts (CAF)

Les Cancer-associated fibroblasts (CAF) du microenvironnement tumoral peuvent avoir différentes origines. La plus commune est que les CAF dérivent des fibroblastes présents dans le microenvironnement du tissu sain au niveau duquel se forme la tumeur. Mais il semble également que les CAF puissent provenir de cellules souches mésenchymateuses, d'adipocytes, de cellules endothéliales ou de cellules épithéliales (Shiga et al., 2015). Les CAF ont un phénotype très proche des fibroblastes « activés » en réponse à l'inflammation et sont caractérisés par l'expression d' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) et de la fibroblast activation protein (FAP) (Shiga et al., 2015). L'activation des CAF dans le microenvironnement tumoral est induite par la libération au niveau de la tumeur de plusieurs molécules telles que le TGF- $\beta$ , le FGF, le PDGF ou encore l'IL-6, et se traduit par l'acquisition de propriétés pro-tumorigéniques (Mukaida and Sasaki, 2016). Ainsi, une fois « activés » en réponse aux signaux issus de la tumeur, les CAF jouent un rôle important dans le contrôle de nombreux processus carcinogéniques. En effet, les CAF stimulent la prolifération des cellules cancéreuses coliques *via* la sécrétion d'HGF ou de FGF *in vitro* (Bai et al., 2015; Li and Zhu, 2015). De plus, une étude a montré que la co-injection de CAF isolées de tumeurs coliques primaires avec des colonies de cellules cancéreuses coliques stimulait le développement de tumeurs dans des souris immunodéficientes (Berdiel-Acer et al., 2014). Les CAF produisent un grand nombre d'autres facteurs de croissance tels que l'EGF, l'IGF, le TGF- $\beta$ , ou encore l'épiréguline, potentiellement impliqués dans les processus de prolifération cellulaire et de croissance tumorale (Mukaida and Sasaki, 2016). Les CAF régulent également les processus d'invasion et de métastases. En effet, plusieurs études ont montré que les CAF stimulaient les capacités de migration et d'invasion de différentes lignées de cellules de CCR

*in vitro*, et ce notamment *via* la sécrétion de métalloprotéases (MMP) dégradant la matrice extracellulaire (Berdier-Acer et al., 2014; Boire et al., 2005; Dimanche-Boitrel et al., 1994; Hawinkels et al., 2014).

L'ensemble de ces données montrent que les CAF ont un impact direct sur le développement et la dissémination du cancer, en favorisant notamment la prolifération des cellules cancéreuses et l'invasion tumorale. Par ailleurs, les CAF du microenvironnement tumoral régulent également les processus immunitaires dans le cancer. En effet, les CAF ont des propriétés immunosuppressives *via* la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 ou de VEGF qui inhibent les fonctions des lymphocytes T, des cellules Natural Killer ou encore des cellules dendritiques (Mukaida and Sasaki, 2016). Les CAF sécrètent également certaines cytokines telles que CCL2 qui intervient dans le recrutement de monocytes et favorise le recrutement et l'activation de macrophages associés à la tumeur ou TAM.

#### 3.3.1.2. Tumor-associated macrophages (TAM)

Les Tumor-associated macrophages (TAM) sont dérivés des monocytes sanguins. Le recrutement et la différenciation des TAM sont deux mécanismes régulés par un grand nombre de chimiokines, facteurs de croissance et facteurs angiogéniques sécrétés par la tumeur. Parmi ces molécules se trouvent le VEGF, le TGF- $\beta$ , le bFGF, le macrophage colony stimulating factor (M-CSF), ou les chimiokines CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5) (Galdiero et al., 2013). En fonction des cytokines présentes dans l'environnement, les macrophages se polarisent en macrophage de type M1 ou en macrophage de type M2 qui, de façon schématique, sont associés à des fonctions opposées. Les macrophages M1, activés en réponse à l'interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) ou à des composants bactériens, tels que les lipopolysaccharides (LPS), produisent un taux élevé de molécules pro-inflammatoires parmi lesquelles l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 ou encore le TNF, ainsi que des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Sica et al., 2015). La polarisation des macrophages en type M2 se fait principalement sous l'effet de l'IL-4, l'IL-13, ou encore le M-CSF. Les



macrophages M2 produisent préférentiellement de l'IL-10 et ont un rôle anti-inflammatoire (Sica et al., 2015). Le microenvironnement tumoral favorise une polarisation des macrophages recrutés vers un phénotype M2 (Solinas et al., 2009). Les TAM présents au sein du microenvironnement tumoral stimulent les processus d'invasion, de métastase ou encore d'angiogenèse. En effet, le milieu conditionné de macrophages M2 augmente la migration des cellules cancéreuses coliques *in vitro* (Zhang et al., 2013). Les TAM produisent et libèrent également des protéases (Gocheva et al., 2010) et des metalloprotéases telles que MMP-2 et MMP-9 (Kessenbrock et al., 2010), intervenant dans le remodelage de la matrice extracellulaire favorisant l'invasion tumorale et ainsi la dissémination des cellules cancéreuses. Les TAM sécrètent également certains facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ , le VEGF ou encore le PDGF, impliqués dans l'angiogenèse (Galdiero et al., 2013; Murdoch, 2004).

#### 3.3.1.3. Cytokines pro-inflammatoires

L'inflammation joue un rôle déterminant dans la carcinogenèse colique. Elle peut en effet dans certains cas précéder et réguler la formation d'une tumeur. De plus, elle accompagne et contrôle systématiquement la croissance de la tumeur ainsi que les processus d'invasion tumorale. Tout d'abord, il a été clairement démontré que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un facteur de risque important du CCR. Les MICI regroupent la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn. La probabilité de développer un CCR chez les patients atteints d'une RCH est d'environ 2% après 10 ans de maladie, et de 18% après 30 ans de maladie. Pour la maladie de Crohn, ce risque est de 3% après 10 ans et de 8% après 30 ans (Rubin et al., 2012). Ce risque varie en fonction de l'ampleur des zones touchées par l'inflammation et de la sévérité des poussées inflammatoires.

L'inflammation chronique est médiée par un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires, produites par les cellules immunitaires mais également par les fibroblastes, les cellules musculaires lisses,

ou encore les cellules épithéliales (Francescone et al., 2015). Parmi les nombreuses molécules pro-inflammatoires intervenant dans la carcinogénèse colique associée à l'inflammation, l'IL-6 et le TNF $\alpha$  ont été identifiés comme étant deux acteurs majeurs. Leur implication a notamment été démontrée *via* l'utilisation du modèle murin de carcinogénèse colique associée à l'inflammation AOM-DSS. Ce modèle associe un traitement à l'azoxyméthane (AOM), qui est un carcinogène, avec un traitement au Dextran Sodium Sulfate (DSS) qui provoque une inflammation colique. Ainsi la délétion constitutive du récepteur au TNF $\alpha$  de type I ou de l'IL-6 diminue la formation de tumeurs coliques dans les souris AOM-DSS (Grivennikov et al., 2009; Popivanova et al., 2008).

Parmi les nombreuses voies de signalisation activées par les cytokines pro-inflammatoires et impliquées dans la carcinogénèse colique, la voie NF $\kappa$ B a été particulièrement bien étudiée. L'activation de la voie NF $\kappa$ B est notamment induite par le TNF $\alpha$  et l'IL-1, et contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, le cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire (Viennois et al., 2013). Dans le modèle AOM-DSS, l'inhibition de la voie NF $\kappa$ B dans les cellules épithéliales coliques limite le développement de tumeurs *via* une augmentation de l'apoptose (Greten et al., 2004). Cette même étude montre que l'inhibition de la voie NF $\kappa$ B dans les cellules myéloïdes provoque également une diminution de la taille des tumeurs *via* une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Les mécanismes par lesquels l'inflammation chronique peut participer à l'initiation d'un cancer peuvent également impliquer la production d'espèces réactives de l'oxygène. En effet, les cellules immunitaires produisent des espèces réactives de l'oxygène qui provoquent des dommages de l'ADN et des altérations épigénétiques dans les cellules cancéreuses mais également au sein des cellules épithéliales saines et des cellules du microenvironnement entraînant des altérations du contrôle du cycle cellulaire ou de la survie cellulaire (Hussain et al., 2003; Kidane et al., 2014; Reuter et al., 2010).

Bien que la majorité des CCR ne soient pas associés aux MICI, toutes les tumeurs sont caractérisées par la présence d'un microenvironnement inflammatoire (Pesic and Greten, 2016). En effet, de

nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont associées au CCR telles que le  $TNF\alpha$ , l'IL-8, l'IL-6 ou encore le VEGF (Klampfer, 2011) et régulent l'ensemble des processus de la carcinogenèse colique depuis l'initiation jusqu'à la formation de métastases ainsi que les mécanismes associés à l'angiogenèse (Pesic and Greten, 2016). Outre les cytokines pro-inflammatoires, d'autres médiateurs de l'inflammation jouent un rôle très important dans le CCR. C'est notamment le cas des prostaglandines.

#### 3.3.1.4. Les prostaglandines et la PGE2

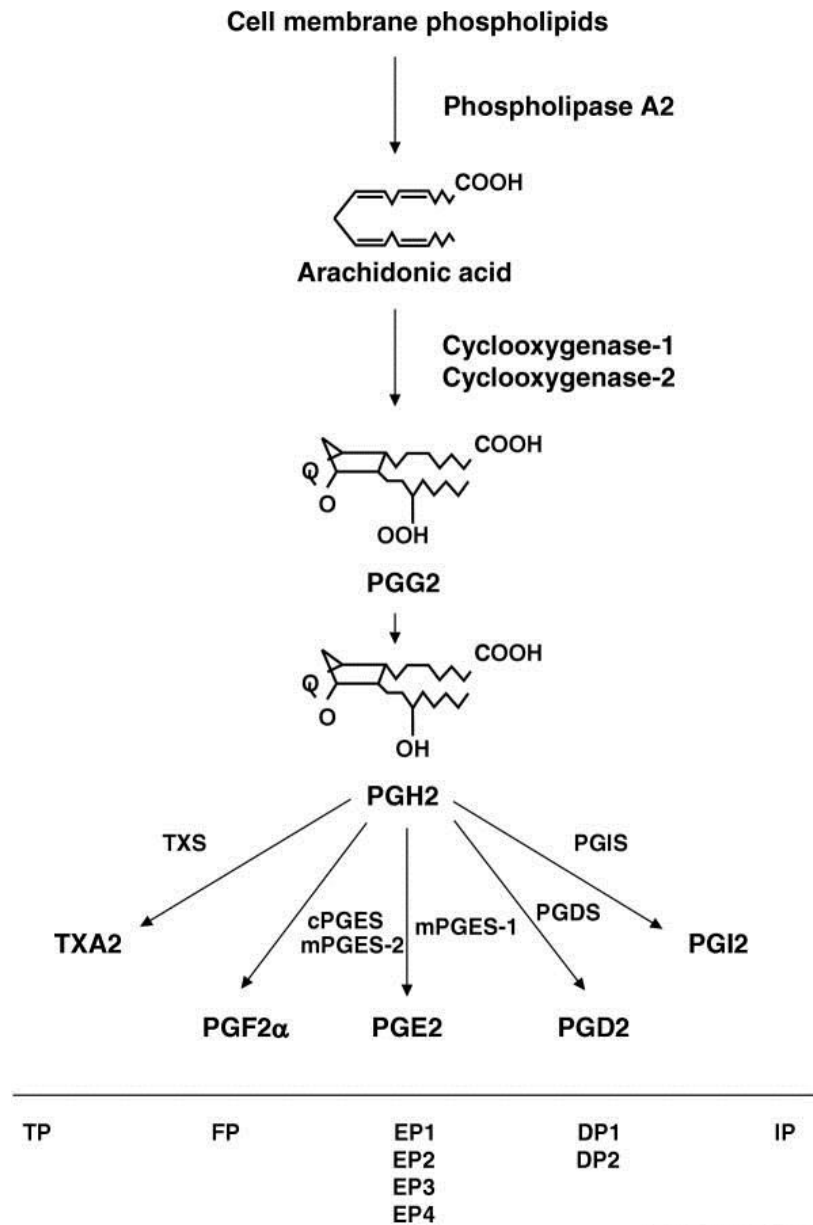
Les prostaglandines sont des lipides appartenant à la famille des eicosanoïdes qui sont des dérivés d'acides gras polyinsaturés (AGPI) à vingt atomes de carbone, divisés en deux catégories : les leucotriènes synthétisés par la voie des lipoxygénases (LOX) et les prostanoïdes synthétisés par la voie des cyclooxygénases (COX). Les prostanoïdes comprennent les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les prostacyclines (PGI). Il existe deux classes d'AGPI : les AGPI n-3 ou oméga-3, qui sont les précurseurs des eicosanoïdes de la série 3 tels que la PGF3 ou la PGE3, et les AGPI n-6 ou oméga-6, qui sont les précurseurs des eicosanoïdes de la série 1 comme la PGE1 pour l'acide eicosatriénoïque et des eicosanoïdes de la série 2 tels que la PGE2 pour l'acide eicosatétraénoïque, aussi appelé acide arachidonique (AA).

La suite de ce sous-chapitre s'intéressera aux prostaglandines de la série 2, et plus particulièrement à la PGE2.

##### 3.3.1.4.1. De l'acide arachidonique aux prostaglandines

Comme évoqué ci-dessus, les prostaglandines de la série 2 sont produites à partir de l'acide arachidonique (AA). Dans un premier temps, l'AA présent à la membrane cellulaire sous forme estérifiée

est libéré par la phospholipase A2 (PLA2). L'AA est ensuite transformé en prostaglandine G2 (PGG2) par l'activité cyclooxygénase, puis en prostaglandine H2 (PGH2) par l'activité peroxydase des enzymes COX-1 et COX-2. La PGH2 est une molécule instable convertie par des prostaglandine synthases en différentes molécules actives que sont les prostaglandines D2 (PGD2), E2 (PGE2), F2 alpha (PGF2 $\alpha$ ) et I2 (PGI2). Les prostaglandines agissent en se fixant à des récepteurs couplés aux protéines G. La PGD2 se fixe aux récepteurs DP1 et DP2, la PGF2 $\alpha$  se fixe au récepteur FP, la PGI2 se fixe au récepteur IP, et la PGE2 se fixe aux récepteurs EP1, EP2, EP3 et EP4 (Figure 18).



*Arthritis Research & Therapy*

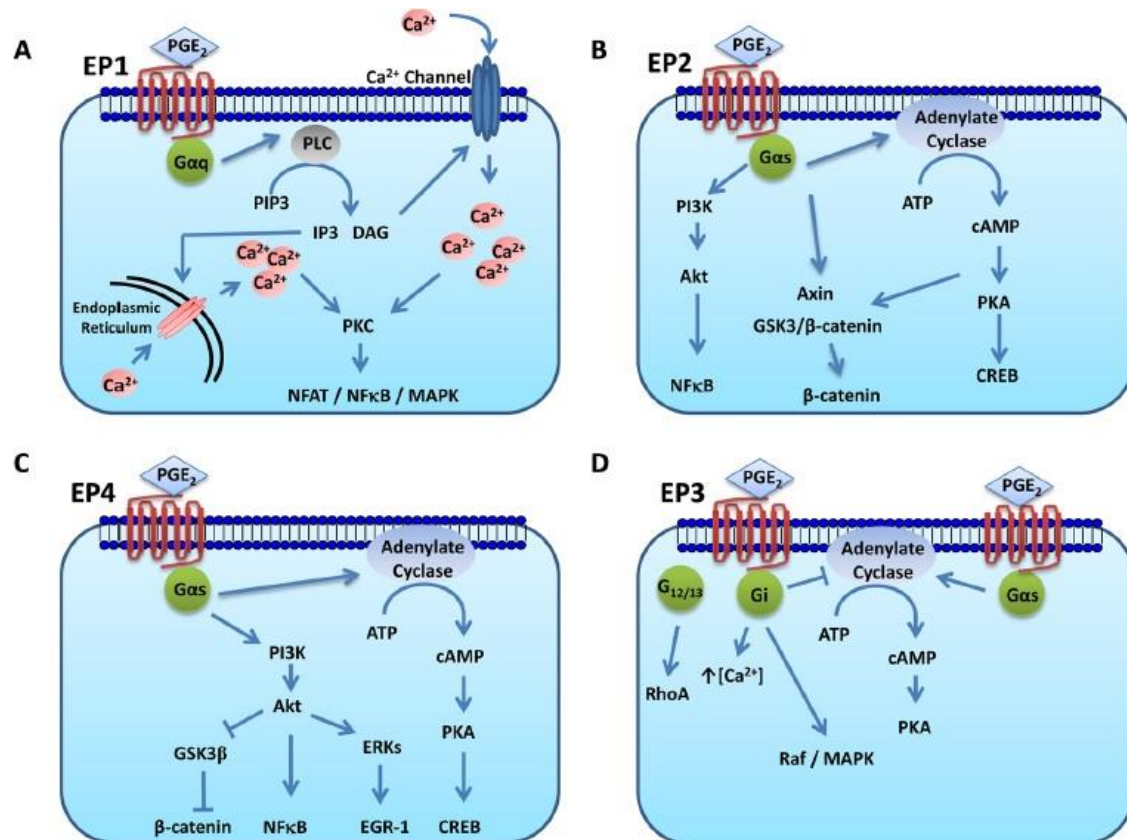
**Figure 18 : Voie de synthèse des prostaglandines** : L'acide arachidonique est métabolisé en PGG2 puis en PGH2 par les enzymes COX-1 et COX-2. La PGH2 est ensuite convertie en PGF2 $\alpha$ , PGE2, PGD2, et PGI2 par les prostaglandine synthases. D'après Sampey et al., 2005.

#### 3.3.1.4.2. La voie PGE2

La conversion de la PGH2 en PGE2 peut se faire *via* trois prostaglandine synthases : la prostaglandine E synthase cytosolique (cPGES) et les prostaglandine E synthases microsomales 1 et 2 (mPGES-1 et mPGES-2). La cPGES est une enzyme localisée dans le cytosol et son expression est constitutive et ubiquitaire (Tanioka et al., 2000). L'activité de la cPGES est dépendante du glutathion qui est ainsi utilisé comme co-facteur pour permettre la conversion de la PGH2 en PGE2. Son activité est majoritairement associée à celle de COX-1 dont l'expression est également constitutive et ubiquitaire. La mPGES-2 est présente au niveau de la membrane golgienne et dans le cytosol. Il s'agit également d'une enzyme constitutive et ubiquitaire, et son activité est couplée aux enzymes COX-1 et COX-2. En revanche, la mPGES-1 est une enzyme dont l'expression est inductible et est localisée au niveau de la membrane périnucléaire (Hara et al., 2010). Son activité est dépendante du glutathion et est couplée à COX-2 dont l'activité est également inductible (Jakobsson et al., 1999). La mPGES-1 est notamment activée en réponse à de nombreuses molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF ou les LPS (Hara et al., 2010). Aussi la mPGES-1 est surexprimée lors de stress inflammatoire notamment au niveau de l'intestin et du côlon, et participe à la réponse inflammatoire, ainsi qu'à la protection et à la réparation de l'épithélium (Hara et al., 2010).

La PGE2 se fixe à 4 récepteurs appelés EP1, EP2, EP3 et EP4. Les récepteurs EP sont couplés à différentes protéines G (Figure 19). Les récepteurs EP2 et EP4 sont couplés à une protéine  $G_s$ , et le récepteur EP1 est couplé à une protéine  $G_q$  (Yang et al., 2013). Le récepteur EP3 peut subir des épissages alternatifs, modifiant en particulier son extrémité C-terminale (Oldfield et al., 2001). De ce fait, le récepteur EP3 peut être couplé à une protéine  $G_i$ ,  $G_s$ , ou encore  $G_{12/13}$ . Cependant, le récepteur EP3 est préférentiellement associé à  $G_i$  (Woodward et al., 2011). Les protéines  $G_q$ ,  $G_s$ ,  $G_i$  activent différentes voies de signalisation. La voie de signalisation liée à la protéine  $G_q$  est médiée par l'activation de la

phospholipase C (PLC), provoquant une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC). La protéine  $G_s$  active l'adenylate cyclase (AC) ce qui entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc provoquant l'activation de la protéine kinase A (PKA). Elle peut également activer la voie de signalisation PI3K. La protéine  $G_i$  a un effet antagoniste à la protéine  $G_s$  en inhibant l'adenylate cyclase.



**Figure 19 : Voies de signalisation des récepteurs EP :** La PGE<sub>2</sub> peut se lier à 4 récepteurs que sont les récepteurs EP1, EP2, EP3 et EP4. **B,C)** Les récepteurs EP2 et EP4 sont couplés à une protéine  $G_s$ , activant l'adenylate cyclase (AC) qui provoque une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA). Elle peut également activer la voie de signalisation PI3K. **A)** Le récepteur EP1 est couplé à une protéine  $G_q$  activant la phospholipase C (PLC), qui provoque une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC). **D)** Le récepteur EP3 est couplé à une protéine  $G_i$ , inhibant l'adenylate cyclase. D'après Callaghan et al., 2015.

Les récepteurs EP présentent des niveaux d'affinité différents pour la PGE<sub>2</sub>. Les récepteurs EP<sub>3</sub> et EP<sub>4</sub> sont des récepteurs de haute affinité, tandis que l'activation des récepteurs EP<sub>1</sub> et EP<sub>2</sub> nécessite des concentrations plus élevées de PGE<sub>2</sub>. L'expression différentielle des 4 types de récepteurs EP ainsi que les différences d'affinité de ces récepteurs pour la PGE<sub>2</sub> participent aux effets variés et parfois antagonistes que peut avoir la PGE<sub>2</sub> au sein d'un même tissu en conditions physiologiques mais aussi lors de pathologies (O'Callaghan and Houston, 2015).

#### 3.3.1.4.3. Régulation des fonctions digestives par la PGE<sub>2</sub>

La PGE<sub>2</sub> est un régulateur clé de l'ensemble des fonctions digestives, dont notamment la motilité intestinale. En effet, des études menées chez la souris ont montré que la PGE<sub>2</sub> induisait la relaxation des muscles circulaires lisses du colon *ex vivo*. Cet effet était bloqué par l'utilisation d'une combinaison d'antagonistes des récepteurs EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> (Martinez-Cutillas et al., 2014). De plus, l'administration chez le rat d'indométacine, un inhibiteur des enzymes COX-1 et COX-2, provoque une hypermotilité intestinale, bloquée par l'administration de PGE<sub>2</sub> exogène (Takeuchi et al., 2002). La PGE<sub>2</sub> intervient également dans la protection de l'épithélium intestinal contre l'acidité du contenu luminal, en induisant la sécrétion de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et de mucus (Akiba and Kaunitz, 2014). La production de mucus induite par la PGE<sub>2</sub> participe également à la protection de l'épithélium intestinal contre infections bactériennes (Kunikata et al., 2002; Takeuchi, 2014). D'autre part, plusieurs études démontrent que la PGE<sub>2</sub> est impliquée dans les processus de régénération des cryptes intestinales. En effet, dans un modèle murin, l'administration de PGE<sub>2</sub> stimule la prolifération cellulaire au niveau des cryptes après traitement au DSS (Tessner et al., 1998). De plus, l'administration d'indométacine ou la délétion du récepteur EP<sub>2</sub> provoque une augmentation de la mort cellulaire au niveau des cryptes après irradiation, effet bloqué par l'administration de PGE<sub>2</sub> exogène (Cohn et al., 1997; Houchen et al., 2003; Tessner et al., 2004). Plus récemment, une étude a montré que la PGE<sub>2</sub>



stimulait la formation d'organoïdes par les CS Lgr5<sup>+</sup> *via* l'activation de la voie Wnt (Fan et al., 2014). Des études menées *in vitro* sur des monocouches de cellules épithéliales coliques ont également montré que la PGE2 augmente la perméabilité paracellulaire *via* les récepteurs EP1 et EP4 (Lejeune et al., 2011; Rodriguez-Lagunas et al., 2010).

Outre son implication dans la régulation des fonctions de l'épithélium intestinal et colique en condition physiologique, la PGE2 a un rôle central dans les mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies gastrointestinales dont le CCR.

#### 3.3.1.4.4. Prostaglandines, PGE2 et CCR

De nombreuses études ont démontré que la prise régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sur une longue période de temps (plusieurs années ou dizaines d'années) diminuait le risque de développer un CCR (Drew et al., 2016; Nan et al., 2015; Rothwell et al., 2010). Les AINS sont des inhibiteurs, sélectifs ou non, des enzymes COX-1 et COX-2. COX-1 et COX-2 ont des profils d'expression différents. COX-1 est exprimé dans la plupart des tissus et, comme évoqué précédemment, est considéré comme une enzyme constitutive, responsable de la production des prostaglandines en condition physiologique. En revanche, l'expression de COX-2 est induite par différents stimuli tels que des facteurs de croissance ou des molécules pro-inflammatoires notamment en condition pathologique. Dans le cas du CCR, de nombreuses études ont montré que l'expression de COX-2 était augmentée par rapport au tissu sain, tandis que l'expression de COX-1 restait stable (Sankasard et al., 2004; Sano et al., 1995).

De nombreuses études *in vivo* ont montré que COX-2 était directement associé au développement tumoral. En effet, la délétion de COX-2 dans des souris *Apc*<sup>Δ716</sup> (modèle génétique de PAF) diminuait le nombre et la taille des tumeurs formées (Oshima et al., 1996). Au contraire, la surexpression de COX-2 dans le côlon de souris ne provoquait pas d'apparition spontanée de tumeurs mais augmentait la taille

des tumeurs induites par un traitement à l'AOM (Al-Salihi et al., 2009). Par ailleurs, l'étude du niveau d'expression des différentes prostaglandines au sein des tumeurs coliques a montré que seule l'expression de la PGE2 est augmentée dans les CCR par rapport au tissu sain (Rigas et al., 1993). L'étude de l'expression des différents récepteurs aux prostaglandines montre également une diminution de l'expression des récepteurs DP1, DP2, FP et IP au sein des tumeurs coliques (Gustafsson et al., 2007). En revanche, les récepteurs à la PGE2 EP1, EP2 et EP4 sont largement exprimés dans des CCR (O'Callaghan and Houston, 2015). L'ensemble de ces études suggèrent que les effets de COX-2 dans les tumeurs coliques sont principalement médiés par la PGE2.

L'impact pro-tumorigénique de la PGE2 a été bien décrit. Notamment, une étude a montré que l'apport de PGE2 exogène augmentait la formation d'adénomes dans des souris *Apc<sup>min</sup>* (modèle génétique de PAF) (Wang et al., 2004). La même approche a également permis de montrer que la PGE2 stimulait la formation de tumeurs chez des souris traitées à l'AOM (Kawamori et al., 2003). Plusieurs études s'intéressant aux effets de la PGE2 sur les cellules cancéreuses coliques ont montré que la PGE2 stimulait les processus de prolifération, d'invasion, de survie et de chimiorésistance des cellules cancéreuses (Choi et al., 2011; Ruan and So, 2014; Sheng et al., 1998; Wang and DuBois, 2010; Wang et al., 2004; Zhu et al., 2013). De manière intéressante, à l'inverse de la PGE2, quelques travaux portant sur la PGI2 et la PGD2 ont mis en évidence des effets anti-tumorigéniques de ces deux prostaglandines (Iwanaga et al., 2014; Pradono et al., 2002; Yoshida et al., 1999, 1998). Ceci suggère que l'activation de la voie générale des COX peut 1) aboutir à la synthèse de PG pro- ou anti-tumorigéniques et 2) ainsi favoriser une réponse pro- ou anti-tumorigénique en fonction du ratio des concentrations des différentes PG ainsi que de l'expression et l'affinité différentielle des récepteurs au niveau des cellules cancéreuses cibles.

Comme décrit dans le Chapitre 3.3.1.4.2., trois prostaglandines synthases sont impliquées dans la production de la PGE2 à partir de la PGH2 : la cPGES et les mPGES-1 et mPGES-2. De manière générale, la cPGES et la mPGES-2 sont constitutives, tandis que l'expression de la mPGES-1 est inductible (Hara et al.,

2010). La mPGES-1 est surexprimée dans le CCR (Sasaki et al., 2012). De plus, et de manière similaire à COX-2, la délétion de la mPGES-1 provoque une diminution du nombre et de la taille des tumeurs formées dans des modèles de carcinogenèse colique génétique ou chimiquement induit (Nakanishi et al., 2008, 2011). Par ailleurs, plusieurs études portant sur les récepteurs à la PGE2 ont mis en évidence que les effets pro-tumorigéniques de la PGE2 étaient médiés par des récepteurs EP spécifiques. En effet, l'ablation ou l'inhibition des récepteurs EP1, EP2 et EP4 dans des modèles de carcinogenèse colique génétique ou chimiquement induit provoque une diminution de la formation de tumeurs (Kawamori, 2004; Mutoh et al., 2002; Sonoshita et al., 2001; Watanabe et al., 1999). A l'inverse, le récepteur EP3 est sous-exprimé dans les tumeurs coliques, et la perte d'expression de l'EP3 stimule la formation de tumeurs coliques dans le modèle carcinogenèse colique AOM (Shoji, 2004).

Les voies de signalisation impliquées dans les effets pro-tumorigéniques de la PGE2 sont très variées. Ainsi des études ont montré que la PGE2 stimulait le développement des adénomes dans un modèle de souris *Apc<sup>min</sup>* en activant la voie Ras/ERK (Wang et al., 2005) et PI3K/AKT (Wang et al., 2004). La PGE2 stimule également la prolifération des cellules cancéreuses coliques *in vitro via* la transactivation de l'EGFR (Pai et al., 2002) ou l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Castellone et al., 2005). Une étude a également montré que l'augmentation de la formation de tumeurs dans des souris *Apc<sup>Min/+</sup>* par la PGE2 était associée à une augmentation de la méthylation de l'ADN (Xia et al., 2012).

L'ensemble de ces données démontrent le rôle majeur des prostaglandines dans la carcinogenèse colique, et en particulier de l'implication des enzymes COX-2 et mPGES-1, de la PGE2 et des récepteurs EP1, EP2 et EP4.

### 3.3.2. Microenvironnement et cellules souches cancéreuses

Depuis la mise en évidence des CSC dans le CCR, de nombreuses études se sont intéressées au contrôle des fonctions « souches cancéreuses » par les composantes moléculaires et cellulaires du microenvironnement tumoral. La composante dont l'impact a été le mieux décrit est sans doute les CAF. Ainsi, en 2010, le groupe de Medema a montré que les CAF stimulaient les « propriétés souches » des cellules cancéreuses coliques *via* des voies HGF/Wnt-dépendantes. Plus précisément, le HGF issu des CAF activait un phénotype souche, à savoir la capacité à initier la formation de tumeurs, dans des cellules cancéreuses « plus différenciées » *via* l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Vermeulen et al., 2010). Ce groupe a montré dans une étude ultérieure que les CAF augmentaient également la résistance à l'oxaliplatine des CSC isolées de tumeurs coliques humaines (Colak and Medema, 2016). De manière intéressante, des travaux ont également montré que les CAF traités avec une combinaison de 5-FU, d'oxaliplatine et de leucovorin, stimulaient la prolifération et les capacités d'invasion des CSC *via* la sécrétion l'IL-17 par rapport aux CAF contrôles (Lotti et al., 2013).

D'autres composantes cellulaires du microenvironnement tumoral ont également été associées à la régulation des fonctions des CSC. Ainsi, la sécrétion de la forme soluble du ligand Notch Jagged-1 par les cellules endothéliales ou encore la libération d'IL-6 par les cellules souches dérivées du tissu adipeux stimulent la formation de tumeurs et de métastases dans des souris immunodéficientes en augmentant la proportion de CSC dans des lignées cellulaires ou des cultures primaires de cellules cancéreuses coliques (Lu et al., 2013; Wei et al., 2015). De la même façon, les lymphocytes T Foxp3<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> induisent une augmentation de la proportion de cellules ayant des propriétés « souches cancéreuses » dans les tumeurs coliques primaires (Yang et al., 2011a).

De manière réciproque, les CSC, comme les autres cellules de la tumeur, induisent un remodelage de leur microenvironnement. Ainsi, les CSC contrôlent notamment la production de molécules pro-tumorigéniques par les cellules du microenvironnement tumoral. En particulier, une étude a montré que

les CSC, *via* la libération d'IL-1, activent la production d'IL-8, d'IL-6, de GRO- $\alpha$  et de PGE2 par les cellules mésenchymateuses, qui ainsi stimulent les fonctions des CSC dans les cancers du sein et du colon (Li et al., 2012). Une étude de 2012 dans le cancer du sein suggère même que les CSC induisent un remaniement plus profond de leur microenvironnement par rapport aux cellules « plus différenciées » (Parashurama et al., 2012).

L'ensemble de ces études montrent que le microenvironnement tumoral, composé de molécules et de cellules résidentes ou recrutées, est remodelé par la tumeur afin de favoriser sa croissance et sa dissémination, forme une niche capable de moduler de manière dynamique les propriétés « souches » au sein des cellules cancéreuses.

## OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les données de la littérature exposées dans le chapitre précédent mettent en évidence le rôle majeur des cellules souches cancéreuses (CSC) dans les processus de carcinogénèse colique, ainsi que dans les mécanismes de résistance aux traitements et de métastases. Ces propriétés sont régulées de manière dynamique par l'ensemble des composantes cellulaires et moléculaires du microenvironnement tumoral. Au sein de ce microenvironnement se trouve les cellules gliales entériques (CGE). Les CGE ont un rôle clé dans la régulation des fonctions de l'épithélium colique en condition physiologique. Des données récentes suggèrent également un rôle important des CGE dans différentes pathologies digestives. En revanche, le rôle des CGE dans le contexte tumoral, et plus précisément l'impact des CGE sur les fonctions des CSC n'ont pas encore été étudiés.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de caractériser les interactions fonctionnelles entre les CGE et les CSC en identifiant les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués, et de déterminer l'impact des CGE sur les différentes propriétés des CSC. Ainsi, les deux études présentées dans cette thèse avaient pour but de déterminer :

- l'impact des CGE sur les capacités tumorigéniques des CSC,
- l'impact des CGE sur les mécanismes de chimiorésistance des CSC.

Ce travail de thèse est présenté sous la forme de deux articles originaux (l'un soumis et l'autre en préparation). Le premier article démontre que les CGE stimulent la tumorigénicité des CSC, *via* une voie PGE2/EP4/EGFR dépendante. La deuxième étude, en cours de préparation, met en évidence l'impact des CGE sur les capacités de chimiorésistance des CSC. Cette étude montre en effet que les CGE stimulent la

résistance des CSC au 5-FU et à l'oxaliplatine *via* l'activation de la voie ATM. L'ensemble de ces travaux de thèse seront discutés dans le chapitre suivant.

## RESULTATS

**ARTICLE 1 : TUMOR CELLS HIJACK ENTERIC GLIA TO ACTIVATE COLON CANCER STEM CELLS AND  
STIMULATE TUMORIGENESIS**



## Présentation de l'article 1

En condition physiologique, les cellules gliales entériques (CGE) forment un réseau dense qui entoure intimement les cryptes coliques. Cette proximité immédiate entre les CGE et les cellules épithéliales favorise l'établissement de communications bidirectionnelles de type paracrine entre les deux types cellulaires. Ainsi plusieurs études ont clairement démontré que les CGE régulent les fonctions de l'épithélium *via* la sécrétion de facteurs gliaux spécifiques. Nos données histologiques ont montré qu'au sein des adénocarcinomes coliques, les CGE forment également un réseau dense situé à proximité immédiate des cellules épithéliales cancéreuses. Ainsi nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle les CGE du microenvironnement tumoral régulent les fonctions des cellules souches cancéreuses (CSC) *via* la libération de facteur(s) paracrine(s). Le but de cette étude était donc spécifiquement de déterminer si les CGE avaient un impact sur la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs et d'identifier les mécanismes moléculaires responsables.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets des CGE sur les capacités des CSC à initier la formation de tumorosphères *in vitro* et de tumeurs *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé *in vitro* un modèle de co-culture de CGE et de CSC dans lequel les CSC isolées à partir de tumeurs primaires coliques humaines ainsi que de différentes lignées cellulaires étaient cultivées dans du Matrigel en présence de CGE ensemencées sur filtre Transwell n'autorisant que le passage de molécules de taille inférieure à 0,4 $\mu$ m. *In vivo*, nous avons utilisé un modèle d'injection sous-cutanée concomitante de CSC et de CGE dans des souris immunodéficientes. Les résultats obtenus ont montré que les CGE stimulaient la capacité des CSC à former des tumeurs *in vivo* et des tumorosphères *in vitro*. En utilisant des inhibiteurs sélectifs, nous avons mis en évidence que les effets pro-tumorigéniques des CGE étaient médiés par une augmentation de l'expression de la mPGES-1 et de la libération de PGE2 gliale. De plus, la stimulation des CSC par la PGE2 gliale mettait en jeu l'activation du récepteur EP4. En effet, l'ajout d'antagonistes sélectifs de différents récepteurs à la PGE2 a montré que seule l'inhibition du récepteur EP4 bloquait les effets de la

PGE2 gliale. Enfin, d'autres données supplémentaires indiquent que l'activation du récepteur EP4 provoquait la transactivation de l'EGFR et l'activation de la voie ERK.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la surproduction de PGE2 gliale et les effets promotorigéniques des CGE associés étaient induits par un facteur soluble libéré par les cellules épithéliales tumorales coliques. En effet, tandis que le milieu conditionné de CGE contrôles n'avait pas d'impact sur les CSC, le milieu conditionné de CGE préalablement incubées avec du milieu conditionné de cellules épithéliales tumorales coliques stimulait la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs. De plus, le surnageant d'adénocarcinomes primaires coliques humains entraînait l'augmentation de l'expression de la mPGES-1 et de la production de PGE2 par les CGE par rapport au surnageant de muqueuses coliques saines. Enfin, en utilisant des approches génétiques et pharmacologiques, nous avons mis évidence que les cellules épithéliales tumorales coliques « activaient » les CGE *via* la libération d'IL-1.

En conclusion, nos travaux ont mis en évidence que les CGE acquéraient des effets promotorigéniques en réponse à l'IL-1 libérée par les cellules tumorales et que les CGE ainsi « activées par la tumeur » stimulaient la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs *via* une voie PGE2/EP4/EGFR-dépendante. D'une façon plus générale, cette étude montre que les CGE sont une composante majeure du microenvironnement tumoral favorisant l'initiation tumorale médiée par les CSC.

Ce travail a été soumis pour publication à *Nature Communications*.

1 **Tumor Cells Hijack Enteric Glia to Activate Colon Cancer Stem Cells and Stimulate Tumorigenesis**

2 *Simon Valès<sup>1</sup>, Mandy Biraud<sup>1,#</sup>, Mélissa Touvron<sup>1,2,#</sup>, Anne Bessard<sup>1,#</sup>, Fanny Geraldo<sup>3</sup>, Kelsie A.*  
3 *Gardner<sup>2</sup>, Gregory Bacola<sup>2</sup>, Céline Bossard<sup>4</sup>, Mathurin Flamant<sup>4,5</sup>, Emilie Duchalais<sup>1,4</sup>, Séverine*  
4 *Marionneau-Lambot<sup>6</sup>, Thibault Oullier<sup>6</sup>, Lisa Oliver<sup>3,4</sup>, Michel Neunlist<sup>1,4</sup>, François M. Vallette<sup>3</sup>,*  
5 *Laurianne Van Landeghem<sup>1,2\*</sup>*

6 <sup>1</sup> Bretagne Loire University, Nantes University, INSERM 1235, IMAD, The enteric nervous system in  
7 gut and brain disorders, Nantes, France

8 <sup>2</sup> Department of Molecular Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State  
9 University, Raleigh, NC, USA

10 <sup>3</sup> Nantes University, INSERM 1232, CRCINA, Nantes, France

11 <sup>4</sup> Nantes University Hospital, Nantes, France

12 <sup>5</sup> Jules Verne Clinic, Nantes, France

13 <sup>6</sup> Cancéropôle Grand Ouest, Nantes, France

14 # These authors contributed equally to this work.

15 \* **Corresponding Author:** Laurianne Van Landeghem, PhD

16 ORCID # 0000-0001-7408-3521

17 Email: [lcvanlan@ncsu.edu](mailto:lcvanlan@ncsu.edu)

18 Current mailing address: North Carolina State University

19 College of Veterinary Medicine

20 Department of Molecular Biomedical Sciences

21 1060 William Moore Drive, CB# 8401

22 Raleigh, NC 27607, USA

23 +1 919 513 6801

24

25 **ABSTRACT**

26 Colon cancer stem cells (CSCs) are constantly exposed to regulatory cues emanating from  
27 neighboring cells present in the tumor microenvironment. Among these cells are enteric glial cells  
28 (EGCs) that are potent regulators of the epithelium functions in healthy intestines. However, whether  
29 EGCs impact CSC-driven tumorigenesis remains unknown. Here, using murine xenograft models and  
30 co-culture systems of EGCs and CSCs from human primary cultures and cell lines, we show that EGCs  
31 stimulate CSC expansion and ability to give rise to tumors *via* paracrine signaling. Importantly, only  
32 EGCs that were pre-activated by tumor epithelial cell-derived soluble factors increased CSC  
33 tumorigenicity. Pharmacological inhibition of PGE2 biosynthesis in EGCs or IL-1 knockdown in tumor  
34 epithelial cells prevented EGC acquisition of a pro-tumorigenic phenotype. Inhibition of PGE2  
35 receptor EP4 and EGFR in CSCs inhibited the effects of tumor-activated EGCs. Altogether, our results  
36 show that EGCs, once activated by the tumor, acquire a pro-tumorigenic phenotype and stimulate  
37 CSC-driven tumorigenesis *via* a PGE2/EP4/EGFR-dependent pathway.

38 Compelling evidence has well-established that within a colonic tumor, only a relatively small fraction  
39 of cells are able to give rise to a *de novo* tumor identical to the original one<sup>1,2</sup>. These cells, termed  
40 tumor-initiating cells or cancer stem cells (CSCs), have been extensively studied over the last decade  
41 and are considered as a highly valuable therapeutic target. Indeed not only do these cells initiate  
42 tumor development, but they also have been associated with a high metastatic potential<sup>3</sup> and  
43 increased chemoresistance<sup>4</sup>. Although controversial, CSCs are thought to be derived from genetically  
44 and/or epigenetically-damaged colonic epithelial stem cells<sup>5</sup>. Regardless of their origin, and similar to  
45 normal intestinal stem cells, CSCs are tightly regulated by their neighboring cells that compose the  
46 so-called 'tumor microenvironment'<sup>6</sup>. For instance elegant studies by Medema's group have  
47 demonstrated that tumor-activated fibroblasts activate 'differentiated' tumor cells to re-acquire  
48 stemness *via* paracrine pathways<sup>7</sup> and this was associated with increased chemoresistance<sup>8</sup>. In the  
49 same vein, recent work suggests that adipose tissue adjacent to the tumor provides adipose-derived  
50 stem cells that enhance tumor initiation and growth *via* the liberation of IL-6<sup>9</sup>. Thus, while fibroblasts,  
51 adipocytes, as well as immune cells of the tumor microenvironment are being closely investigated, to  
52 the best of our knowledge, the impact of enteric glial cells (EGCs) on CSCs and associated  
53 tumorigenesis remains completely unknown.

54 EGCs are the most abundant cell type of the enteric nervous system and form a dense network that  
55 runs all along the gastrointestinal tract and extends into all layers of the intestinal wall<sup>10</sup>. Work from  
56 our group and others has demonstrated that EGCs are essential for the maintenance of intestinal  
57 homeostasis and functions<sup>11,12</sup>. Indeed complete loss of EGCs leads to a massive breakdown of the  
58 intestinal epithelium followed by a fulminant and fatal jejunoileitis in transgenic mice<sup>13</sup>. Furthermore  
59 EGCs regulate all the major functions of the epithelium *via* the release of specific paracrine factors.  
60 For instance, they promote barrier function and mucosal healing *via* the secretion of GSNO and pro-  
61 EGF, respectively<sup>14,15</sup>. While the impact of EGCs on the epithelium has been well-studied in healthy  
62 intestine, there is very little information about EGCs in colorectal cancer. Descriptive studies from our  
63 group and others have reported architectural alterations of the glial network in colorectal pre-

64 cancerous lesions and adenocarcinomas<sup>16,17</sup>. Nevertheless, while a putative role for glial cells in colon  
65 carcinogenesis has been proposed elsewhere<sup>18</sup>, there is no direct evidence available that EGCs affect  
66 colon tumorigenesis and more importantly, whether EGCs impact colon CSCs has not been addressed  
67 as yet.

68 In the present study we used xenograft and 3D co-culture systems of CSCs, isolated from human  
69 primary colon adenocarcinomas or several human colon cancer cell lines, grown in the presence of  
70 human primary cultures of EGCs or a non-transformed EGC line to test our hypothesis that EGCs  
71 affect CSC-derived tumorigenesis. Combining pharmacological and genetic approaches, and using the  
72 supernatant of human primary colon adenocarcinomas to mimic the tumor microenvironment, we  
73 demonstrate that once activated by tumor cells, EGCs acquire pro-tumorigenic effects, and activate  
74 CSCs and associated tumorigenesis *via* a PGE2/EP4/EGFR-dependent pathway.

75 **RESULTS**

76 **Enteric glial cells activate cancer stem cells to promote tumorigenesis**

77 Immunofluorescence studies on human primary colon adenocarcinomas revealed that EGCs,  
78 identified using the markers S-100 $\beta$  and GFAP, were densely present in the tumor microenvironment,  
79 and were located close to/adjacent to tumor epithelial cells (Fig. 1a, b), strongly suggesting that  
80 paracrine communication occurs between the two cell types. To evaluate whether EGCs could impact  
81 CSC-driven tumorigenesis, CD44<sup>High</sup>-CD133<sup>High</sup> CSCs isolated from the human colon cancer HT29 cell  
82 line stably expressing luciferase (Supplementary Fig. 1) were injected alone or concomitantly with  
83 EGCs subcutaneously in immunodeficient mice. Our data demonstrate that EGCs increased tumor  
84 load and this was correlated with enhanced bioluminescence intensity (Fig. 2a-c).

85 *In vitro* the number and size of tumorspheres formed from HT29-derived CSCs grown in 3D Matrigel  
86 were dramatically increased in the presence of JUG-EGCs, which correspond to a non-transformed  
87 rat embryonic EGC line immortalized by serial passages<sup>14,19</sup> (Fig. 2e, f). Since EGCs were seeded on  
88 Transwell filters whose porosity only allowed for paracrine crosstalk between CSCs and EGCs, EGC  
89 impact on CSC ability to form tumorspheres was mediated by soluble factors released by EGCs. EGCs  
90 increased tumorsphere formation to the same extent in CD44<sup>High</sup>-CD133<sup>High</sup>, CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup> and  
91 CD44<sup>High</sup>-CD133<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup> HT29-derived CSCs<sup>20,21</sup> (Supplementary Fig. 2). Primary cultures of human  
92 EGCs (HOG-EGCs) had similar impact to JUG-EGCs on tumorsphere formation and growth. In contrast  
93 normal human colonic fibroblasts (CCD18-Co) had no significant impact on tumorsphere yield or size  
94 (Fig. 2e, f). To assess whether EGCs impact CSC expansion, tumorspheres derived from CSCs grown in  
95 the presence or absence of JUG-EGCs were retrieved, dissociated, replated in Matrigel and cultured  
96 alone for 8 additional days. CSC expansion was evaluated by dividing the number of tumorspheres  
97 obtained after replating by the initial number of tumorspheres yielded in the presence or absence of  
98 EGCs. Quantification showed that the tumorspheres grown in the presence of EGCs were composed  
99 of a significant increased proportion of cells that had the ability to form tumorspheres (Fig. 2d). Thus  
100 this strongly suggests that EGCs stimulated CSC expansion. Together these results demonstrate that

101 EGCs stimulate CSC expansion and ability to give rise to tumors. This is further confirmed by  
102 additional data demonstrating that JUG-EGCs had similar impact on number and size of  
103 tumorspheres yielded from CSCs isolated from HCT116 (Fig. 2i, j), HCT15 (Fig. 2k, l) and SW1222 (Fig.  
104 2m, n), which are human colon cancer cell lines associated with different p53, MMR system and  
105 stemness status<sup>21,22</sup>. Importantly, primary cultures of human EGCs (HOG-EGCs) significantly increased  
106 the number and size of tumorspheres formed from CSCs isolated from primary adenocarcinomas  
107 from colon cancer patients (Fig. 2g, h; Supplementary Fig. 3).

### 108 **Tumor epithelial cells activate EGCs to acquire pro-tumorigenic abilities by stimulating glial PGE2** 109 **release**

110 Considering that the *in vitro* co-culture system only permits paracrine communication, we sought to  
111 test whether EGC-conditioned medium (EGC-CM) could reproduce EGC effects on CSCs. Our data  
112 show that EGC-CM had no significant impact on tumorsphere formation (Fig. 3), indicating that at  
113 basal state EGCs do not release pro-tumorigenic factor(s) or not in sufficient quantities to activate  
114 CSCs. Since Transwell filters allow bi-directional exchanges between the tumor epithelial cells (TECs)  
115 composing the tumorspheres and EGCs, we then evaluated whether conditioned medium (CM) of  
116 EGCs that had been pre-incubated with HT29 cell-CM (TEC-CM) could activate CSCs. Our results  
117 demonstrate that CM of EGCs that had been activated by tumor epithelial cells (TA EGC-CM)  
118 significantly increased tumorsphere numbers (Fig. 3). Of note CM of HT29 cells (TEC-CM) had no  
119 significant effect on CSC ability to give rise to tumorspheres (Fig. 3).

120 To identify the EGC-derived soluble ligand(s) responsible for CSC activation, we tested several glial  
121 derived factors (data not shown) and only prostaglandin-E2 (PGE2)<sup>23</sup> reproduced EGC effects (Fig. 4a).  
122 RT-qPCR on EGCs cultured in control medium or in TEC-CM showed that TEC-CM increased gene  
123 expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1), the inducible terminal synthase in  
124 the PGE2 biosynthesis pathway (Fig. 4b). EIA (Enzyme Immunoassay) demonstrated that this was  
125 accompanied by increased glial release of PGE2 (Fig. 4c). Next, primary adenocarcinomas and  
126 macroscopically healthy mucosa taken at a distance from the tumor from colon cancer patients were



127 incubated for one hour, and the supernatants, which thus contained soluble factors released by the  
128 tumor vs. normal mucosa, were collected. Supernatant of human colon adenocarcinomas led to  
129 increased gene expression of mPGES-1 and PGE2 release in EGCs as compared to supernatant of  
130 healthy colon mucosa (Fig. 4d, e). In contrast, supernatants of colon adenocarcinomas and healthy  
131 mucosa did not differentially impact mPGES-1 gene expression or PGE2 release in colonic fibroblasts  
132 (Fig. 4d, e). Finally TEC-CM supplemented with a selective inhibitor of mPGES-1 expression  
133 (CAY10526) failed to activate EGCs to stimulate CSC-derived tumorsphere formation (Fig. 4f).  
134 Altogether these data indicate that TECs stimulate mPGES-1 expression and PGE2 release in EGCs,  
135 which, in turn, increase CSC-driven tumorigenesis.

#### 136 **Tumor-activated EGCs stimulate CSCs via PGE2 receptor EP4**

137 PGE2 signals through four distinct G protein-coupled receptors termed EP 1 to 4. We first sought to  
138 define which EP subtype(s) was expressed in HT29-derived CSCs. Out of the 4 receptors, only *PTGER1*  
139 and *PTGER4* genes, encoding EP1 and EP4 respectively, were expressed at detectable levels in the  
140 (unsorted) HT29 cell line (data not shown). RT-qPCR data demonstrated that CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup> HT29-  
141 derived CSCs were significantly enriched for *PTGER4* mRNA compared to unsorted HT29 cells and  
142 especially compared to CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup> HT29 cells (termed non-CSCs) that do not yield  
143 tumorspheres in 3D Matrigel and express lower levels of colon (cancer) stem cell markers *PTK7<sup>24</sup>* and  
144 *CEACAM6/CD66c<sup>25</sup>* compared with CSCs (Fig. 5a; Supplementary Fig. 4). In addition CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup>  
145 HT29 cells exhibited significant lower levels of *PTGER4* mRNA vs. unsorted HT29 cells. In contrast,  
146 *PTGER1* showed opposite expression profile as compared with *PTGER4*, i.e. *PTGER1* mRNA was  
147 enriched in non-CSCs while being down-regulated in CSCs (Fig. 5b). Addition of a selective antagonist  
148 of EP4 (L-161,982) to tumor-activated (TA) EGC-CM abolished EGC pro-tumorigenic impact on CSCs,  
149 while EP1 antagonist (SC-19220) had no significant impact (Fig. 5c). These results demonstrate that  
150 glial-derived PGE2 stimulates CSC clonogenicity via EP4 activation.

#### 151 **CSC activation by tumor-activated EGCs involves EGFR and ERK pathways**

152 Previous studies indicated that PGE2 could promote colon cancer growth by transactivating EGFR in a  
153 c-Src-dependent manner and consequently activating downstream ERK pathway<sup>26,27</sup>. Therefore we  
154 first sought to assess whether tumor-activated (TA) EGCs stimulate CSCs *via* EGFR transactivation.  
155 Western blot data showed that EGFR phosphorylation on tyrosine 845 (Y845), which is a site targeted  
156 by c-Src and required for EGFR transactivation, was increased in CSC-derived tumorspheres grown in  
157 the presence of EGCs as compared to controls (Fig. 6a). Importantly, addition of a selective inhibitor  
158 of EGFR tyrosine kinase activity (AG 1478) to TA EGC-CM abolished EGC pro-tumorigenic effects (Fig.  
159 6b). Activation of the downstream ERK pathway was also increased in CSC-derived tumorspheres  
160 grown in the presence of EGCs, as assessed by immunoblotting showing a significant increased  
161 ERK1/2 phosphorylation (Fig. 6c). These results indicate that EGC-induced CSC activation involves  
162 EGFR and ERK signaling pathways.

### 163 **Tumor cells activate EGCs to acquire a pro-tumorigenic phenotype *via* IL-1 secretion**

164 Since IL-1 signaling has been reported to modulate the production of various prostaglandins including  
165 PGE2 in different organs<sup>28-31</sup>, we tested whether tumor epithelial cells (TECs) activate EGCs to acquire  
166 a pro-tumorigenic phenotype *via* IL-1 release. Consistent with previous findings<sup>32</sup>, IL-1 receptor (IL-  
167 1R) was expressed in primary cultures of human EGCs (HOG-EGCs) (Fig. 7a) and in rat EGCs (JUG-  
168 EGCs) (Fig. 7b). We next sought to determine the effect of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on mPGES-1 gene  
169 expression in EGCs. RT-qPCR data showed that both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  markedly induced mPGES-1 gene  
170 expression in primary cultures of human EGCs (>270 fold increase vs. control) (Fig. 8a). Supernatants  
171 of human primary colon adenocarcinomas were significantly enriched in IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  as assessed  
172 by ELISA (Fig. 7c, d). Importantly, the addition of a naturally occurring IL-1R antagonist (IL-1Ra)  
173 abolished the impact of the supernatant of human primary colon adenocarcinomas on glial mPGES1  
174 expression and PGE2 release (Fig. 8b, c). Consistent with these results, CM of EGCs that had been  
175 pre-activated with CM from IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  double knock-down TECs failed to stimulate tumorsphere  
176 growth as compared to CM of EGCs pre-activated with CM of TECs control or single knock-down for  
177 IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  (Fig. 8d; Supplementary Fig. 5). Interestingly, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNAs were significantly

178 enriched in CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup> HT29 cells (non-CSCs) as compared to unsorted HT29 cells, suggesting  
179 that the tumor cells responsible for EGC activation towards a pro-tumorigenic phenotype correspond  
180 to non-CSCs/a more differentiated cellular fraction of the tumor (Fig. 7e, f). Altogether these results  
181 demonstrate that TEC-derived IL-1 $\alpha$ / $\beta$  activates the synthesis and release of glial PGE2 that in turn  
182 stimulates CSCs.

183 **DISCUSSION**

184 Consistent with the 'seed and soil' theory from Fuchs and Paget at the end of the 19th century,  
185 current views in the field suggest that tumor initiation driven by a subset of cancer cells depends on  
186 cues emanating from resident or recruited cells present at the tumor site that have been altered to  
187 favor tumor formation and growth. Altogether our data give strong evidence *in vivo* and *in vitro* that  
188 EGCs are critical cells of the tumor microenvironment that are remodeled by tumor epithelial cells to  
189 acquire pro-tumorigenic impact on CSCs and activate colon tumorigenesis. This work further  
190 identifies the bidirectional molecular crosstalk between tumor epithelial cells and EGCs (Fig. 9).  
191 One major finding of this study is that EGCs stimulate CSC tumorigenicity and CSC-derived tumor  
192 growth as demonstrated by our xenograft and co-culture results (Fig. 9). This might be surprising  
193 considering previous work from our group demonstrating that EGCs inhibit intestinal epithelial cell  
194 proliferation partly *via* the release of TGF- $\beta$ <sup>16</sup>. However, the former study tested the impact of EGCs  
195 on epithelial cells grown in 2D and more importantly on unsorted cells, *i.e.* it did not focus on the cell  
196 fraction with higher stemness potential. Thus, it is likely that EGCs differentially impact CSCs and  
197 'more differentiated' cells *via* distinct glia-derived paracrine factors and also *via* the expression of  
198 distinct receptor panels in CSCs vs. non-CSCs. This is consistent with our data indicating that EP4 is  
199 enriched, while EP1 is reduced in CSCs vs. non-CSCs. It would be interesting to assess the impact of  
200 EGC-induced activation of EP1 in non-CSCs.

201 Another major finding of this work is that at basal state EGCs do not produce (or not enough) pro-  
202 tumorigenic factors, and thus do not impact CSC-derived tumorsphere growth. However, once  
203 activated by tumor epithelial cell (TEC)-derived IL-1, EGCs have a pro-tumorigenic impact and  
204 increase CSC tumorigenicity and tumorsphere growth (Fig. 9). This is consistent with a growing body  
205 of evidence demonstrating that tumor initiation and progression is dependent on the activation of  
206 different cell types present in the stroma such as fibroblasts, macrophages or adipocytes in response  
207 to stimuli emanating from the tumor such as cytokines or reactive oxygen species<sup>33-35</sup>. In addition, we  
208 show that the addition of IL-1Ra to the supernatant of human primary colon adenocarcinomas

209 completely blocked EGC activation as assessed by glial PGE2 release, and in our co-culture system,  
210 knocking down IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in TECs inhibited EGC pro-tumorigenic effect. Altogether these data  
211 are in favor of a model where IL-1 released by TECs activates EGCs (Fig. 9). Our results even tend to  
212 indicate that 'more differentiated' tumor cells as opposed to CSCs predominantly produce IL-1 $\alpha$ / $\beta$ .  
213 However, we cannot rule out that other cell types of the microenvironment also release IL-1, and  
214 further activate EGCs and glial PGE2 production. Furthermore, in our study, the activation of EGCs by  
215 the tumor was associated with increased mPGES-1 expression and PGE2 production. However it is  
216 very likely that the tumor also impacts other cellular mechanisms and molecular pathways in EGCs as  
217 is the case for other stromal cell types of the tumor microenvironment<sup>36</sup>. It is also interesting to note  
218 that the supernatant of human primary colon adenocarcinomas did not impact mPGES-1 gene  
219 expression or PGE2 release in colonic fibroblasts, suggesting that increased PGE2 production in  
220 response to tumor-derived factors may be specific to EGCs.

221 According to our results, PGE2 derived from tumor-activated EGCs was responsible for CSC activation  
222 and induced an increase in tumorsphere formation and growth (Fig. 9). This strengthens the concept  
223 arising from a growing body of studies that EGCs are a major source of prostaglandins of the stroma  
224 that regulate all the main functions of the intestine<sup>37-40</sup>. Our data using the CAY10526 inhibitor  
225 indicate that increased PGE2 release was dependent on the up-regulation of mPGES-1 gene  
226 expression<sup>41</sup>. Other studies have suggested that IL-1 activates mPGES-1 expression *via* Egr-1, NAB-1,  
227 NF $\kappa$ B or DNA methylation-related pathways<sup>42-44</sup>, and it would be interesting to investigate in further  
228 studies the molecular mechanism involved in our system.

229 Altogether the results of this study propose a model where tumor-activated EGCs release increased  
230 levels of PGE2 that targets CSCs and activates their ability to form tumorspheres *via* the activation of  
231 a pathway that involves EP4, EGFR and ERK1/2 (Fig. 9). This is consistent with a recent study by the  
232 group of DuBois demonstrating that PGE2 induces CSC expansion *via* an EP4/ERK1 pathway<sup>45</sup>. The  
233 transactivation of EGFR by PGE2/EP4 has already been proposed by other groups<sup>26,46</sup>. Here our data  
234 suggest that PGE2 activation of the pathway EP4/EGFR/ERK may be specific to CSCs as indicated by

235 our results demonstrating that EP4 is enriched in CSCs as compared to ‘more differentiated’ tumor  
236 cells.

237 This study is, to the best of our knowledge, the first to define EGCs as active players of the tumor  
238 microenvironment. Our data give strong and direct evidence that EGCs of the tumor  
239 microenvironment undergo a switch towards a pro-tumorigenic phenotype induced by the cytokine  
240 IL-1. One can therefore speculate that chronic inflammatory stress associated with enhanced local  
241 levels of cytokines and increased risk of colorectal cancer<sup>47</sup> may activate this switch of EGC  
242 phenotype that might thus accompany or even precede tumor initiation. Supporting this hypothesis,  
243 previous descriptive studies have reported that alterations in the glial network architecture occur as  
244 early as in adenomas<sup>17</sup>, implying that EGC remodeling is an early event during colon carcinogenesis.  
245 Thus chronic inflammatory stress may alter the bi-directional molecular crosstalk between EGCs and  
246 tumor epithelial cells, which would favor CSC-derived tumor formation. This strengthens the tissue  
247 organization field theory (TOFT) of carcinogenesis, which proposes that it is the disruption of normal  
248 signaling between cells due to carcinogenic insults that compromises genomic integrity leading to  
249 tumor development<sup>48</sup>. It will be very interesting to evaluate whether EGC acquisition of a ‘pro-  
250 tumorigenic phenotype’ occurs before or concomitantly with tumor initiation in future studies.

251 Finally, from a therapeutic perspective, a better understanding of the crosstalk between EGCs and  
252 tumor cells may lead to the development of new therapies aiming to block CSC-driven tumor  
253 initiation and cancer relapse. Here we show that the tumor-induced remodeling of EGCs activating  
254 stemness in colon tumors is driven by an IL-1/PGE2 paracrine signaling. Cooperative effects between  
255 cancer cells and their niche *via* an IL-1/PGE2 paracrine signaling have been previously suggested in  
256 other systems<sup>49,50</sup>, and interestingly, recent studies in head and neck squamous cell carcinoma  
257 suggest that targeting IL-1 may hinder carcinogenesis by reprogramming the tumor  
258 microenvironment<sup>51</sup>. Together with our study, this may suggest that the IL-1/PGE2 paracrine  
259 signaling might be a common target to limit stemness in various cancers.

260 **METHODS**

261 **Tissue Collection.** All collected tissues originated from patients having undergone surgery for  
262 colorectal cancer with a histologic diagnosis of colon adenocarcinoma confirmed by pathologists at  
263 Nantes University Hospital according to international criteria. Two types of tissues were collected: 1)  
264 tumor specimens to establish primary cultures of tumor epithelial cells and 2) macroscopically  
265 healthy colon specimens located at >10cm from the tumor area to isolate primary EGCs<sup>19</sup>. Patients  
266 gave their informed consent to take part in the study and all procedures were performed according  
267 to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human. All experimental protocols  
268 were approved by local Committee on Ethics and Human Research and Inserm (Institut national de la  
269 santé et de la recherche médicale), and registered as #DC-2008-402.

270 **Preparation of human tissue supernatants.** Supernatants were obtained from human primary colon  
271 adenocarcinomas or from macroscopically healthy human colon mucosa. Briefly tissues were  
272 incubated 1h at 37°C in 1mL Krebs-Hepes solution per 30 mg tissue and frozen in liquid nitrogen.  
273 Supernatants were centrifuged using Spin-X Centrifuge Tube Filter 0.22 µm (Corning) and diluted 1:8  
274 in culture medium prior testing.

275 **Cell culture.** JUG-EGC line was obtained as described in Van Landeghem et al.<sup>14</sup>. Human primary HOG-  
276 EGC cultures were isolated and grown following procedures previously established in Soret et al.<sup>19</sup>.  
277 Human colon adenocarcinoma HT29, HCT116 and HCT15 cell lines and human colon fibroblast  
278 CCD18-Co cell line were purchased from ATCC. Human colon adenocarcinoma SW1222 cell line was  
279 from Sigma-Aldrich. JUG-EGC, HT29, HCT116, HCT15 and SW1222 cell lines were cultured in DMEM  
280 (4.5 g/l glucose; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 50 U/ml penicillin, and 50  
281 µg/ml streptomycin (Gibco). HOG-EGCs were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose; Gibco)  
282 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine (Gibco), 50 U/ml penicillin, and 50  
283 µg/ml streptomycin. CCD18-Co cells were grown in MEM medium (Gibco) with 10% heat-inactivated  
284 FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acid (Gibco), 50U/ml penicillin, and 50µg/ml  
285 streptomycin. All cell lines were routinely confirmed to be mycoplasma-free using PCR testing<sup>52</sup>.

286 To establish primary cultures of tumor epithelial cells, tumors harvested at the time of surgical  
287 resection were immediately placed into in Nunclon Sphera 90mm culture dishes (Thermo Fisher  
288 Scientific) after dissociation using the gentleMACs Dissociator (Miltenyi) according to the  
289 manufacturer's instructions. Cells were then cultured in defined medium (Advanced DMEM/F12  
290 containing 2 mM Glutamax, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, HEPES 10 mM, 1X B27  
291 supplement, 1X N2 supplement, 2 µg/ml heparin, 40 ng/ml bFGF, 40 ng/ml EGF, gastrin 10 nM and 1  
292 mM N-acetylcysteine). Medium was changed every 2 to 3 days, and yielded floating spheres  
293 containing primary tumor epithelial cells were maintained until CSCs were FACS-isolated.

294 Stable HT29 cell lines expressing short hairpin RNA (shRNA) sequences targeting IL-1 $\alpha$  (sc-39613-V) or  
295 IL-1 $\beta$  (sc-39615-V) were established using lentiviral particles purchased from Santa Cruz  
296 Biotechnology (MOI 5). Non-Target control HT29 cells were infected with control shRNA lentiviral  
297 particles (sc-108080). Stable cell lines were selected with 5µg/mL puromycin dihydrochloride (Sigma-  
298 Aldrich) for 3 consecutive weeks prior to testing and were maintained constantly in selective  
299 medium.

300 **Reagents.** The selective mPGES-1 inhibitor CAY10526, the EP1 receptor antagonist SC-19220 and the  
301 EP4 receptor antagonist L-161,982 were purchased from Cayman Chemical. PGE2, Human IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$   
302 and Ra were purchased from Sigma-Aldrich. Antibodies phycoerythrin (PE) anti-human CD44 (clone  
303 BJ18), Brilliant Violet 421 (BV421) anti-human CD24 (clone ML5), Alexa Fluor 488 anti-human CD326  
304 (EpCAM) and APC anti-human CD44 (clone BJ18) antibodies were purchased from Biolegend. APC  
305 anti-human CD133/2 antibody was purchased from Miltenyi Biotec. The EGFR Kinase inhibitor AG  
306 1478 was purchased from Merck Millipore.

307 **Fluorescence-activated cell sorting (FACS)-based isolation of CSCs.** HT29, HCT116, HCT15 and  
308 SW1222 CSCs were sorted on a BD FACS Aria based on the levels of expression of the cell surface  
309 markers CD44 and CD24<sup>21</sup>, CD44 and CD133<sup>20</sup>, or CD44, CD24 and CD133: Briefly cells were  
310 trypsinized, resuspended in culture medium, and incubated for 30min on ice with CD44 antibody  
311 (1:40), CD24 antibody (1:20) and/or CD133 antibody (1:100). Sorted CSCs corresponded to the



312 highest 1-2% CD24/CD44, CD44/CD133, or CD24/CD44/CD133-expressing cells, and sorted non-CSCs  
313 corresponded to the lowest 1-2% CD24/CD44, CD44/CD133, or CD24/CD44/CD133-expressing cells.  
314 Primary CSCs were sorted on a BD FACS Aria based on the level of expression of the cell surface  
315 markers EpCAM and CD44 as previously described<sup>53</sup>. Briefly, dissociation of the spheres into single  
316 cells was performed in 1X PBS containing 0.5% BSA and 2mM EDTA and using a 1ml insulin syringe.  
317 Dissociated cell preparations were then incubated for 30min on ice with EpCAM antibody (1:20) and  
318 CD44 antibody (1:40). Sorted CSCs corresponded to EpCAM positive cells and to the highest 1-2%  
319 CD44-expressing cells. Sorted non-CSCs corresponded to EpCAM positive cells and CD44 negative  
320 cells.

321 ***Xenografts.*** Scid Beige mice (6 week old; 6 males and 6 females) were purchased from Charles River  
322 and housed in specific pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit animal facility of  
323 Nantes (Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical  
324 Committee (CEEA, authorization # 2010.49). Appropriate experimental sample size was estimated  
325 from previous pilot studies aiming to determine which number of CSCs and which immunodeficient  
326 mouse model allowed for the most robust and reproducible tumor growth. Mice were anaesthetized  
327 by inhalation of an isoflurane/air mixture (2%, 1 L/min) before injection of 200 CSCs isolated from  
328 luciferase-expressing HT29 cells (Bioware HT29-luc-D6 PerkinElmer) alone or with JUG-EGCs (ratio  
329 1:1) in opposite flanks subcutaneously. Mice were divided into two groups: (Group 1) 3 males and 3  
330 females were injected with CSCs in the left flank and with CSCs + EGCs in the right flank, and (Group  
331 2) 3 males and 3 females were injected with CSCs in the right flank and with CSCs + EGCs in the left  
332 flank. Furthermore CSCs and EGCs from different passages/sorts were used in the same group. At 4  
333 weeks post-injection, bioluminescent imaging was performed after luciferin injection using a  
334 PhotonIMAGER (Biospace Lab). At 5 weeks post-injection, tumor burden was evaluated by volume  
335 calculation using caliper measurement by an observer blinded to treatment groups.

336 ***CSC clonogenicity assay.*** HT29, HCT116, HCT15 and SW1222 CSCs were plated at a density of 400  
337 cells per drop (50  $\mu$ L) of Growth Factor Reduced Matrigel Matrix (Corning) in 24-well plates, and

338 cultured alone or in the presence of JUG-EGCs, HOG-EGCs, CCD18-Co cells, conditioned medium (CM)  
339 of JUG-EGCs pre-activated (TA EGC-CM) or not by HT29 cell-CM (TEC-CM). In co-culture experiments,  
340 JUG-EGCs, HOG-EGCs and CCD18-Co cells were seeded onto porous filters at 45,000 cells per filter  
341 (24-well Transwell Clear, 0.4 $\mu$ m porosity; Corning) one day prior to testing. In conditioned medium  
342 (CM)-based experiments, HT29 cells, IL-1 $\alpha$ / $\beta$  knock down HT29 cells and JUG-EGCs were seeded in  
343 24-well plates at a density of 15,000 cells per well at least one day prior to testing. CM were collected  
344 after a 24h incubation, and centrifuged for 5min at 3,000rpm to eliminate the presence of eventual  
345 cells/debris. HT29 cell-CM was incubated for 24h with JUG-EGCs to obtain CM of tumor-activated  
346 EGCs (TA EGC-CM), or placed in an empty well for 24h (TEC-CM). To evaluate PGE2 impact on  
347 tumorsphere numbers, PGE2 (10 $\mu$ M) was added to the culture medium daily. To assess CAY10526  
348 effects, JUG-EGCs were pre-incubated for 30min with CAY10526 (10  $\mu$ M), and then cultured with  
349 TEC-CM supplemented with CAY10526 (10  $\mu$ M). To test the involvement of EP receptors and EGFR  
350 respectively, CSCs were pre-incubated for 30 min with EP1 or EP4 antagonists (50  $\mu$ M), or EGFR  
351 tyrosine kinase inhibitor AG 1478 (10  $\mu$ M), and then grown in the presence of EGC-CM or TA EGC-CM  
352 supplemented with EP1 or EP4 antagonists (50  $\mu$ M), or AG 1478 (10  $\mu$ M). Medium was changed every  
353 day. Tumorsphere number was determined at day 8 post-plating by two observers blinded to  
354 treatment groups, and tumorsphere size was determined at day 9 using an inverted system  
355 microscope Olympus IX50 (objective 10X FN 22) and ImageJ software.

356 Primary CSCs were plated at a density of 5,000 cells per drop (50  $\mu$ L) Matrigel Matrix hESC-qualified  
357 (Corning) in 24-well plates, and cultured in defined medium alone or in the presence of HOG-EGCs.  
358 Tumorsphere number and size were determined at days 8, 10, 12, 16 and 20 post-plating using an  
359 inverted system microscope Olympus IX50 (objective 10X FN 22) and ImageJ software.

360 **CSC expansion assay.** HT29 CSCs were cultured in 3D-Matrigel as described above for 8 days alone or  
361 in the presence of JUG-EGCs. Yielded tumorspheres were then extracted from Matrigel using the Cell  
362 Recovery Solution (Corning) according to the manufacturer's protocol. Tumorspheres were  
363 trypsinized, and total isolated cells obtained were replated in a 50  $\mu$ L drop of Matrigel and grown

364 without JUG-EGCs for another 8 days before determining the number of tumorspheres that were *de*  
365 *novo* formed.

366 **Evaluation of glial PGE2 production.** To study mPGES 1 expression and PGE2 release, HOG-EGCs  
367 were seeded onto porous filters (24-well Transwell Clear, 0.4µm porosity; Corning) and cultured until  
368 they reached confluence. HOG-EGCs were then cultured without FBS for 24h in control medium,  
369 HT29 cell-CM, or supernatants of human primary colon adenocarcinomas or macroscopically healthy  
370 human colon mucosa. To determine the impact of IL-1α/β on glial mPGES-1 expression, HOG-EGCs  
371 were incubated for 24h without FBS in the presence of 1 nM or 10 nM human IL-1α or IL-1β, or with  
372 tumor vs. healthy supernatants supplemented or not with IL-1Ra (10 µM, after a pre-incubation of 30  
373 min with IL-1Ra alone). After 24h, supernatants of HOG-EGCs treated or not were collected and  
374 processed for PGE2 EIA, and HOG-EGCs were lysed in RA1 buffer (Macherey-Nagel) to assess mPGES-  
375 1 gene expression by Real-Time qPCR.

376 **EIA/ELISAs.** Supernatants were collected and centrifuged for 5 min at 3,000rpm to eliminate the  
377 presence of eventual cells/debris. PGE2 quantity was measured using the PGE2 EIA Kit (Cayman  
378 Chemical) according to the manufacturer's protocol. IL-1α/β concentrations were assessed using  
379 human IL-1α/IL-1F1 and IL-1β/IL-1F2 Quantikine ELISA Kits (R&D).

380 **Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis.** Extraction of total RNA was performed  
381 using the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's recommendations.  
382 Reverse transcription was performed using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Real-  
383 Time qPCR studies were carried out using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems), and  
384 run on StepOnePlus system (Life Technologies). All qRT-PCR data were normalized to the invariant  
385 control gene *RPS6*. The following TaqMan primer/probe sets were used: *RPS6*: Hs041950248g1,  
386 *CD24*: Hs03044178\_g1, *CD44*: Hs01075862\_m1, *PTK7*: Hs00897151\_m1, *CEACAM6* (CD66c):  
387 Hs03645554\_m1, *PTGER1*: Hs00168752\_m1, *PTGER2*: Hs04183523, *PTGER3*: Hs00168755\_m1,  
388 *PTGER4*: Hs00168761\_m1, *IL1A*: Hs00174092\_m1, *IL1B*: Hs01555410\_m1, *PTGES*: Hs01115610\_m1,  
389 *IL1R1*: Hs00991002\_m1/Rn00565482\_m1 (HOG-EGC/JUG-EGC).

390 **Western Blotting.** HT29 CSCs were 3D-cultured in Matrigel as described above for 4 days alone or in  
391 the presence of JUG-EGCs. Tumorspheres were extracted from Matrigel using the Cell Recovery  
392 Solution (Corning) according to the manufacturer's protocol, and then lysed with 2X Laemmli buffer  
393 with 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol heated at 60°C. Samples were processed for electrophoresis using  
394 NuPAGE MOPS SDS buffer (Life Technologies) and separated on 10% Bis-Tris gels (Life Technologies).  
395 Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes using the iBlot System (Life Technologies).  
396 After blocking, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in 1X TBS with  
397 5% BSA and 0.1% Tween for ERK (1:500, Cell Signaling), pERK (1:500, Cell Signaling), EGFR (1:500, Cell  
398 Signaling) and pEGFR (1:4000, Cell Signaling). Immunoblots were probed with appropriate  
399 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature (Thermo  
400 Scientific) and visualized by chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad) using a Gel-  
401 Doc imager and the Image Lab Software (Bio-Rad).

402 **Immunohistofluorescence studies.** Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C.  
403 Following paraffin-embedding and sectioning, slides were baked at 60°C for 2h, deparaffinized with  
404 successive incubations in xylene, absolute ethanol, 95% ethanol and 70% ethanol, and incubated in  
405 1X Target Retrieval Solution (Dako) at 110°C for 90s. Sections were then successively incubated in  
406 blocking solution (Dako) for 1h, primary and secondary antibodies diluted in antibody diluent solution  
407 (Dako) overnight at 4°C and 1 hour at room temperature, respectively. The following primary and  
408 secondary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-S-100 $\beta$  (1:1000, DAKO), rabbit polyclonal anti-  
409 GFAP (1:500, DAKO), mouse polyclonal anti-EpCAM (1:200, Biolegend), anti-rabbit-Cy3 (1:500,  
410 Jackson) and anti-mouse-Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen). Stained sections were imaged using a  
411 microscope OLYMPUS BX51 (objectives 20X FN 26.5, 40X FN 26.5) and with an inverted microscope  
412 OLYMPUS IX83 (objectives 20X FN 22, 40X FN 22).

413 **Statistical Analysis.** Data were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using  
414 SigmaPlot software. Non-parametric tests were used to compare different groups as indicated in the

415 figure legends if Shapiro-Wilk Normality Test or Equal Variance Test failed. Differences were  
416 considered as significant for a p-value of less than 0.05.  
417 **Data availability.** The data that support the findings of this study are available from the  
418 corresponding author upon reasonable request.

419 **ACKNOWLEDGMENTS**

420 The authors wish to thank Tony Durand, Philippe Aubert, Julien Chevalier, Alice Prigent, Julie Jaulin,  
421 Elise Beneteau and Nathalie Vaillant for their invaluable technical assistance. Discussions with  
422 Malvyne Rolli-Derkinderen and Geneviève Aillet are gratefully acknowledged. The work was assisted  
423 by services of the Cytometry and cell sorting Cytocell core facility of Nantes (France), the  
424 Experimental Therapy Unit animal facility of Nantes (France) and the Histopathology Institute of  
425 Nantes (IHP, France). This work was supported by grants from La Ligue contre le Cancer (to M.  
426 Neunlist from the Loire-Atlantique, Morbihan, Mayenne, Loiret and Sarthe Committees, a post-  
427 doctoral fellowship to L. Van Landeghem from the Loire-Atlantique and Sarthe Committees, and a  
428 PhD fellowship to S. Valès from La Ligue Nationale contre le Cancer), the French National Cancer  
429 Institute (INCA\_7904 to L. Van Landeghem), and the 'Région des Pays de la Loire'.

430 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

431 SV and LVL designed and performed the experiments. SV and LVL interpreted the data. MB, MT, FG,  
432 KAG, GB and LO participated in the *in vitro* experiments. AB, SML and TO participated in the *in vivo*  
433 experiments. MT performed histology procedures and analysis. SV, FG, CB, MF, ED, LO and LVL  
434 performed the collection of human colon specimens. SV, LO, MN and FMV participated in the study  
435 concept and the manuscript writing. LVL supervised the study and wrote the manuscript.

436 **COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

437 The authors declare no conflicting financial interests.

438 **MATERIALS & CORRESPONDENCE**

439 Correspondence and material requests should be addressed to LVL (North Carolina State University,  
440 College of Veterinary Medicine, Department of Molecular Biomedical Sciences, 1060 William Moore  
441 Drive, CB# 8401, Raleigh, NC 27607, USA, +1 919 513 6801, [lcvanlan@ncsu.edu](mailto:lcvanlan@ncsu.edu)).

442

443 **REFERENCES**

- 444 1. Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*  
445 **445**, 111–115 (2007).
- 446 2. O’Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating  
447 tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–110 (2007).
- 448 3. Gao, W. *et al.* Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with  
449 organ-specific metastatic potential. *Gastroenterology* **145**, 636–646.e5 (2013).
- 450 4. Colak, S. *et al.* Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer  
451 stem cells. *Cell Death Differ.* **21**, 1170–1177 (2014).
- 452 5. Huels, D. J. & Sansom, O. J. Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **113**, 1–  
453 5 (2015).
- 454 6. Medema, J. P. & Vermeulen, L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal  
455 homeostasis and cancer. *Nature* **474**, 318–326 (2011).
- 456 7. Vermeulen, L. *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the  
457 microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **12**, 468–476 (2010).
- 458 8. Colak, S. & Medema, J. P. Human colonic fibroblasts regulate stemness and chemotherapy  
459 resistance of colon cancer stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **0** (2014).  
460 doi:10.4161/15384101.2014.973321
- 461 9. Wei, H.-J. *et al.* Adipose-derived stem cells promote tumor initiation and accelerate tumor  
462 growth by interleukin-6 production. *Oncotarget* **6**, 7713–7726 (2015).
- 463 10. Gulbransen, B. D. & Sharkey, K. A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal  
464 tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 625–632 (2012).
- 465 11. Sharkey, K. A. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J. Clin. Invest.* **125**,  
466 918–925 (2015).
- 467 12. Neunlist, M. *et al.* The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and  
468 disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 90–100 (2013).

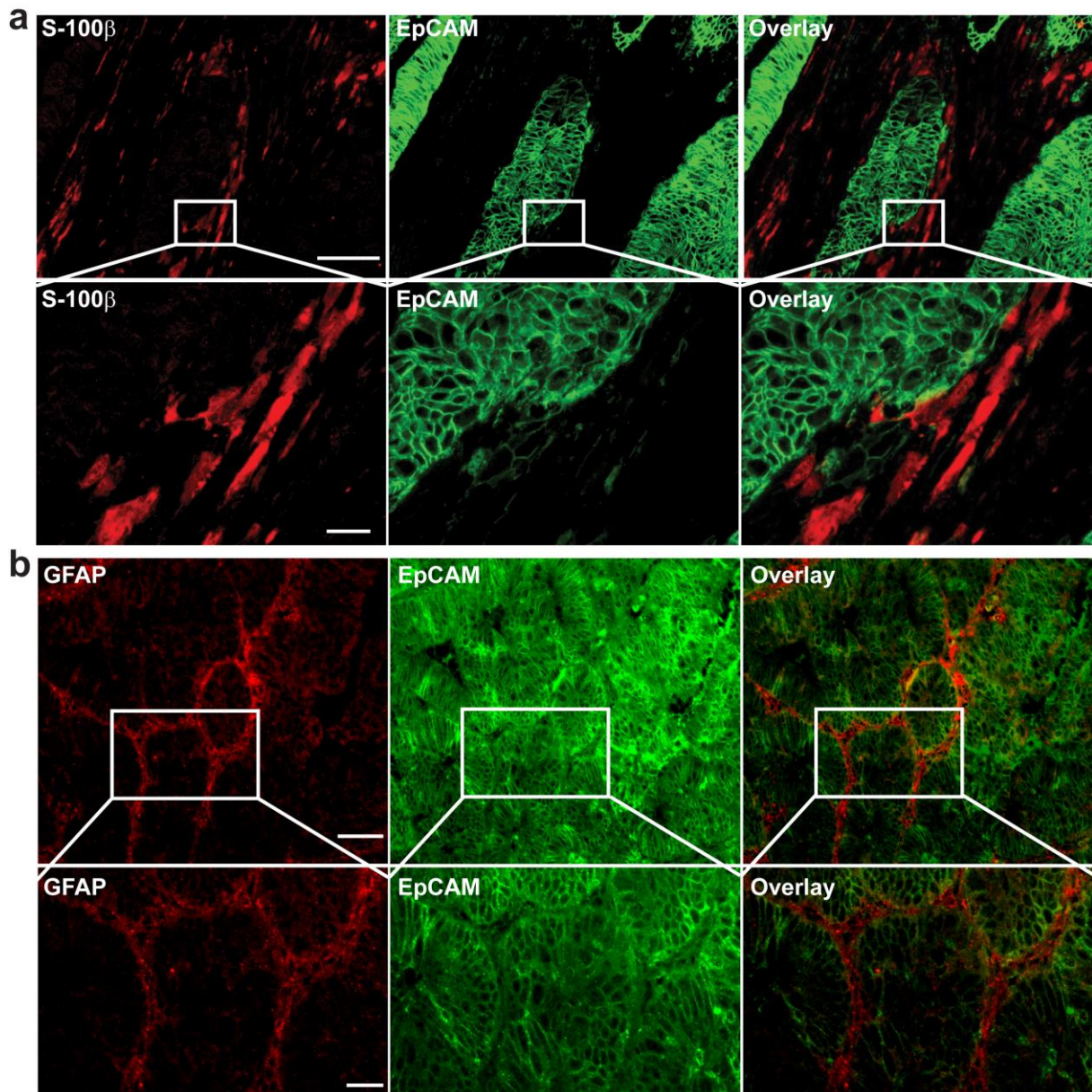
- 469 13. Bush, T. G. *et al.* Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic  
470 mice. *Cell* **93**, 189–201 (1998).
- 471 14. Van Landeghem, L. *et al.* Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal  
472 adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G976-987  
473 (2011).
- 474 15. Savidge, T. C. *et al.* Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release  
475 of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344–1358 (2007).
- 476 16. Neunlist, M. *et al.* Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-  
477 beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G231-241 (2007).
- 478 17. Liu, Y. A. *et al.* 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent  
479 human colon mucosa. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* **25**, e324-  
480 338 (2013).
- 481 18. Garcia, S. B., Stopper, H. & Kannen, V. The contribution of neuronal–glial–endothelial–epithelial  
482 interactions to colon carcinogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3191–3197 (2014).
- 483 19. Soret, R. *et al.* Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their  
484 effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.*  
485 **25**, e755-764 (2013).
- 486 20. Botchkina, G. I. *et al.* New-generation taxoid SB-T-1214 inhibits stem cell-related gene expression  
487 in 3D cancer spheroids induced by purified colon tumor-initiating cells. *Mol. Cancer* **9**, 192  
488 (2010).
- 489 21. Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R. & Bodmer, W. F. Cancer stem cells from  
490 colorectal cancer-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 3722–3727 (2010).
- 491 22. Adamsen, B. L., Kravik, K. L. & De Angelis, P. M. DNA damage signaling in response to 5-  
492 fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status.  
493 *Int. J. Oncol.* **39**, 673–682 (2011).



- 494 23. Murakami, M., Ohta, T., Otsuguro, K.-I. & Ito, S. Involvement of prostaglandin E2 derived from  
495 enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* **145**,  
496 642–653 (2007).
- 497 24. Jung, P. *et al.* Isolation of Human Colon Stem Cells Using Surface Expression of PTK7. *Stem Cell*  
498 *Rep.* **5**, 979–987 (2015).
- 499 25. Gemei, M. *et al.* CD66c is a novel marker for colorectal cancer stem cell isolation, and its silencing  
500 halts tumor growth in vivo. *Cancer* **119**, 729–738 (2013).
- 501 26. Pai, R. *et al.* Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting  
502 colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat. Med.* **8**, 289–293 (2002).
- 503 27. Buchanan, F. G. *et al.* Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer.  
504 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1492–1497 (2006).
- 505 28. Li, H.-J., Reinhardt, F., Herschman, H. R. & Weinberg, R. A. Cancer-stimulated mesenchymal stem  
506 cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov.* **2**, 840–855  
507 (2012).
- 508 29. Dinarello, C. A. & Wolff, S. M. The role of interleukin-1 in disease. *N. Engl. J. Med.* **328**, 106–113  
509 (1993).
- 510 30. Postlethwaite, A. E. *et al.* Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-  
511 state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but  
512 not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J. Cell Biol.* **106**, 311–318  
513 (1988).
- 514 31. Mayer-Barber, K. D. *et al.* Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I  
515 interferon crosstalk. *Nature* **511**, 99–103 (2014).
- 516 32. Stoffels, B. *et al.* Postoperative Ileus Involves Interleukin-1 Receptor Signaling in Enteric Glia.  
517 *Gastroenterology* **146**, 176–187.e1 (2014).
- 518 33. Schwartz, B. & Yehuda-Shnaidman, E. Putative role of adipose tissue in growth and metabolism  
519 of colon cancer cells. *Front. Oncol.* **4**, 164 (2014).

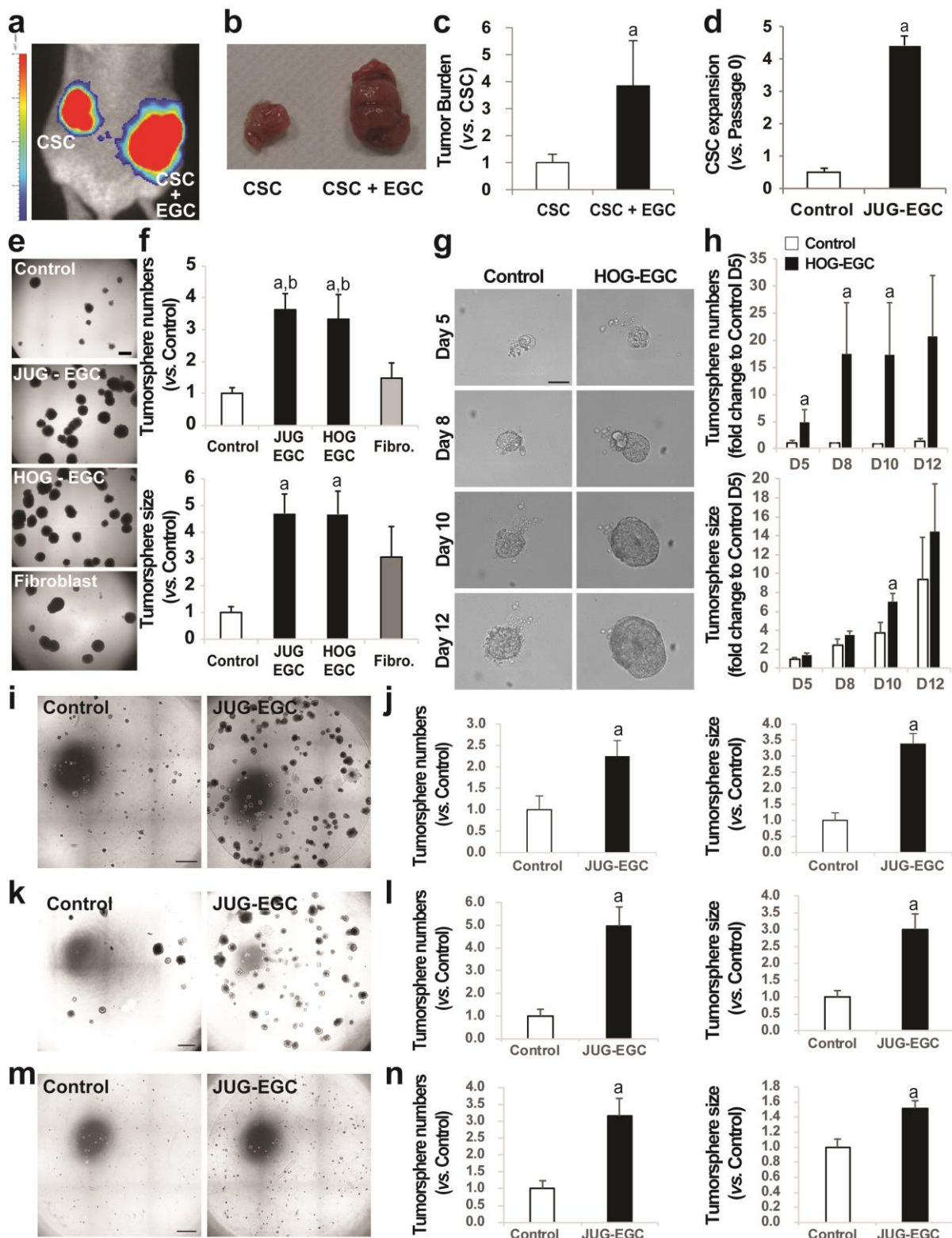
- 520 34. Catalano, V. *et al.* Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Semin. Cancer Biol.*  
521 **23**, 522–532 (2013).
- 522 35. Mariani, F., Sena, P. & Roncucci, L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer  
523 development. *World J. Gastroenterol.* **20**, 9716–9731 (2014).
- 524 36. Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G. & Chiarugi, P. Microenvironment and tumor cell plasticity:  
525 An easy way out. *Cancer Lett.* **341**, 80–96 (2013).
- 526 37. Le Loupp, A.-G. *et al.* Activation of the prostaglandin D2 metabolic pathway in Crohn’s disease:  
527 involvement of the enteric nervous system. *BMC Gastroenterol.* **15**, 112 (2015).
- 528 38. Pochard, C. *et al.* Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human  
529 Enteric Glial Cells From Patients With Crohn’s Disease. *Gastroenterology* **150**, 168–180 (2016).
- 530 39. Coquenlorge, S. *et al.* The arachidonic acid metabolite 11 $\beta$ -ProstaglandinF2 $\alpha$  controls intestinal  
531 epithelial healing: deficiency in patients with Crohn’s disease. *Sci. Rep.* **6**, 25203 (2016).
- 532 40. Bach-Ngohou, K. *et al.* Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation  
533 through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J. Physiol.* **588**, 2533–2544 (2010).
- 534 41. Guerrero, M. D. *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of a selected library of new  
535 potential anti-inflammatory agents bearing the gamma-hydroxybutenolide scaffold: a new class  
536 of inhibitors of prostanoid production through the selective modulation of microsomal  
537 prostaglandin E synthase-1 expression. *J. Med. Chem.* **50**, 2176–2184 (2007).
- 538 42. El Mansouri, F. E. *et al.* Lysine-specific demethylase 1-mediated demethylation of histone H3  
539 lysine 9 contributes to interleukin 1 $\beta$ -induced microsomal prostaglandin E synthase 1 expression  
540 in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R113 (2014).
- 541 43. Zayed, N. *et al.* Valproic acid suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced microsomal prostaglandin E2  
542 synthase-1 expression in chondrocytes through upregulation of NAB1. *J. Rheumatol.* **38**, 492–502  
543 (2011).
- 544 44. Deckmann, K. *et al.* Dimethylcelecoxib inhibits mPGES-1 promoter activity by influencing EGR1  
545 and NF- $\kappa$ B. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1365–1372 (2010).

- 546 45. Wang, D., Fu, L., Sun, H., Guo, L. & DuBois, R. N. Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer  
547 Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. *Gastroenterology* **149**, 1884–1895.e4 (2015).
- 548 46. Doherty, G. A. *et al.* Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer.  
549 *BMC Cancer* **9**, 207 (2009).
- 550 47. Pesic, M. & Greten, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Curr. Opin.*  
551 *Cell Biol.* **43**, 55–61 (2016).
- 552 48. Soto, A. M. & Sonnenschein, C. The tissue organization field theory of cancer: a testable  
553 replacement for the somatic mutation theory. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **33**, 332–  
554 340 (2011).
- 555 49. Hou, Z., Falcone, D. J., Subbaramaiah, K. & Dannenberg, A. J. Macrophages induce COX-2  
556 expression in breast cancer cells: role of IL-1 $\beta$  autoamplification. *Carcinogenesis* **32**, 695–702  
557 (2011).
- 558 50. Dudás, J. *et al.* Tumor-produced, active Interleukin-1  $\beta$  regulates gene expression in carcinoma-  
559 associated fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **317**, 2222–2229 (2011).
- 560 51. Wu, T. *et al.* Modulation of IL-1 $\beta$  reprogrammes the tumor microenvironment to interrupt oral  
561 carcinogenesis. *Sci. Rep.* **6**, 20208 (2016).
- 562 52. Wong-Lee, J. G. & Lovett, M. Rapid and sensitive PCR method for identification of Mycoplasma  
563 species in tissue culture. *Diagn. Mol. Microbiol. Princ. Appl. Am. Soc. Microbiol. Wash. DC USA*  
564 (1993).
- 565 53. Dalerba, P. *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl.*  
566 *Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10158–10163 (2007).
- 567



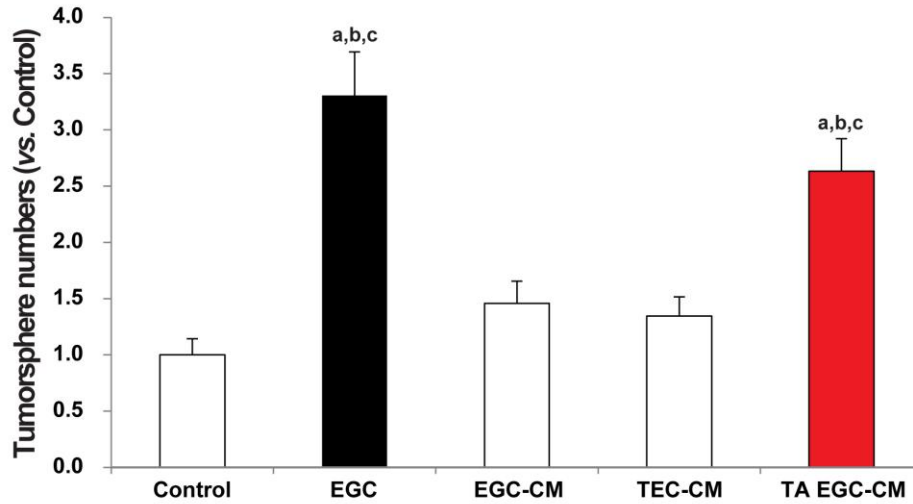
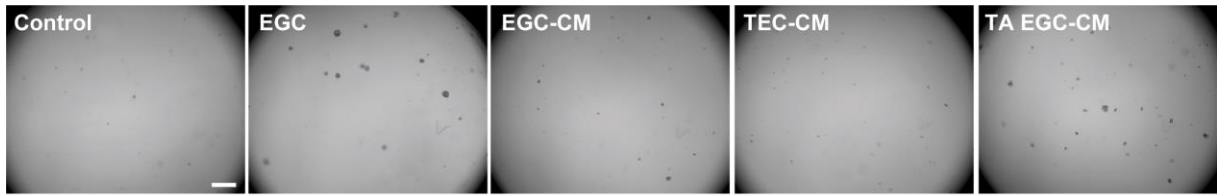
568

569 **FIGURE 1: EGCs are part of the tumor microenvironment. a/b.** Representative photographs of  
 570 human primary colon adenocarcinomas stained for the EGC markers S-100β (red) (a) or GFAP (red)  
 571 (b) and the epithelial cell marker EpCAM (green) demonstrating that EGCs are in close proximity to  
 572 colon cancer epithelial cells. Scale Bars: (a) Upper Panel: 20μm, Lower Panel: 10μm; (b) Upper Panel:  
 573 50μm; Lower Panel: 20μm.



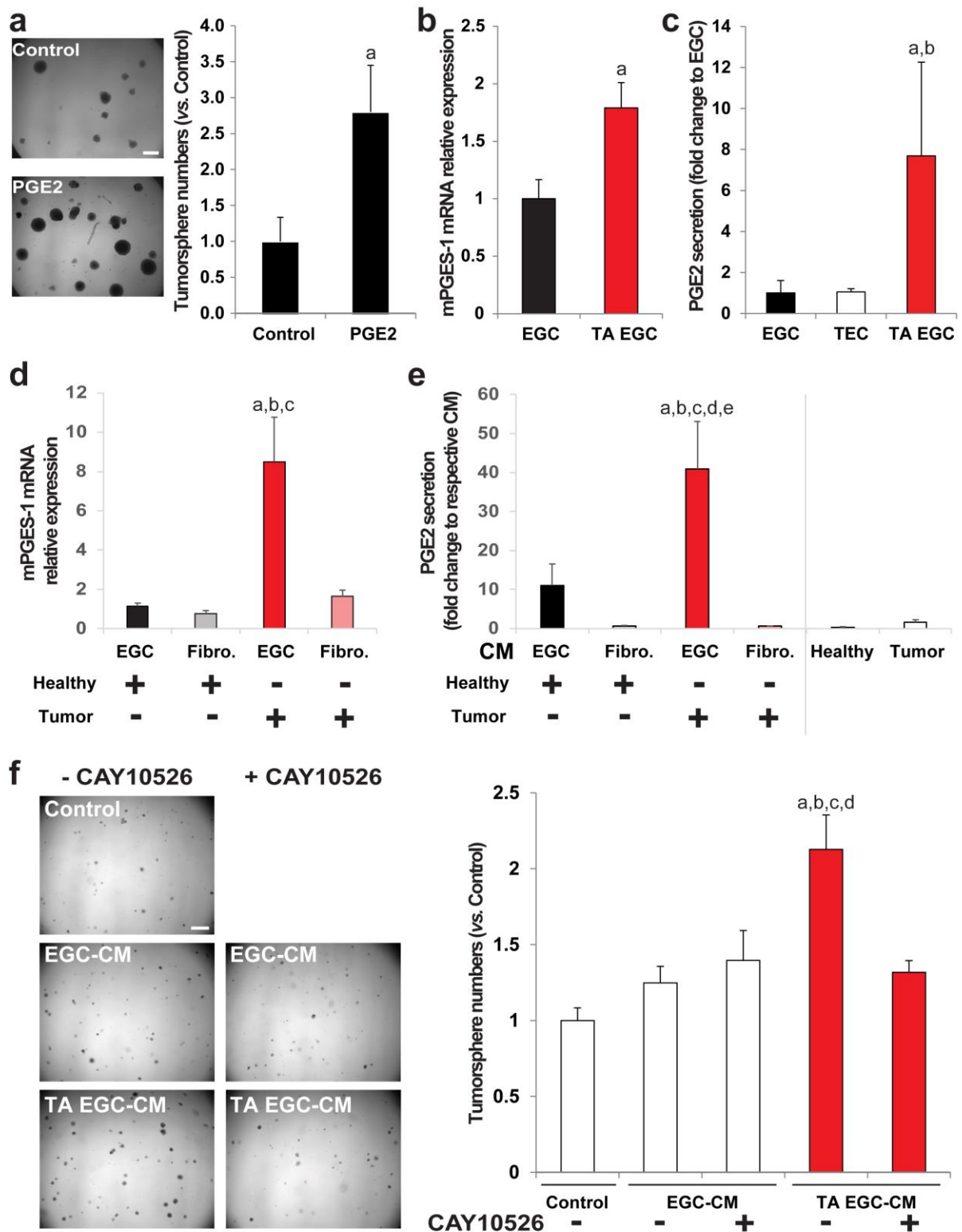
574  
 575 **FIGURE 2: EGCs stimulate CSC-driven tumorigenesis.** (a-f. CSCs were isolated from the human HT29  
 576 cell line.) a. Bioluminescence imaging of a representative mouse at 4 weeks after injection of  
 577 luciferase-expressing CSCs alone (CSC) and a mix of CSCs + EGCs (CSC + EGC) at a 1:1 ratio in opposite  
 578 flanks. b. Photographs of representative tumors at 6 weeks after injection of CSCs alone and a mix of  
 579 CSCs + EGCs in opposite flanks. c. Tumor burden corresponds to the tumor volume and is expressed  
 580 as fold change relative to control (CSC) (mean  $\pm$  SEM). n=12; Mann and Whitney test, a:  $p < 0.01$ . d.  
 581 Quantification of CSC expansion corresponds to [number of tumorspheres (Passage 1, P1) yielded  
 582 from single cell suspension obtained from dissociation of P0 tumorspheres and cultured alone] /

583 [initial number of tumorspheres (**Passage 0, P0**) yielded from CSCs cultured alone or in the presence  
584 of EGCs]. n=5; Mann and Whitney test, a: p<0.01. **e.** Representative photographs of CSCs cultured  
585 alone (**Control**), in the presence of **JUG-EGCs**, **HOG-EGCs** or normal human **fibroblasts** (CCD18-Co).  
586 Scale Bar: 500µm. **f.** Quantification of tumorsphere number (*upper panel*) and size (*lower panel*) is  
587 expressed as fold change relative to Control (mean ± SEM). n ≥ 3; ANOVA, Holm-Sidak multiple  
588 comparison test, a: p<0.05 vs. Control, b: p<0.05 vs. fibroblasts. **g/h.** Representative photographs (**g**)  
589 of tumorspheres derived from CSCs isolated from primary adenocarcinomas from colorectal cancer  
590 patients cultured alone (**Control**) or in the presence of primary cultures of human EGCs (**HOG-EGC**)  
591 from day 5 to day 12 post-plating illustrating that HOG-EGCs increased tumorsphere number (**h**,  
592 *upper panel*) and size (**h**, *lower panel*). n=5; Mann and Whitney test, a: p<0.05. Scale Bar: 20µm. **i-n.**  
593 Representative photographs (**l,k,m**) of HCT116 (**i/j**), HCT15(**k/l**) and SW1222(**m/n**)-derived CSCs  
594 cultured alone (**Control**) or in the presence of EGCs (**JUG-EGC**) illustrating that EGCs increased  
595 tumorsphere number (**j,l,n**; *left panel*) and size (**j,l,n**; *right panel*). n≥4; Mann and Whitney test, a:  
596 p<0.05. Scale Bar: 1mm.



597

598 **FIGURE 3: Tumor epithelial cells activate EGCs to acquire pro-tumorigenic effects.** Representative  
 599 photographs and bar graph demonstrating that in contrast to the presence of EGCs on Transwell  
 600 filters (**EGC**), EGC-conditioned medium (**EGC-CM**) did not impact CSC-derived tumorsphere yield.  
 601 However, CM of tumor-activated EGCs (**TA EGC-CM**) induced a significant increase in tumorsphere  
 602 numbers. CM of tumor epithelial cells (**TEC-CM**) had no effect. Quantification of tumorsphere  
 603 number is expressed as fold change relative to Control (mean  $\pm$  SEM).  $n \geq 9$ ; ANOVA, Holm-Sidak  
 604 multiple comparison test, a:  $p < 0.05$  vs. Control, b:  $p < 0.05$  vs. EGC-CM, c:  $p < 0.05$  vs. TEC-CM. Scale  
 605 Bar: 500 $\mu$ m.

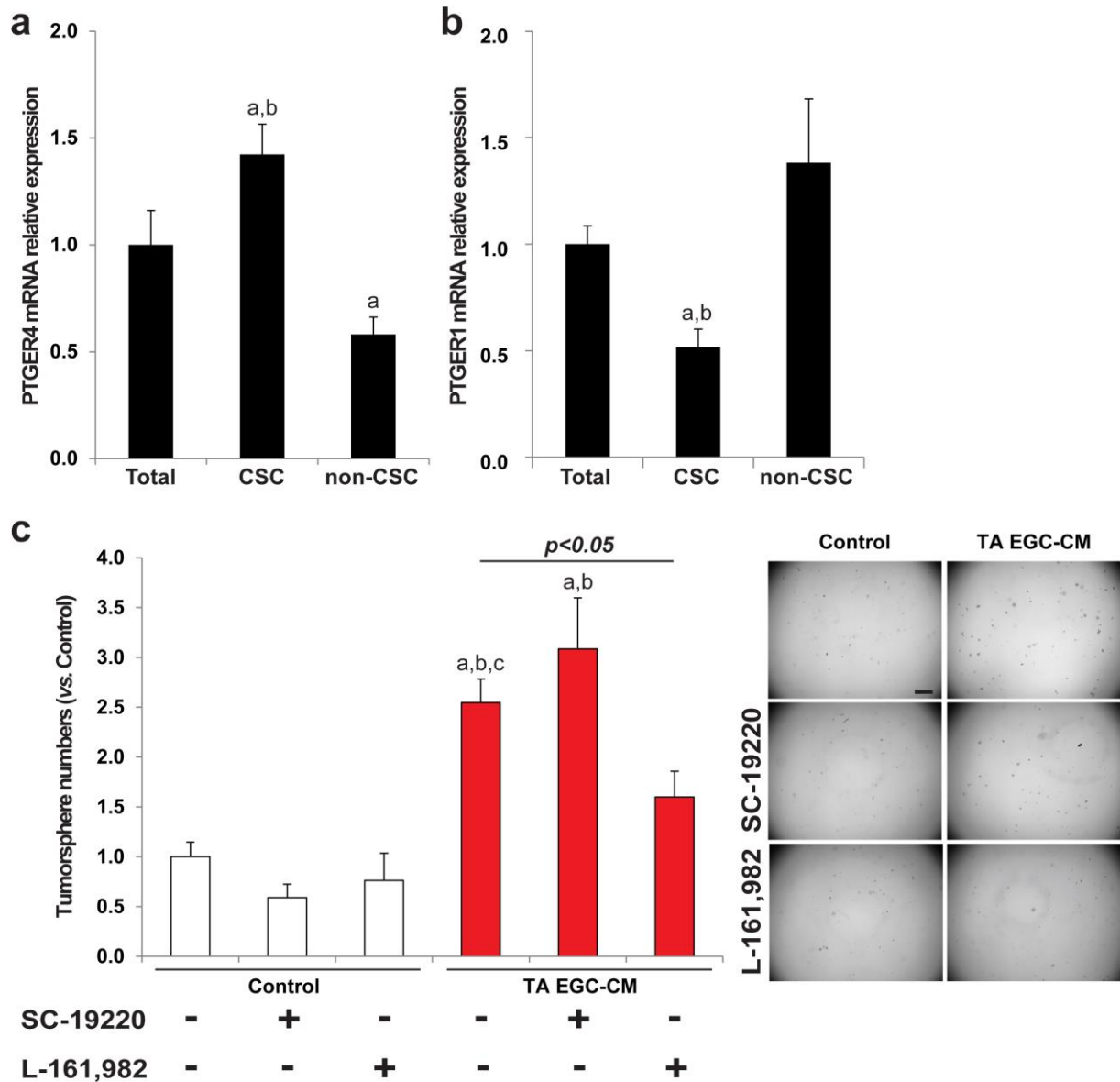


606

607 **FIGURE 4: Tumor-activated EGCs stimulate CSC clonogenicity via increased glial PGE2.** **a.** (left panel)  
 608 Photographs illustrating that PGE2 treatment (10 $\mu$ M) increased the number of tumorspheres yielded  
 609 from CSCs. Scale Bar: 500 $\mu$ m. (right panel) Quantification is expressed as fold change to Control  
 610 (mean  $\pm$  SEM). n=3; two tailed t-test, a: p<0.05. **b.** RT-qPCR data showing that mPGES-1 gene  
 611 expression was up-regulated in tumor-activated EGCs (TA EGC) vs. control EGCs. n=5; Mann and  
 612 Whitney test, a: p<0.01. **c.** PGE2 EIA analysis showed a significantly higher PGE2 concentration in TA  
 613 EGC-CM vs. EGC-CM or TEC-CM. n $\geq$ 3; Kruskal-Wallis ANOVA, Dunn's multiple comparison test, a:

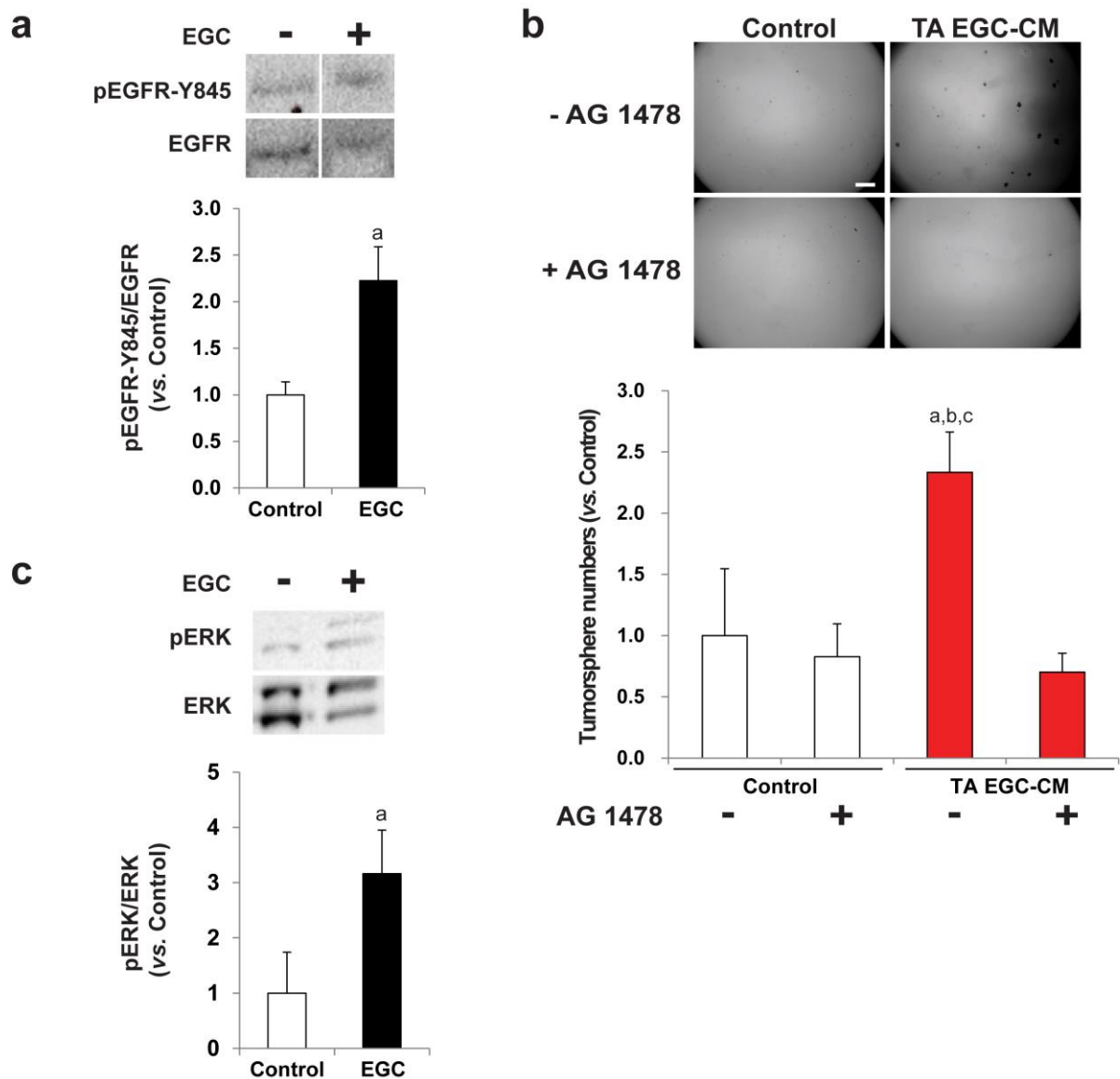


614 p<0.05 vs. EGC, b: p<0.05 vs. TEC. **d.** Supernatant of human primary colon adenocarcinomas (**Tumor**)  
615 stimulated mPGES-1 gene expression in **EGCs**, but not in **fibroblasts** (CCD18Co), compared to  
616 supernatant of macroscopically **healthy** human colon mucosa. n≥4; ANOVA, Holm-Sidak multiple  
617 comparison test, a: p<0.05 vs. EGC/Healthy, b: p<0.05 vs. Fibro./Healthy, c: p<0.05 vs. Fibro./Tumor.  
618 **e.** PGE2 EIA validated that supernatant of human primary colon adenocarcinomas (**Tumor**)  
619 stimulated PGE2 release in **EGCs**, but not in **fibroblasts**, compared to supernatant of healthy human  
620 colon mucosa (**Healthy**) (**CM**= conditioned medium). n≥4; ANOVA, Holm-Sidak multiple comparison  
621 test, a: p<0.05 vs. EGC/Healthy, b: p<0.05 vs. Fibro./Healthy, c: p<0.05 vs. Fibro./Tumor, d: p<0.05 vs.  
622 Healthy, e: p<0.05 vs. Tumor. **f.** Representative photographs and quantification to illustrate that  
623 addition of a specific inhibitor of mPGES-1 expression (**CAY10526**; 10 μM) to tumor epithelial cell-CM  
624 prevented tumor cell-induced activation of pro-tumorigenic effects in EGCs. n=5; ANOVA, Holm-Sidak  
625 multiple comparison test, a: p<0.05 vs. Control, b: p<0.05 vs. EGC CM, c: p<0.05 vs. EGC-  
626 CM+CAY10526, d: p<0.05 vs. TA EGC-CM+CAY10526. Scale Bar: 500μm.



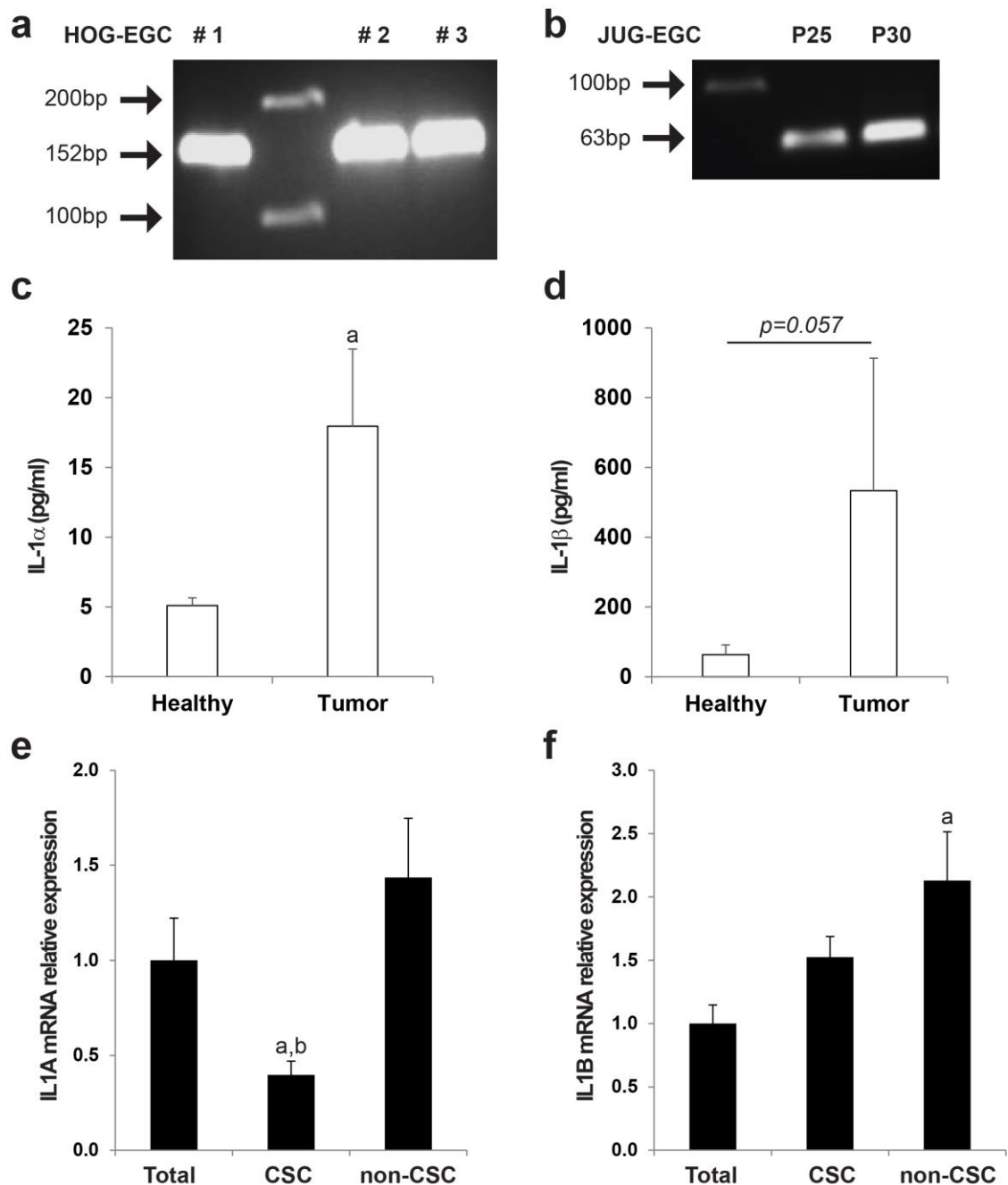
627

628 **FIGURE 5: TA EGC-derived PGE2 stimulates CSC clonogenicity via EP4 activation.** a/b. RT-qPCR data  
 629 showing that PTGER4 (EP4) mRNA was significantly enriched in CSCs compared to unsorted HT29  
 630 cells (**Total**) and compared to cells expressing lower levels of CSC markers (**non-CSC**) (**a**). In contrast,  
 631 PTGER1 (EP1) was expressed at significantly lower levels in CSCs than in unsorted HT29 cells and non-  
 632 CSCs (**b**). Data are expressed as fold change to Total (mean ± SEM). n=5; ANOVA, Holm-Sidak multiple  
 633 comparison test, a: p<0.05 vs. Total, b: p<0.05 vs. non-CSC. **c.** Representative photographs (*right*  
 634 *panel*) and quantification (*left panel*) demonstrated that the addition of a selective antagonist of EP4  
 635 (**L-161,982**, 50 μM) but not EP1 (**SC-19220**, 50 μM) to TA EGC-CM abolished its pro-tumorigenic  
 636 effects. n≥4; ANOVA, Holm-Sidak multiple comparison test, a: p<0.05 vs. Control, b: p<0.05 vs. SC-  
 637 19220, c: p<0.05 vs. L-161,982. Scale Bar: 500μm.

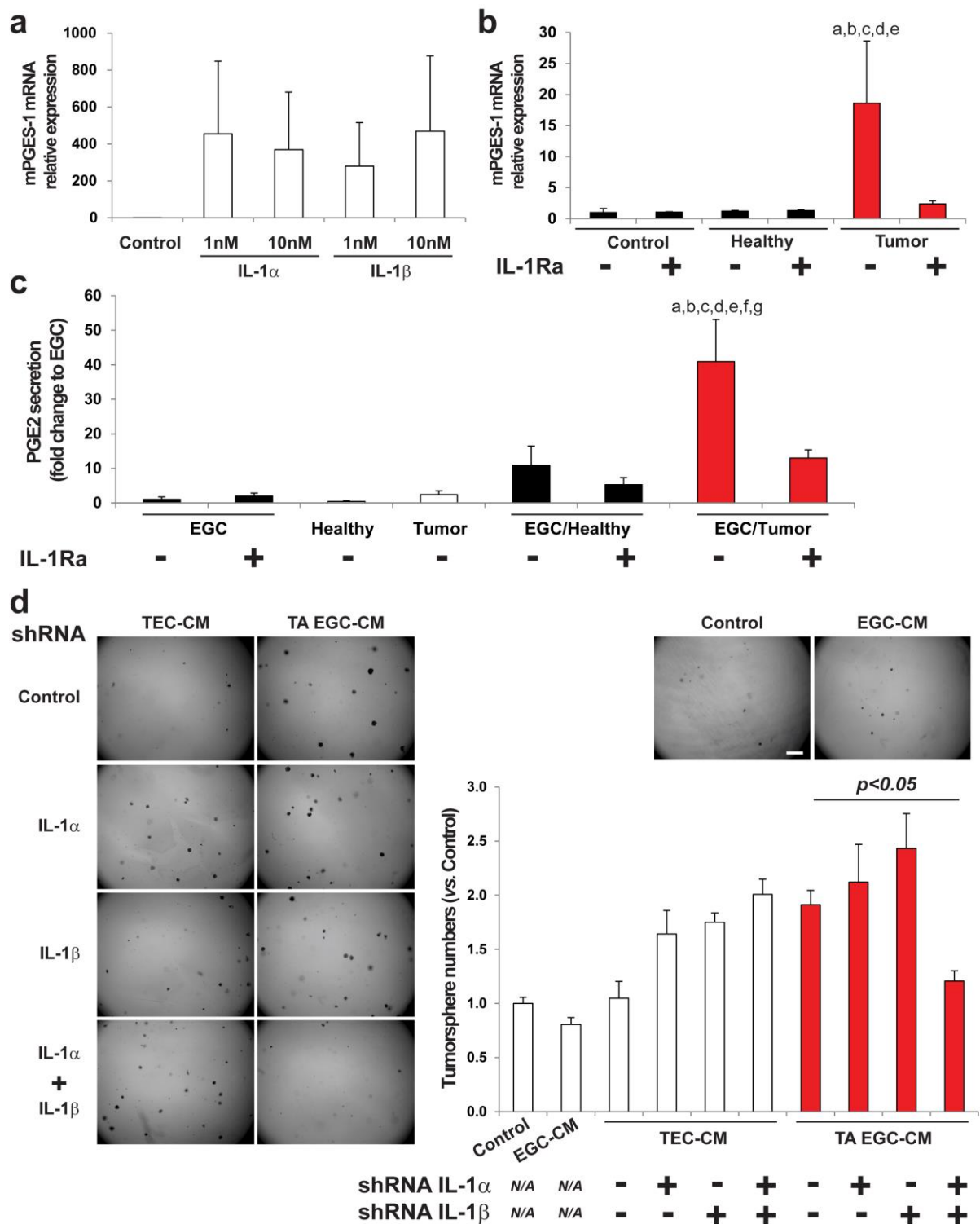


638

639 **FIGURE 6: TA EGCs activate CSCs via EGFR and ERK-dependent pathways.** **a.** Representative western  
 640 blots and quantification demonstrating that EGCs increased pEGFR-Y845/EGFR in CSCs.  
 641 Quantification is expressed as fold change to Control (mean  $\pm$  SEM). n=4, Mann and Whitney test, a:  
 642 p<0.05. **b.** Representative photographs and quantification of tumorspheres yielded from CSCs  
 643 cultured alone (**Control**) or with tumor-activated EGC-CM (**TA EGC-CM**) supplemented or not with an  
 644 inhibitor of EGFR tyrosine kinase activity (**AG 1478**; 10  $\mu$ M). Data are expressed as fold change  
 645 relative to Control (mean  $\pm$  SEM). n=4; ANOVA, Holm-Sidak multiple comparison test, a: p<0.05 vs.  
 646 Control, b: p<0.05 vs. AG 1478, b: p<0.05 vs. TA EGC-CM + AG 1478. Scale bar: 500 $\mu$ m. **c.**  
 647 Representative immunoblots illustrating that pERK/ERK was increased in CSCs cultured in the  
 648 presence of EGCs compared to CSCs cultured alone. n=4; Mann and Whitney test, a: p<0.05.

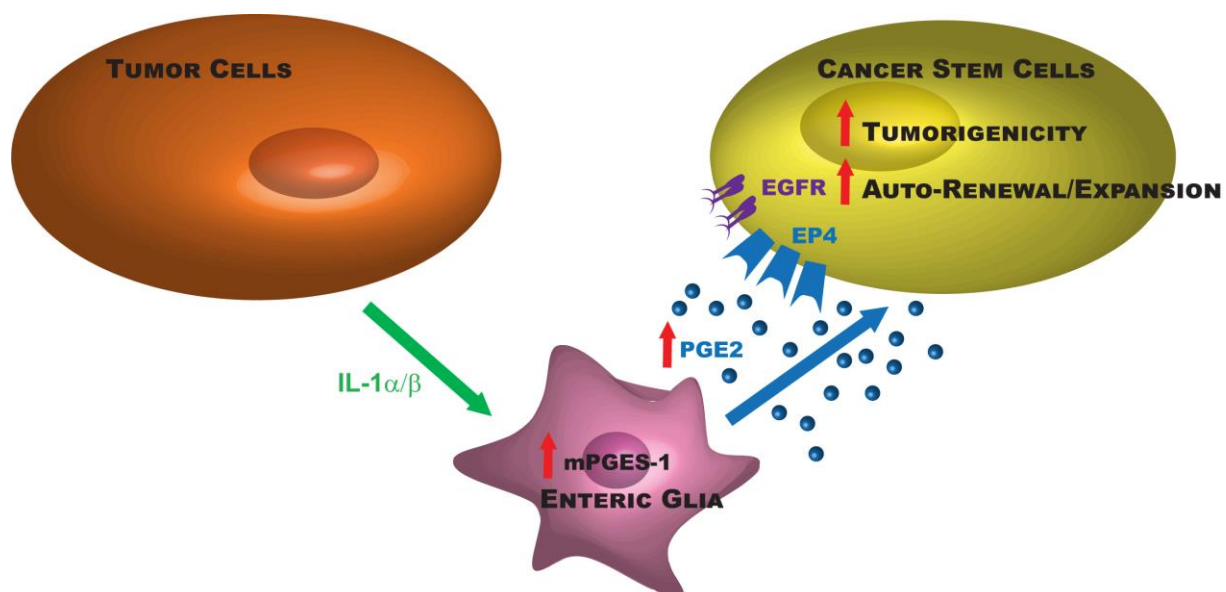


649  
650 **FIGURE 7. EGCs express IL-1R, and IL-1 $\alpha/\beta$  are highly enriched in the tumor microenvironment. a/b.**  
651 Agarose gel electrophoresis of PCR products corresponding to IL-1R cDNA amplicons in human  
652 primary EGC cultures (a) (HOG-EGC, amplicon size 152bp) and in rat non-transformed EGC line (b)  
653 (JUG-EGC, amplicon size 63bp). Lanes #1, #2 and #3 (a) correspond to 3 cultures derived from 3  
654 different patients. Lanes P25 and P30 (b) correspond to 2 different passages. c/d. ELISA data showed  
655 that IL-1 $\alpha$  (c) and IL-1 $\beta$  (d) were highly enriched in supernatants of human colon adenocarcinomas  
656 (Tumor) compared with supernatants of human healthy colonic mucosa (Healthy). n=4; Wilcoxon  
657 rank-sum test, a: p<0.05 vs. Healthy. e/f. Real-Time qPCR data demonstrated that IL-1 $\alpha$  gene  
658 expression (e) was downregulated in CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup> CSCs as compared to unsorted HT29 (Total)  
659 and CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup> non-CSCs, and IL-1 $\beta$  mRNA (f) was overexpressed in non-CSCs. Data are  
660 expressed as fold change to unsorted HT29 cells (Total) (mean  $\pm$  SEM). n=4, ANOVA, a: p<0.05 vs.  
661 Total, b: p<0.05 vs. non-CSC.  
662

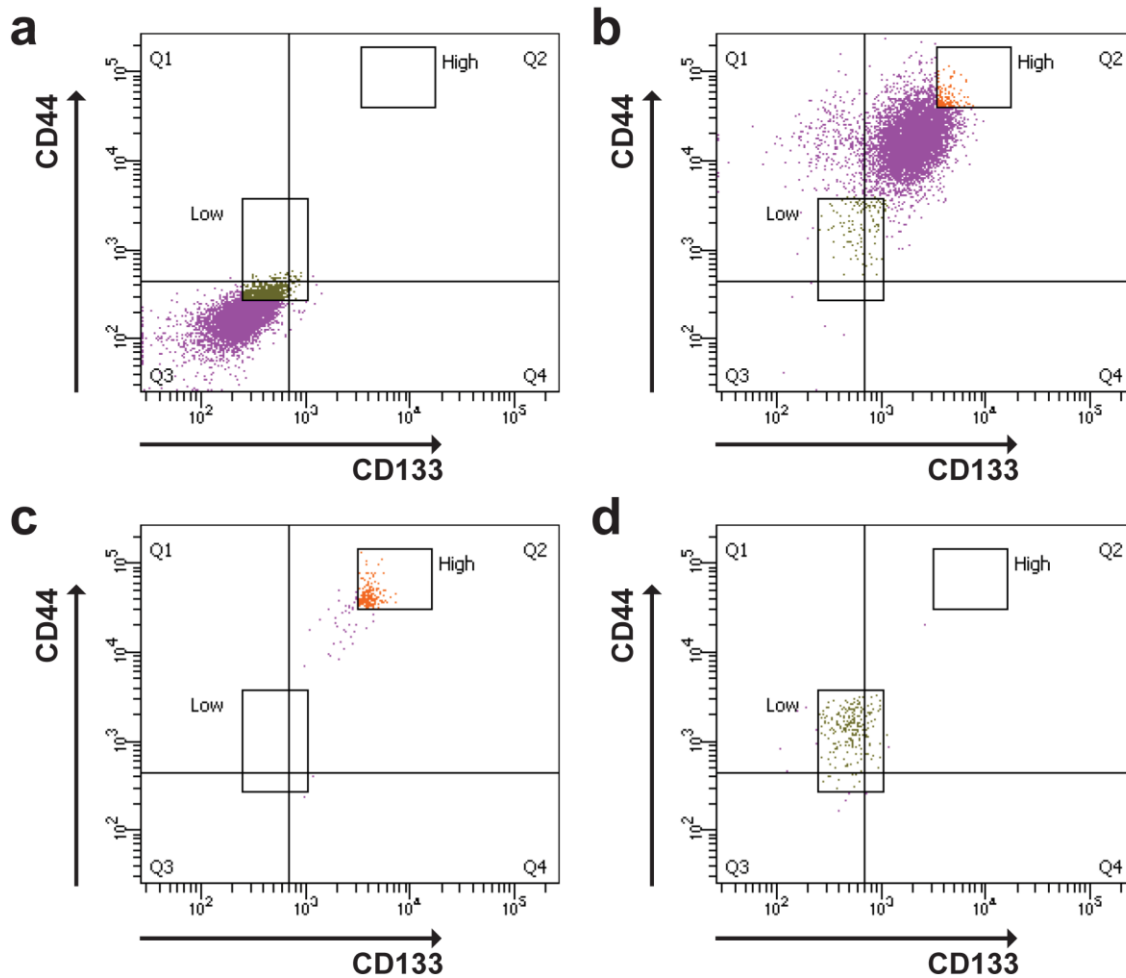


663  
664 **FIGURE 8: Tumor epithelial cell-derived IL1α/β activates pro-tumorigenic phenotype in EGCs.** a. RT-  
665 qPCR data demonstrating that addition of IL-1α or IL-1β strongly induced mPGES-1 gene expression in  
666 EGCs. n=3. b. RT-qPCR data showing that addition of an antagonist of IL-1R (**IL-1Ra**, 10 μM) to  
667 supernatants of human primary colon adenocarcinomas (**Tumor**) abolished the tumor-induced up-  
668 regulation of mPGES-1 expression in EGCs. **Healthy** represents supernatants of human healthy  
669 colonic mucosa. n=8; ANOVA, Holm-Sidak multiple comparison test, a: p<0.05 vs. Control, b: p<0.05  
670 vs. IL-1Ra, c: p<0.05 vs. Healthy, d: p<0.05 vs. Healthy+IL-1Ra, e: p<0.05 vs. Tumor+IL-1Ra. c. PGE2 EIA  
671 confirmed that addition of **IL-1Ra** blocked the increase in PGE2 release in EGCs activated by  
672 supernatants of human colon adenocarcinomas (**EGC/Tumor**). **EGC**, **Healthy**, **Tumor** and

673 **EGC/Healthy** represent EGC-CM, supernatant of healthy mucosa, supernatant of tumors, and CM of  
674 EGCs stimulated with supernatant of healthy mucosa, respectively.  $n \geq 4$ ; ANOVA, a:  $p < 0.05$  vs. EGC, b:  
675  $p < 0.05$  vs. EGC+IL-1Ra, c:  $p < 0.05$  vs. Healthy, d:  $p < 0.05$  vs. Tumor, e:  $p < 0.05$  vs. EGC/Healthy, f:  
676  $p < 0.05$  vs. EGC/Healthy+IL-1Ra, g:  $p < 0.05$  vs. EGC/Tumor+IL-1RA. **d.** Representative photographs (*left*  
677 *panel*) and quantification (*right panel*) to show that double IL-1 $\alpha$  and  $\beta$ -knock-down tumor epithelial  
678 cells (**TEC**) had lost their abilities to activate pro-tumorigenic phenotype in EGCs, while single IL-1 $\alpha$  or  
679  $\beta$ -knock-down TECs had impact similar to that of **Control** TECs.  $n=4$ , ANOVA. Scale Bar: 500 $\mu$ m.  
680

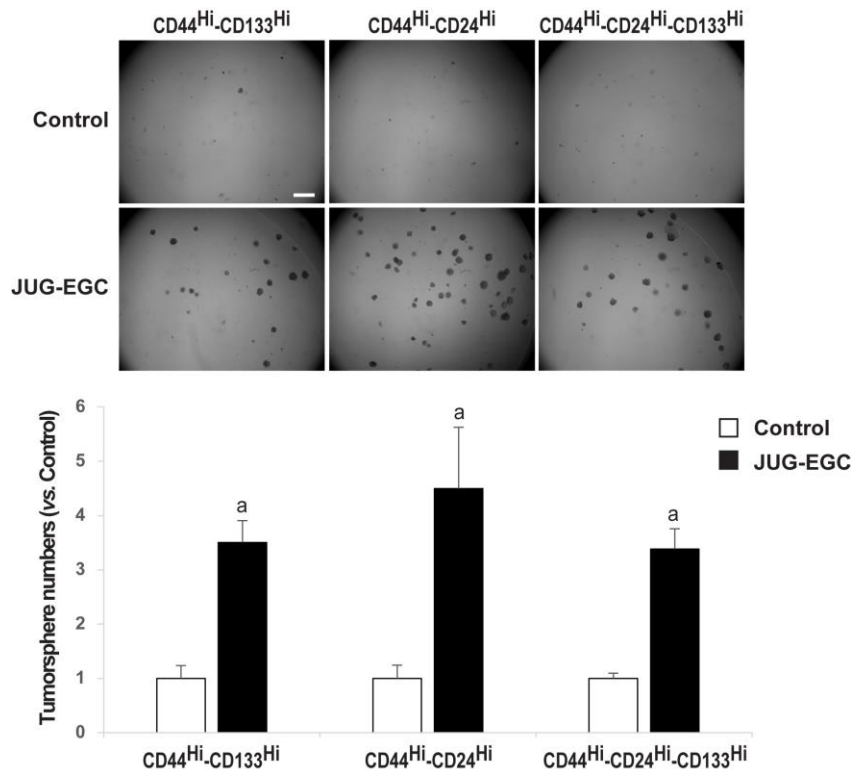


681  
 682 **FIGURE 9. Molecular crosstalk between EGCs and colon cancer (stem) cells.** The schematic  
 683 summarizes the molecular pathways involved in the pro-tumorigenic effects of tumor-activated EGCs  
 684 on colon CSC-driven tumorigenesis.



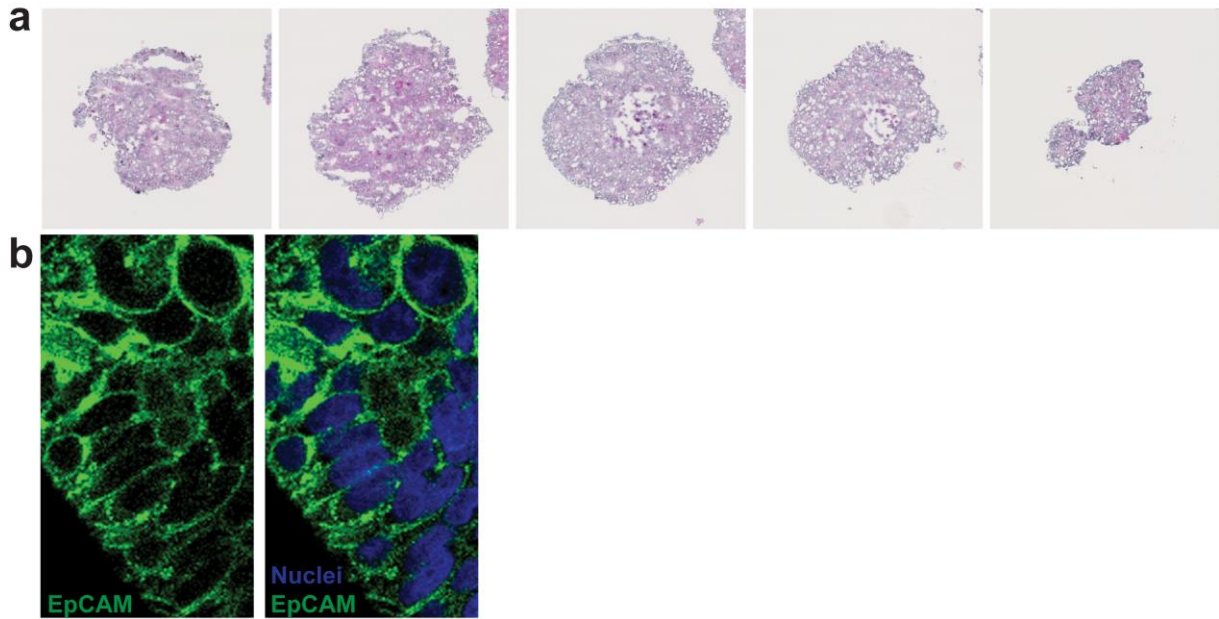
1  
 2 **Supplementary Figure 1: FACS-based isolation of CD44<sup>High</sup>-CD133<sup>High</sup> CSCs from HT29 cells. a-d.**  
 3 Representative dot-plots of CD44-PE vs. CD133-APC fluorescence intensities corresponding to  
 4 unstained HT29 cells (a), double stained HT29 cells (b), sorted CD44<sup>High</sup>-CD133<sup>High</sup> HT29 CSCs (c) and  
 5 sorted CD44<sup>Low</sup>-CD133<sup>Low</sup> HT29 cells (non-CSCs) (d) to illustrate the cell sorting strategy and show  
 6 representative post-sort purity.





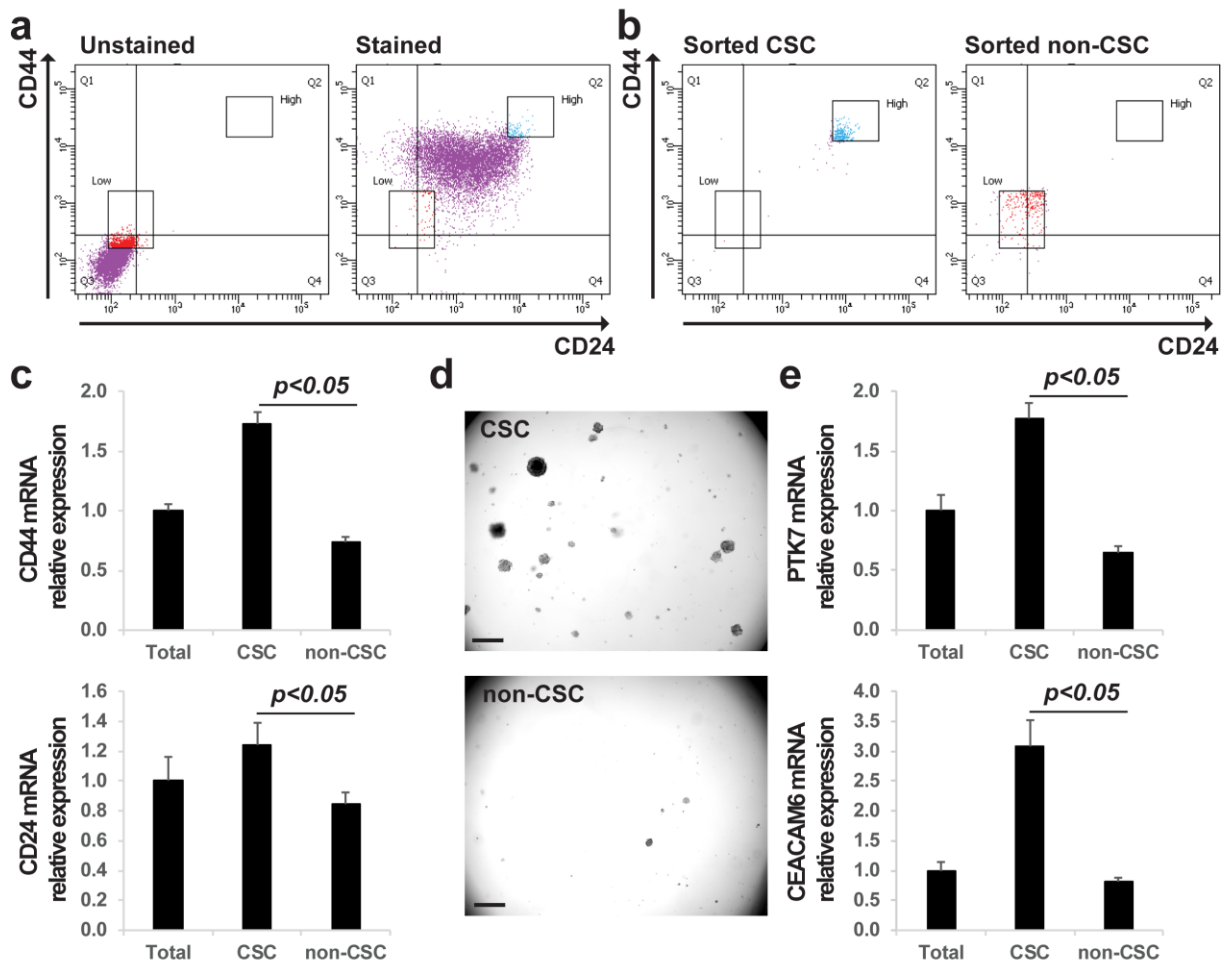
7

8 **Supplementary Figure 2: EGCs have similar impact on CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup>, CD44<sup>High</sup>-CD133<sup>High</sup> and**  
 9 **CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup>-CD133<sup>High</sup> CSCs FACS-isolated from HT29 cells *in vitro*.** Representative photographs  
 10 and bar graph to show that **JUG-EGCs** similarly stimulated the formation of tumorspheres from CSCs  
 11 that were FACS-isolated based on the levels of expression of 1) CD44 and CD133 (**CD44<sup>Hi</sup>-CD133<sup>Hi</sup>**), 2)  
 12 CD44 and CD24 (**CD44<sup>Hi</sup>-CD24<sup>Hi</sup>**) and 3) CD44, CD24 and CD133 (**CD44<sup>Hi</sup>-CD24<sup>Hi</sup>-CD133<sup>Hi</sup>**).  
 13 Quantification of tumorsphere numbers is expressed as fold change relative to Control (mean ± SEM).  
 14 n≥5; ANOVA, a: p<0.05 vs. respective Control. Scale Bar: 500µm.



15

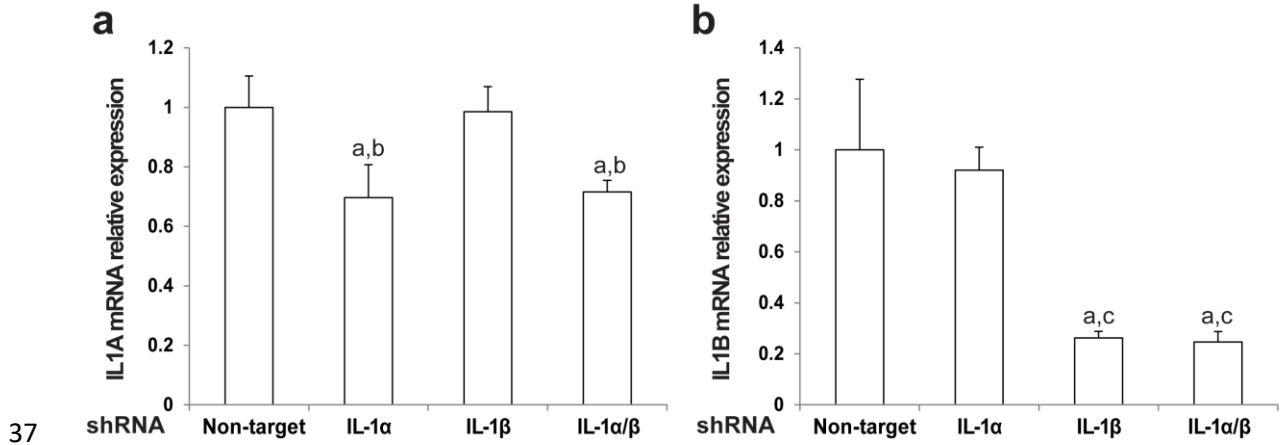
16 **Supplementary Figure 3: Primary cultures of tumor epithelial cells derived from human primary**  
17 **colon adenocarcinomas. a.** Representative photographs of H&E-stained serial sections (collected  
18 every 100 $\mu$ m) of floating spheres derived from dissociated human primary colon adenocarcinomas.  
19 **b.** Confocal imaging of a representative primary culture of tumor epithelial cells stained for the  
20 epithelial cell marker EpCAM (**green**) demonstrating that the floating spheres are exclusively  
21 composed of epithelial cells (Nuclei: DAPI, **blue**).



22

23 **Supplementary Figure 4: Characterization of FACS-isolated CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup> CSCs. a/b.**

24 Representative dot-plots of CD44-PE vs. CD24-BV421 fluorescence intensities corresponding to  
 25 **unstained** HT29 cells (**a**, left panel), double **stained** HT29 cells (**a**, right panel), **sorted** CD44<sup>High</sup>-  
 26 CD24<sup>High</sup> HT29 **CSCs** (**b**, left panel) and **sorted** CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup> HT29 cells (**non-CSCs**) (**b**, right panel)  
 27 to illustrate the cell sorting strategy and show representative post-sort purity. **c**. Real time qPCR data  
 28 to show that *CD44* and *CD24* gene expressions were consistent with the sorted populations (CD44<sup>High</sup>-  
 29 CD24<sup>High</sup> **CSCs** and CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup> **non-CSCs**). Results are expressed as fold change relative to  
 30 unsorted **total** HT29 cells (mean ± SEM). n=5; ANOVA. **d**. Representative photographs to demonstrate  
 31 that while CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup> **CSCs** (upper panel) were able to give rise to tumorspheres in 3D  
 32 Matrigel, CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup> **non-CSCs** (lower panel) had little (or no) ability to grow. Scale Bar: 500µm.  
 33 **d**. Real time qPCR data demonstrating that CD44<sup>High</sup>-CD24<sup>High</sup> **CSCs** are enriched in mRNAs coding for  
 34 the colon (cancer) stem cell markers PTK7 and CEACAM6/CD66c as compared to CD44<sup>Low</sup>-CD24<sup>Low</sup>  
 35 **non-CSCs**. Results are expressed as fold change relative to unsorted **total** HT29 cells (mean ± SEM).  
 36 n=3; ANOVA.



37  
 38 **Supplementary Figure 5: IL-1 $\alpha/\beta$  expression in IL-1 $\alpha/\beta$  knock down HT29 cells. a/b.** Real-Time qPCR  
 39 data showed that IL-1 $\alpha$  (a) and IL-1 $\beta$  (b) gene expressions were consistent with the different shRNA  
 40 lentiviral particles used to transduce HT29 cells. n=7; ANOVA, a: p<0.05 vs. Non-target control shRNA,  
 41 b: p<0.05 vs. IL-1 $\beta$  shRNA, c: p<0.05 vs. IL-1 $\alpha$  shRNA.

**ARTICLE 2 : ENTERIC GLIAL CELLS STIMULATE COLON CANCER STEM CELL CHEMORESISTANCE VIA AN  
ATM-DEPENDENT PATHWAY**

## Présentation de l'article 2

Les CSC sont considérées comme responsables des récurrences et des métastases des CCR car elles possèdent un potentiel de résistance accru aux molécules de chimiothérapie. Quelques études récentes suggèrent que la chimiorésistance des CSC est régulée par certaines composantes cellulaires du microenvironnement tumoral dont notamment les myofibroblastes et cellules endothéliales. Dans la première étude de ce travail de thèse, nous avons montré que les CGE stimulaient la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs *via* des voies impliquant des facteurs solubles, démontrant que les interactions bidirectionnelles paracrines entre les CGE et les cellules de la tumeur avaient un impact fonctionnel sur les processus de carcinogenèse colique. Dans ce contexte, l'objectif de cette deuxième étude était de déterminer si les CGE avaient un impact sur les capacités de chimiorésistance des CSC.

Dans un premier temps, nous avons montré *in vitro* que les CGE stimulaient la résistance des CSC coliques à deux agents de chimiothérapie des CCR, à savoir le 5-Fluorouracil (5-FU) et l'oxaliplatine, en utilisant un modèle de co-culture ne permettant que des échanges paracrines entre les CGE et les CSC. En effet, la présence de CGE augmentait la capacité des CSC à initier la formation de tumoresphères en présence de 5-FU. Des résultats préliminaires similaires ont été obtenus avec l'oxaliplatine. De plus, des travaux préliminaires *in vivo* suggèrent que l'injection concomitante de CGE avec les CSC stimule la formation de tumeurs dans des modèles de souris immunodéficientes traitées au 5-FU. L'utilisation de CSC isolées à partir de différentes lignées de cellules cancéreuses coliques déficientes ou non pour deux voies impliquées dans les processus de chimiorésistance, à savoir les voies p53 et des mismatch repair (MMR), a permis de mettre en évidence que les effets protecteurs des CGE étaient indépendants de ces deux voies.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une étude transcriptomique ciblant 48 gènes représentatifs des voies majeures impliquées dans la chimiorésistance. Parmi ces 48 gènes, un seul gène

était surexprimé dans les tumorosphères formées à partir de CSC traitées au 5-FU et cultivées en présence de CGE *versus* en absence de CGE. Ce gène code pour la protéine kinase *ataxia-telangiectasia* mutated (ATM) qui est une sérine/thréonine kinase activée lors de lésions double-brin de l'ADN et impliquée notamment dans la réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et la survie cellulaire. L'utilisation d'un inhibiteur sélectif de l'activité kinase d'ATM ou de CSC isolées d'une lignée de cellules épithéliales cancéreuses coliques déficientes pour ATM bloquait l'effet protecteur des CGE.

Ainsi l'ensemble de ces résultats montre que les CGE stimulent la chimiorésistance des CSC *via* une voie ATM-dépendante. Des études ultérieures auront pour but d'identifier le facteur glial responsable et les voies activées en aval d'ATM. D'une façon plus générale, ces travaux renforcent le concept que les CGE du microenvironnement tumoral sont un acteur clé de la carcinogenèse colique et que les mécanismes moléculaires impliqués représentent potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques dans les CCR.

Cet article est en cours de préparation et présente ici des résultats préliminaires.

**Enteric glial cells stimulate colon cancer stem cell chemoresistance *via* an ATM-dependent pathway**

*Simon Valès<sup>1</sup>, Gregory Bacola<sup>2</sup>, Kelsie A. Gardner<sup>2</sup>, Mélissa Touvron<sup>2</sup>, Lisa Oliver<sup>3,4</sup>, François Vallette<sup>3</sup>, Michel Neunlist<sup>1</sup>, Laurianne Van Landeghem<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> INSERM 1235, IMAD, Nantes University, Nantes, France

<sup>2</sup> Department of Molecular Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

<sup>3</sup> INSERM 1232, CRCINA, Nantes University, Nantes, France

<sup>4</sup> Nantes University Hospital, Nantes, France

**Running Title:** Enteric glia stimulate colon cancer stem cell chemoresistance

**Keywords:** Enteric glial cells, Colon Cancer Stem cells, Colorectal Cancer, Tumor Microenvironment, chemoresistance, 5-fluorouracil, ATM

**Financial Support:** This work was supported by grants from La Ligue Nationale contre le Cancer (PhD fellowship to S. Valès), the French National Cancer Institute (INCA\_7904 to L. Van Landeghem), NCSU CVM (Seed Funding to L. Van Landeghem) and UNC CGIBD (Pilot/Feasibility grant NIH P30 DK034987 to L. Van Landeghem).

**Corresponding Author:** Laurianne Van Landeghem, PhD

Current mailing address: NCSU, College of Veterinary Medicine, MBS Department  
1060 William Moore Drive, CB# 8401, Raleigh, NC 27607, USA  
+1 191 513 6801; lcvanlan@ncsu.edu

**COI disclosure statement:** All authors declare having no conflict of interest.



**ABSTRACT**

Colon cancer stem cells (CSC) have been recently shown to possess increased chemoresistance and are thus highly valuable therapeutic targets against colorectal cancer (CRC) relapse. Recent work from our group has shown that enteric glial cells (EGC) were potent inducers of CSC ability to initiate the formation of tumors *via* a PGE2/EP4/EGFR pathway. In this work, we explored whether EGC impact CSC chemoresistance. Using *in vivo* xenograft models in immunodeficient mice and *in vitro* 3D culture systems, we tested EGC paracrine effects on CSC resistance to 5-Fluorouracil (5-FU) and oxaliplatin. Our *in vitro* results show that EGC stimulated the formation and the growth of tumorspheres derived from CSC isolated from three different CRC cell lines harboring distinct p53 and MMR status in the presence of 5-FU and oxaliplatin. *In vivo* the concomitant injection of EGC and CSC promoted tumor growth in 5-FU-treated immunodeficient mice *versus* CSC injected alone. High throughput gene expression analysis showed that EGC increased Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) gene expression in 5-FU-treated tumorspheres. In addition, EGC had no effect on CSC chemoresistance in the presence of a selective inhibitor of ATM activity (KU-55933) as well as when CSC were isolated from an ATM-deficient CRC cell line. Altogether our data strongly suggest that EGC stimulate CSC chemoresistance *via* an ATM-dependent pathway.

## INTRODUCTION

Current views suggest that colonic tumors derive from a subpopulation of cancer cells able to self-renew and to give rise to all the different cell types of the tumor<sup>1,2</sup>. These cells, called cancer-initiating cells or cancer stem cells (CSC), possess increased tumorigenic and metastatic potentials<sup>3</sup> as well as increased chemoresistance<sup>4</sup>, which strongly suggests a pivotal role for CSC in drug resistance and relapse of colon cancers.

Compelling evidence have shown that CSC chemoresistance, along with other CSC specific abilities, is modulated by the tumor microenvironment composed of resident or recruited cells that surround the tumor and sustain its survival, growth and spread<sup>5</sup>. In fact, the impact of the tumor microenvironment on CSC chemoresistance has been shown in various cancers including breast cancer<sup>6</sup> and leukemia<sup>7,8</sup>. In colorectal cancer (CRC), different cellular components of the tumor microenvironment such as myofibroblasts and endothelial cells have recently been showed to increase CSC chemoresistance to the common CRC chemotherapeutic drugs oxaliplatin and 5-fluorouracil (5-FU) *via* BCLXL- or NANOGP8-dependent pathways, respectively<sup>9,10</sup>. However, despite these recent studies, there is still much to be done to fully grasp the extent of the impact of the tumor microenvironment on colon CSC chemoresistance. This is particularly true for one cell type of the microenvironment: the enteric glial cells (EGC).

EGC are the specific glial cell type that belongs to the intrinsic enteric nervous system. They form a vast network that extends in all layers of the intestinal wall<sup>11</sup>. Work from our group and others has demonstrated that EGC are key regulators of the intestinal epithelial cell functions in healthy intestine<sup>12,13</sup>. For instance, they promote barrier function and mucosal healing *via* the release of specific paracrine factors<sup>14,15</sup>. However, little is known about the crosstalk between EGC and colon CSC, and whether it affects CSC-associated carcinogenesis processes. In a previous work, we showed that EGC stimulate colon

CSC ability to initiate tumor formation *via* a PGE2/EP4/EGFR-dependent pathway. In the present study, we hypothesized that EGC impact CSC chemoresistance.

Colorectal cancer (CCR) chemotherapy is primarily based on the use of the antimetabolite 5-fluorouracil (5-FU), which is a pyrimidine analogue with cytotoxic effects induced by an inhibition of the thymidylate synthase and the misincorporation of fluoronucleotides into RNA and DNA<sup>16</sup>. 5-FU is commonly administered in conjunction with other chemotherapeutic drugs such as the platinum derivative oxaliplatin, which is a DNA crosslinking cytotoxic agent<sup>17</sup>. Despite tremendous advances in the development of novel CRC chemotherapies<sup>18</sup>, intrinsic and acquired resistance remains a major setback to the efficacy of the current therapeutic arsenal<sup>19,20</sup>. Resistance to chemotherapeutic agents has been shown to be associated with the CSC phenotype<sup>4,20,21</sup> and numerous molecular mechanisms such as increased drug efflux, detoxification and metabolism, decreased apoptosis or increased DNA repair<sup>22,23</sup>.

In this study, we use 3D co-culture systems of EGC and CSC isolated from four different CRC cell lines as well as *in vivo* xenograft models in immunodeficient mice to test our hypothesis that EGC increase CSC tumor-initiating abilities and promote tumor growth in the presence of 5-FU and oxaliplatin.

## RESULTS

### **EGC stimulate colon CSC tumor-initiating ability in the presence of 5-fluorouracil and oxaliplatin.**

To evaluate EGC impact on CSC resistance to 5-FU, CSC were FACS-isolated from three human colon adenocarcinoma cell lines (HT29, HCT116 and HCT15), 3D grown in Matrigel, and treated with 5-FU for eight days in the presence or absence of EGC seeded on Transwell filters. The three CRC cell lines have differing p53 and MMR (mismatch repair) status (deficient/proficient) (Supplementary Table 1) because they harbor different mutations in *TP53* and genes of the MMR (mismatch repair) system, which are two major pathways implicated in CRC chemoresistance. Working concentration of 5-FU was chosen so that it approximately induced a 50% decrease in the number of tumorspheres yielded from CSC grown alone (Supplementary Figure 1). Our data demonstrate that the presence of EGC dramatically decreased 5-FU anti-tumorigenic effects in all three CRC cell lines (Figure 1). These results indicate that EGC promoted CSC tumor-initiating ability in the presence of 5-FU, independently of p53 and MMR. Of note, the porosity of the Transwell filters only authorized the passage of molecules smaller than 0.4 $\mu$ m, indicating that EGC induced CSC chemoresistance *via* paracrine signaling. EGC also induced increased growth in 5-FU-treated tumorspheres derived from HCT116 and HCT15 CSC (Figure 1). In contrast, normal human colonic fibroblasts (CCD18-Co) did not significantly protect CSC against 5-FU effects (Figure 2). EGC impact on CSC chemoresistance was consequently evaluated *in vivo* in immunocompromised SCID Beige mice. CSC were FACS-isolated from luciferase-expressing HT29 cell line and injected alone or concomitantly with EGC in opposite flanks of mice treated with 5-FU. Our preliminary data strongly suggest that EGC increased tumor growth in the presence of 5-FU as indicated by increased bioluminescence intensity in CSC/EGC injected flanks *versus* flanks injected with CSC alone (Figure 3).

We next sought to assess whether EGC protective impact was cell cycle-dependent. To do this, we tested EGC effects on tumor-initiating ability of CSC grown in the presence of oxaliplatin. Indeed oxaliplatin is a cell cycle non-specific alkylating agent in contrast to 5-FU, which is an antimetabolite mostly active during

S-phase of the cell division. Our preliminary data indicate that EGC strongly promoted both CSC tumor-initiating ability and tumorsphere growth in the presence of oxaliplatin (Figure 4), suggesting that EGC effects on CSC resistance to chemotherapeutic agents are cell cycle-independent.

Altogether, these results demonstrate that EGC are a potent inducer of CSC tumor-initiating ability in the presence of 5-FU and oxaliplatin.

#### **EGC-derived paracrine factors stimulate tumorsphere growth in the presence of 5-FU.**

We next sought to assess whether tumorspheres grown in the presence of EGC had increased resistance to 5-FU treatment compared to tumorspheres grown alone. To do this, we first grew tumorspheres alone or in the presence of EGC for five days. At this time point, in our co-culture system, the numbers of tumorspheres yielded from CSC cultured alone or with EGC do not fluctuate anymore, and only growth (or not) of the tumorspheres is observed. At 5 days post-plating, we subsequently started treating the yielded tumorspheres with 5-FU for five additional days. Tumorsphere size changes were recorded between the first day of 5-FU treatment and five days later. Results showed that while the size of the tumorspheres grown alone only increased by 38% ( $\pm 8\%$ ), the tumorspheres cultured in the presence of EGC increased by 145% ( $\pm 22\%$ ) (Figure 5), demonstrating that EGC-derived paracrine factors counteract 5-FU effects to sustain tumorsphere growth.

Interestingly preliminary experiments indicated that tumorspheres grown with EGC prior 5-FU treatment and then alone during 5-FU treatment had a 64% increase in size during the 5-FU treatment period. However, tumorspheres grown first alone and then with EGC during 5-FU treatment did not show a significant increase in size (7%) (Figure 5). These preliminary results suggest that EGC may activate an intrinsic mechanism of drug resistance early during tumorsphere formation that prevents 5-FU anti-tumorigenic effects.

#### **Enhanced CSC chemoresistance induced by EGC involves ATM.**

We next aimed to identify the molecular mechanism involved in EGC-induced CSC chemoresistance. Using the Fluidigm BioMark HD PCR Array platform, we assessed the expression of 48 genes in CSC-derived tumorspheres treated with 5-FU and cultured alone or in the presence of EGC. Those 48 genes were representative of the main regulatory pathways related to chemoresistance, including ATP-dependent drug efflux, drug detoxification, DNA damage repair (DDR), cell cycle checkpoints, and cell death (Figure 6A and Supplementary Table 2). Data showed that among those 48 genes, only *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) was significantly up-regulated in 5-FU-treated tumorspheres grown with EGC vs. alone (Figure 6B-C). We next sought to test whether ATM inhibition could block EGC-induced CSC chemoresistance. First we used KU-55933, which is an inhibitor of ATM kinase activity. Our data showed that the addition of KU-55933 abolished EGC protective effects on CSC against 5-FU (Figure 6D). Then we tested EGC impact on chemoresistance of CSC derived from the human CRC SW1222 cell line, which is mutated in the *ATM* gene<sup>24-26</sup>. Results demonstrated that EGC failed to protect SW1222-derived CSC against 5-FU anti-tumorigenic effects (Figure 6E-F). Altogether, our data indicate that EGC induce CSC chemoresistance *via* an ATM-dependent pathway.

## DISCUSSION

In the last two decades, the use of anticancer drugs in monotherapy or in combined regimens has drastically improved the survival of CRC patients, especially those with advanced stages III and IV<sup>27</sup>. However, resistance to chemotherapy remains one of the primary cause of death of colorectal patients<sup>28</sup>. Thus a better understanding of the regulatory mechanisms governing CRC chemoresistance seems critical to improve systemic therapies. Here we identify EGC as inducers of chemoresistance in CSC and their derived tumorspheres. This is consistent with the increasing body of work in the field demonstrating that the cells of the tumor microenvironment also respond to chemotherapy to sustain tumor growth<sup>29-31</sup>.

One of the main findings of this work is that EGC not only stimulated tumor-initiating ability of CSC, but also promoted the growth of the tumorspheres in the presence of chemotherapy. This suggests that EGC may promote increased drug resistance when chemotherapy is used either as adjuvant treatment to prevent residual cells/CSC to initiate tumor regrowth and also as preoperative neoadjuvant treatment, which is used mostly in locally advanced colorectal tumors to reduce tumor size, facilitate resectability and decrease recurrence<sup>32</sup>. Furthermore our preliminary data suggest that EGC may activate resistance pathways early during tumor formation and prior to treatment, thus increasing intrinsic CSC chemoresistance potential. Indeed tumorspheres grown with EGC and then treated with 5-FU but grown alone still exhibited increased growth compared to tumorspheres grown alone prior and during treatment. It will be interesting in future studies to determine whether these protective effects last for a longer period of time, which would lead us to speculate that EGC induce pro-chemoresistance epigenetics changes in CSC.

Another major finding of this work was that EGC protective effects against chemotherapy in CSC are ATM-dependent as assessed by the use of an inhibitor of ATM kinase activity and CSC derived from the ATM-deficient SW1222 cell line. We identified that ATM is potentially involved using a high throughput screening system that allows for simultaneous relative quantification of expression of 48 genes. Out of all

the genes tested, only *ATM* mRNA showed significant enrichment in 5-FU-treated tumorspheres grown in the presence of EGC *versus* alone. The fact that *TP53*, *hMLH1* and *hMSH6* did not show any changes in gene expression is consistent with our data demonstrating that EGC similarly promoted chemoresistance in CSC derived from p53-proficient/MMR-deficient HCT116 line, p53-deficient/MMR-proficient HCT29 line and p53-deficient/MMR-deficient HCT15 line. Although it is well accepted that chemoresistance may arise from ATM signaling<sup>33</sup>, some specific studies have proposed that acquired resistance to oxaliplatin involves the suppression of the ATM pathway<sup>34</sup>. However, these latter studies used 2D cultured cancer epithelial cells in contrast to the present study that focuses on 3D grown CSC. Several molecular mechanisms have been linked to ATM-induced chemoresistance including p38 MAPK and NFκB activation<sup>35</sup> or phosphorylation of HMGA1/2 oncogenic proteins<sup>36</sup>. Future studies will investigate which molecular pathways are activated by EGC in CSC downstream ATM.

EGC pro-chemoresistance impact on CSC and their derived tumorspheres is mediated by paracrine signaling as demonstrated by the porosity of the Transwell filters used in our co-culture system. This is in line with a substantial amount of literature reporting EGC-derived soluble factors as potent regulators of epithelial cell functions in health and diseases<sup>15,37-43</sup>. However, we cannot rule out that EGC also affect CSC functions and associated carcinogenesis processes *via* direct cell-cell interactions as recently proposed in a healthy epithelium<sup>44</sup>.

Previous work (Vales et al, *in revision*) has demonstrated that at basal state healthy EGC do not release paracrine factors promoting CSC tumor-initiating abilities. However once activated by tumor cell-derived IL1, EGC secrete increased amounts of PGE2 that stimulates CSC tumor-initiating abilities *via* an EP4/EGFR-dependent pathway. Future studies will determine whether EGC need to be activated by tumor cell-derived paracrine ligands to impact CSC chemoresistance. Alternatively, EGC may also acquire pro-chemoresistance effects in response to chemotherapy. This is supported by recent studies reporting that chemotherapeutic agents induce a remodeling of the EGC network characterized by altered expression of



S-100 $\beta$  and GFAP expression<sup>45,46</sup>. One could speculate that chemotherapy-induced genotoxic stress activates a senescence-associated secretory phenotype (SASP)<sup>47</sup> in EGC leading to the release of pro-tumorigenic and especially pro-chemoresistance paracrine factors<sup>48-50</sup> such as IL-6. This hypothesis is especially relevant since IL-6 is the most prominent cytokine associated to the SASP<sup>51,52</sup>, activates CSC phenotype in colorectal tumors<sup>53</sup>, is a known EGC-derived factor<sup>54</sup>, and activates ATM<sup>55,56</sup>. Future studies test the hypothesis that chemotherapy induces SASP in EGC that, in response, secrete large amounts of IL-6 leading to increased drug resistance in CSC-derived tumors.

Altogether this study strengthens the emerging concept that local neural cells of the intrinsic nervous system are critical component of the tumor microenvironment<sup>57-59</sup>, and hence correspond to potential therapeutic targets to limit CRC chemoresistance and associated relapse and metastasis.

**METHODS**

**Cell culture.** EGC line was obtained as described in Van Landeghem et al<sup>14</sup>. Human colon adenocarcinoma HT29, HCT116, HCT15 and human colon fibroblast CCD18-Co cell lines were purchased from ATCC. SW1222 cell line was purchased from Sigma-Aldrich. EGC, HT29, HCT116, HCT15 and SW1222 cell lines were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Gibco). CCD18-Co cells were grown in MEM medium (Gibco) with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 1X non-essential amino acid (Gibco), 50U/ml penicillin, and 50µg/ml streptomycin.

**Reagents.** The selective inhibitor of ATM kinase activity KU-55933 was purchased from Sigma-Aldrich. Antibodies PE anti-human CD44 (clone BJ18) and BV 421 anti-human CD24 (clone ML5) antibodies were purchased from Biolegend.

**Fluorescence-activated cell sorting (FACS)-based isolation of CSC.** HT29, HCT116, HCT15 and SW1222 CSC were sorted on a Sony SH800 Cell Sorter based on the levels of expression of the cell surface markers CD44 and CD24(Yeung et al., 2010). Briefly, cells were trypsinized, resuspended in culture medium, and incubated for 30min on ice with CD44 antibody (1:40) and CD24 antibody (1:20). Sorted CSC corresponded to the highest 1-2% CD24/CD44 expressing cells, and sorted non-CSC corresponded to the lowest 1-2% CD24/CD44 expressing cells.

**Xenografts.** SCID Beige mice (8 week old) were purchased from Charles River and housed in specific pathogen-free conditions. Mice were anaesthetized by inhalation of an isoflurane/Oxygen mixture (2% isoflurane; 100% Oxygen) before injection of 200 CSC isolated from luciferase-expressing HT29 cells (Bioware HT29-luc-D6 PerkinElmer) alone or with EGC (ratio 1:1) in Matrigel diluted 1:1 in culture medium in opposite flanks subcutaneously. Animals were then intravenously treated with 5-FU 1 time/week at 100 mg/kg at days 5, 12, 19, 26 and 33. Bioluminescent imaging was performed after luciferin injection at day

40 after CSC injection. All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of North Carolina State University (protocol #16-052-B).

**CSC chemoresistance assay.** HT29-, HCT116-, HCT15- and SW1222-derived CSC were plated at a density of 400 cells per drop (50  $\mu$ L) of Growth Factor Reduced Matrigel Matrix (Corning) in 24-well plates in the presence or not of 5-FU (0.5-1  $\mu$ g/mL) or oxaliplatin (0.5  $\mu$ M) and cultured alone or in the presence of EGC or CCD18-Co cells. EGC or CCD18-Co cells were seeded onto porous filters at 45,000 cells per filter (24-well Transwell Clear, 0.4  $\mu$ m porosity; Corning) one day prior to testing. Medium supplemented or not with 5-FU was changed every day. Tumorsphere number was determined at day 7 post-plating, and tumorsphere size was assessed at days 4, 6 and 8 using a microscope Olympus IX83 (objective 20X) and ImageJ software.

To evaluate the impact of KU-55933, a selective inhibitor of ATM kinase activity, on tumorsphere number, HT29-derived CSC were pre-incubated for 30 min with KU-55933 (7.5  $\mu$ M) and then cultured with KU-55933 (7.5  $\mu$ M), in the presence or absence of EGC and treated or not with 5-FU.

**Tumorsphere growth assay.** HT29-derived CSC were 3D-cultured in Matrigel as described above for 5 days alone or in the presence of EGC without 5-FU treatment. Starting at day 5 post-plating, tumorspheres were treated with 5-FU (5  $\mu$ g/mL) for 5 consecutive days in the presence or absence of EGC. Tumorsphere size was assessed at days 5 and 11 post-plating.

**Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) Analysis.** HT29-derived CSC were 3D-cultured in Matrigel with or without 5-FU (1  $\mu$ g/mL) in the presence or absence of EGC. Total RNA was extracted using the RNAqueous-Micro kit (Ambion) following the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed using the High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Real-Time qPCR studies on 48 genes were performed using a 48.48 BioMark Dynamic Array chip run with the Fluidigm's BioMark HD system. The TaqMan probes (Applied Biosystems) used are presented in Supplementary Table 2.

**Statistical Analysis.** Data were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using SigmaPlot software v12.0. Non-parametric tests were used to compare different groups as indicated in the figure legends if Shapiro-Wilk Normality Test or Equal Variance Test failed. Differences were considered as significant for a p-value of less than 0.05.

## REFERENCES

## REFERENCES

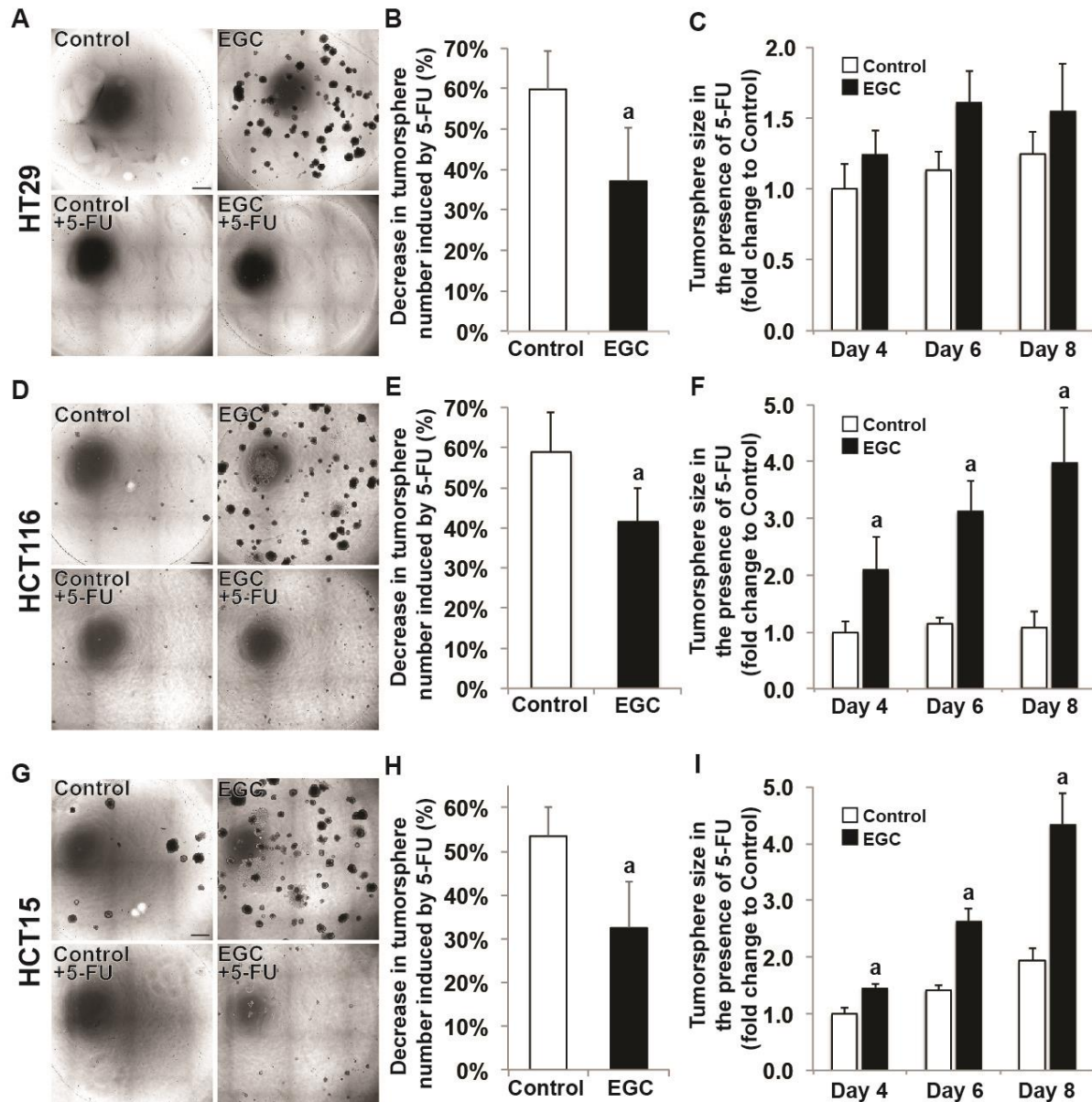
1. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–110 (2007).
2. Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111–115 (2007).
3. Gao, W. *et al.* Isolation and Phenotypic Characterization of Colorectal Cancer Stem Cells With Organ-Specific Metastatic Potential. *Gastroenterology* **145**, 636–646.e5 (2013).
4. Colak, S. *et al.* Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ* **21**, 1170–7 (2014).
5. Chen, S. & Huang, E. H. The Colon Cancer Stem Cell Microenvironment Holds Keys to Future Cancer Therapy. *J. Gastrointest. Surg.* **18**, 1040–1048 (2014).
6. Dittmer, J. & Leyh, B. The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* **31**, 3–15 (2015).
7. Bakker, E., Qattan, M., Mutti, L., Demonacos, C. & Krstic-Demonacos, M. The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1863**, 414–426 (2016).
8. Tabe, Y. & Konopleva, M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br. J. Haematol.* **164**, 767–778 (2014).
9. Colak, S. & Medema, J. P. Human colonic fibroblasts regulate stemness and chemotherapy resistance of colon cancer stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **0** (2014). doi:10.4161/15384101.2014.973321
10. Wang, R. *et al.* Endothelial cells activate the cancer stem cell-associated NANOGP8 pathway in colorectal cancer cells in a paracrine fashion. *Mol. Oncol.* **11**, 1023–1034 (2017).
11. Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P. & Pachnis, V. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* **63**, 229–241 (2015).
12. Neunlist, M. *et al.* The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 90–100 (2012).
13. Neunlist, M. *et al.* Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* **147**, 1230–1237 (2014).

14. Savidge, T. C. *et al.* Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344–1358 (2007).
15. Van Landeghem, L. *et al.* Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G976–G987 (2011).
16. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
17. Alcindor, T. & Beauger, N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol. Tor. Ont* **18**, 18–25 (2011).
18. Cassidy, S. & Syed, B. A. Colorectal cancer drugs market. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 525–526 (2017).
19. Paldino, E., Tesori, V., Casalbore, P., Gasbarrini, A. & Puglisi, M. A. Tumor initiating cells and chemoresistance: which is the best strategy to target colon cancer stem cells? *BioMed Res. Int.* **2014**, 859871 (2014).
20. Dallas, N. A. *et al.* Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* **69**, 1951–1957 (2009).
21. Medema, J. P. Targeting the Colorectal Cancer Stem Cell. *N. Engl. J. Med.* **377**, 888–890 (2017).
22. Kachalaki, S., Ebrahimi, M., Mohamed Khosroshahi, L., Mohammadinejad, S. & Baradaran, B. Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. *Eur. J. Pharm. Sci.* **89**, 20–30 (2016).
23. Pan, S.-T., Li, Z.-L., He, Z.-X., Qiu, J.-X. & Zhou, S.-F. Molecular mechanisms for tumor resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (2016). doi:10.1111/1440-1681.12581
24. Williams, J. R. *et al.* Tumor response to radiotherapy is dependent on genotype-associated mechanisms in vitro and in vivo. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* **5**, 71 (2010).
25. Williams, J. R., Zhang, Y., Russell, J., Koch, C. & Little, J. B. Human tumor cells segregate into radiosensitivity groups that associate with ATM and TP53 status. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **46**, 628–638 (2007).
26. Williams, J. R. *et al.* Genotype-dependent radiosensitivity: clonogenic survival, apoptosis and cell-cycle redistribution. *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 151–164 (2008).
27. Marin, J. J. G. *et al.* Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug Metab. Rev.* **44**, 148–172 (2012).
28. Hammond, W. A., Swaika, A. & Mody, K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8**, 57–84 (2016).
29. Huang, C.-Y. & Yu, L. C.-H. Pathophysiological mechanisms of death resistance in colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **21**, 11777–11792 (2015).

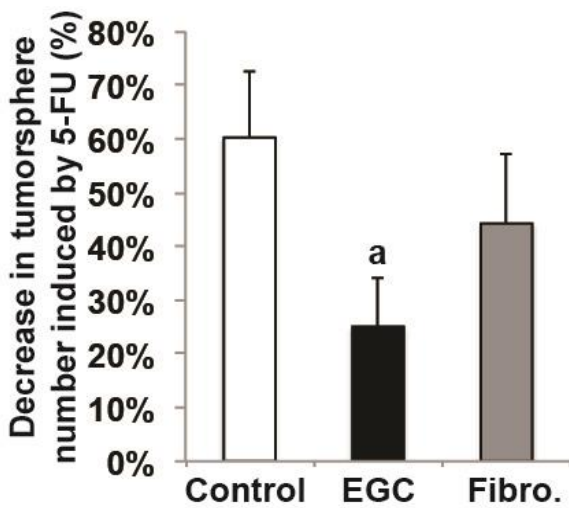
30. Lotti, F. *et al.* Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* **210**, 2851–2872 (2013).
31. Mukaida, N. & Sasaki, S. Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World J. Gastroenterol.* **22**, 5301–5316 (2016).
32. Zhou, Z., Nimeiri, H. S. & Benson, A. B. Preoperative chemotherapy for locally advanced resectable colon cancer - a new treatment paradigm in colon cancer? *Ann. Transl. Med.* **1**, (2013).
33. Cremona, C. A. & Behrens, A. ATM signalling and cancer. *Oncogene* **33**, 3351–3360 (2014).
34. Zhou, Y. *et al.* miR-203 induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells by negatively regulating ATM kinase. *Mol. Oncol.* **8**, 83–92 (2014).
35. Yang, Y. *et al.* A cytosolic ATM/NEMO/RIP1 complex recruits TAK1 to mediate the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/MAPK-activated protein 2 responses to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2774–2786 (2011).
36. Palmieri, D. *et al.* HMGA proteins promote ATM expression and enhance cancer cell resistance to genotoxic agents. *Oncogene* **30**, 3024–3035 (2011).
37. Coquenlorge, S. *et al.* The arachidonic acid metabolite 11 $\beta$ -ProstaglandinF2 $\alpha$  controls intestinal epithelial healing: deficiency in patients with Crohn's disease. *Sci. Rep.* **6**, 25203 (2016).
38. Pochard, C. *et al.* Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* **150**, 168–180 (2016).
39. Neunlist, M. *et al.* The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 90–100 (2013).
40. Van Landeghem, L. *et al.* Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* **10**, 507 (2009).
41. Bach-Ngohou, K. *et al.* Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J. Physiol.* **588**, 2533–2544 (2010).
42. Flamant, M. *et al.* Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* **60**, 473–484 (2011).
43. Xiao, W. *et al.* GDNF is involved in the barrier-inducing effect of enteric glial cells on intestinal epithelial cells under acute ischemia reperfusion stimulation. *Mol. Neurobiol.* **50**, 274–289 (2014).
44. Bohórquez, D. V. *et al.* An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One* **9**, e89881 (2014).
45. Robinson, A. M. *et al.* Effects of Oxaliplatin Treatment on the Enteric Glial Cells and Neurons in the Mouse Ileum. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **64**, 530–545 (2016).

46. Nogueira, L. T. *et al.* The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. *J. Neuroinflammation* **14**, 79 (2017).
47. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 99–118 (2010).
48. Gilbert, L. A. & Hemann, M. T. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* **143**, 355–366 (2010).
49. Bent, E. H., Gilbert, L. A. & Hemann, M. T. A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes Dev.* **30**, 1811–1821 (2016).
50. Georgilis, A. & Gil, J. Controlling secretion to limit chemoresistance. *Genes Dev.* **30**, 1791–1792 (2016).
51. Davalos, A. R., Coppe, J.-P., Campisi, J. & Desprez, P.-Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 273–283 (2010).
52. Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A. & Vernet, J.-P. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun. Signal. CCS* **15**, 17 (2017).
53. Carpentino, J. E. *et al.* Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res.* **69**, 8208–8215 (2009).
54. Rühl, A., Franzke, S., Collins, S. M. & Stremmel, W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G1163-1171 (2001).
55. Jiang, Y. N. *et al.* Interleukin 6 triggered ataxia-telangiectasia mutated activation facilitates lung cancer metastasis via MMP-3/MMP-13 up-regulation. *Oncotarget* **6**, 40719–40733 (2015).
56. Yan, H. Q. *et al.* Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation. *Cancer Sci.* **105**, 1220–1227 (2014).
57. Garcia, S. B., Stopper, H. & Kannen, V. The contribution of neuronal–glial–endothelial–epithelial interactions to colon carcinogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3191–3197 (2014).
58. Rademakers, G. *et al.* The role of enteric neurons in the development and progression of colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta* (2017). doi:10.1016/j.bbcan.2017.08.003
59. Vaes, N. *et al.* NDRG4, an early detection marker for colorectal cancer, is specifically expressed in enteric neurons. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* **29**, (2017).
60. Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R. & Bodmer, W. F. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 3722–3727 (2010).
61. Dalerba, P. *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10158–10163 (2007).

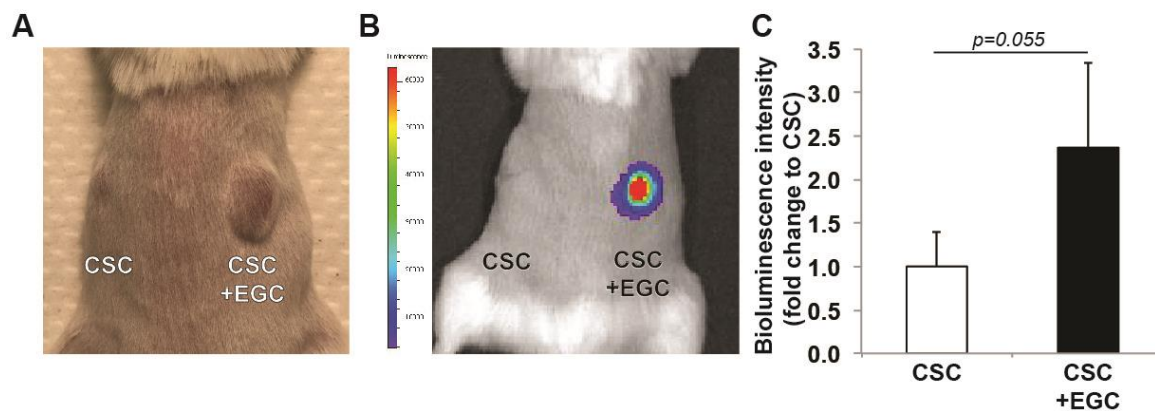




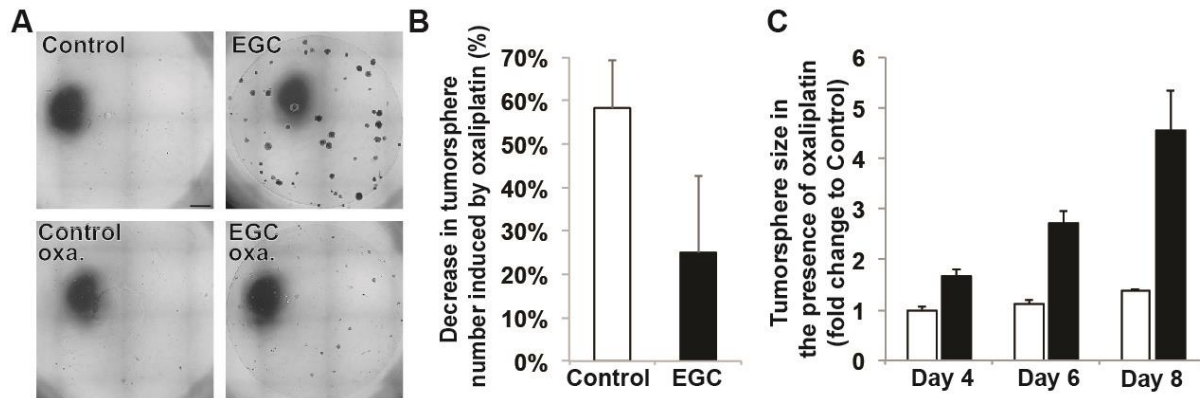
**FIGURE 1: EGC stimulate CSC tumor-initiating ability in the presence of 5-FU *in vitro*.** (A-C. CSC were isolated from the human HT29 cell line; D-F. CSC were isolated from the human HCT116 cell line; G-I. CSC were isolated from the human HCT15 cell line.) A, D, G. Representative photographs of CSC cultured for 9 days with (+5-FU) or without 5-FU (0.5-1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the presence (EGC) or absence (Control) of EGC. Scale Bar: 1mm. B, E, H. Quantification of the decrease in the number of CSC-derived tumorspheres induced by a 7 day 5-FU treatment. Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the percentage of decrease in tumorsphere numbers induced by 5-FU relative to the number of tumorspheres yielded without 5-FU. Mann and Whitney test,  $n \geq 4$ , a:  $p < 0.05$ . C, F, I. Quantification of the sizes of tumorspheres grown in the presence (EGC) or absence (Control) with 5-FU (0.5-1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the fold change relative to Control at day 4. Mann and Whitney test,  $n \geq 4$ , a:  $p < 0.05$ .



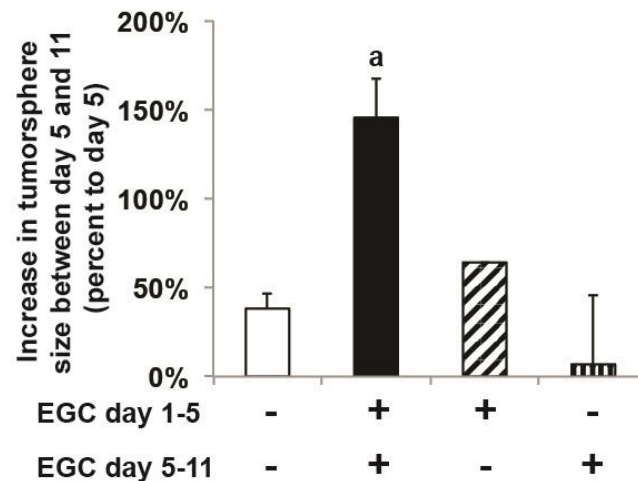
**FIGURE 2: Fibroblasts do not significantly impact CSC tumor-initiating ability in the presence of 5-FU.** Quantification of the decrease in the number of tumorspheres induced by a 7 day 5-FU treatment yielded from CSC grown alone (**control**), with EGC (**EGC**) or with CCD18Co fibroblasts (**Fibro.**). Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the percentage of decrease in tumorsphere numbers induced by 5-FU relative to the number of tumorspheres yielded without 5-FU. ANOVA,  $n=4$ , a:  $p<0.05$  vs. Control.



**FIGURE 3: EGC stimulate CSC-driven tumorigenesis in the presence of 5-FU *in vivo* (preliminary data).** **A-B.** Representative photograph (**A**) and bioluminescence imaging (**B**) at 6 weeks after the subcutaneous injection of CSC alone (**CSC**) and a mix of CSC + EGC (**CSC + EGC**) at a 1:1 ratio in opposite flanks of SCID Beige mice treated with 5-FU. **C.** Quantification of the intensity of the bioluminescence signal from tumors yielded from CSC injected alone (**CSC**) and concomitantly with EGC (**CSC + EGC**). Data are expressed as the mean ( $\pm$ SEM) of the fold change relative to control (**CSC**). Mann and Whitney test,  $n=9$ ,  $p=0.055$ .

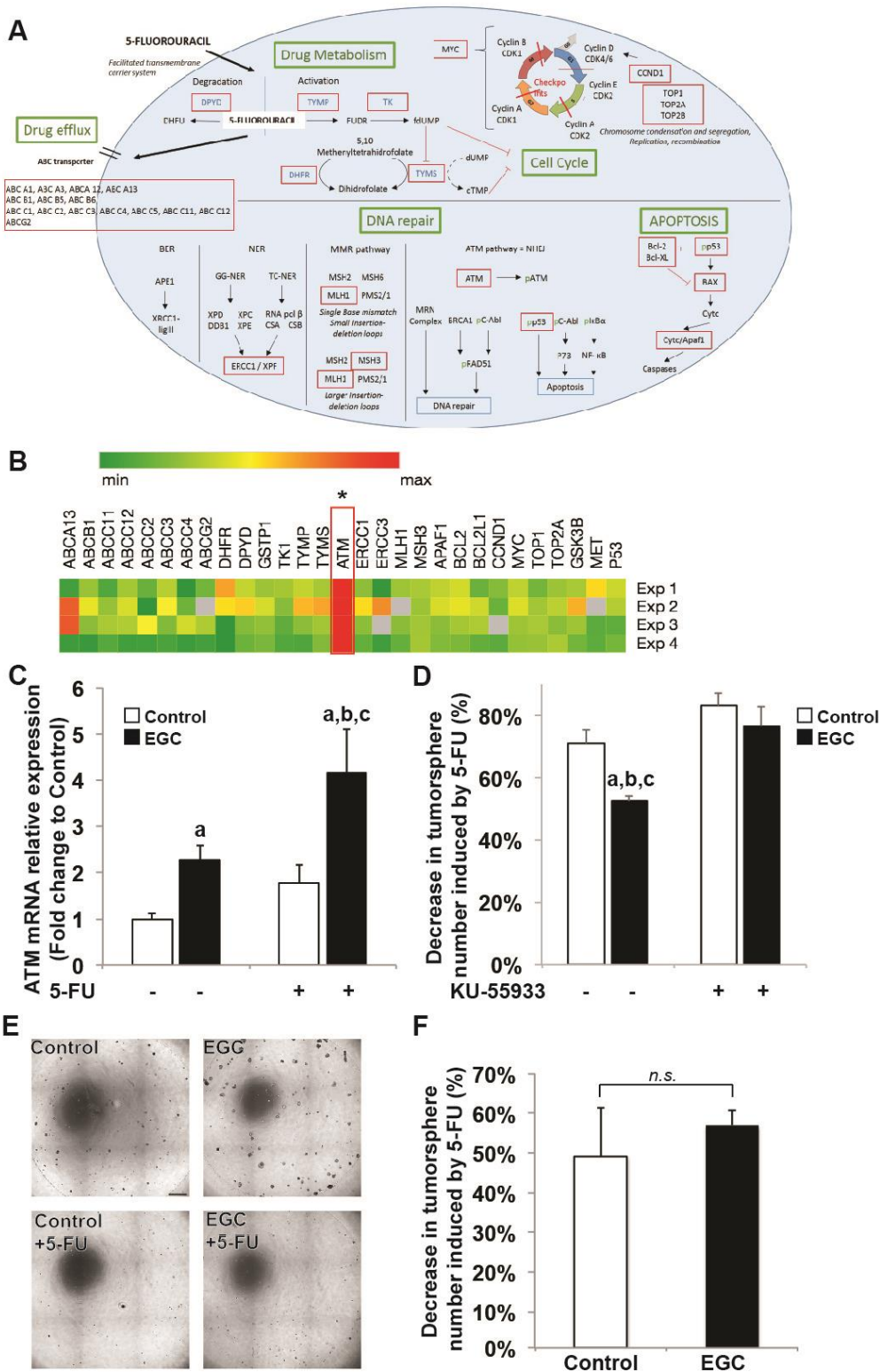


**FIGURE 4: EGC stimulate CSC tumor-initiating ability in the presence of oxaliplatin (preliminary data).** **A.** Representative photographs of CSC cultured for 9 days with (oxa) or without oxaliplatin (0.5  $\mu$ M) in the presence (EGC) or absence (Control) of EGC. Scale Bar: 1mm. **B.** Quantification of the decrease in the number of CSC-derived tumorspheres induced by a 7 day oxaliplatin treatment. Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the percentage of decrease in tumorsphere numbers induced by oxaliplatin relative to the number of tumorspheres yielded without oxaliplatin. n=3. **C.** Quantification of the sizes of tumorspheres grown in the presence (EGC) or absence (Control) with oxaliplatin (0.5  $\mu$ M). Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the fold change relative to Control at day 4. n=3.



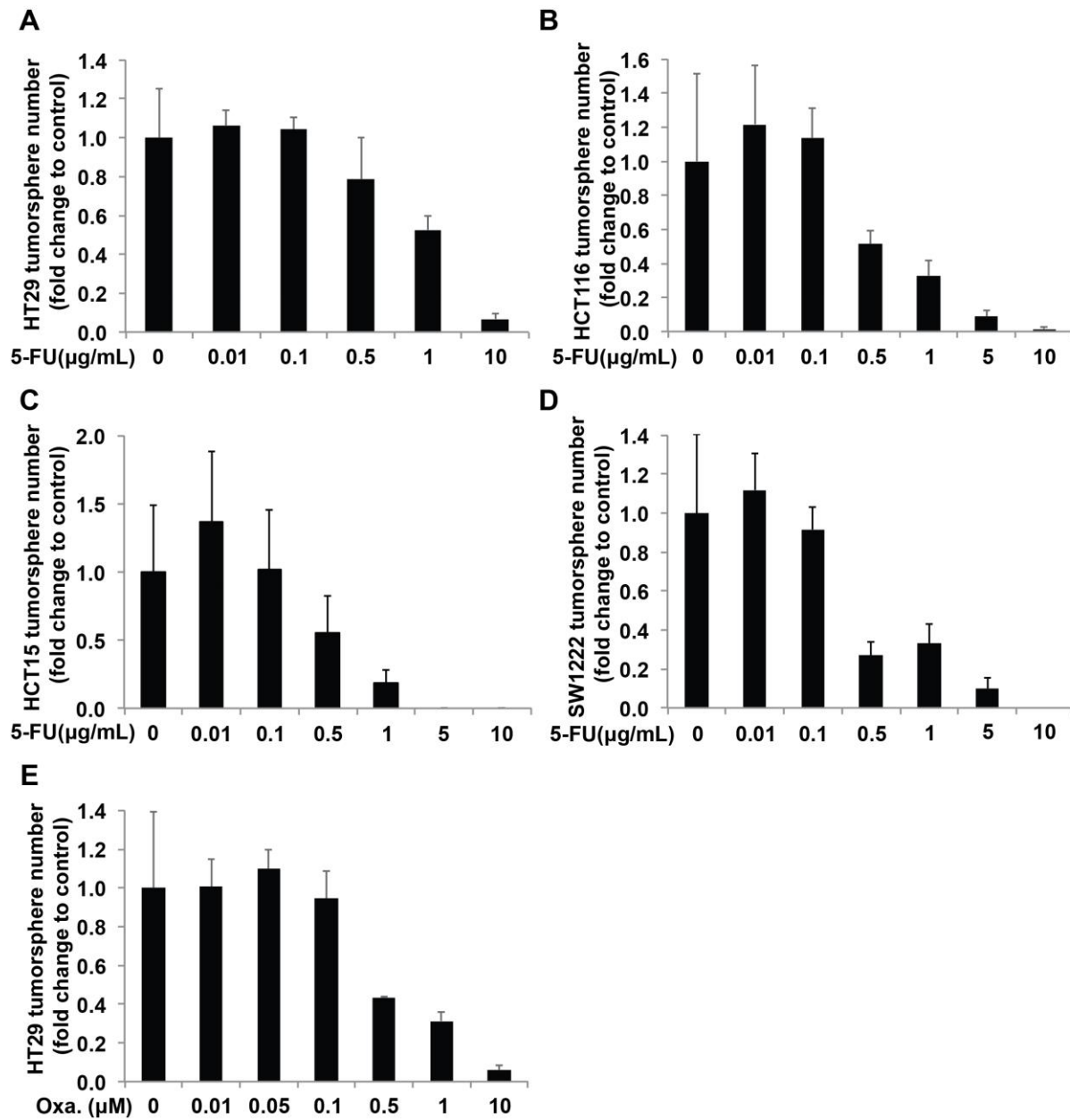
**FIGURE 5: EGC stimulate tumorsphere growth in the presence of 5-FU (preliminary data).** Quantification of the increase in size of tumorspheres first grown for 5 days in the presence or absence EGC ( $\pm$ EGC day 1-5), and then treated with 5-FU (5  $\mu$ g/mL) for 5 consecutive days in the presence or absence of EGC ( $\pm$ EGC day 5-11). Date expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the percentage of increase in tumorsphere size increase

between day 5 and day 11. (plain bars) Mann and Whitney,  $n=4$ ,  $a: p<0.05$  vs. Control. (patterned bars)  $n\leq 2$ .



**FIGURE 6: EGC-induced CSC chemoresistance involves ATM.** **A.** Schematic representing the genes whose relative expression was studied (circled in red) and representative of the main regulatory pathways related to chemoresistance. **B.** Heatmap showing fold change in gene expression in 5-FU-treated

tumorspheres after 4 days of culture in the presence of EGC *versus* in the absence of EGC in 4 independent experiments. **C.** RT-qPCR data showing that ATM mRNA was significantly increased in 5-FU-treated tumorspheres yielded from CSC in the presence of **EGC** *versus* in the absence of EGC (**Control**). Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the fold change relative to non-treated Controls. ANOVA, n=4, a:  $p < 0.05$  vs. Control-5-FU, b:  $p < 0.05$  vs. EGC-5-FU, c:  $p < 0.05$  vs Control+5-FU. **D.** Quantification of the decrease in the number of CSC-derived tumorspheres induced by 5-FU shows that the addition of a selective inhibitor of ATM kinase activity (KU-55933, 7.5  $\mu$ M) inhibits EGC protective effects. Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the percentage of decrease in tumorsphere numbers induced by 5-FU relative to the number of tumorspheres yielded without 5-FU. ANOVA, n=5, a:  $p < 0.05$  vs. Control, b:  $p < 0.05$  vs. Control +KU-55933, c:  $p < 0.05$  vs. +EGC +KU-55933. **E.** Representative photographs of CSC isolated from the human ATM-deficient SW1222 cell line grown for 9 days with (**+5-FU**) or without 5-FU (0.5  $\mu$ g/mL) in the presence (**EGC**) or absence (**Control**) of EGC. Scale Bar: 1mm. **F.** Quantification of the decrease induced by a 7 day 5-FU treatment in the number of tumorspheres yielded from ATM-deficient CSC. Data are expressed as the means ( $\pm$ SEM) of the percentage of decrease in tumorsphere numbers induced by 5-FU relative to the number of tumorspheres yielded without 5-FU. Mann and Whitney test, n.s.: non-significant ( $p \geq 0.05$ ).



**Supplementary Figure 1: Dose responses:** (A,E. CSC were isolated from the human HT29 cell line; B. CSC were isolated from the human HCT116 cell line; C. CSC were isolated from the human HCT15 cell line; D. CSC were isolated from the human SW1222 cell line). A-D. Quantification of the numbers of tumorspheres yielded from CSC grown for 7 days in the presence of 5-FU at different concentrations (0.01, 0.1, 0.5, 1, 10 µg/mL). Data are expressed as the means (±SEM) of the fold change relative to the number of tumorspheres yielded from CSC grown in the absence of 5-FU. E. Quantification of the numbers of tumorspheres yielded from CSC grown for 7 days in the presence of oxaliplatin (Oxa.) at different concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 µM). Data are expressed as the means (±SEM) of the fold change relative to the number of tumorspheres yielded from CSC grown in the absence of oxaliplatin.

<b>Cell line</b>	<b><i>TP53</i> status</b>	<b>MMR status</b>	<b><i>ATM</i> status</b>
<b>HT29</b>	<i>MT</i>	WT	WT
<b>HCT116</b>	WT	<i>hMLH1 MT</i>	WT
<b>HCT15</b>	<i>MT</i>	<i>hMSH6 MT</i>	WT
<b>SW1222</b>	<i>MT</i>	WT	<i>MT</i>

**Supplementary Table 1: *TP53*, MMR and *ATM* status in HT29, HCT116, HCT15 and SW1222 colon adenocarcinoma cell lines. (WT: Wild Type; *MT*: Mutated).**



Gene Name	Probe reference	Gene Name	Probe reference	Gene Name	Probe reference
18S	Hs99999901_s1	ABCC11	Hs01090768_m1	GSTP1	Hs00168310_m1
GAPDH	Hs99999905_m1	ABCC12	Hs00264354_m1	LGR5	Hs00969422_m1
HPRT1	Hs99999909_m1	ABCG2	Hs00184979_m1	MCL1	Hs01050896_m1
GUSB	Hs99999908_m1	APAF1	Hs00559441_m1	MET	Hs01565576_m1
ABCA1	Hs00194045_m1	ATM	Hs01112307_m1	MLH1	Hs00979923_m1
ABCA3	Hs00184543_m1	BAX	Hs00180269_m1	MSH3	Hs00989003_m1
ABCA12	Hs00292421_m1	BCL2	Hs00608023_m1	MYC	Hs00153408_m1
ABCA13	Hs01110200_m1	BCL2L1	Hs00236329_m1	P53	Hs01034249_m1
ABCB1	Hs00184491_m1	CCND1	Hs00765553_m1	PROM1	Hs01009257_m1
ABCB5	Hs00698751_m1	cdx1	Hs00156451_m1	PTK7	Hs00897151_m1
ABCB6	Hs00180568_m1	DHFR	Hs00758822_s1	TK1	Hs01062125_m1
ABCC1	Hs00219905_m1	DPYD	Hs00559279_m1	TOP1	Hs00243257_m1
ABCC2	Hs00166123_m1	ERCC1	Hs01012158_m1	TOP2A	Hs01032137_m1
ABCC3	Hs00358656_m1	ERCC3	Hs00164475_m1	TOP2B	Hs00172259_m1
ABCC4	Hs00195260_m1	GSK3A	Hs00997938_m1	TYMP	Hs00157317_m1
ABCC5	Hs00981089_m1	GSK3B	Hs01047719_m1	TYMS	Hs00426586_m1

**Supplementary Table 2: List of gene names and Taqman probe references used in the *Fluidigm's Dynamic Array* chip.**

## DISCUSSION

Ces travaux de thèse représentent les premières études explorant le rôle des cellules gliales entériques (CGE) du microenvironnement tumoral dans la régulation des propriétés des cellules souches cancéreuses (CSC) coliques et des mécanismes de carcinogenèse associés. Les deux études présentées dans cette thèse, par des approches *in vitro* et *in vivo*, ont montré l'existence d'interactions bidirectionnelles entre les CGE et les CSC ayant un impact majeur sur l'initiation tumorale et la chimiorésistance. Ainsi, d'une part, nous avons mis en évidence que les CGE du microenvironnement tumoral stimulent la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs. De façon importante, nos données démontrent que les CGE ne libèrent pas de substance pro-tumorigénique à l'état basal mais seulement en réponse à l'IL-1 sécrétée par les cellules cancéreuses, mettant en évidence le nouveau concept que les CGE sont activées ou remodelées par la tumeur dans le but de stimuler les CSC et favoriser les processus de tumorigenèse. D'autre part, nous avons montré que les CGE stimulent les capacités de chimiorésistance des CSC et plus largement des tumeurs coliques. Remis dans le contexte des connaissances actuelles sur l'implication du microenvironnement tumoral dans les processus de carcinogenèse colique, nos résultats identifient les CGE comme une composante déterminante du microenvironnement tumoral ciblant et stimulant les fonctions « souches cancéreuses » dont notamment l'initiation et la chimiorésistance au sein des CCR.

### **Des communications privilégiées entre les CGE et les CSC ?**

Un nombre croissant d'études s'intéressent à l'impact des composantes cellulaires du microenvironnement tumoral sur les fonctions des CSC. Dans notre étude, nous avons montré que les CGE stimulaient à la fois les capacités des CSC à initier la formation de tumeur et à résister aux molécules de chimiothérapie. Afin de déterminer si ces effets étaient spécifiques des CGE, nous avons étudié en

parallèle l'impact d'un autre acteur du microenvironnement tumoral, les fibroblastes. Nos résultats *in vitro* montrent que les fibroblastes stimulent à échelle significativement moindre la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs en présence ou non d'agents de chimiothérapie. De plus, nos données démontrent que le mécanisme moléculaire entraînant l'acquisition d'un phénotype pro-tumorigénique par les CGE en réponse à l'IL-1 sécrétée par la tumeur, n'est pas activé dans les fibroblastes. En effet, nous avons montré que le surnageant de tissu cancéreux augmentait l'expression de la mPGES-1 et la sécrétion de PGE2 par les CGE. Ainsi, un tel effet du surnageant de tissu cancéreux n'a pas été observé dans les fibroblastes, suggérant que l'activation de la voie mPGES-1/PGE2 par l'IL-1 issue de la tumeur pourrait être « plus spécifique des CGE ». Cependant nos résultats ne permettent pas de conclure que l'expression de PGE2 n'est pas activée par l'IL-1 dans d'autres types cellulaires du microenvironnement des CCR. En effet, l'activation de la production de la PGE2 par l'IL-1 a été montrée dans les cellules épithéliales ou mésenchymateuses dans d'autres cancers (Li et al., 2012; Schrey and Patel, 1995). Une étude plus complète des niveaux de sécrétion de PGE2 en réponse à l'IL-1 par les différentes composantes du microenvironnement cellulaire du CCR serait en ce sens intéressant et permettrait également de valider l'hypothèse selon laquelle les CGE pourraient être une source majeure de PGE2 au sein du microenvironnement tumoral. D'autre part, l'utilisation d'antagonistes sélectifs montre que parmi les deux récepteurs à la PGE2 exprimés par les CSC dans notre système, seul l'EP4 médie les effets pro-tumorigéniques de la PGE2 gliale. De plus, nous avons observé un enrichissement de l'EP4 et un appauvrissement de l'EP1 dans les CSC comparées à une population « plus différenciée ». Ainsi il semble que la PGE2 gliale cible les CSC *via* des voies EP4-spécifiques. Il serait intéressant de déterminer les conséquences fonctionnelles de l'activation de EP1 par la PGE2 gliale sur les fonctions des cellules cancéreuses « plus différenciées ».

Plusieurs travaux ont montré que certains éléments du microenvironnement tumoral tels que les myofibroblastes, les cellules endothéliales, les lymphocytes T Foxp3<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> ou encore des cellules

dérivées du tissu adipeux stimulent l'acquisition de propriétés « souches cancéreuses » par des cellules tumorales « plus différenciées » (Lu et al., 2013; Vermeulen et al., 2010; Wei et al., 2015; Yang et al., 2017). Il serait extrêmement intéressant de savoir si les CGE induisent la réacquisition d'un « phénotype souche cancéreux » par les cellules tumorales plus différenciées.

Les deux études de cette thèse se sont principalement basées sur des techniques de co-culture *in vitro* ou sur l'emploi de milieux conditionnés permettant d'étudier les communications cellulaires de type paracrine. Le choix d'utiliser ces techniques a été basé sur de nombreuses études montrant que les CGE communiquent avec les cellules de l'épithélium intestinal par libération de facteurs solubles spécifiques (Neunlist et al., 2013). Cependant, les processus d'invasion des couches de la paroi colique par le CCR augmentent vraisemblablement la possibilité de contacts cellule/cellule directs entre les CGE et les cellules cancéreuses. Ainsi, il serait également pertinent d'étudier les interactions cellule-cellule CGE/CSC et leurs conséquences sur les processus de carcinogenèse colique.

### **L'activation d'un phénotype pro-tumorigénique dans les CGE. Phénomène précoce et/ou persistant ?**

Nos données montrent que l'activation des propriétés pro-tumorigéniques des CGE est induite par l'IL-1 issue des cellules épithéliales tumorales. Outre la présence de l'IL-1 au sein du microenvironnement tumoral, cette cytokine pro-inflammatoire est également produite par les cellules épithéliales et les cellules du stroma dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), qui sont un facteur de risque important du CCR (Pescic and Greten, 2016; Voronov and Apte, 2015). Il serait intéressant de savoir si l'« activation » des CGE en réponse à l'IL-1 dans le CCR a également lieu dans les MICI. Des études récentes ont d'ores et déjà montré que les CGE issues de patients atteints de la maladie de Crohn avaient une expression réduite de 15-HETE, 18-HEPE, 15dPGJ2 et de 11 $\beta$ PGF2 $\alpha$  (Coquenlorge et al., 2016; Pochard et al., 2016), indiquant une altération des voies de synthèse des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique. Au-delà des CCR associés à l'inflammation, la transformation des adénomes coliques en

adénocarcinomes est également associée à un microenvironnement inflammatoire mettant en jeu l'IL-1 (Choi et al., 2013). De plus, certaines études ont décrit des altérations du réseau glial dans les adénomes coliques (Liu et al., 2013), suggérant que le remodelage des CGE intervient à des stades précoces de la maladie. Ainsi, nos travaux associés aux données de la littérature sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'« activation » des CGE pourrait être un phénomène précoce dans la carcinogenèse colique, participant à l'initiation du CCR. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour valider cette hypothèse. Il serait notamment intéressant de regarder l'impact du surnageant de muqueuse de MICI, de lésions dysplasiques de bas grade ou de haut grade sur la sécrétion de PGE2 gliale.

Une autre question pertinente soulevée par nos données est : est-ce que l'« activation » des CGE est un processus réversible ou persistant ? Ainsi, il a été montré que les fibroblastes activés par la tumeur, appelés cancer-associated fibroblasts (CAF), conservaient des effets pro-tumorigéniques même après de longues périodes en dehors du contexte tumoral (Orimo et al., 2005). De plus, la surexpression dans les CCR des enzymes impliquées dans le voie de synthèse de la PGE2, telles que COX-2, peut être liée à des modifications épigénétiques telles qu'une hypométhylation du gène (de Melo et al., 2014). La PGE2 peut également avoir un impact sur la méthylation, notamment *via* la régulation de l'expression des DNA methyltransferases DNMT1 et DNMT3B dans les cellules cancéreuses (Xia et al., 2012). Il serait intéressant de voir si la surexpression de PGE2 gliale induite par la tumeur pourrait avoir un effet autocrine sur les CGE qui impacterait l'état de méthylation du gène codant pour COX-2 et augmenterait de façon stable la libération de PGE2 gliale. Ainsi, la pérennité de l'état « activé » des CGE pourrait favoriser la récurrence des cancers après traitement en contribuant à la formation d'un microenvironnement favorable à l'initiation tumorale.

### Les CGE, un acteur majeur dans la chimiorésistance des CSC ?

Dans la deuxième étude de cette thèse, nous avons montré que les CGE stimulent les capacités de chimiorésistance des CSC. En effet, nos données montrent *in vivo* et *in vitro* que les CGE stimulent la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs et de tumorsphères en présence de molécules de chimiothérapie. Il semble que les CGE protègent de façon similaire les CSC contre les effets du 5-FU et de l'oxaliplatine, qui sont deux agents fréquemment utilisés dans le traitement contre le CCR et ayant des modes d'action distincts. Ainsi le 5-FU cible en particulier les cellules en phase S du cycle cellulaire tandis que les effets de l'oxaliplatine ne sont pas dépendants du cycle cellulaire. Nos données suggèrent donc que les effets protecteurs des CGE n'impliquent pas de mécanismes liés au cycle cellulaire. L'utilisation de CSC isolées à partir de lignées cellulaires présentant des statuts différents pour p53 et la voie de réparation de l'ADN des mismatch repair (MMR) a permis de démontrer que l'effet des CGE sur la chimiorésistance des CSC était indépendant de l'activité de ces voies. D'autre part, nos résultats ont montré que l'effet des CGE sur les CSC était médié par la protéine kinase ATM. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif d'ATM ou de CSC isolées d'une lignée déficiente pour ATM abrogeait l'effet protecteur des CGE. ATM est activé en réponse à des cassures double-brin de l'ADN, et régule des voies intervenant dans la réparation de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire, ou encore dans la survie (Stracker et al., 2013). Il serait intéressant de déterminer les voies activées ou inhibées par ATM favorisant la chimiorésistance des CSC. Notre étude portant sur le cancer du côlon, nous nous sommes intéressés ici aux phénomènes de chimiorésistance. Néanmoins, dans le cas du cancer du rectum, la radiothérapie est également utilisée comme traitement. Certaines études ont montré que la radiorésistance pouvait être liée à l'activation d'ATM (Li et al., 2017; Tao et al., 2016). Il serait donc intéressant de voir si les CGE stimulent la radiorésistance des CSC des cancers rectaux par des voies ATM-dépendantes.

La prochaine étape de cette étude est de déterminer le facteur glial responsable de la stimulation de la chimiorésistance des CSC. Plusieurs facteurs candidats pourraient être testés dont notamment l'IL-6 et

le TGF- $\beta$ . En effet, tous les deux sont des facteurs gliaux connus (Neunlist et al., 2006; Rühl et al., 2001). De plus, de nombreuses études ont montré que ces deux molécules stimulent la chimiorésistance des cellules cancéreuses coliques, et ont la capacité d'activer ATM (Centurione and Aiello, 2016; Jiang et al., 2015; Yan et al., 2014b).

La chimiothérapie peut être utilisée selon deux stratégies thérapeutiques distinctes. En adjuvant, la chimiothérapie limite les risques de récurrence potentielle dus à la présence de cellules cancéreuses résiduelles après résection chirurgicale de la tumeur. En néoadjuvant, la chimiothérapie est utilisée pour diminuer la taille de la tumeur afin de la rendre opérable. Les résultats obtenus dans notre étude montrent que, en présence de molécules de chimiothérapie, non seulement les CGE stimulent la capacité d'une CSC isolée à former une tumorosphère, mais elles stimulent également la croissance des tumorosphères. Ces résultats suggèrent que les CGE pourraient stimuler la chimiorésistance dans le cadre d'un traitement adjuvant et néoadjuvant. De plus, nos données préliminaires suggèrent que la co-culture de tumorosphères en présence de CGE avant le traitement au 5-FU permet d'induire une augmentation de la croissance des tumorosphères pendant le traitement, et ce malgré l'absence des CGE. Ces données préliminaires suggèrent que les CGE activent un mécanisme de chimiorésistance intrinsèque dans les tumorosphères qui précède le traitement. Cette hypothèse pourrait être confortée en étudiant les modifications épigénétiques potentielles des CSC provoquées par les CGE, en particulier pour le gène codant pour ATM.

Il semble également important de déterminer si les effets des CGE sur la chimiorésistance des CSC sont la conséquence de l'« activation » des CGE par l'IL-1 issue de la tumeur, comme c'est le cas pour l'acquisition de propriétés pro-tumorigéniques mise en évidence dans notre première étude. Par ailleurs, quelques travaux suggèrent que certaines composantes du microenvironnement pourraient stimuler la chimiorésistance des CSC en réponse aux traitements de chimiothérapie. Ainsi, les CAF traités avec une

combinaison de 5-FU, d'oxaliplatine et de leucovorin, stimulent la prolifération et les capacités d'invasion des CSC *via* la sécrétion l'IL-17 par rapport aux CAF non-traités (Lotti et al., 2013). De plus, une étude a montré que l'irinotécan provoquait une augmentation de l'expression des marqueurs gliaux GFAP et S-100 $\beta$ , suggérant une altération des CGE (Nogueira et al., 2017). Il semble donc pertinent d'étudier l'impact des molécules de chimiothérapie sur le phénotype des CGE et de déterminer si les effets protecteurs des CGE sur la chimiorésistance des CSC sont induits par les molécules de chimiothérapie.

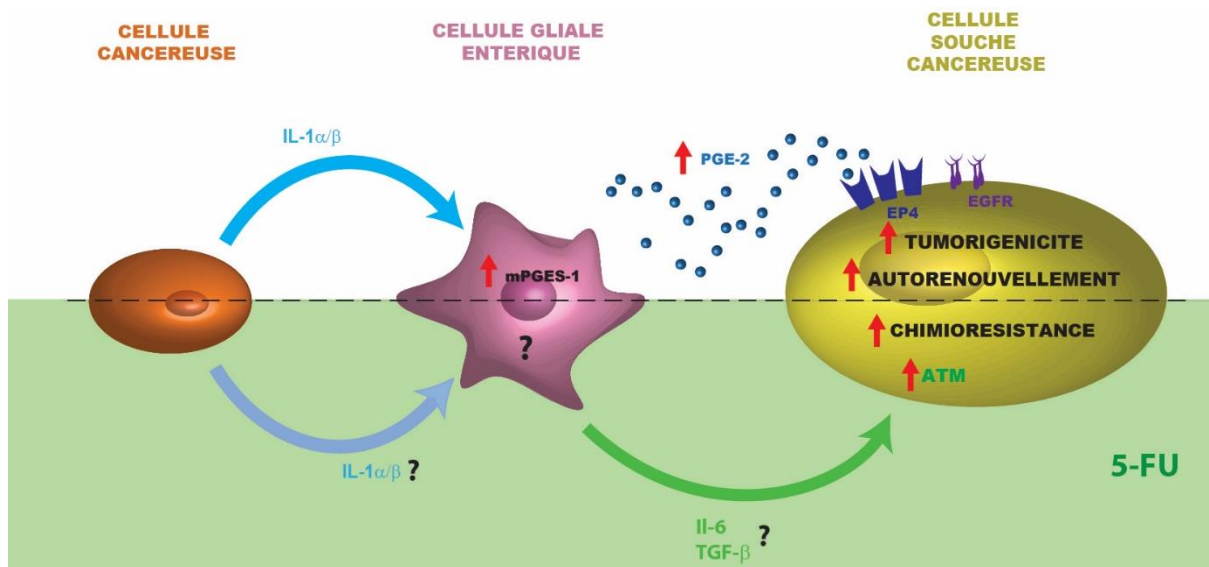


## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse récapitulés dans la figure 20 caractérisent pour la première fois le rôle fonctionnel des CGE dans l'initiation tumorale et la chimiorésistance des CCR. Les deux études présentées s'inscrivent dans la lignée de travaux récents étudiant le rôle du SNE dans diverses maladies digestives et extra-digestives telles que les MICI, la maladie de Hirschsprung ou encore la maladie de Parkinson. Nos travaux démontrent que les CGE sont une composante du microenvironnement tumoral contrôlant les processus de carcinogenèse. Plus précisément, ces travaux mettent en évidence que les interactions bidirectionnelles entre les cellules épithéliales cancéreuses coliques et les CGE sont impliquées dans la régulation des mécanismes d'initiation tumorale et de chimiorésistance médiés par les CSC. En effet, nous avons mis en évidence un remodelage ou une « activation » des CGE par la tumeur *via* des voies IL-1-dépendantes. En réponse à cette « activation » par la tumeur, les CGE acquièrent des propriétés pro-tumorigéniques et stimulent la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs *via* une voie mPGES-1/PGE2/EP4/EGFR-dépendante. Ainsi cette étude renforce le concept que les CGE sont des producteurs majeurs de dérivés des AGPI dont la dérégulation des voies de synthèse dans les CGE participe à la physiopathologie des maladies gastrointestinales. La deuxième étude de cette thèse démontre que les CGE stimulent également les capacités de chimiorésistance des CSC. Si les mécanismes cellulaires et moléculaires dont notamment le(s) facteur(s) paracrine(s) glial (gliaux) responsable(s) restent à mieux caractériser, notre étude a néanmoins identifié que la stimulation des capacités de chimiorésistance des CSC passait par l'activation d'ATM, une kinase notamment impliquée dans la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN.

D'une façon plus générale, ce travail de thèse apporte de nouveaux arguments renforçant le concept que les CGE participent aux mécanismes physiopathologiques de différentes maladies digestives, dont notamment le CCR. Plus spécifiquement, nos travaux définissent de nouveaux mécanismes de remodelage

du microenvironnement par la tumeur favorisant les processus de carcinogénèse et plus particulièrement stimulant les fonctions « souches cancéreuses » responsables de l'initiation tumorale et de la chimiorésistance. Ainsi une meilleure compréhension du remodelage moléculaire et fonctionnel des CGE par la tumeur pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les CGE « activées par la tumeur » favorisant les processus de carcinogénèse colique.



**Figure 20 : Proposition des interactions entre les CGE et les cellules épithéliales tumorales et de l'impact des CGE sur les propriétés des CSC.**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* 24, 1082–1094.

Abdo, H., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2012). The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress: 15d-PGJ2 and neuroprotection by enteric glial cells. *J. Physiol.* 590, 2739–2750.

Ahlman, H., and Nilsson, null (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 12 Suppl 2, S63-68.

Ahn, J.-Y., Lee, J.-S., Min, H.-Y., and Lee, H.-Y. (2015). Acquired resistance to 5-fluorouracil via HSP90/Src-mediated increase in thymidylate synthase expression in colon cancer. *Oncotarget* 6, 32622.

Aigner, S., Ramos, C.L., Hafezi-moghadam, A., Lawrence, M.B., Friederichs, J., Altevogt, P., and Ley, K. (1998). CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.* 12, 1241–1251.

Akiba, Y., and Kaunitz, J.D. (2014). Prostaglandin pathways in duodenal chemosensing: Prostaglandins and duodenal chemosensing. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29, 93–98.

Albo, D., Akay, C.L., Marshall, C.L., Wilks, J.A., Verstovsek, G., Liu, H., Agarwal, N., Berger, D.H., and Ayala, G.E. (2011). Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes: Neurogenesis in Colorectal Cancer. *Cancer* 117, 4834–4845.

Alcindor, T., and Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol.* 18, 18.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3983–3988.

Al-Salihi, M.A., Terrece Pearman, A., Doan, T., Reichert, E.C., Rosenberg, D.W., Prescott, S.M., Stafforini, D.M., and Topham, M.K. (2009). Transgenic expression of cyclooxygenase-2 in mouse intestine epithelium is insufficient to initiate tumorigenesis but promotes tumor progression. *Cancer Lett.* 273, 225–232.

Al-Shboul, O.A. (2013). The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *Saudi J. Gastroenterol. Off. J. Saudi Gastroenterol. Assoc.* 19, 3–15.

Althumairi, A.A., and Gearhart, S.L. (2015). Local excision for early rectal cancer: transanal endoscopic microsurgery and beyond. *J. Gastrointest. Oncol.* 6, 296.

Anitha, M. (2006). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* 116, 344–356.

Arakawa, Y. (2006). Novel missense mutation of the DNA topoisomerase I gene in SN-38-resistant DLD-1 cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 502–508.

Arango, D., Wilson, A.J., Shi, Q., Corner, G.A., Arañes, M.J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J.M., and Augenlicht, L.H. (2004). Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* *91*, 1931–1946.

Arnould, S., Hennebelle, I., Canal, P., Bugat, R., and Guichard, S. (2003). Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* *39*, 112–119.

Aube, A.-C. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* *55*, 630–637.

Bach-Ngohou, K., Mahé, M.M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2: Soluble glial mediators effects on intestinal epithelial cells. *J. Physiol.* *588*, 2533–2544.

Bai, Y.-P., Shang, K., Chen, H., Ding, F., Wang, Z., Liang, C., Xu, Y., Sun, M.-H., and Li, Y.-Y. (2015). FGF-1/-3/FGFR4 signaling in cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in colon cancer through Erk and MMP-7. *Cancer Sci.* *106*, 1278–1287.

Bakker, E., Qattan, M., Mutti, L., Demonacos, C., and Krstic-Demonacos, M. (2016). The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1863*, 414–426.

Bandyopadhyay, K., and Gjerset, R.A. (2011). Protein Kinase CK2 Is a Central Regulator of Topoisomerase I Hyperphosphorylation and Camptothecin Sensitivity in Cancer Cell Lines. *Biochemistry (Mosc.)* *50*, 704–714.

Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., and Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J. Histochem. Cytochem.* *57*, 1013–1023.

Barker, N. (2013). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 19–33.

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.

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.

Bassotti, G. (2006). The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut* *55*, 41–46.

Baumann, P., Cremers, N., Kroese, F., Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., Uede, T., Yagita, H., and Sleeman, J.P. (2005). CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* *65*, 10783–10793.

- ter Beek, J., Guskov, A., and Slotboom, D.J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *J. Gen. Physiol.* *143*, 419–435.
- Bent, E.H., Gilbert, L.A., and Hemann, M.T. (2016). A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes Dev.* *30*, 1811–1821.
- Berdiel-Acer, M., Sanz-Pamplona, R., Calon, A., Cuadras, D., Berenguer, A., Sanjuan, X., Paules, M.J., Salazar, R., Moreno, V., Batlle, E., et al. (2014). Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol. Oncol.* *8*, 1290–1305.
- Berthoud, H.-R., and Neuhuber, W.L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci.* *85*, 1–17.
- Bitarte, N., Bandres, E., Boni, V., Zarate, R., Rodriguez, J., Gonzalez-Huarriz, M., Lopez, I., Javier Sola, J., Alonso, M.M., Fortes, P., et al. (2011). MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *29*, 1661–1671.
- Blick, T., Hugo, H., Widodo, E., Waltham, M., Pinto, C., Mani, S.A., Weinberg, R.A., Neve, R.M., Lenburg, M.E., and Thompson, E.W. (2010). Epithelial Mesenchymal Transition Traits in Human Breast Cancer Cell Lines Parallel the CD44hi/CD24lo/- Stem Cell Phenotype in Human Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 235–252.
- Boesmans, W., Cirillo, C., Van den Abbeel, V., Van den Haute, C., Depoortere, I., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2013). Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells: Neurotransmitters directly activate enteric glia. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e151–e160.
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system: Enteric Glial Cell Heterogeneity. *Glia* *63*, 229–241.
- Bohórquez, D.V., Samsa, L.A., Roholt, A., Medicetty, S., Chandra, R., and Liddle, R.A. (2014). An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One* *9*, e89881.
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., and Kuliopulos, A. (2005). PAR1 Is a Matrix Metalloprotease-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cell* *120*, 303–313.
- Boland, C.R., and Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* *138*, 2073–2087.e3.
- Bondurand, N., and Sham, M.H. (2013). The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev. Biol.* *382*, 330–343.
- 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.* *3*, 730–737.

- Bornstein, J.C., Costa, M., and Grider, J.R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol. Motil.* *16*, 34–38.
- von Boyen, G.B.T. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* *53*, 222–228.
- von Boyen, G.B., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* *11*, 3.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006). Nerve Growth Factor Secretion in Cultured Enteric Glia Cells is Modulated by Proinflammatory Cytokines. *J. Neuroendocrinol.* *18*, 820–825.
- Boyer, J., McLean, E.G., Aroori, S., Wilson, P., McCulla, A., Carey, P.D., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2004). Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2158–2167.
- Brun, P., Giron, M.C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A.R., Spagnol, L., De Caro, R., et al. (2013). Toll-Like Receptor 2 Regulates Intestinal Inflammation by Controlling Integrity of the Enteric Nervous System. *Gastroenterology* *145*, 1323–1333.
- Buczacki, S.J.A., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., and Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* *495*, 65–69.
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* *93*, 189–201.
- Caiado, F., Silva-Santos, B., and Norell, H. (2016). Intra-tumour heterogeneity - going beyond genetics. *FEBS J.* *283*, 2245–2258.
- Cameron, H.L., and Perdue, M.H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium *in vitro*: Cholinergic regulation of epithelial permeability. *Neurogastroenterol. Motil.* *19*, 47–56.
- Candeil, L., Gourdier, I., Peyron, D., Vezzio, N., Copois, V., Bibeau, F., Orsetti, B., Scheffer, G.L., Ychou, M., Khan, Q.A., et al. (2004). ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int. J. Cancer* *109*, 848–854.
- Cao, D., Qin, S., Mu, Y., and Zhong, M. (2017). The role of MRP1 in the multidrug resistance of colorectal cancer. *Oncol. Lett.*
- Cao, H., Xu, E., Liu, H., Wan, L., and Lai, M. (2015). Epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol. - Res. Pract.* *211*, 557–569.
- Carethers, J.M., and Jung, B.H. (2015). Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* *149*, 1177–1190.e3.

- Carpentino, J.E., Hynes, M.J., Appelman, H.D., Zheng, T., Steindler, D.A., Scott, E.W., and Huang, E.H. (2009). Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res.* *69*, 8208–8215.
- Carulli, A.J., Keeley, T.M., Demitrack, E.S., Chung, J., Maillard, I., and Samuelson, L.C. (2015). Notch receptor regulation of intestinal stem cell homeostasis and crypt regeneration. *Dev. Biol.* *402*, 98–108.
- Cassidy, S., and Syed, B.A. (2017). Colorectal cancer drugs market. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 525–526.
- Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druet, K.M., and Gutkind, J.S. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* *310*, 1504–1510.
- Catalano, V., Di Franco, S., Iovino, F., Dieli, F., Stassi, G., and Todaro, M. (2012). CD133 as a target for colon cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* *16*, 259–267.
- Centurione, L., and Aiello, F.B. (2016). DNA Repair and Cytokines: TGF- $\beta$ , IL-6, and Thrombopoietin as Different Biomarkers of Radioresistance. *Front. Oncol.* *6*.
- Chai, J., Dong, W., Xie, C., Wang, L., Han, D.-L., Wang, S., Guo, H.-L., and Zhang, Z.-L. (2015). MicroRNA-494 sensitizes colon cancer cells to fluorouracil through regulation of DPYD: Chemoresistance of Colon Cancer Cells. *IUBMB Life* *67*, 191–201.
- Chen, S., and Huang, E.H. (2014). The Colon Cancer Stem Cell Microenvironment Holds Keys to Future Cancer Therapy. *J. Gastrointest. Surg.* *18*, 1040–1048.
- Chen, J., Solomides, C., and Simpkins, H. (2014). Sensitization of mesothelioma cells to platinum-based chemotherapy by GST $\pi$  knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *447*, 77–82.
- Chen, S., Song, X., Chen, Z., Li, X., Li, M., Liu, H., and Li, J. (2013). CD133 Expression and the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* *8*, e56380.
- 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.
- Cheung-Ong, K., Giaever, G., and Nislow, C. (2013). DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chem. Biol.* *20*, 648–659.
- Chiu, S.-J., Chao, J.-I., Lee, Y.-J., and Hsu, T.-S. (2008). Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. *Toxicol. Lett.* *179*, 63–70.
- Chiu, S.-J., Lee, Y.-J., Hsu, T.-S., and Chen, W.-S. (2009). Oxaliplatin-induced gamma-H2AX activation via both p53-dependent and -independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* *182*, 173–182.
- Choi, D. (2009). Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* *15*, 2258.

Choi, C.H., Lee, T.B., Lee, Y.A., Choi, S., and Kim, K.J. (2011). Up-regulation of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E<sub>2</sub> in colon cancer cells resistant to 5-fluorouracil. *J. Korean Surg. Soc.* *81*, 115.

Choi, J.-W., Liu, H., Shin, D.H., Yu, G.I., Hwang, J.S., Kim, E.S., and Yun, J.W. (2013). Proteomic and cytokine plasma biomarkers for predicting progression from colorectal adenoma to carcinoma in human patients. *Proteomics* *13*, 2361–2374.

Chu, P., Clanton, D.J., Snipas, T.S., Lee, J., Mitchell, E., Nguyen, M.-L., Hare, E., and Peach, R.J. (2009). Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int. J. Cancer* *124*, 1312–1321.

Ciombor, K.K., Wu, C., and Goldberg, R.M. (2015). Recent Therapeutic Advances in the Treatment of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Med.* *66*, 83–95.

Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Grosso, M., Petruzzelli, R., Izzo, P., Calì, G., D'Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., et al. (2009). Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *21*, 1209-e112.

Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., and Cuomo, R. (2011). Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production: Enteric glial cells activation and proliferation. *Neurogastroenterol. Motil.* *23*, e372–e382.

Clairembault, T., Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2015). Enteric glial cells: New players in Parkinson's disease?: Enteric Glia in PD. *Mov. Disord.* *30*, 494–498.

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* 313–319.

Cohen, S., and Leininger, A. (2014). The genetic basis of Lynch syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl. Clin. Genet.* 147.

Cohn, S.M., Schloemann, S., Tessner, T., Seibert, K., and Stenson, W.F. (1997). Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J. Clin. Invest.* *99*, 1367–1379.

Colak, S., and Medema, J.P. (2016). Human colonic fibroblasts regulate stemness and chemotherapy resistance of colon cancer stem cells. *Cell Cycle* *15*, 1531–1537.

Colak, S., Zimmerlin, C.D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P.R., Grandela, C.M., Letai, A., and Medema, J.P. (2014a). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ* *21*, 1170–7.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* *65*, 10946–10951.

Compton, C.C., and Greene, F.L. (2004). The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA. Cancer J. Clin.* *54*, 295–308.



Conlin, V.S., Wu, X., Nguyen, C., Dai, C., Vallance, B.A., Buchan, A.M.J., Boyer, L., and Jacobson, K. (2009). Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G735–G750.

Cooke, H.J. (2000). Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915, 77–80.

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 99–118.

Copur, S., Aiba, K., Drake, J.C., Allegra, C.J., and Chu, E. (1995). Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochem. Pharmacol.* 49, 1419–1426.

Coquenlorge, S., Van Landeghem, L., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Duchalais, E., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016). The arachidonic acid metabolite 11 $\beta$ -ProstaglandinF2 $\alpha$  controls intestinal epithelial healing: deficiency in patients with Crohn's disease. *Sci. Rep.* 6, 25203.

Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.-L., Colombel, J.-F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R.S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13306–13311.

Cremona, C.A., and Behrens, A. (2014). ATM signalling and cancer. *Oncogene* 33, 3351–3360.

Crotti, S., Piccoli, M., Rizzolio, F., Giordano, A., Nitti, D., and Agostini, M. (2017). Extracellular Matrix and Colorectal Cancer: How Surrounding Microenvironment Affects Cancer Cell Behavior?: ECM AND COLORECTAL CANCER. *J. Cell. Physiol.* 232, 967–975.

Curtin, K., Slattery, M.L., and Samowitz, W.S. (2011). CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pathol. Res. Int.* 2011, 1–8.

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.

Dallas, N.A., Xia, L., Fan, F., Gray, M.J., Gaur, P., van Buren, G., Samuel, S., Kim, M.P., Lim, S.J., and Ellis, L.M. (2009). Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 69, 1951–1957.

Davalos, A.R., Coppe, J.-P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 273–283.

Davis, H., Irshad, S., Bansal, M., Rafferty, H., Boitsova, T., Bardella, C., Jaeger, E., Lewis, A., Freeman-Mills, L., Giner, F.C., et al. (2014). Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat. Med.* 21, 62–70.

De Angelis, P. (2011). DNA damage signaling in response to 5-fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status. *Int. J. Oncol.*

De Iudibus, S., De Pellegrin, A., Stocco, G., Bartoli, F., Bussani, R., and Decorti, G. (2008). ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res.* *28*, 3921–3928.

Dignass, A.U., Becker, A., Spiegler, S., and Goebell, H. (1998). Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* *28*, 554–561.

Dimanche-Boitrel, M.T., Vakaet, L., Pujuguet, P., Chauffert, B., Martin, M.S., Hammann, A., Van Roy, F., Mareel, M., and Martin, F. (1994). In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *Int. J. Cancer* *56*, 512–521.

Ding, Z., Yang, L., Xie, X., Xie, F., Pan, F., Li, J., He, J., and Liang, H. (2010). Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *136*, 1697–1707.

Dittmer, J., and Leyh, B. (2015). The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* *31*, 3–15.

Drew, D.A., Cao, Y., and Chan, A.T. (2016). Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 173–186.

Drost, J., van Jaarsveld, R.H., Ponsioen, B., Zimmerlin, C., van Boxtel, R., Buijs, A., Sachs, N., Overmeer, R.M., Offerhaus, G.J., Begthel, H., et al. (2015). Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* *521*, 43–47.

Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., Jin, H., Cahuzac, N., Mehrpour, M., Lu, Y., et al. (2008). CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6751–6760.

Duchalais, E., Guilluy, C., Nedellec, S., Touvron, M., Bessard, A., Touchefeu, Y., Bossard, C., Boudin, H., Louarn, G., Neunlist, M., et al. (2017). Colorectal cancer cells adhere to and migrate along the neurons of the enteric nervous system.

Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.-K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., et al. (2008). Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogeneic Tumors Following Chemotherapy. *PLoS ONE* *3*, e2428.

El Marjou, F., Janssen, K.-P., Hung-Junn Chang, B., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* *39*, 186–193.

Elsaba, T.M.A., Martinez-Pomares, L., Robins, A.R., Crook, S., Seth, R., Jackson, D., McCart, A., Silver, A.R., Tomlinson, I.P.M., and Ilyas, M. (2010). The Stem Cell Marker CD133 Associates with Enhanced Colony Formation and Cell Motility in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* *5*, e10714.

Emmink, B.L., Van Houdt, W.J., Vries, R.G., Hoogwater, F.J.H., Govaert, K.M., Verheem, A., Nijkamp, M.W., Steller, E.J.A., Jimenez, C.R., Clevers, H., et al. (2011). Differentiated Human Colorectal Cancer Cells Protect Tumor-Initiating Cells From Irinotecan. *Gastroenterology* *141*, 269–278.

- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* *15*, 504–514.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* *435*, 959–963.
- van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A.N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., et al. (2012a). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1099–1104.
- van Es, J.H., Haegerbarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B.-K., Boj, S.F., Korving, J., van den Born, M., van Oudenaarden, A., Robine, S., et al. (2012b). A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1918–1927.
- Fan, C.-W., Wen, L., Qiang, Z.-D., Chen, T., Zhou, Z.-G., Mo, X.-M., and Hu, J.-K. (2012a). Prognostic significance of relevant markers of cancer stem cells in colorectal cancer - a meta analysis. *Hepatogastroenterology.* *59*, 1421–1427.
- Fan, F., Samuel, S., Evans, K.W., Lu, J., Xia, L., Zhou, Y., Sceusi, E., Tozzi, F., Ye, X.-C., Mani, S.A., et al. (2012b). Overexpression of Snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.* *1*, 5–16.
- Fan, X., Ouyang, N., Teng, H., and Yao, H. (2011). Isolation and characterization of spheroid cells from the HT29 colon cancer cell line. *Int. J. Colorectal Dis.* *26*, 1279–1285.
- Fan, Y.-Y., Davidson, L.A., Callaway, E.S., Goldsby, J.S., and Chapkin, R.S. (2014). Differential effects of 2- and 3-series E-prostaglandins on in vitro expansion of Lgr5+ colonic stem cells. *Carcinogenesis* *35*, 606–612.
- Fathi, A., Mosaad, H., Hussein, S., Roshdy, M., and Ismail, E.I. (2017). Prognostic significance of CD133 and ezrin expression in colorectal carcinoma: EZRIN EXPRESSION IN COLORECTAL CANCER. *IUBMB Life* *69*, 328–340.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *6*, 479–507.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.
- Feng, L., Wu, J., and Yi, F. (2015). Isolation and phenotypic characterization of cancer stem-like side population cells in colon cancer. *Mol. Med. Rep.*
- Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P.J., and Polak, J.M. (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* *297*, 409–410.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7551–7559.

Flamant, M., Aubert, P., Rolli-Derkinderen, M., Bourreille, A., Neunlist, M.R., Mahé, M.M., Meurette, G., Marteyn, B., Savidge, T., Galmiche, J.P., et al. (2011). Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 60, 473–484.

Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S.F., and Wang, H.L. (2012). Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* 3, 153.

Fletcher, E., Clark, M., and Furness, J. (2002). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res.* 308, 339–346.

van der Flier, L.G., Haegerbarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009a). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 137, 15–17.

van der Flier, L.G., van Gijn, M.E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegerbarth, A., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., et al. (2009b). Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 136, 903–912.

Francescone, R., Hou, V., and Grivennikov, S.I. (2015). Cytokines, IBD, and Colitis-associated Cancer: Inflamm. *Bowel Dis.* 21, 409–418.

Fujikawa, Y., Tominaga, K., Tanaka, F., Tanigawa, T., Watanabe, T., Fujiwara, Y., and Arakawa, T. (2015). Enteric glial cells are associated with stress-induced colonic hyper-contraction in maternally separated rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 1010–1023.

Fujita, K. (2015). Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 21, 12234.

Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.

Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294.

Furness, J.B. (2016). Integrated Neural and Endocrine Control of Gastrointestinal Function. In *The Enteric Nervous System*, S. Brierley, and M. Costa, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 159–173.

Furness, J.B., Bornstein, J.C., and Trussell, D.C. (1988). Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. *Cell Tissue Res.* 254, 561–571.

Furness, J.B., Alex, G., Clark, M.J., and Lal, V.V. (2003). Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 272, 475–483.

Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164.

Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69.

- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* 6, 425–436.
- Gagnon, J.-F. (2006). Irinotecan Inactivation Is Modulated by Epigenetic Silencing of UGT1A1 in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 1850–1858.
- Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., and Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218, 1402–1410.
- Gao, M.Q., Choi, Y.P., Kang, S., Youn, J.H., and Cho, N.H. (2010). CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* 29, 2672.
- Gao, W., Chen, L., Ma, Z., Du, Z., Zhao, Z., Hu, Z., and Li, Q. (2013). Isolation and Phenotypic Characterization of Colorectal Cancer Stem Cells With Organ-Specific Metastatic Potential. *Gastroenterology* 145, 636–646.e5.
- Garcia, S.B., Stopper, H., and Kannen, V. (2014). The contribution of neuronal–glial–endothelial–epithelial interactions to colon carcinogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3191–3197.
- Gelsomino, F., Barbolini, M., Spallanzani, A., Pugliese, G., and Cascinu, S. (2016). The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat. Rev.* 51, 19–26.
- Gemei, M., Mirabelli, P., Di Noto, R., Corbo, C., Iaccarino, A., Zamboli, A., Troncone, G., Galizia, G., Lieto, E., Del Vecchio, L., et al. (2013). CD66c is a novel marker for colorectal cancer stem cell isolation, and its silencing halts tumor growth in vivo: CD66c Involvement in Colon Cancer. *Cancer* 119, 729–738.
- Georgilis, A., and Gil, J. (2016). Controlling secretion to limit chemoresistance. *Genes Dev.* 30, 1791–1792.
- Gerbe, F., and Jay, P. (2016). Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunol.* 9, 1353–1359.
- Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 192, 767–780.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2907–2917.
- Ghuwalewala, S., Ghatak, D., Das, P., Dey, S., Sarkar, S., Alam, N., Panda, C.K., and Roychoudhury, S. (2016). CD44 high CD24 low molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Res.* 16, 405–417.
- Gilbert, L.A., and Hemann, M.T. (2010). DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* 143, 355–366.
- Gocheva, V., Wang, H.-W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., and Joyce, J.A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 24, 241–255.

Goode, T., O'Connor, T., Hopkins, A., Moriarty, D., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., O'Donoghue, D., Baird, A.W., O'Connell, J., and Shanahan, F. (2003). Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. *J. Cell. Physiol.* *197*, 30–41.

Gourdier, I., Del Rio, M., Crabbé, L., Candeil, L., Copois, V., Ychou, M., Auffray, C., Martineau, P., Mechti, N., Pommier, Y., et al. (2002). Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett.* *529*, 232–236.

Goyal, R.K., and Hirano, I. (1996). The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.* *334*, 1106–1115.

Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *Gastroenterology* *129*, 626–638.

Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.-W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2004). IKK $\beta$  links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* *118*, 285–296.

Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., et al. (2009). IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* *15*, 103–113.

Gross, E.R., Gershon, M.D., Margolis, K.G., Gertsberg, Z.V., and Cowles, R.A. (2012). Neuronal Serotonin Regulates Growth of the Intestinal Mucosa in Mice. *Gastroenterology* *143*, 408–417.e2.

Grubišić, V., and Gulbransen, B.D. (2017). Enteric glial activity regulates secretomotor function in the mouse colon but does not acutely affect gut permeability: Acute activity of enteric glia and functions of the gut epithelium. *J. Physiol.* *595*, 3409–3424.

Grundy, D. (2002). Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* *51*, i2–i5.

Gulbransen, B.D. (2014). Enteric Glia. *Colloq. Ser. Neuroglia Biol. Med. Physiol. Dis.* *1*, 1–70.

Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2009). Purinergic Neuron-to-Glia Signaling in the Enteric Nervous System. *Gastroenterology* *136*, 1349–1358.

Gunawardene, A.R., Corfe, B.M., and Staton, C.A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract: Classification and functions of colorectal enteroendocrine cells. *Int. J. Exp. Pathol.* *92*, 219–231.

Gustafsson, A., Hansson, E., Kressner, U., Nordgren, S., Andersson, M., Lönnroth, C., and Lundholm, K. (2007). Prostanoid receptor expression in colorectal cancer related to tumor stage, differentiation and progression. *Acta Oncol.* *46*, 1107–1112.

Haimoto, H., Hosoda, S., and Kato, K. (1987). Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *57*, 489–498.

- Hammond, W.A., Swaika, A., and Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther. Adv. Med. Oncol.* *8*, 57–84.
- Han, X.-Y., Wei, B., Fang, J.-F., Zhang, S., Zhang, F.-C., Zhang, H.-B., Lan, T.-Y., Lu, H.-Q., and Wei, H.-B. (2013). Epithelial-Mesenchymal Transition Associates with Maintenance of Stemness in Spheroid-Derived Stem-Like Colon Cancer Cells. *PLoS ONE* *8*, e73341.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanani, M., and Reichenbach, A. (1994). Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* *278*, 153–160.
- Hara, S., Kamei, D., Sasaki, Y., Tanemoto, A., Nakatani, Y., and Murakami, M. (2010). Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie* *92*, 651–659.
- Haramis, A.-P.G., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J.A., and Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* *303*, 1684–1686.
- Hardwick, J.C.H., Van Den Brink, G.R., Bleuming, S.A., Ballester, I., Van Den Brande, J.M.H., Keller, J.J., Offerhaus, G.J.A., Van Deventer, S.J.H., and Peppelenbosch, M.P. (2004). Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* *126*, 111–121.
- Haug, K., Kravik, K.L., and De Angelis, P.M. (2008). Cellular response to irinotecan in colon cancer cell lines showing differential response to 5-fluorouracil. *Anticancer Res.* *28*, 583–592.
- Hawinkels, L.J. a. C., Paauwe, M., Verspaget, H.W., Wiercinska, E., van der Zon, J.M., van der Ploeg, K., Koelink, P.J., Lindeman, J.H.N., Mesker, W., ten Dijke, P., et al. (2014). Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF- $\beta$  signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* *33*, 97–107.
- Hayden, U.L., and Carey, H.V. (2000). Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *278*, R1589–R1594.
- He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- $\beta$ -catenin signaling. *Nat. Genet.* *36*, 1117–1121.
- Hill, M.J., Morson, B.C., and Bussey, H.J. (1978). Aetiology of adenoma--carcinoma sequence in large bowel. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 245–247.
- Hirokawa, Y., Yip, K.H.Y., Tan, C.W., and Burgess, A.W. (2014). Colonic myofibroblast cell line stimulates colonoid formation. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *306*, G547–G556.
- Hodges, L.M., Markova, S.M., Chinn, L.W., Gow, J.M., Kroetz, D.L., Klein, T.E., and Altman, R.B. (2011). Very important pharmacogene summary: Pharmacogenet. Genomics *21*, 152–161.

Hoehner, J.C., Wester, T., Pahlman, S., and Olsen, L. (1996). Alterations in neurotrophin and neurotrophin-receptor localization in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* *31*, 1524–1529.

Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W.H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., and Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* *509*, 356–371.

Hopper-Borge (2013). Drug Resistance Mechanisms in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J. Cancer Res. Updat.*

Houchen, C.W., Sturmoski, M.A., Anant, S., Breyer, R.M., and Stenson, W.F. (2003). Prosurvival and antiapoptotic effects of PGE<sub>2</sub> in radiation injury are mediated by EP<sub>2</sub> receptor in intestine. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *284*, G490–G498.

Hu, T., To, K.K.W., Wang, L., Zhang, L., Lu, L., Shen, J., Chan, R.L.Y., Li, M., Yeung, J.H.K., and Cho, C.H. (2014). Reversal of P-glycoprotein (P-gp) mediated multidrug resistance in colon cancer cells by cryptotanshinone and dihydrotanshinone of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytomedicine* *21*, 1264–1272.

Hu, T., Li, Z., Gao, C.-Y., and Cho, C.H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J. Gastroenterol.* *22*, 6876.

Huang, C.-Y., and Yu, L.C.-H. (2015). Pathophysiological mechanisms of death resistance in colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *21*, 11777–11792.

Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S., and Boman, B.M. (2009). Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis. *Cancer Res.* *69*, 3382–3389.

Hui, L., and Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* *368*, 7–13.

Hussain, S.P., Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 276–285.

Ibiza, S., García-Cassani, B., Ribeiro, H., Carvalho, T., Almeida, L., Marques, R., Misić, A.M., Bartow-McKenney, C., Larson, D.M., Pavan, W.J., et al. (2016). Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* *535*, 440–443.

Ieta, K., Tanaka, F., Haraguchi, N., Kita, Y., Sakashita, H., Mimori, K., Matsumoto, T., Inoue, H., Kuwano, H., and Mori, M. (2008). Biological and Genetic Characteristics of Tumor-Initiating Cells in Colon Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* *15*, 638–648.

Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* *363*, 558–561.

Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Winton, D.J. (2004). Inducible cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of  $\beta$ -catenin. *Gastroenterology* *126*, 1236–1246.



Iwanaga, K., Nakamura, T., Maeda, S., Aritake, K., Hori, M., Urade, Y., Ozaki, H., and Murata, T. (2014). Mast Cell-Derived Prostaglandin D2 Inhibits Colitis and Colitis-Associated Colon Cancer in Mice. *Cancer Res.* 74, 3011–3019.

Jakobsson, P.J., Thorén, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7220–7225.

Jansen, W.J., Zwart, B., Hulscher, S.T., Giaccone, G., Pinedo, H.M., Boven, E., and others (1997). CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants.

Jensen, N.F., Agama, K., Roy, A., Smith, D.H., Pfister, T.D., Rømer, M.U., Zhang, H.-L., Doroshow, J.H., Knudsen, B.R., Stenvang, J., et al. (2016). Characterization of DNA topoisomerase I in three SN-38 resistant human colon cancer cell lines reveals a new pair of resistance-associated mutations. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35.

Jeppsson, S., Srinivasan, S., and Chandrasekharan, B. (2017). Neuropeptide Y (NPY) promotes inflammation-induced tumorigenesis by enhancing epithelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G103–G111.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736–737.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci.* 3, 2206–2218.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1985). Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J. Neuroimmunol.* 8, 377–393.

Jiang, Y.N., Yan, H.Q., Huang, X.B., Wang, Y.N., Li, Q., and Gao, F.G. (2015). Interleukin 6 triggered ataxia-telangiectasia mutated activation facilitates lung cancer metastasis via MMP-3/MMP-13 up-regulation. *Oncotarget* 6, 40719–40733.

Jin, G., Westphalen, C.B., Hayakawa, Y., Worthley, D.L., Asfaha, S., Yang, X., Chen, X., Si, Y., Wang, H., Taylor, Y., et al. (2013). Progastrin Stimulates Colonic Cell Proliferation via CCK2R- and  $\beta$ -Arrestin-Dependent Suppression of BMP2. *Gastroenterology* 145, 820–830.e10.

Jung, P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M.A., Sancho, E., et al. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat. Med.* 17, 1225–1227.

Jung, P., Sommer, C., Barriga, F.M., Buczacki, S.J., Hernando-Momblona, X., Sevillano, M., Duran-Frigola, M., Aloy, P., Selbach, M., Winton, D.J., et al. (2015). Isolation of Human Colon Stem Cells Using Surface Expression of PTK7. *Stem Cell Rep.* 5, 979–987.

Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, Aliyev, J., Wu, Y., Bunte, R., et al. (2014). Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development* 141, 2206–2215.

- Kachalaki, S., Ebrahimi, M., Mohamed Khosroshahi, L., Mohammadinejad, S., and Baradaran, B. (2016). Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. *Eur. J. Pharm. Sci.* *89*, 20–30.
- Kaeffer, B. (2011). Survival of Exfoliated Epithelial Cells: A Delicate Balance between Anoikis and Apoptosis. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 1–9.
- Kang, Y. (2009). Analysis of cancer stem cell metastasis in xenograft animal models. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *568*, 7–19.
- Kang, H., O’Connell, J.B., Leonardi, M.J., Maggard, M.A., McGory, M.L., and Ko, C.Y. (2006). Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int. J. Colorectal Dis.* *22*, 183–189.
- Kato, H., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Ohi, R., So, N., and Iwasaki, Y. (1990). Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung’s disease. *J. Pediatr. Surg.* *25*, 514–519.
- Kawamori, T. (2004). Prostaglandin E receptor subtype EP1 deficiency inhibits colon cancer development. *Carcinogenesis* *26*, 353–357.
- Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2003). Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis* *24*, 985–990.
- Ke, J., Wu, X., Wu, X., He, X., Lian, L., Zou, Y., He, X., Wang, H., Luo, Y., Wang, L., et al. (2012). A subpopulation of CD24+ cells in colon cancer cell lines possess stem cell characteristics. *Neoplasma* *59*, 282–288.
- 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. (2010). The AC133 Epitope, but not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation. *Cancer Res.* *70*, 719–729.
- Kermarrec, L., Durand, T., Neunlist, M., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2016). Enteric glial cells have specific immunosuppressive properties. *J. Neuroimmunol.* *295–296*, 79–83.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* *141*, 52–67.
- Kidane, D., Chae, W.J., Czochor, J., Eckert, K.A., Glazer, P.M., Bothwell, A.L.M., and Sweasy, J.B. (2014). Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *49*, 116–139.
- Kim, Y.-J., and Wilson, D.M. (2012). Overview of base excision repair biochemistry. *Curr. Mol. Pharmacol.* *5*, 3–13.
- Kim, B.R., Oh, S.C., Lee, D.-H., Kim, J.L., Lee, S.Y., Kang, M.H., Lee, S.I., Kang, S., Joung, S.Y., and Min, B.W. (2015). BMP-2 induces motility and invasiveness by promoting colon cancer stemness through STAT3 activation. *Tumor Biol.* *36*, 9475–9486.

- Kimura, Y., Goi, T., Nakazawa, T., Hirono, Y., Katayama, K., Urano, T., and Yamaguchi, A. (2013). CD44variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells. *Oncotarget* 4, 785.
- King, J.B., von Furstenberg, R.J., Smith, B.J., McNaughton, K.K., Galanko, J.A., and Henning, S.J. (2012). CD24 can be used to isolate Lgr5+ putative colonic epithelial stem cells in mice. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G443–G452.
- Klampfer, L. (2011). Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 11, 451–464.
- Kobayashi, S., Yamada-Okabe, H., Suzuki, M., Natori, O., Kato, A., Matsubara, K., Jau Chen, Y., Yamazaki, M., Funahashi, S., Yoshida, K., et al. (2012). LGR5-Positive Colon Cancer Stem Cells Interconvert with Drug-Resistant LGR5-Negative cells and are Capable of Tumor Reconstitution. *STEM CELLS* 30, 2631–2644.
- Komuro, T. (2006). Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract: ICC in the gastrointestinal tract. *J. Physiol.* 576, 653–658.
- Konishi, T., Sasaki, S., Watanabe, T., Kitayama, J., and Nagawa, H. (2006). Overexpression of hRFI inhibits 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells via activation of NF- $\kappa$ B and upregulation of BCL-2 and BCL-XL. *Oncogene* 25, 3160.
- Kosinski, C., Li, V.S., Chan, A.S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., et al. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15418–15423.
- Kozlov, S.V., Graham, M.E., Jakob, B., Tobias, F., Kijas, A.W., Tanuji, M., Chen, P., Robinson, P.J., Taucher-Scholz, G., Suzuki, K., et al. (2011). Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. *J. Biol. Chem.* 286, 9107–9119.
- Kozłowska, A., Kwiatkowski, P., Oponowicz, A., Majewski, M., Kmiec, Z., and Godlewski, J. (2015). Myenteric plexuses atrophy in the vicinity of colorectal cancer tissue is not caused by apoptosis or necrosis. *Folia Histochem. Cytobiol.*
- Kozovska, Z., Gabrisova, V., and Kucerova, L. (2014). Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomed. Pharmacother.* 68, 911–916.
- Krausova, M., and Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell. Signal.* 26, 570–579.
- Kreso, A., and Dick, J.E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 14, 275–291.
- Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.-T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., and Kuo, C.J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 266–271.
- Kunikata, T., Tanaka, A., Miyazawa, T., Kato, S., and Takeuchi, K. (2002). 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 inhibits indomethacin-induced small intestinal lesions through EP3 and EP4 receptors. *Dig. Dis. Sci.* 47, 894–904.

Lahar, N., Lei, N.Y., Wang, J., Jabaji, Z., Tung, S.C., Joshi, V., Lewis, M., Stelzner, M., Martín, M.G., and Dunn, J.C.Y. (2011). Intestinal Subepithelial Myofibroblasts Support *in vitro* and *in vivo* Growth of Human Small Intestinal Epithelium. *PLoS ONE* 6, e26898.

Lee, G.H., Malietzis, G., Askari, A., Bernardo, D., Al-Hassi, H.O., and Clark, S.K. (2015a). Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? – A systematic review. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* 41, 300–308.

Lee, M.-R., Ji, S.-Y., Mia-Jan, K., and Cho, M.-Y. (2015b). Chemoresistance of CD133+ colon cancer may be related with increased survivin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 229–234.

Lei, N.Y., Jabaji, Z., Wang, J., Joshi, V.S., Brinkley, G.J., Khalil, H., Wang, F., Jaroszewicz, A., Pellegrini, M., Li, L., et al. (2014). Intestinal Subepithelial Myofibroblasts Support the Growth of Intestinal Epithelial Stem Cells. *PLoS ONE* 9, e84651.

Lejeune, M., Moreau, F., and Chadee, K. (2011). Prostaglandin E2 Produced by *Entamoeba histolytica* Signals via EP4 Receptor and Alters Claudin-4 to Increase Ion Permeability of Tight Junctions. *Am. J. Pathol.* 179, 807–818.

Lelièvre, V., Meunier, A.-C., Caigneaux, E., Falcon, J., and Muller, J.-M. (1998). Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. *Cell. Signal.* 10, 13–26.

Levin, T.G., Powell, A.E., Davies, P.S., Silk, A.D., Dismuke, A.D., Anderson, E.C., Swain, J.R., and Wong, M.H. (2010). Characterization of the Intestinal Cancer Stem Cell Marker CD166 in the Human and Mouse Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* 139, 2072–2082.e5.

Li, X.-L. (2015). *p53* mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* 21, 84.

Li, F., and Lai, M. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 219–229.

Li, F., and Zhu, Y.-T. (2015). HGF-activated colonic fibroblasts mediates carcinogenesis of colonic epithelial cancer cells via PKC-cMET-ERK1/2-COX-2 signaling. *Cell. Signal.* 27, 860–866.

Li, S.K.H., and Martin, A. (2016). Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends Mol. Med.* 22, 274–289.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037.

Li, C., Lee, C.J., and Simeone, D.M. (2009). Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 568, 161–173.

Li, H.-J., Reinhardt, F., Herschman, H.R., and Weinberg, R.A. (2012). Cancer-Stimulated Mesenchymal Stem Cells Create a Carcinoma Stem Cell Niche via Prostaglandin E2 Signaling. *Cancer Discov.* 2, 840–855.

Li, T., Gao, F., and Zhang, X.-P. (2015). miR-203 enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil by targeting thymidylate synthase in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 33, 607–614.

Li, Y., Li, L., Wu, Z., Wang, L., Wu, Y., Li, D., Ma, U., Shao, J., Yu, H., and Wang, D. (2017). Silencing of ATM expression by siRNA technique contributes to glioma stem cell radiosensitivity in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* *38*, 325–335.

Lim, S.-C., and Oh, S.-H. (2005). The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol. - Res. Pract.* *201*, 479–486.

Lin, T., Zhang, W., Fan, Y., and Mulholland, M. (2007). Interleukin-1 $\beta$  and Interleukin-6 Stimulate Matrix Metalloproteinase-9 Secretion in Cultured Myenteric Glia. *J. Surg. Res.* *137*, 38–45.

Lipkin, M., and Quastler, H. (1962). Cell population kinetics in the colon of the mouse. *J. Clin. Invest.* *41*, 141.

Lipkin, M., Bell, B., and Sherlock, P. (1963). Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. I. Cell renewal in colon and rectum. *J. Clin. Invest.* *42*, 767.

Liu, R.-L., Dong, Y., Deng, Y.-Z., Wang, W.-J., and Li, W.-D. (2015). Tumor suppressor miR-145 reverses drug resistance by directly targeting DNA damage-related gene RAD18 in colorectal cancer. *Tumor Biol.* *36*, 5011–5019.

Liu, Y.A., Chung, Y.C., Pan, S.T., Shen, M.Y., Hou, Y.C., Peng, S.J., Pasricha, P.J., and Tang, S.C. (2013). 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e324–e338.

Iomax, a. e., Sharkey, k. a., and Furness, j. b. (2009). The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. *Neurogastroenterol. Motil.*

Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 330–338.

Lotti, F., Jarrar, A.M., Pai, R.K., Hitomi, M., Lathia, J., Mace, A., Gantt, G.A., Sukhdeo, K., DeVecchio, J., Vasanji, A., et al. (2013). Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* *210*, 2851–2872.

Lou, D., Zhu, L., Ding, H., Dai, H., and Zou, G. (2014). Aberrant expression of redox protein Ape1 in colon cancer stem cells. *Oncol. Lett.*

Lu, J., Ye, X., Fan, F., Xia, L., Bhattacharya, R., Bellister, S., Tozzi, F., Sceusi, E., Zhou, Y., Tachibana, I., et al. (2013). Endothelial Cells Promote the Colorectal Cancer Stem Cell Phenotype through a Soluble Form of Jagged-1. *Cancer Cell* *23*, 171–185.

Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* *6*, 666–677.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* *133*, 704–715.

Manoochchri, M., Karbasi, A., Bandehpour, M., and Kazemi, B. (2014). Down-Regulation of BAX Gene During Carcinogenesis and Acquisition of Resistance to 5-FU in Colorectal Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* *20*, 301–307.

Mao, Q., and Unadkat, J.D. (2015). Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS J.* *17*, 65–82.

Marin, J.J.G., Sanchez de Medina, F., Castaño, B., Bujanda, L., Romero, M.R., Martinez-Augustin, O., Moral-Avila, R.D., and Briz, O. (2012). Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug Metab. Rev.* *44*, 148–172.

Marotta, L.L.C., Almendro, V., Marusyk, A., Shipitsin, M., Schemme, J., Walker, S.R., Bloushtain-Qimron, N., Kim, J.J., Choudhury, S.A., Maruyama, R., et al. (2011). The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24– stem cell–like breast cancer cells in human tumors. *J. Clin. Invest.* *121*, 2723–2735.

Martinez-Cutillas, M., Mañé, N., Gallego, D., Jimenez, M., and Martin, M.T. (2014). EP2 and EP4 receptors mediate PGE2 induced relaxation in murine colonic circular muscle: Pharmacological characterization. *Pharmacol. Res.* *90*, 76–86.

Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., and Sato, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9–mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat. Med.*

Maudlej, N., and Hanani, M. (1992). Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res.* *578*, 94–98.

May, R., Riehl, T.E., Hunt, C., Sureban, S.M., Anant, S., and Houchen, C.W. (2008). Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 630–637.

Mazard, T., Causse, A., Simony, J., Leconet, W., Vezzio-Vie, N., Torro, A., Jarlier, M., Evrard, A., Del Rio, M., Assenat, E., et al. (2013). Sorafenib Overcomes Irinotecan Resistance in Colorectal Cancer by Inhibiting the ABCG2 Drug-Efflux Pump. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 2121–2134.

McClain, J.L., Grubišić, V., Fried, D., Gomez-Suarez, R.A., Leininger, G.M., Sévigny, J., Parpura, V., and Gulbransen, B.D. (2014). Ca<sup>2+</sup> Responses in Enteric Glia Are Mediated by Connexin-43 Hemichannels and Modulate Colonic Transit in Mice. *Gastroenterology* *146*, 497–507.e1.

McClain, J.L., Fried, D.E., and Gulbransen, B.D. (2015). Agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in enteric glia drives neural programs that regulate intestinal motility in mice. *CMGH Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *1*, 631–645.

Medema, J.P. (2017). Targeting the Colorectal Cancer Stem Cell. *N. Engl. J. Med.* *377*, 888–890.

Meijer, G.A., Schroeijers, A.B., Flens, M.J., Meuwissen, S.G., Van der Valk, P., Baak, J.P., and Scheper, R.J. (1999). Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* *52*, 450–454.

Melo, F.D.S.E., Vermeulen, L., Fessler, E., and Medema, J.P. (2013). Cancer heterogeneity—a multifaceted view. *EMBO Rep.* *14*, 686–695.

de Melo, C.F.V., Gígek, C.O., da Silva, J.N., Cardoso Smith, M. de A., de Araújo, R.M., Burbano, R.R., and Lima, E.M. (2014). Association of COX2 gene hypomethylation with intestinal type gastric cancer in samples of patients from northern Brazil. *Tumor Biol.* *35*, 1107–1111.

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.

Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Jung, P., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz, P., et al. (2011). The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell* *8*, 511–524.

Meurette, G., Blanchard, C., Duchalais-Dassonneville, E., Coquenlorge, S., Aubert, P., Wong, M., Lehur, P.-A., and Neunlist, M. (2012). Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model: SNS reinforces rectal epithelial barrier. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 267-e110.

Meyers, M., Wagner, M.W., Hwang, H.-S., Kinsella, T.J., and Boothman, D.A. (2001). Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. *Cancer Res.* *61*, 5193–5201.

Mhaidat, N., Bouklihacene, M., and Thorne, R. (2014). 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase  $\zeta$ /C- $\delta$ . *Oncol. Lett.*

Mia-Jan, K., Jung, S.Y., Kim, I.-Y., Oh, S.S., Choi, E., Chang, S.J., Kang, T.Y., and Cho, M.-Y. (2013). CD133 expression is not an independent prognostic factor in stage II and III colorectal cancer but may predict the better outcome in patients with adjuvant therapy. *BMC Cancer* *13*, 166.

Mittal, B., Tulsyan, S., and Mittal, R. (2016). The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmacogenomics Pers. Med.* *47*.

Miyoshi, H. (2017). Wnt-expressing cells in the intestines: guides for tissue remodeling. *J. Biochem. (Tokyo)* *161*, 19–25.

Montazami, N., Kheir Andish, M., Majidi, J., Yousefi, M., Yousefi, B., Mohamadnejad, L., Shanebandi, D., Estiar, M.A., Khaze, V., Mansoori, B., et al. (2015). siRNA-mediated silencing of MDR1 reverses the resistance to oxaliplatin in SW480/OxR colon cancer cells. *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* *61*, 98–103.

Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E., 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.

Morgan, R.G. (1989). Leucovorin enhancement of the effects of the fluoropyrimidines on thymidylate synthase. *Cancer* *63*, 1008–1012.

Morton, J.J., Bird, G., Refaeli, Y., and Jimeno, A. (2016). Humanized Mouse Xenograft Models: Narrowing the Tumor–Microenvironment Gap. *Cancer Res.* *76*, 6153–6158.

Mukaida, N., and Sasaki, S. (2016). Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World J. Gastroenterol.* *22*, 5301.

Muñoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers. *EMBO J.* *31*, 3079–3091.

Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., and Norris, M. (2007). Role of the MRP1/ABCC1 Multidrug Transporter Protein in Cancer. *IUBMB Life* *59*, 752–757.

Murakami, M., Ohta, T., and Ito, S. (2009). Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1 $\beta$  from enteric glial cells. *J. Neurosci. Res.* *87*, 2095–2104.

Murdoch, C. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* *104*, 2224–2234.

Murgai, M., Giles, A., and Kaplan, R. (2015). Physiological, Tumor, and Metastatic Niches: Opportunities and Challenges for Targeting the Tumor Microenvironment. *Crit. Rev. Oncog.* *20*, 301–314.

Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., et al. (2002). Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* *62*, 28–32.

Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., and Aoki, E. (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol. Signals Recept.* *10*, 336–340.

Nakanishi, M., Montrose, D.C., Clark, P., Nambiar, P.R., Belinsky, G.S., Claffey, K.P., Xu, D., and Rosenberg, D.W. (2008). Genetic Deletion of mPGES-1 Suppresses Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Res.* *68*, 3251–3259.

Nakanishi, M., Menoret, A., Tanaka, T., Miyamoto, S., Montrose, D.C., Vella, A.T., and Rosenberg, D.W. (2011). Selective PGE2 Suppression Inhibits Colon Carcinogenesis and Modifies Local Mucosal Immunity. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* *4*, 1198–1208.

Nami, B., Donmez, H., and Kocak, N. (2016). Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44+/CD24- phenotype breast cancer stem cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* *68*, 419–426.

Nan, H., Hutter, C.M., Lin, Y., Jacobs, E.J., Ulrich, C.M., White, E., Baron, J.A., Berndt, S.I., Brenner, H., Butterbach, K., et al. (2015). Association of Aspirin and NSAID Use With Risk of Colorectal Cancer According to Genetic Variants. *JAMA* *313*, 1133.

Nannizzi, S., Veal, G.J., Giovannetti, E., Mey, V., Ricciardi, S., Ottley, C.J., Del Tacca, M., and Danesi, R. (2010). Cellular and molecular mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by oxaliplatin and pemetrexed in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *66*, 547–558.

Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C.M., Ho, W., Oland, L.D., Tibbles, L.A., Schemann, M., MacNaughton, W.K., Ruhl, A., and Sharkey, K.A. (2006). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *291*, G912–G927.



Neunlist, M., Frieling, T., Rupprecht, C., and Schemann, M. (1998). Polarized enteric submucosal circuits involved in secretory responses of the guinea-pig proximal colon. *J. Physiol.* 506 ( Pt 2), 539–550.

Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G1028–G1036.

Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2006). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G231–G241.

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A., and Savidge, T. (2008). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 263, 577–583.

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 90–100.

Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., Latorre, R., Van Landeghem, L., Coron, E., Derkinderen, P., and De Giorgio, R. (2014). Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions. *Gastroenterology* 147, 1230–1237.

Nishimura, S., Wakabayashi, N., Toyoda, K., Kashima, K., and Mitsufuji, S. (2003). Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig. Dis. Sci.* 48, 1523–1529.

Nita, M.E., Tominaga, O., Nagawa, H., Tsuruo, T., and Muto, T. (1998). Dihydropyrimidine dehydrogenase but not thymidylate synthase expression is associated with resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 45, 2117–2122.

Nogueira, L.T., Costa, D.V.S., Gomes, A.S., Martins, C.S., Silva, A.M.H.P., Coelho-Aguiar, J.M., Castelucci, P., Lima-Júnior, R.C.P., Leitão, R.F.C., Moura-Neto, V., et al. (2017). The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. *J. Neuroinflammation* 14, 79.

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.

O'Callaghan, G., and Houston, A. (2015). Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets?: PGE<sub>2</sub> receptors as targets in cancer therapy. *Br. J. Pharmacol.* 172, 5239–5250.

Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Cuomo, R., and Christofi, F.L. (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 433–449.

O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., et al. (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 57, 4285–4300.

- Ohno, H. (2016). Intestinal M cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 159, 151–160.
- Oldfield, S., Grubb, B.D., and Donaldson, L.F. (2001). Identification of a prostaglandin E2 receptor splice variant and its expression in rat tissues. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 63, 165–173.
- Ong, C.W., Kim, L.G., Kong, H.H., Low, L.Y., Iacopetta, B., Soong, R., and Salto-Tellez, M. (2010). CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* 23, 450.
- Orian-Rousseau, V., and Sleeman, J. (2014). CD44 is a Multidomain Signaling Platform that Integrates Extracellular Matrix Cues with Growth Factor and Cytokine Signals. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 231–254.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* 121, 335–348.
- Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A., and Vernot, J.-P. (2017). Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun. Signal. CCS* 15, 17.
- Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., and Taketo, M.M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc  $\Delta$ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87, 803–809.
- Owens, B.M.J. (2015). Inflammation, Innate Immunity, and the Intestinal Stromal Cell Niche: Opportunities and Challenges. *Front. Immunol.* 6.
- Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I.L., Pavelka, M., Baatar, D., and Tarnawski, A.S. (2002). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat. Med.* 8, 289–293.
- Paldino, E., Tesori, V., Casalbore, P., Gasbarrini, A., and Puglisi, M.A. (2014). Tumor initiating cells and chemoresistance: which is the best strategy to target colon cancer stem cells? *BioMed Res. Int.* 2014, 859871.
- Palmieri, D., Valentino, T., D'Angelo, D., De Martino, I., Postiglione, I., Pacelli, R., Croce, C.M., Fedele, M., and Fusco, A. (2011). HMGA proteins promote ATM expression and enhance cancer cell resistance to genotoxic agents. *Oncogene* 30, 3024–3035.
- Pan, S.-T., Li, Z.-L., He, Z.-X., Qiu, J.-X., and Zhou, S.-F. (2016). Molecular mechanisms for tumor resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*
- Parashurama, N., Lobo, N.A., Ito, K., Mosley, A.R., Habte, F.G., Zabala, M., Smith, B.R., Lam, J., Weissman, I.L., Clarke, M.F., et al. (2012). Remodeling of endogenous mammary epithelium by breast cancer stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 2114–2127.

- Paratore, C., Eichenberger, C., Suter, U., and Sommer, L. (2002). Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 3075–3085.
- Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K.H., Kopan, R., Lewis, J., and Radtke, F. (2011). Dll1- and Dll4-Mediated Notch Signaling Are Required for Homeostasis of Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology* *140*, 1230–1240.e7.
- Pesic, M., and Greten, F.R. (2016). Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Curr. Opin. Cell Biol.* *43*, 55–61.
- Pilati, P., Mocellin, S., Bertazza, L., Galdi, F., Briarava, M., Mammano, E., Tessari, E., Zavagno, G., and Nitti, D. (2012). Prognostic Value of Putative Circulating Cancer Stem Cells in Patients Undergoing Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* *19*, 402–408.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* *138*, 2059–2072.
- Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G., Freyssinet, M., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016a). Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* *150*, 168–180.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P.A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 33–45.
- Popivanova, B.K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C., and Mukaida, N. (2008). Blocking TNF- $\alpha$  in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J. Clin. Invest.*
- Porter, A.J., Wattchow, D.A., Brookes, S.J., and Costa, M. (1997). The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology* *113*, 1916–1923.
- Potten, C.S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* *269*, 518–521.
- Powell, D.W. (2005). Epithelial Cells and Their Neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *289*, G2–G7.
- Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Washington, M.K., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S.E., et al. (2012). The Pan-ErbB Negative Regulator Lrig1 Is an Intestinal Stem Cell Marker that Functions as a Tumor Suppressor. *Cell* *149*, 146–158.
- Pradono, P., Tazawa, R., Maemondo, M., Tanaka, M., Usui, K., Saijo, Y., Hagiwara, K., and Nukiwa, T. (2002). Gene transfer of thromboxane A2 synthase and prostaglandin I2 synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* *62*, 63–66.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* *19*, 1423–1437.

- Quastler, H., and Sherman, F.G. (1959). Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* *17*, 420–438.
- Rademakers, G., Vaes, N., Schonkeren, S., Koch, A., Sharkey, K.A., and Melotte, V. (2017). The role of enteric neurons in the development and progression of colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Ramalingam, S., Daughtridge, G.W., Johnston, M.J., Gracz, A.D., and Magness, S.T. (2012). Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G10–G20.
- Rao, M., Nelms, B.D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M.D., and Corfas, G. (2015). Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system: Transcriptional Profiling PLP1<sup>+</sup> Enteric Glia. *Glia* *63*, 2040–2057.
- Rao, M., Rastelli, D., Dong, L., Chiu, S., Setlik, W., Gershon, M.D., and Corfas, G. (2017). Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but are not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice. *Gastroenterology.*
- Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J., and Cvitkovic, E. (2002). Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin1. *Mol. Cancer Ther.* *1*, 227–235.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 1603–1616.
- 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.
- Rigas, B., Goldman, I.S., and Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J. Lab. Clin. Med.* *122*, 518–523.
- Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., and Solcia, E. (2004). The “Normal” Endocrine Cell of the Gut: Changing Concepts and New Evidences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1014*, 1–12.
- Rivory, L.P. (1996). IRINOTECAN (CPT-11): A BRIEF OVERVIEW. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *23*, 1000–1004.
- Robinson, A.M., Stojanovska, V., Rahman, A.A., McQuade, R.M., Senior, P.V., and Nurgali, K. (2016). Effects of Oxaliplatin Treatment on the Enteric Glial Cells and Neurons in the Mouse Ileum. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *64*, 530–545.
- Rodriguez-Lagunas, M.J., Martin-Venegas, R., Moreno, J.J., and Ferrer, R. (2010). PGE2 promotes Ca<sup>2+</sup>-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *AJP Cell Physiol.* *299*, C324–C334.
- Rothenberg, M.E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J.J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., Kulkarni, S., Sim, S., Qian, D., et al. (2012). Identification of a cKit<sup>+</sup> Colonic Crypt Base Secretory Cell That Supports Lgr5<sup>+</sup> Stem Cells in Mice. *Gastroenterology* *142*, 1195–1205.e6.

- Rothkamm, K., Barnard, S., Moquet, J., Ellender, M., Rana, Z., and Burdak-Rothkamm, S. (2015). DNA damage foci: Meaning and significance: DNA Damage Foci. *Environ. Mol. Mutagen.* *56*, 491–504.
- Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.-E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P., and Meade, T.W. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet* *376*, 1741–1750.
- Ruan, D., and So, S.-P. (2014). Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Life Sci.* *116*, 43–50.
- Rubin, D.C., Shaker, A., and Levin, M.S. (2012). Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front. Immunol.* *3*.
- ruhl, a. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 777–790.
- Rühl, A., Franzke, S., Collins, S.M., and Stremmel, W. (2001). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *280*, G1163–G1171.
- Rustgi, A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* *21*, 2525–2538.
- Sahlberg, S.H., Spiegelberg, D., Glimelius, B., Stenerlöw, B., and Nestor, M. (2014). Evaluation of Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT Isoforms and Radiation Resistance in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE* *9*, e94621.
- Sakthianandeswaren, A., Christie, M., D'Andreti, C., Tsui, C., Jorissen, R.N., Li, S., Fleming, N.I., Gibbs, P., Lipton, L., Malaterre, J., et al. (2011). PHLDA1 Expression Marks the Putative Epithelial Stem Cells and Contributes to Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Res.* *71*, 3709–3719.
- Salonga, D., Danenberg, K.D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Lenz, H.-J., Leichman, C.G., Leichman, L., Diasio, R.B., et al. (2000). Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin. Cancer Res.* *6*, 1322–1327.
- Sánchez-Mejías, A., Watanabe, Y., M Fernández, R., López-Alonso, M., Antiñolo, G., Bondurand, N., and Borrego, S. (2010). Involvement of SOX10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *88*, 507–514.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* *40*, 915–920.
- Sankasard, S., Leartprasertsuk, N., Vinitketkumnun, U., and Cressey, R. (2004). Expression of cyclooxygenase-1 and-2 and clinicopathologic features of colorectal cancer in northern Thailand. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *5*, 44–49.
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., and Hla, T. (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* *55*, 3785–3789.

San Roman, A.K., Jayewickreme, C.D., Murtaugh, L.C., and Shivdasani, R.A. (2014). Wnt Secretion from Epithelial Cells and Subepithelial Myofibroblasts Is Not Required in the Mouse Intestinal Stem Cell Niche In Vivo. *Stem Cell Rep.* 2, 127–134.

Sasaki, Y., Kamei, D., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M., and Hara, S. (2012). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is involved in multiple steps of colon carcinogenesis. *Oncogene* 31, 2943–2952.

Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007). Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132, 1344–1358.

Sawers, L., Ferguson, M.J., Ihrig, B.R., Young, H.C., Chakravarty, P., Wolf, C.R., and Smith, G. (2014). Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) directly influences platinum drug chemosensitivity in ovarian tumour cell lines. *Br. J. Cancer* 111, 1150–1158.

Scharer, O.D. (2013). Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012609–a012609.

Schepers, A.G., Vries, R., Van Den Born, M., Van De Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J.* 30, 1104–1109.

Schepers, A.G., Snippert, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337, 730–735.

Schrey, M.P., and Patel, K.V. (1995). Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators. *Br. J. Cancer* 72, 1412–1419.

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. (2013). Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell* 152, 25–38.

See, N.A., Epstein, M.L., Dahl, J.L., and Bass, P. (1990). The myenteric plexus regulates cell growth in rat jejunum. *J. Auton. Nerv. Syst.* 31, 219–229.

Sémont, A., Demarquay, C., Bessout, R., Durand, C., Benderitter, M., and Mathieu, N. (2013). Mesenchymal Stem Cell Therapy Stimulates Endogenous Host Progenitor Cells to Improve Colonic Epithelial Regeneration. *PLoS ONE* 8, e70170.

Shaffer, B.C., Gillet, J.-P., Patel, C., Baer, M.R., Bates, S.E., and Gottesman, M.M. (2012). Drug resistance: Still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist. Updat.* 15, 62–69.

Sheehan, D., MEADE, G., FOLEY, V.M., and others (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.

Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D., and DuBois, R.N. (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58, 362–366.

Shenoy, A., Butterworth, E., and Huang, E.H. (2012). ALDH as a Marker for Enriching Tumorigenic Human Colonic Stem Cells. In *Progenitor Cells*, K.A. Mace, and K.M. Braun, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 373–385.

Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., and Takeyama, H. (2015). Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* 7, 2443–2458.

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.

Shirazi-Beechey, S.P., Moran, A.W., Batchelor, D.J., Daly, K., and Al-Rammahi, M. (2011). Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc. Nutr. Soc.* 70, 185–193.

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. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133– metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest.*

Shoji, Y. (2004). Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut* 53, 1151–1158.

Sica, A., Erreni, M., Allavena, P., and Porta, C. (2015). Macrophage polarization in pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4111–4126.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.

smith, t. k., spencer, n. j., hennig, g. w., and dickson, e. j. (2007). Recent advances in enteric neurobiology: mechanosensitive interneurons. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 869–878.

Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* 108, 73–112.

Smith, N.R., Davies, P.S., Levin, T.G., Gallagher, A.C., Keene, D.R., Sengupta, S.K., Wiegand, N., El Rassi, E., and Wong, M.H. (2017). Cell adhesion molecule CD166/ALCAM functions within the crypt to orchestrate murine intestinal stem cell homeostasis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 389–409.

Snippert, H.J., van Es, J.H., van den Born, M., Begthel, H., Stange, D.E., Barker, N., and Clevers, H. (2009). Prominin-1/CD133 Marks Stem Cells and Early Progenitors in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* 136, 2187–2194.e1.

- Sobrero, A., and Bennicelli, E. (2010). Chemotherapy: which drug and when? *Ann. Oncol.* *21*, vii130-vii133.
- Sofroniew, M.V. (2015). Astrogliosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a020420.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 1065–1073.
- Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2001). Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat. Med.* *7*, 1048–1051.
- Spencer, N., McCarron, S.L., and Smith, T.K. (1999). Sympathetic inhibition of ascending and descending interneurons during the peristaltic reflex in the isolated guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* *519*, 539–550.
- Srinivas, U.S., Dyczkowski, J., Beisbarth, T., Gaedcke, J., Mansour, W.Y., Borgmann, K., and Dobbstein, M. (2015). 5-Fluorouracil sensitizes colorectal tumor cells towards double stranded DNA breaks by interfering with homologous recombination repair. *Oncotarget* *6*, 12574.
- Stanislav, J., Mls, J., Červinka, M., and Rudolf, E. (2013). The role of autophagic cell death and apoptosis in irinotecan-treated p53 null colon cancer cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* *13*, 811–820.
- Stenkamp-Strahm, C., Patterson, S., Boren, J., Gericke, M., and Balemba, O. (2013). High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine. *Auton. Neurosci.* *177*, 199–210.
- Stewart, S.L., Wike, J.M., Kato, I., Lewis, D.R., and Michaud, F. (2006). A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998–2001. *Cancer* *107*, 1128–1141.
- Stracker, T.H., Roig, I., Knobel, P.A., and Marjanović, M. (2013). The ATM signaling network in development and disease. *Front. Genet.* *4*.
- Stryker, S.J., Wolff, B.G., Culp, C.E., Libbe, S.D., Ilstrup, D.M., and MacCarty, R.L. (1987). Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* *93*, 1009–1013.
- Sun, Z., Zhou, N., Han, Q., Zhao, L., Bai, C., Chen, Y., Zhou, J., and Zhao, R.C. (2015). MicroRNA-197 influences 5-fluorouracil resistance via thymidylate synthase in colorectal cancer. *Clin. Transl. Oncol.* *17*, 876–883.
- Tabe, Y., and Konopleva, M. (2014). Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br. J. Haematol.* *164*, 767–778.
- 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.
- Takeuchi, K. (2014). Prophylactic effects of prostaglandin E2 on NSAID-induced enteropathy—role of EP4 receptors in its protective and healing-promoting effects. *Curr. Opin. Pharmacol.* *19*, 38–45.
- Takeuchi, K., Miyazawa, T., Tanaka, A., Kato, S., and Kunikata, T. (2002). Pathogenic importance of intestinal hypermotility in NSAID-induced small intestinal damage in rats. *Digestion* *66*, 30–41.



Tamas, K., Walenkamp, A.M.E., de Vries, E.G.E., van Vugt, M.A.T.M., Beets-Tan, R.G., van Etten, B., de Groot, D.J.A., and Hospers, G.A.P. (2015). Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat. Rev.* *41*, 671–679.

Tanaka, K., and Hirota, T. (2016). Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1866*, 64–75.

Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E<sub>2</sub> Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *275*, 32775–32782.

Tao, Z., Chen, S., Mao, G., Xia, H., Huang, H., and Ma, H. (2016). The PDRG1 is an oncogene in lung cancer cells, promoting radioresistance via the ATM-P53 signaling pathway. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *83*, 1471–1477.

Târtea, E.A., Florescu, C., Donoiu, I., Pirici, D., Mihailovici, A.R., Albu, V.C., Bălşeanu, T.A., Iancău, M., Badea, C.D., Vere, C.C., et al. (2017). Implications of inflammation and remodeling of the enteric glial cells in colorectal adenocarcinoma. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* *58*, 473–480.

Tellez-Gabriel, M., Ory, B., Lamoureux, F., Heymann, M.-F., and Heymann, D. (2016). Tumour Heterogeneity: The Key Advantages of Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 2142.

Terashima, M., Fujiwara, H., Takagane, A., Abe, K., Irinoda, T., Nakaya, T., Yonezawa, H., Oyama, K., Saito, K., Kanzaki, N., et al. (2003). Prediction of sensitivity to fluoropyrimidines by metabolic and target enzyme activities in gastric cancer. *Gastric Cancer* *6*, 71–81.

Tessner, T.G., Cohn, S.M., Schloemann, S., and Stenson, W.F. (1998). Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice. *Gastroenterology* *115*, 874–882.

Tessner, T.G., Muhale, F., Riehl, T.E., Anant, S., and Stenson, W.F. (2004). Prostaglandin E<sub>2</sub> reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J. Clin. Invest.* *114*, 1676–1685.

Tetteh, P.W., Basak, O., Farin, H.F., Wiebrands, K., Kretschmar, K., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., de Sauvage, F., van Es, J.H., et al. (2016). Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Cell Stem Cell* *18*, 203–213.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* *478*, 255–259.

Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., and Scheuermann, D.W. (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *118*, 331–340.

Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., et al. (2007). Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell* *1*, 389–402.

Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., et al. (2014). CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell* *14*, 342–356.

Tomicic, M.T., and Kaina, B. (2013). Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1835*, 11–27.

Toscano, F., Parmentier, B., Fajoui, Z.E., Estornes, Y., Chayvialle, J.-A., Saurin, J.-C., and Abello, J. (2007). p53 dependent and independent sensitivity to oxaliplatin of colon cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 392–406.

Touil, Y., Igoudjil, W., Corvaisier, M., Dessein, A.-F., Vandomme, J., Monte, D., Stechly, L., Skrypek, N., Langlois, C., Grard, G., et al. (2014). Colon Cancer Cells Escape 5FU Chemotherapy-Induced Cell Death by Entering Stemness and Quiescence Associated with the c-Yes/YAP Axis. *Clin. Cancer Res.* *20*, 837–846.

Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C.L., Galmitche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil.* *15*, 239–242.

Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.-P.J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 8681–8686.

Triolo, D. (2006). Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J. Cell Sci.* *119*, 3981–3993.

Tseng, W., Leong, X., and Engleman, E. (2007). Orthotopic Mouse Model of Colorectal Cancer. *J. Vis. Exp.*

Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., and Cuomo, R. (2014). Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* *63*, 105–115.

Turinetto, V., and Giachino, C. (2015). Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* *43*, 2489–2498.

Tuy, H., Shiomi, H., Mukaisho, K., Naka, S., Shimizu, T., Sonoda, H., Mekata, E., Endo, Y., Kurumi, Y., Sugihara, H., et al. (2016). ABCG2 expression in colorectal adenocarcinomas may predict resistance to irinotecan. *Oncol. Lett.*

Vaes, N., Lentjes, M.H.F.M., Gijbels, M.J., Rademakers, G., Daenen, K.L., Boesmans, W., Wouters, K. a. D., Geuzens, A., Qu, X., Steinbusch, H.P.J., et al. (2017). NDRG4, an early detection marker for colorectal cancer, is specifically expressed in enteric neurons. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *29*.

Valeri, N., Gasparini, P., Braconi, C., Paone, A., Lovat, F., Fabbri, M., Sumani, K.M., Alder, H., Amadori, D., Patel, T., et al. (2010). MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 21098–21103.

Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Teusan, R., Léger, J., Guisle, I., Houlgatte, R., and Neunlist, M. (2009). Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* *10*, 507.

Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahe, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G976–G987.

Van Landeghem, L., Santoro, M.A., Krebs, A.E., Mah, A.T., Dehmer, J.J., Gracz, A.D., Scull, B.P., McNaughton, K., Magness, S.T., and Lund, P.K. (2012). Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G1111–G1132.

Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M.R., Kemper, K., Alea, M.P., 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.

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. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* *12*, 468–476.

Viennois, E., Chen, F., and Merlin, D. (2013). NF- $\kappa$ B pathway in colitis-associated cancers. *Transl. Gastrointest. Cancer* *2*, 21.

Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A.-M., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., Staedel, C., and Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-XL in addition to Bax and p53 status. *Int. J. Cancer* *98*, 498–504.

Voronov, E., and Apte, R.N. (2015). IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* *8*, 187–200.

Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 181–193.

Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell* *6*, 285–295.

Wang, D., Buchanan, F.G., Wang, H., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2005). Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res.* *65*, 1822–1829.

Wang, R., Bhattacharya, R., Ye, X., Fan, F., Boulbes, D.R., Xia, L., and Ellis, L.M. (2017). Endothelial cells activate the cancer stem cell-associated NANOG/P8 pathway in colorectal cancer cells in a paracrine fashion. *Mol. Oncol.* *11*, 1023–1034.

- Wang, T., Chen, Z., Zhu, Y., Pan, Q., Liu, Y., Qi, X., Jin, L., Jin, J., Ma, X., and Hua, D. (2015). Inhibition of Transient Receptor Potential Channel 5 Reverses 5-Fluorouracil Resistance in Human Colorectal Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *290*, 448–456.
- Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., et al. (1999). Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* *59*, 5093–5096.
- Webster, M.J., Devic, S., Vuong, T., Han, D.Y., Scanderbeg, D., Choi, D., Song, B., and Song, W.Y. (2013). HDR brachytherapy of rectal cancer using a novel grooved-shielding applicator design. *Med. Phys.* *40*.
- Wei, H.-J., Zeng, R., Lu, J.-H., Lai, W.-F.T., Chen, W.-H., Liu, H.-Y., Chang, Y.-T., and Deng, W.-P. (2015). Adipose-derived stem cells promote tumor initiation and accelerate tumor growth by interleukin-6 production. *Oncotarget* *6*, 7713.
- Weichert, W. (2004). ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J. Clin. Pathol.* *57*, 1160–1164.
- Weichert, W. (2005). Cytoplasmic CD24 Expression in Colorectal Cancer Independently Correlates with Shortened Patient Survival. *Clin. Cancer Res.* *11*, 6574–6581.
- Weiswald, L.-B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* *17*, 1–15.
- Welch, M.G., Margolis, K.G., Li, Z., and Gershon, M.D. (2014). Oxytocin regulates gastrointestinal motility, inflammation, macromolecular permeability, and mucosal maintenance in mice. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *307*, G848–G862.
- Westphalen, C.B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D.J., Nuber, A.H., Brandtner, A., Setlik, W., Remotti, H., Muley, A., et al. (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer–initiating cells. *J. Clin. Invest.* *124*, 1283–1295.
- Wilhelmsen, I. (2000). Brain-gut axis as an example of the bio-psycho-social model. *Gut* *47*, iv5–iv7.
- Williams, J.R., Zhang, Y., Russell, J., Koch, C., and Little, J.B. (2007). Human tumor cells segregate into radiosensitivity groups that associate with ATM and TP53 status. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *46*, 628–638.
- Williams, J.R., Zhang, Y., Zhou, H., Russell, J., Gridley, D.S., Koch, C.J., and Little, J.B. (2008). Genotype-dependent radiosensitivity: clonogenic survival, apoptosis and cell-cycle redistribution. *Int. J. Radiat. Biol.* *84*, 151–164.
- Williams, J.R., Zhang, Y., Zhou, H., Gridley, D.S., Koch, C.J., Dicello, J.F., Slater, J.M., and Little, J.B. (2010). Tumor response to radiotherapy is dependent on genotype-associated mechanisms in vitro and in vivo. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* *5*, 71.
- Woodward, D.F., Jones, R.L., and Narumiya, S. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. *Pharmacol. Rev.* *63*, 471–538.

- Wu, J., Lu, L.-Y., and Yu, X. (2010). The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell* 1, 117–123.
- Wyatt, M.D., and Wilson, D.M. (2009). Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 788–799.
- Xia, D., Wang, D., Kim, S.-H., Kato, H., and DuBois, R.N. (2012). Prostaglandin E2 promotes intestinal tumor growth via DNA methylation. *Nat. Med.* 18, 224–226.
- Xiao, W., Wang, W., Chen, W., Sun, L., Li, X., Zhang, C., and Yang, H. (2014). GDNF is involved in the barrier-inducing effect of enteric glial cells on intestinal epithelial cells under acute ischemia reperfusion stimulation. *Mol. Neurobiol.* 50, 274–289.
- Xiong, B., Ma, L., Hu, X., Zhang, C., and Cheng, Y. (2014). Characterization of side population cells isolated from the colon cancer cell line SW480. *Int. J. Oncol.*
- Xu, Y. (2002). Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann. Oncol.* 13, 1841–1851.
- Yan, H.Q., Huang, X.B., Ke, S.Z., Jiang, Y.N., Zhang, Y.H., Wang, Y.N., Li, J., and Gao, F.G. (2014a). Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation. *Cancer Sci.* 105, 1220–1227.
- Yan, H.Q., Huang, X.B., Ke, S.Z., Jiang, Y.N., Zhang, Y.H., Wang, Y.N., Li, J., and Gao, F.G. (2014b). Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation. *Cancer Sci.* 105, 1220–1227.
- Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva, M.R., et al. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 466–471.
- Yang, S., Wang, B., Guan, C., Wu, B., Cai, C., Wang, M., Zhang, B., Liu, T., and Yang, P. (2011a). Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J. Leukoc. Biol.* 89, 85–91.
- Yang, Y., Xia, F., Hermance, N., Mabb, A., Simonson, S., Morrissey, S., Gandhi, P., Munson, M., Miyamoto, S., and Kelliher, M.A. (2011b). A cytosolic ATM/NEMO/RIP1 complex recruits TAK1 to mediate the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/MAPK-activated protein 2 responses to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2774–2786.
- Yang, Y., Tang, L.-Q., and Wei, W. (2013). Prostanoids receptors signaling in different diseases/cancers progression. *J. Recept. Signal Transduct.* 33, 14–27.
- Yang, Y., Wang, G., Zhu, D., Huang, Y., Luo, Y., Su, P., Chen, X., and Wang, Q. (2017). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotype induced by Twist1 contribute to acquired resistance to irinotecan in colon cancer. *Int. J. Oncol.*
- Yeung, T.M., Gandhi, S.C., Wilding, J.L., Muschel, R., and Bodmer, W.F. (2010). Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3722–3727.

- Yoshida, N., Yoshikawa, T., Nakagawa, S., Sakamoto, K., Nakamura, Y., Naito, Y., and Kondo, M. (1999). Effect of shear stress and a stable prostaglandin I<sub>2</sub> analogue on adhesive interactions of colon cancer cells and endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* *117*, 430.
- Yoshida, T., Ohki, S., Kanazawa, M., Mizunuma, H., Kikuchi, Y., Satoh, H., Andoh, Y., Tsuchiya, A., and Abe, R. (1998). Inhibitory effects of prostaglandin D<sub>2</sub> against the proliferation of human colon cancer cell lines and hepatic metastasis from colorectal cancer. *Surg. Today* *28*, 740–745.
- Young, R.L. (2011). Sensing Via Intestinal Sweet Taste Pathways. *Front. Neurosci.* *5*.
- Yu, Y.-B. (2014). Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J. Gastroenterol.* *20*, 11273.
- Zaman, G.J., Lankelma, J., vAN Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Elferink, R.O., Baas, F., and Borst, P. (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 7690–7694.
- Zeilstra, J., Joosten, S.P., Dokter, M., Verwiel, E., Spaargaren, M., and Pals, S.T. (2008). Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc (Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* *68*, 3655–3661.
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M.W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J.M., Yan, P.S., Huang, T.H.-M., and Nephew, K.P. (2008). Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Res.* *68*, 4311–4320.
- Zhang, Y., Sime, W., Juhas, M., and Sjölander, A. (2013). Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *Eur. J. Cancer* *49*, 3320–3334.
- Zhou, J.-Y., Chen, M., Ma, L., Wang, X., Chen, Y.-G., and Liu, S.-L. (2016). Role of CD44<sup>high</sup>/CD133<sup>high</sup> HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget* *7*, 7657.
- Zhou, Y., Wan, G., Spizzo, R., Ivan, C., Mathur, R., Hu, X., Ye, X., Lu, J., Fan, F., Xia, L., et al. (2014). miR-203 induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells by negatively regulating ATM kinase. *Mol. Oncol.* *8*, 83–92.
- Zhou, Z., Nimeiri, H.S., and Benson, A.B. (2013). Preoperative chemotherapy for locally advanced resectable colon cancer - a new treatment paradigm in colon cancer? *Ann. Transl. Med.* *1*.
- Zhu, L., Gibson, P., Currle, D.S., Tong, Y., Richardson, R.J., Bayazitov, I.T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D.W., and Gilbertson, R.J. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* *457*, 603–607.
- Zhu, M., Zhu, Y., and Lance, P. (2013). TNF $\alpha$ -activated stromal COX-2 signalling promotes proliferative and invasive potential of colon cancer epithelial cells. *Cell Prolif.* *46*, 374–381.
- Zhu, M.M., Tong, J.L., Xu, Q., Nie, F., Xu, X.T., Xiao, S.D., and Ran, Z.H. (2012). Increased JNK1 Signaling Pathway Is Responsible for ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Human Colon Cancer. *PLoS ONE* *7*, e41763.

Zucoloto, S., Diaz, J.A., Oliveira, J.S., Muccilo, G., Sales Neto, V.N., and Kajiwara, J.K. (1988). Effect of chemical ablation of myenteric neurones on intestinal cell proliferation. *Cell Tissue Kinet.* 21, 213–219.

# Thèse de Doctorat

Simon VALES

## Impact des cellules gliales entériques sur les cellules souches cancéreuses coliques et processus de carcinogenèse associés

Enteric glial cell impact on colon cancer stem cells and associated carcinogenesis

### Résumé

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont une sous-population de cellules tumorales qui possèdent un fort pouvoir tumorigénique, métastatique, ainsi qu'une résistance élevée aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie. Ainsi, les CSC sont considérées comme responsables de l'initiation, de la progression et des récurrences des cancers. Des études récentes ont montré que le microenvironnement tumoral (MET) joue un rôle clé dans la régulation des CSC. Parmi les cellules du MET des cancers colorectaux se trouvent les cellules gliales entériques (CGE) qui sont essentielles au maintien des fonctions de l'épithélium digestif en situation physiologique. Cependant leur impact sur les processus de carcinogenèse colique est peu connu à ce jour. Ce travail de thèse a pour but de déterminer l'impact des CGE sur les fonctions des CSC et les processus de carcinogenèse associés. En combinant des approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons montré que les cellules tumorales induisent l'acquisition d'un phénotype protumorigénique par les CGE via l'IL-1. Nous avons également mis en évidence que les CGE ainsi 'activées' par la tumeur stimulent la capacité des CSC à initier la formation de tumeurs via la sécrétion de PGE2, en activant des voies EP4/EGFR-dépendantes dans les CSC. Dans une deuxième étude, nous avons montré que les CGE stimulent la chimiorésistance des CSC en augmentant leur capacité à initier la formation de tumeurs en présence de 5-fluorouracil ou d'oxaliplatine via une voie ATM-dépendante. Ces travaux montrent que les CGE sont une composante clé du MET qui, une fois remodelée par la tumeur, stimule les CSC et ainsi favorise les processus de carcinogenèse colique associés.

### Mots clés

Cancer colorectal, cellule souche cancéreuse, cellule gliale entérique, microenvironnement tumoral

### Abstract

Cancer stem cells (CSC) are a subset of tumor cells that possess increased tumorigenic and metastatic abilities, as well as enhanced resistance to chemotherapy and radiotherapy. Thus CSC are considered as responsible for tumor initiation, metastasis and relapse. Compelling evidence have shown that the tumor microenvironment tightly controls CSC functions. Among the cells of the colorectal tumor microenvironment are enteric glial cells (EGC) that are potent regulators of barrier functions in a healthy intestine. However, little is known about the impact of EGC on colorectal carcinogenesis. Therefore the main objective of my PhD project was to explore EGC impact on CSC functions and associated carcinogenesis processes. Using *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrated that tumor cells activate EGC to acquire a pro-tumorigenic phenotype via the release of IL-1. We also showed that tumor-activated EGC increase CSC ability to initiate the formation of a tumor via the production of PGE2 and the activation of EP4/EGFR-dependent pathways in CSC. In a second study, we demonstrated that EGC increase CSC ability to give rise to tumors in the presence of 5-fluorouracil and oxaliplatin via an ATM-dependent pathway. Altogether our data demonstrate that EGC are a key component of the tumor microenvironment that, once activated by the tumor, stimulates CSC and thus promotes associated carcinogenesis.

### Key Words

Colorectal cancer, cancer stem cell, enteric glial cell, tumor microenvironment