Fonction et mode d'action du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers de l'intestin

Camille Balbinot

▶ **To cite this version:**

Camille Balbinot. Fonction et mode d'action du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers de l'intestin. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ006 . tel-01559023

HAL Id: tel-01559023

https://theses.hal.science/tel-01559023

Submitted on 10 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

Inserm U1113 : Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques

THÈSE présentée par :

Camille BALBINOT

soutenue le : **20 Janvier 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Fonction et mode d'action du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers de l'intestin

THÈSE dirigée par :

Mme DULUC Isabelle	CR-HDR, Inserm U1113 - Strasbourg
M. FREUND Jean-Noël	DR, Inserm U1113 - Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. BLACHE Philippe	DR, Inserm U1194 - Montpellier
M. OGIER-DENIS Eric	DR, Inserm U1149 - Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme DONTENWILL Monique	DR, CNRS 7213 - Strasbourg
Mme ORIAN-ROUSSEAU Véronique	Professeur, KIT - Karlsruhe, Allemagne

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

Inserm U1113 : Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques

THÈSE présentée par :

Camille BALBINOT

soutenue le : **20 Janvier 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Fonction et mode d'action du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers de l'intestin

THÈSE dirigée par :

Mme DULUC Isabelle	CR-HDR, Inserm U1113 - Strasbourg
M. FREUND Jean-Noël	DR, Inserm U1113 - Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. BLACHE Philippe	DR, Inserm U1194 - Montpellier
M. OGIER-DENIS Eric	DR, Inserm U1149 - Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme DONTENWILL Monique	DR, CNRS 7213 - Strasbourg
Mme ORIAN-ROUSSEAU Véronique	Professeur, KIT - Karlsruhe, Allemagne

Ce travail a été financé par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et par la Ligue nationale contre le cancer.

A mes parents.

REMERCIEMENTS

Réaliser une thèse est un défi que je me suis lancé il y a bien des années. Une aventure scientifique certes, mais avec une dimension humaine considérable que j'ignorais alors. Il m'est donc impossible de clore ce chapitre de ma vie sans prendre le temps de remercier toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide, leur soutien et leurs conseils et sans lesquelles ce projet qui me tenait tant à cœur n'aurait pu se concrétiser.

A Madame Monique Dontenwill, Madame Véronique Orian, Monsieur Philippe Blache et Monsieur Eric Ogier-Denis. Je vous remercie d'avoir accepté avec enthousiasme de participer à mon jury de thèse et d'avoir consacré de votre précieux temps à la lecture critique de ce manuscrit.

A tous les membres de l'équipe, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler au quotidien et qui m'ont permis de progresser dans mes recherches dans une ambiance et un cadre de travail privilégiés :

A Isabelle D, ma directrice de thèse. Tes qualités humaines et scientifiques font de toi une directrice de thèse exceptionnelle. Par tes mots réconfortants, tu as très rapidement su apaiser mes craintes à travailler sur des modèles animaux ; tu m'as par la suite transmis plusieurs de tes nombreuses compétences en expérimentation animale, devant lesquelles on ne peut qu'être admiratif. Au-delà de ce savoir-faire, tu as partagé plus d'une fois mes joies et mes peines et m'as toujours conseillée justement sur des problèmes d'ordre scientifique et personnel. Pour ta confiance, ton écoute, ta disponibilité, pour nos échanges, et pour tant d'autres choses encore, merci infiniment.

A Jean-Noël, mon co-directeur de thèse et directeur d'unité, qui, malgré un emploi du temps surchargé, a toujours fait preuve d'une très grande disponibilité et qui ne ménage pas ses efforts pour que chacun puisse travailler dans les meilleures conditions. Je vous remercie sincèrement de la confiance que vous m'avez témoignée en me confiant ce projet, pour lequel vous avez toujours manifesté un intérêt très marqué. De par votre enthousiasme communicatif, votre volonté à m'intégrer à vos réflexions par des discussions scientifiques enrichissantes et productives, vos encouragements constants et vos conseils toujours justes et

constructifs, vous m'avez véritablement confortée dans mon choix de poursuivre une carrière dans la recherche. Pour ces raisons, vous m'inspirez une grande estime et un profond respect.

A toutes les « poulettes » : Annick, Claire, Elisabeth, Isabelle D, Isabelle Gi, Isabelle Gr, Léo, et Véro. Ensemble, vous êtes le rayon de soleil du laboratoire. Grâce à vous toutes, chaque problème, qu'il soit d'ordre scientifique, administratif, logistique, voire même personnel, a sa solution. C'est un véritable privilège d'avoir pu travailler à vos côtés, dans une ambiance aussi détendue et chaleureuse. Une pensée toute particulière pour Elisabeth, la petite fée du laboratoire à la gentillesse, au professionnalisme et à la disponibilité exemplaires qui a très largement contribué à la réussite de ce projet; et pour Claire, qui m'a prise sous son aile au cours de mon stage de Master et qui m'a initiée au travail de la recherche.

A Marie, dont le départ du laboratoire a laissé un grand vide. Tu as été pour moi une véritable source d'inspiration : perfectionniste, dévouée, bienveillante, toujours de bon conseil. Ta bonne humeur et ta joie de vivre à toute épreuve forcent le respect et sont une véritable leçon de vie. Merci de la confiance que tu m'as accordée pour la poursuite du projet miniCdx2. J'espère ne pas t'avoir déçue ! Je te souhaite le meilleur pour ta retraite.

A Asmaa, avec qui j'ai partagé, plus qu'un bureau et une paillasse, un projet de recherche passionnant mais aussi, et surtout, les joies de devenir maman pendant la thèse. Merci à toi pour ton aide précieuse, ta présence à chaque instant, et ton soutien. Par-dessus tout, merci pour tous ces moments inoubliables passés dans et en dehors du laboratoire, en particulier lors de nos escapades en congrès. J'espère sincèrement que notre amitié dépassera les murs de l'unité.

A tous les autres doctorants : Susanna, Marine, Bénédicte, Ahlam, Emilie et Jean-Baptiste. Merci à tous pour votre gentillesse et votre bonne humeur communicative. Travailler à vos côtés est synonyme d'entre-aide et de solidarité, ingrédients indispensables à la réussite d'une thèse et qui font de vous des collègues extraordinaires. Je vous souhaite de belles découvertes dans vos projets de thèse respectifs. Une pensée toute particulière pour Susanna, sans qui je n'aurais probablement jamais réussi à faire la mise en page de ce manuscrit !

A mes anciens compagnons de route : Mathilde la téméraire et Christine l'aventurière, pour votre aide et vos conseils dès mon arrivée au laboratoire.

A tous les membres de l'équipe de Christian Gaiddon. Merci pour vos conseils scientifiques avisés au cours de nos réunions hebdomadaires qui m'ont permis de surmonter

de nombreux problèmes techniques, et pour ces bons moments passés en dehors de l'unité, en particulier lors des séminaires des doctorants.

Aux petites mains de l'unité, Michèle, Pierre, Fanny et Solène qui prennent grand soin de nos animaux et qui veillent à ce que l'on ne manque jamais de rien.

Parce que rien n'aurait été possible sans mes proches :

A mes plus fidèles amis, de Paris, de Toulouse, de Lyon, de Lorraine, et d'ailleurs. Merci pour votre amitié sincère et partagée, pour votre soutien indéfectible, et pour tous ces moments inoubliables passés à vos côtés et pour ceux qui nous attendent.

A ma famille et belle-famille, qui m'ont toujours encouragée et soutenue fidèlement, alors que l'essence même de mon projet de thèse leur échappait. Une pensée particulière pour ma twinette / co(u)sine / demi-sœur génétique, qui, malgré les centaines de kilomètres qui nous séparent, est toujours présente dans les bons et les mauvais moments.

A mes disparus, partis bien trop tôt, qui font ma fierté et m'ont donné l'envie de me battre.

A Mathieu, mon présent et mon futur qui rend ma vie exceptionnelle. Il me faudrait écrire une deuxième thèse pour te remercier d'être présent au quotidien, de partager mes joies et peines, de prendre soin de nous, d'avoir accepté que je m'éloigne le temps de la rédaction de ce manuscrit, et pour tant d'autres choses encore. Merci d'être ce que tu es.

A Hugo, le deuxième amour de ma vie, ma force, ma faiblesse, et indéniablement mon plus beau résultat de thèse. Merci d'avoir pointé ton petit nez inopinément, merci pour tes câlins et tes éclats de rire qui sont un véritable souffle de vie, et merci de m'avoir aidée à relativiser tous mes problèmes, qui finalement n'en étaient pas.

Enfin, et surtout, merci à mes parents, à qui je dois tout et plus encore. Merci à toi maman, et à toi papa, pour votre soutien inconditionnel, votre écoute, votre patience, et vos nombreux sacrifices durant toutes ces années. Vous avez toujours cru en moi quand moi-même je n'y croyais plus. Cette thèse est la vôtre autant que la mienne.

A tous, merci.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS 1

TABLE DES ILLUSTRATIONS 7

INTRODUCTION 9

Chapitre 1 : La physiologie intestinale 11
1. Structure et fonction de l'intestin 11
1.1 L'intestin grêle et le côlon 11
1.2 Les cellules de l'épithélium intestinal 11
1.2.1 Les cellules différenciées 11
1.2.2 Les cellules souches 15
2. Bases moléculaires de l'homéostasie intestinale 26
2.1 La voie Wnt 26
2.1.1 La voie Wnt canonique 26
2.1.2 Les voies Wnt non canoniques 29
2.2 La voie Notch 32
2.2.1 Description de la voie 32
2.2.2 Profil d'expression et fonctions de la voie Notch 34
2.3 La voie BMP 35
2.3.1 Description de la voie 35
2.3.2 Profil d'expression et fonctions de la voie BMP 37
2.4 La voie Hedgehog 37
2.4.1 Description de la voie 37
2.4.2 Profil d'expression et fonction 39
2.5 La voie Hippo/YAP 40
2.5.1 Description de la voie 40
2.5.2 Profil d'expression et fonction 42
2.6 Interactions entre les voies de signalisation 43

Chapitre 2 : Les cancers de l'intestin 45
1. Epidémiologie et classification anatomopathologique 45
1.1 Epidémiologie et facteurs de risques 45
1.2 Classification histologique 45
1.2.1 Le stade tumoral 46
1.2.2 Le grade tumoral 46
2. Altérations chromosomiques dans les CCR 46
2.1 Classification chromosomique des CCR 48
2.1.1 Les CCR de type CIN 48
2.1.2 Les CCR de type MSI 51
2.1.3 Les cancers de type CIMP 52
2.1.4 Les autres formes héréditaires de CCR 54
2.2 Modèles murins de CCR 55
2.2.1 Les modèles génétiques 55

2.2.2 Les modèles chimio-induits 62
3. Apport des données transcriptomiques 64
4. L'écosystème des CCR 67
4.1 L'hétérogénéité tumorale : concept de la cellule souche cancéreuse 67
4.1.1 Cellule souche cancéreuse : historique et définition 67
4.1.2 Origine de la cellule souche cancéreuse du CCR 68
4.2 Impact du microenvironnement tumoral 679
4.2.1 Le système immunitaire 70
4.2.2 Le microbiote 73
5. Traitements des CCR 77

Chapitre 3: Le gène homéotique Cdx2 79
1. Les gènes homéotiques 79
1.1 Définition 79
1.2 Structure du gène et de la protéine Cdx2 79
2. Cdx2 au cours du développement embryonnaire 81
2.1 Profil d'expression de Cdx2 pendant l'embryogénèse 81
2.2 Fonctions de Cdx2 81
2.2.1 Cdx2 détermine le lignage trophectodermique 81
2.2.2 Cdx2 participe à la mise en place de l'axe antéro-postérieur 82
2.2.3 Cdx2 détermine l'identité intestinale 82
3. Cdx2 dans l'intestin adulte 84
3.1 Profil d'expression de Cdx2 dans l'intestin 84
3.2 Cdx2 : un régulateur majeur de l'homéostasie de l'épithélium intestinal 86
4. Modes d'action de Cdx2 88
4.1 Activité transcriptionnelle de Cdx2 88
4.2 Activités non transcriptionnelles de Cdx2 90
5. Régulation de l'expression et de l'activité de Cdx2 91
5.1 Régulation transcriptionnelle de Cdx2 91
5.2 Régulation post-transcriptionnelle de Cdx2 91
5.3 Régulations post-traductionnelles de Cdx2 92
5.4 Impact du microenvironnement sur l'expression de Cdx2 93
6. Cdx2 et pathologies 94
6.1 Cdx2 dans les cancers colorectaux (CCR) 94
6.1.1 Profil d'expression de Cdx2 dans les CCR 94
6.1.2 Mécanismes de la perte d'expression de Cdx2 dans les CCR 96
6.1.3 Cdx2, un gène à fonction suppresseur de tumeurs dans l'intestin 98
6.2 Cdx2 dans les pathologies extra-intestinales 99
6.2.1 Cdx2 dans les métaplasies intestinales 99
6.2.2 Cdx2 dans les leucémies 100

OBJECTIFS 103

RESULTATS 107
1. Résumé des résultats obtenus 109

A. Caractérisation des CCR humains présentant une forte réduction de l'expression de Cdx2 109
B. Caractérisation des lésions caecales résultant de la perte d'expression de Cdx2 dans l'intestin chez la souris 109
C. Etude de l'évolution des lésions dans un fond génétique $Apc^{+/\Delta 14}$ 110
D. Effet suppresseur de tumeur « cellulaire-non autonome » de Cdx2 110
E. La perte de fonction Cdx2 crée un microenvironnement pro-oncogénique 111
F. Les zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes se développent selon un modèle « top-down » 112
2. Publication 112

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 147

DISCUSSION / PERSPECTIVES 151

I. Cdx2, un gène à fonction suppresseur de tumeurs dans l'intestin 152
II. Cdx2 exerce sa fonction suppresseur de tumeurs de façon « cellule non-autonome » en modifiant le microenvironnement inflammatoire 153
A. Effet suppresseur de tumeurs cellule-non-autonome de Cdx2 153
B. Impact du microenvironnement 154
III. Un modèle murin qui supporte le modèle de tumorigénèse intestinale top/down 155
IV. Un modèle murin représentatif d'un sous-type de CCR humain ? 156
V. Conclusion générale 158
ANNEXE : miniCdx2, un variant d'épissage alternatif de Cdx2 159
I. Contexte 160
II. Contribution au projet et résumé des principaux résultats obtenus 160
III. Conclusion 161
IV. Publication 162
V. Résultats complémentaires 209
A. Etude du ratio miniCdx2/Cdx2 dans les tumeurs intestinales de souris $Apc^{+/\Delta 14}$ 209
B. Etude du ratio miniCdx2/Cdx2 dans les tumeurs coliques humaines 209

BIBLIOGRAPHIE 213

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 243

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FU: 5-Fluorouracile

- A -

Acvr2: Activin type II Receptor
ADAM: A Disintegrin And Metalloprotease domain
ADN: Acide Désoxyribonucléique
Ah: Aryl hydrocarbon
ALK: Activin receptor-Like Kinase
Alpi: Alkaline phosphatase, intestinal
AOM: Azoxyméthane
Anxa 10: Annexine A10
Apc: Adenomatous Polyposis Coli
Apcdd1: Apc Down-regulated 1
Aph1: Anterior pharynx-defective 1
AREG: Amphiregulin
ARN: Acide Ribonucléique
Asbt: Apical sodium–bile acid transporter
Ascl2: Achaete-scute-like 2
Axin2: Axis inhibitor 2

- B -

Bax: Bcl-2–associated X protein
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
Bcl2l1: BCL2 like 1
BER: Base-Excision Repair
Bft: Bacteroides fragilis toxin
bHLH: basic Helix-Loop-Helix
Birc5: Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 5
Bmi1: B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP: Bone Morphogenetic Protein
BMPR: BMP Receptor
β-TrCP: β-Transducing Repeat-Containing Protein

- C -

Cad: Caudal
CaMKII: Calcium calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate
CBC: Crypt Base Columnar
CBF1: C-promoter Binding Factor 1
CCR: Cancer Colorectal
CD: Cluster of Differentiation
CDH1: Cadherin-1
Cdk: Cyclin-dependent kinase
Cdt: Cytolethal distending toxin
CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
Cdx2: Caudal-type homeobox 2

CIMP: CpG Island Methylator Phenotype
CIN: Chromosomal Instability
CIR: CBF1 Interacting Corepressor
CK1: Casein Kinase 1
Cldn18 : Claudin18
CMH-I: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I
CMS: Consensus Molecular Subtype
CMV: Cytomégalovirus
COX: Cylcooxygénase
CREB: cAMP Response Element-Binding protein
CSC: Cellule Souche Cancéreuse
CSL: CBF1, Suppressor of hairless, Lag-1
CTGF: Cystein-rich protein connective Tissue Growth Factor
Ctse : Cathepsine E
CXXC4 : CXXC finger protein 4
Cyp26a: Cytochrome P450 family 26 subfamily A

- D -

Daam1: Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1
DAG: Diacylglycérol
Dclk1: Doublecortin-like kinase 1
Dhh: Desert hedgehog
Dkk: Dickkopf
DMBA: 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl
DMH: 1,2-dimethylhydrazine
Dll: Delta-like protein
Dsh: Dishevelled
DSS: Dextran Sulfate Sodium

- E -

EGF: Epidermal Growth Factor
EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR: EGF Receptor
ENU: N-ethyl-N-nitrosourea
Epcam: Epithelial cellular adhesion molecule
Erk1/2: Extracellular signal-regulated kinases 1/2
Exo1: Exonuclease 1

- F -

FAK: Focal Adhesion Kinase
FAP: Familial Adenomatous Polyposis
FGF1: Fibroblast Growth Factor-1
Foxf2: Forkhead box F2
Fzd: Frizzled
FXR: Farnesoid X Receptor

- G -

GATA6: GATA-binding factor 6
GFP: Green Fluorescent Protein
Gli: Glioma-associated transcription factor
Glut2: Glucose transporter 2

GRK2: G protein-coupled Receptor Kinase 2
GSK3β: Glycogène Synthétase Kinase 3β
Gsx: Genomic screened homeobox
GTP: Guanosine Triphosphate

- H -

HDAC: Histone Deacetylase
Herp/Hey: Hes-related Repressor proteins with Y-box
Hes: Hairy/enhancer of split
HHIP: Hedgehog Interacting Protein
HIF: Hypoxia Inducible Factors
HNF4α: Hepatocyte nuclear factor-4α
HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
Hopx: Homeodomain-only protein homeobox

- I -

IAP: Inhibitor of Apoptosis
ICAT: Inhibitor of β-catenin
Id1-3: Inhibitor of differentiation 1-3
I-Fabp: Intestinal fatty acid binding protein
IFN-γ: Interferon-γ
Ihh: Indian Hedghog
IL: Interleukin
iNos: inducible Nitric oxyde synthase
IP3: Inositoltriphosphate
IQ: 2-amino-33-methylimidazo [4,5-f]quinolone
IRES: Internal Ribosome Entry Site
IRS2: Insulin Receptor Substrate 2

- J -

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

- K -

Klf4: Kruppel-like factor 4
Krt8: Keratin 8

- L -

Lag1*:* Longevity assurance gene 1
LATS1/2: Large Tumor Suppressor kinases 1/2
LBD: Ligand Binding Domain
LDL: Low-Density Lipoprotein
LEF: Lymphoid Enhancer-binding Factor 1
Lgr5: Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
Lkb1: Liver kinase b1
LPS : Lipopolysaccharide
LRC: Label Retaining Cells
Lrig1: Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
Lrp5/6 : LDL receptor related protein 5 /6
LTC: Lymphocyte T Cytotoxique
LTh: Lymphocyte T helper
LTreg: Lymphocyte T régulateur

- M -

MAM: Methylazoxyméthanol
MAML: Mastermind-Like
MAP: MUTYH Associated Polyposis
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
Mash: Mammalian achaete-scute homolog
Math: Mammalian atonal homolog
MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
miARN: micro-ARN
Min: Multiple intestinal neoplasia
Mlh: MutL homolog
MMP : Métalloprotéase Matricielle
MMR: Mismatch Repair
MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU: Methylnitrosourea
Msh: MutS Homolog
MSI: Microsatellite Instability
MST1/2: Mammalian Ste20-like Protein Kinase 1/2
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
Muc: Mucine
Mutyh: Mut Y homolog

- N -

NFAT: Nuclear Factor Associated with T cells
NF-κB: Nuclear Factor- κB
NHEJ: Non-Homologous End Joining
NICD: Notch Intra-Cellular Domain
NK: Natural Killer
NKD1: Naked cuticle homolog 1
NLK: Nemo Like Kinase
NOD: Non-Obese Diabetic

- O -

Oct4: Octamer-binding transcription factor 4
Olfm4: Olfactomedin 4

- P -

PCP: Planar Cell Polarity
qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
Pdx: Pancreatic duodenal homeobox
Pen2: Presenilin enhancer 2
PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA: Protein Kinase A
PKC: Protein Kinase C
PLC: Phospholipase C
Pms: Postmeiotic segregation
PP1: Protein Phosphatase 1
PPARγ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ
Ptch: Patched
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

- R -

RBP-Jκ: Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region
Rnf43: Ring finger protein 43
ROCK: Rho-associated Kinase
RT: Reverse Transcription

- S -

SCID: Severe Combined Immunodeficiency
sFRP: secreted Frizzled-Related Proteins
shARN: short hairpin ARN
SHARP: SMRT and HDAC associated Repressor Protein
Shh: Sonic hedgehog
sIgAs: secretory Immunoglobulin A
SMAD: Mothers Against Decapentaplegic homolog
Smo: Smoothened
Smoc2: SPARC-related modular calcium-binding 2
SMRT: Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor
SPARC: Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich
SOST: Sclérostine
Sox9: SRY- box 9
SRF: Serum Responsive Factor
SRY: Sex determining Region Y
Stk11: Serine/Threonine Kinase 11

- T -

TAK1: TGF-β Activated Kinase 1
TAZ: Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
Tbx5: T-box transcription factor 5
TCF: T Cell Factor
TEAD1-4: TEA Domain family Member 1-4
Tert: Telomerase reverse transcriptase
TFF: Trefoil Factor
TGF: Transforming Growth Factor
TGFβR2: TGFβ Receptor 2
TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α
Tnfrsf19: TNF Receptor Superfamily Member 19

- U -

UTR: Untranslated Region

-V-

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2: VEGF Receptor 2
VHL: Von Hippel–Lindau

-W-

WIF-1: Wnt Inhibitory Factor 1
WISP-1: Wnt1-Inducible-Signaling Pathway protein 1
Wnt: Wingless-type MMPTV integration site

-Y-

YAP1: Yes-Associated Protein 1

-Z-

Zeb1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1
Znrf3: Zinc/ring finger protein 3

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Introduction

Chapitre 1 : La physiologie intestinale

Figure 1: Structure de l'intestin grêle et du côlon. 10
Figure 2: Schéma de la structure d'une plaque de Peyer. 12
Figure 3: Renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal. 16
Figure 4: Organisation structurale et fonctionnelle de la crypte intestinale. 22
Figure 5: Plasticité cellulaire de l'épithélium intestinal. 22
Figure 6: Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt canonique. 27
Figure 7: Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/PCP. 30
Figure 8: Représentation schématique de la voie de signalisation Notch. 33
Figure 9: Représentation schématique de la voie de signalisation BMP. 36
Figure 10: Représentation schématique de la voie de signalisation Hedgehog. 38
Figure 11: Représentation schématique de la voie de signalisation Hippo/YAP. 41

Chapitre 2 : Les cancers de l'intestin

Figure 12: Evaluation du stade tumoral du cancer colorectal selon la classification TNM. .. 47
Figure 13: De la muqueuse intestinale saine au CCR. 49
Figure 14: Représentation schématique de la protéine Apc et des mutations du gène chez l'homme. 49
Figure 15: Adénomes coliques du syndrome de la polypose adénomateuse familiale. 50
Figure 16: Adénocarcinome du côlon d'un patient atteint du syndrome de Lynch. 53
Figure 17: Classification moléculaire des CCR humains. 66
Figure 18: Concept de l'immunoédition. 72
Figure 19: Composition et densité du microbiote intestinal. 75
Figure 20: Représentation schématique de la structure de l'homéodomaine des gènes homéotiques. 80
Figure 21: Représentation schématique des clusters Hox et ParaHox chez la souris. 80

Chapitre 3 : Le gène homéotique Cdx2

Figure 22: Représentation schématique de la protéine Cdx2 humaine. 80
Figure 23 : Conséquences phénotypiques de l'haploinsuffisance de Cdx2. 83
Figure 24 : Conséquences phénotypiques de la perte de fonction intestinale de Cdx2 au cours du développement. 85
Figure 25 : Conséquences phénotypiques de la perte de fonction mosaïque de Cdx2 dans l'intestin adulte. 87
Figure 26 : Profil d'expression de la protéine Cdx2 dans les CCR humains. 95

Figure 27 : Sensibilité des souris Cdx2$^{+/-}$ à développer des tumeurs intestinales chimio-induites. 97

Résultats

Figure 28 : Schéma descriptif du modèle d'invalidation de Cdx2 dans l'intestin adulte. ... 108

Résultats complémentaires

Figure 29: Effet d'un inhibiteur de iNos sur le développement des tumeurs mixtes du caecum. 148

Annexe

Figure 30: Altération de l'expression des transcrits Cdx2 et miniCdx2 dans les tumeurs intestinales de souris. 210
Figure 31: Altération de l'expression des transcrits Cdx2 et miniCdx2 dans les CCR humains 211

TABLEAUX

Introduction

Chapitre 2 : Les cancers de l'intestin

Tableau 1: Modèles animaux transgéniques Apc muté. 56

Tableau 2: Phénotype des souris déficientes pour les gènes du système de réparation MMR ..... 60.

Tableau 3: Exemples de travaux montrant le rôle pro-tumoral du microbiote dans la tumorigénèse intestinale. 76

INTRODUCTION

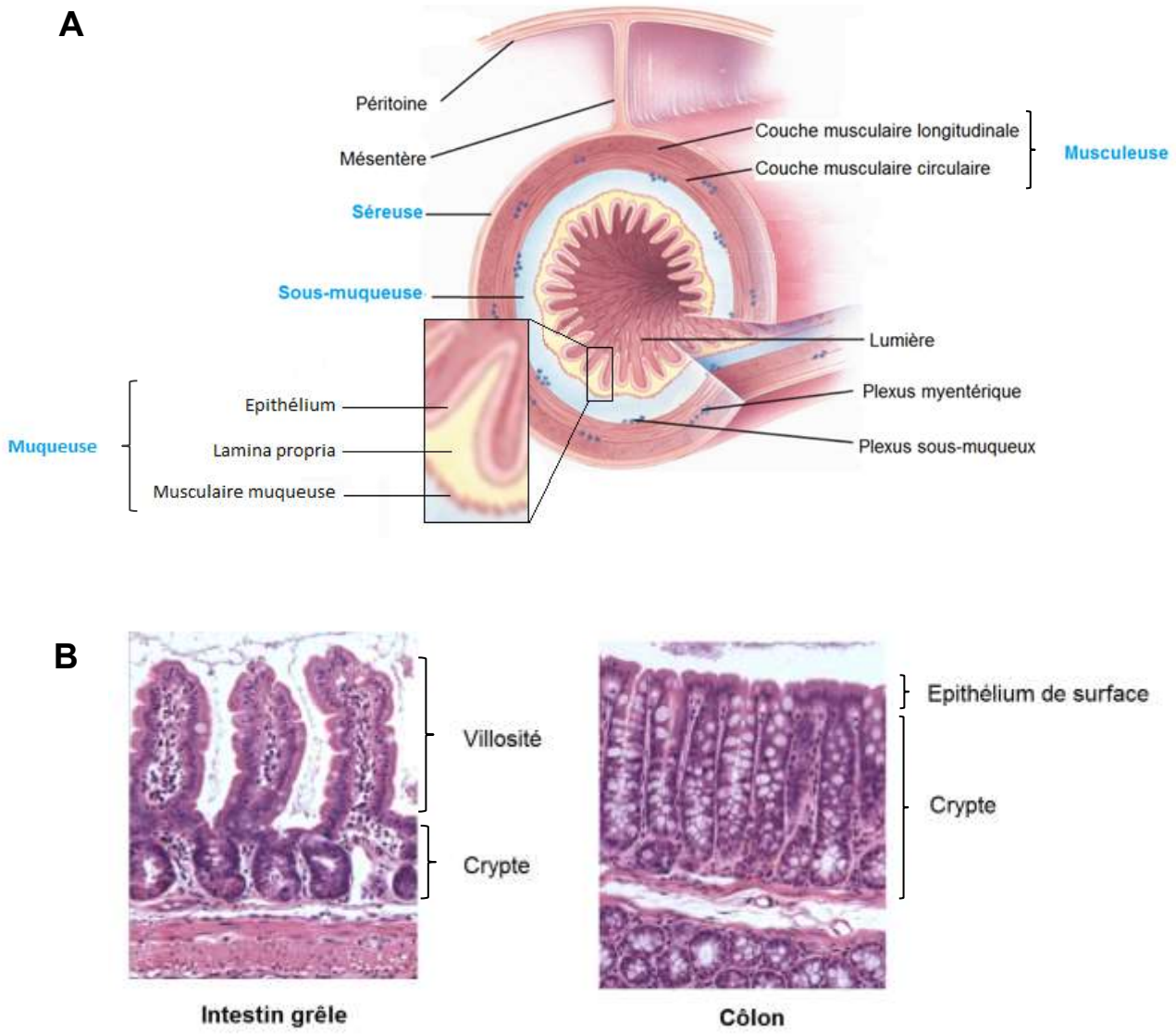

Figure 1: Structure de l'intestin grêle et du côlon.
(A) L'intestin est un organe tubulaire, dont la cavité centrale appelée « lumière » est bordée par une paroi comportant, de la lumière vers l'extérieur du tube: **la muqueuse**, formée d'un épithélium simple reposant sur un tissu conjonctif lâche, la lamina propria (ou chorion); **la sous-muqueuse**, comportant des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des fibres nerveuses; **la musculeuse**, constituée d'une couche circulaire interne et d'une couche longitudinale externe de muscles lisses; **la séreuse**, formée du feuillet viscéral du péritoine (Adapté de http://www.slideshare.net/emanshrydeh/git-32506522).
(B) Histologie de la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon (Coloration HE) (Schneider et al., 2010).

Chapitre 1 : La physiologie intestinale

1. Structure et fonction de l'intestin

1.1 L'intestin grêle et le côlon

L'intestin est la portion du tube digestif qui s'étend de la sortie de l'estomac à l'anus. Chez les mammifères, il se compose de deux parties fonctionnellement distinctes : l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle, lui-même constitué du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, assure principalement la digestion puis l'absorption des nutriments dans le sang.
Le gros intestin, comprenant le caecum, le côlon proximal et distal et le rectum, est le siège de l'absorption d'eau et d'électrolytes à partir des résidus non digérés de l'intestin grêle.

Histologiquement, la paroi intestinale est formée de quatre tuniques concentriques: la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse, et la muqueuse **(Figure 1A).**
Afin d'optimiser l'absorption des nutriments, la muqueuse de l'intestin grêle forme de nombreux et larges replis appelés valvules conniventes, qui présentent une alternance de protubérances digitiformes, les villosités, et d'invaginations, les cryptes de Lieberkühn. Dans le côlon, la muqueuse comporte des cryptes particulièrement profondes mais elle est dépourvue de villosités, rendant la surface interne relativement lisse **(Figure 1B)**.

1.2 Les cellules de l'épithélium intestinal

1.2.1 Les cellules différenciées

Outre sa fonction d'assimilation des nutriments, l'intestin constitue une barrière physiologique et immunologique contre les éléments potentiellement nocifs du contenu luminal et régule certaines fonctions digestives telles que la satiété, la fonction pancréatique et l'activité sécrétoire des cellules épithéliales. Ces fonctions sont assurées par différents types de cellules différenciées, localisées au niveau des villosités de l'intestin grêle et dans la partie supérieure des cryptes du côlon. Selon leurs caractéristiques fonctionnelles, ces cellules appartiennent au lignage absorbant (entérocytes/colonocytes, cellules M et cellules en coupe) ou sécréteur (cellules de Paneth, cellules caliciformes, cellules entéro-endocrines, et cellules en houppes).

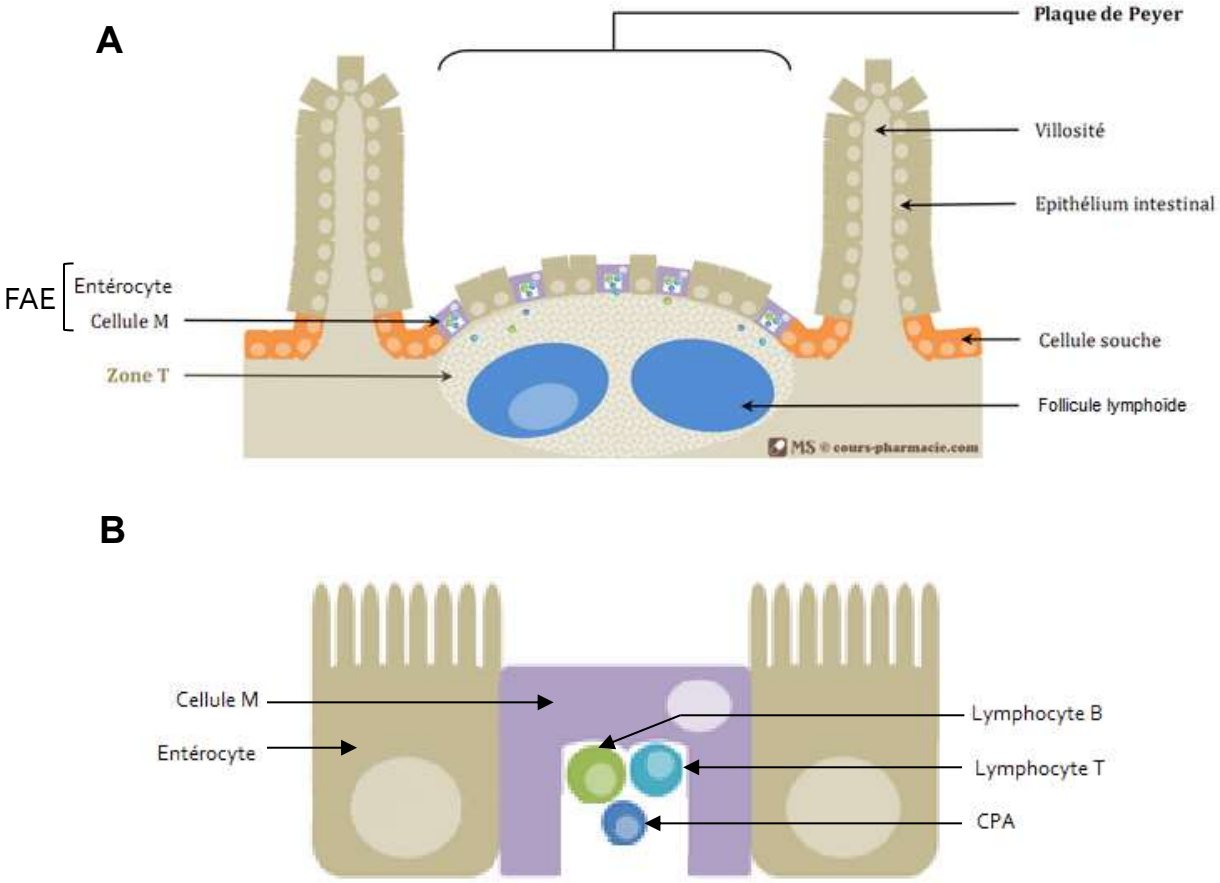

Figure 2: Schéma de la structure d'une plaque de Peyer.
(A) Dans l'intestin, les plaques de Peyer sont formées de follicules lymphoïdes comportant des lymphocytes B, des lymphocytes T $CD4^+$ et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et sont recouvertes par un épithélium associé au follicule (FAE) constitué de cellules M et d'entérocytes. **(B)** Dans leur domaine basolatéral, les cellules M présentent des invaginations membranaires entre lesquelles sont logés des lymphocytes B intraépithéliaux, des lymphocytes T et des CPA (Adapté de http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-cellules-immunitaires-et-les-organes-lymphoides.html).

1.2.1.1. Les cellules du lignage absorbant

Les entérocytes/colonocytes

Les entérocytes sont les cellules épithéliales les plus représentées de l'intestin grêle (85%). Dans le côlon, les colonocytes représentent environ la moitié des cellules épithéliales. Ces cellules sont caractérisées par une bordure en brosse à leur pôle apical formée de microvillosités qui se projettent dans la lumière intestinale et qui participent à l'augmentation de la surface d'échange. Les microvillosités sont recouvertes d'un réseau fibrillaire superficiel, le glycocalyx, riche en glycoprotéines et en enzymes digestives. La membrane des microvillosités comporte par ailleurs des enzymes intra-membranaires et des transporteurs spécifiques, assurant ainsi la digestion et le passage sélectif des nutriments dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques du chorion (Hussain, 2014; Ziv and Bendayan, 2000).

Les cellules M

Les cellules M, ou cellules à microplis, sont principalement retrouvées dans l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer, et, dans une moindre mesure, entre les autres types cellulaires différenciés des villosités **(Figure 2)**. Elles sont caractérisées par de petites invaginations membranaires de leur domaine basolatéral entre lesquelles sont hébergées des cellules immunitaires. Les cellules M participent à la réponse immunitaire en reconnaissant les antigènes présents dans la lumière intestinale et en les transportant vers les cellules présentatrices d'antigènes (Kucharzik et al., 2000; Miller et al., 2007).

Les cellules en coupe

Les cellules en coupe, ou « cup cells », représentent jusqu'à 6% des cellules épithéliales dans l'iléon. Elles se caractérisent par une bordure en brosse constituée de courtes microvillosités, et par une activité réduite de la phosphatase alcaline Leur fonction au sein de la muqueuse intestinale n'est pas encore établie (Madara, 1982; Madara and Carlson, 1985).

1.2.1.2. Les cellules du lignage sécréteur

Les cellules caliciformes

Egalement appelées « cellules à mucus » ou « cellules en gobelet », les cellules caliciformes représentent environ 5% des cellules épithéliales de l'intestin grêle et jusqu'à 16% des cellules épithéliales du côlon distal. Ces cellules, plus abondantes dans la partie supérieure des cryptes, sont caractérisées par la présence de granules de mucines situés sous la membrane apicale qui sont déchargés par exocytose au niveau de la surface épithéliale. Les

mucines ainsi sécrétées forment une couche de mucus qui tapisse l'ensemble de l'épithélium intestinal et le protège des agressions mécaniques, chimiques, et microbiennes.
Outre les mucines, d'autres molécules produites par les cellules caliciformes entrent dans la composition du mucus, en particulier les facteurs TFF qui interviennent dans la protection et la réparation de la muqueuse intestinale (Kim and Ho, 2010; Specian and Oliver, 1991).

Les cellules entéro-endocrines

Les cellules entéro-endocrines représentent une minorité des cellules de l'épithélium intestinal (<1%) (Noah et al., 2011). Elles sont responsables de la production d'une trentaine d'hormones régulant la satiété, la motilité, l'immunité, et l'inflammation. Une quinzaine de sous-types de cellules entéro-endocrines ont été décrits, témoignant de leur très grande hétérogénéité. Chaque sous-type cellulaire est caractérisé par la nature des hormones sécrétées : sérotonine, somatostatine, cholécystokinine (CCK), peptide inhibiteur gastrique (GIP), sécrétine, etc. Ces hormones sont contenues dans des vésicules de sécrétion localisées dans la partie basale de la cellule et sont déversées dans la circulation sanguine en réponse à des stimuli variés. Les cellules entérochromaffines, sécrétant principalement la sérotonine, sont les cellules entéro-endocrines les plus représentées de la muqueuse intestinale (Gunawardene et al., 2011).

Les cellules de Paneth

A l'inverse des autres types cellulaires différenciés de l'épithélium, les cellules de Paneth sont localisées au fond des cryptes de l'intestin grêle (5 à 12 cellules par crypte) et sont absentes dans le côlon. Elles sont caractérisées par la présence, au pôle apical, de vésicules de sécrétion riches en lysozyme et en défensines à activité anti-microbienne. Lors d'une exposition à des substances microbiennes tel que le lipopolysaccharide, le contenu des vésicules est déversé dans la lumière intestinale. Les cellules de Paneth participent ainsi largement à la réponse immunitaire innée de l'épithélium intestinal (Ayabe et al., 2000; Clevers and Bevins, 2013).
Elles appartiennent également à la niche des cellules souches intestinales et participent à leur maintien. Cette propriété sera développée dans la suite du manuscrit (p.24). Dans le côlon, une sous-population de cellules caliciformes c-Kit^{+} exprime des facteurs nécessaires au maintien d'un caractère souche, exerçant ainsi une fonction similaire à celle des cellules de Paneth de l'intestin grêle (Rothenberg et al., 2012).

Les cellules en houppes

Les cellules en houppes, ou « Tuft cells » ne représentent qu'une très faible proportion des cellules épithéliales de l'intestin (0.4%). Elles présentent une morphologie particulière caractérisée par une bordure en brosse très développée dans la région apicale.

Ces cellules expriment constitutivement des enzymes de synthèse des prostaglandines telles que les cyclo-oxygénases COX1 et COX2, suggérant un rôle dans l'inflammation et dans la perception de la douleur (Gerbe et al., 2012). En effet, des études récentes ont souligné l'importance des cellules en houppes dans l'initiation des réponses immunitaires de type 2 induites par une infection parasitaire, qui serait relayée par la production d'IL-25 (Gerbe et al., 2016; Howitt et al., 2016; Moltke et al., 2016).

1.2.2 Les cellules souches

1.2.2.1 Renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est un système en constant renouvellement cellulaire, qui est régénéré en 3 à 5 jours, à l'exception des cellules de Paneth, renouvelées toutes les 8 semaines environ (Ireland et al., 2005). Ce renouvellement continu repose sur de fortes activités de prolifération et de différenciation cellulaire dont l'équilibre dynamique répond à une organisation anatomique et fonctionnelle précise **(Figure 3)** : les cellules prolifératives se concentrent dans des structures glandulaires, les cryptes ; les cellules produites migrent vers le sommet des cryptes tout en acquérant les caractéristiques fonctionnelles propres à chaque type cellulaire différencié de l'épithélium intestinal et en perdant progressivement leur capacité à proliférer ; à la sortie des cryptes, les cellules différenciées non-prolifératives poursuivent leur progression jusqu'au sommet des villosités de l'intestin grêle ou à la surface en plateau du côlon où elles meurent par anoïkis et sont exfoliées dans la lumière intestinale (Heath, 1996; Marshman et al., 2002). A l'inverse des autres types cellulaires différenciés, les cellules de Paneth migrent vers le fond des cryptes et sont éliminées dans le chorion par phagocytose (Ireland et al., 2005).

1.2.2.2 Le concept des cellules souches

Le renouvellement constant des cellules d'un organe ou d'un tissu ne peut se concevoir sans la présence de cellules résidentes qui alimentent la population de cellules transitoirement en prolifération: les cellules souches. Les cellules souches présentent 3 propriétés principales :

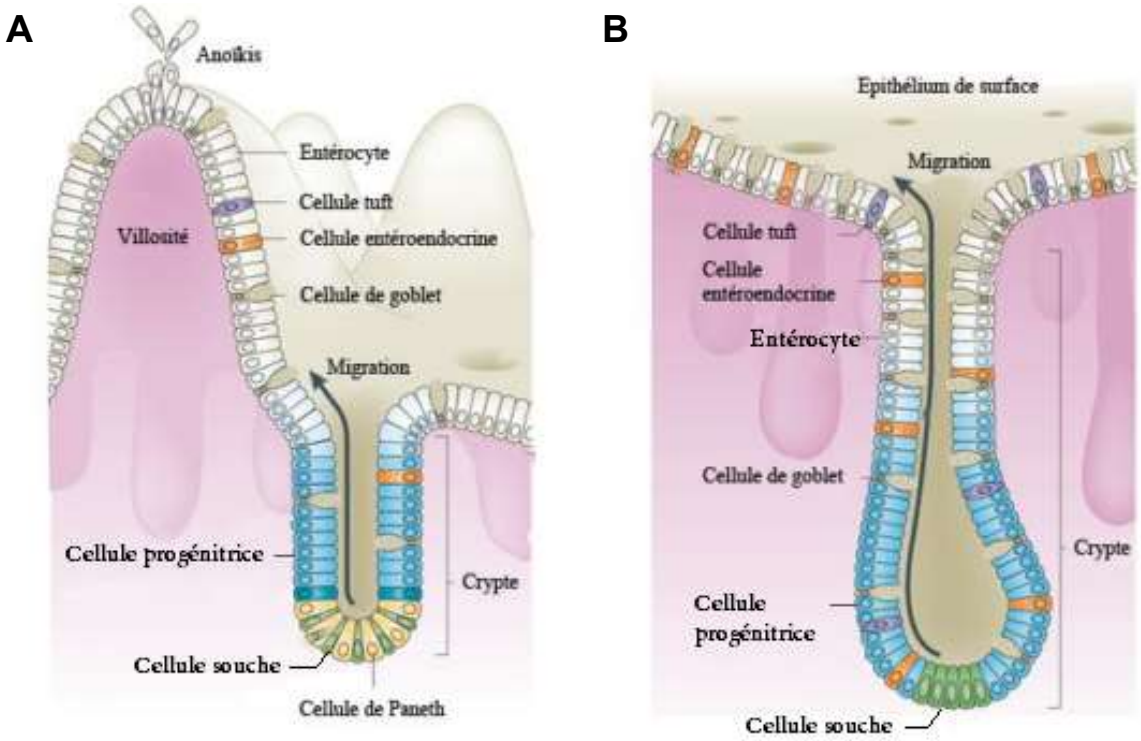

Figure 3: Renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal.
Les cellules prolifératives, localisées dans le compartiment des cryptes, migrent vers la surface des villosités de l'intestin grêle **(A)** ou vers la surface plane du côlon **(B)**. Au cours de leur progression, elles perdent progressivement leur capacité à proliférer et se différencient en cellules matures sécrétrices ou absorbantes (Adapté de Barker, 2014).

(i) la capacité d'auto-renouvellement, (ii) la capacité à produire un nombre défini de types cellulaires différenciés et (iii) la capacité à régénérer l'organe ou le tissu en cas de lésion.

Plusieurs types de cellules souches sont à considérer selon leur potentiel à générer des cellules différenciées :

- Les cellules souches totipotentes sont définies par leur capacité à produire tous les types cellulaires du zygote. Il s'agit de l'ovocyte fécondé et des cellules issues des premières divisions.
- Les cellules souches pluripotentes peuvent produire tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires, mais ne permettent pas le développement des annexes extra-embryonnaires. Il s'agit des cellules souches embryonnaires de la masse cellulaire interne du blastocyste (« ES cells »).
- Les cellules souches multipotentes sont engagées dans un programme de différenciation tissu-spécifique. Il s'agit des cellules souches présentes dans les organes/tissus dont dérivent un ou plusieurs types cellulaires différenciés spécifiques de cet organe/tissu.

Il est maintenant admis que tous les organes adultes contiennent des cellules souches. Leur activité, évaluée sur la base du taux de renouvellement cellulaire, est variable d'un organe à l'autre. Dans certains cas comme dans le système nerveux, les cellules souches sont très peu actives ; dans d'autres organes tel que le foie, elles sont peu actives en situation physiologique mais ont la capacité d'être fortement mobilisées en cas d'agression aiguë. Enfin, dans certains organes/tissus, les cellules souches sont très actives : il s'agit principalement de l'intestin, du tissu hématopoïétique, de la peau et du système reproducteur mâle.

1.2.2.3 Localisation des cellules souches intestinales : deux concepts

Le concept de cellules souches intestinales a émergé en 1965 suite aux travaux de A.B Cairnie et de son équipe. Par des expériences de suivi cellulaire utilisant l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN, leurs résultats suggéraient que les cellules épithéliales de l'intestin avaient une origine commune et provenaient de cellules localisées au-dessus des cellules de Paneth (Cairnie et al., 1965). Près de 10 ans plus tard, cette théorie fut reprise et approfondie par le groupe de C.Potten, dont les travaux ont proposé que les cellules souches intestinales sont localisées autour de la 4ème position depuis le fond des cryptes (zone « +4 »), immédiatement au-dessus des cellules de Paneth. Ces cellules sont alors décrites comme sensibles aux radiations et se caractérisent par la rétention d'ADN marqué qui témoigne d'une

ségrégation asymétrique des brins d'ADN matrice et néo-synthétisés entre les cellules souches et leur descendance. Cette dernière propriété est à l'origine du nom attribué à ces cellules, « Label Retaining Cells » (LRC), et serait responsable du maintien de l'intégrité du génome de la muqueuse intestinale en limitant le risque d'accumulation de mutations lors de la réplication (Potten, 1977; Potten et al., 1974, 2002).

Au début des années 1970, d'autres travaux menés par Cheng et Leblond ont conduit ces auteurs à formuler une autre théorie quant à la localisation des cellules souches intestinales. L'analyse histologique approfondie des cryptes intestinales révèle l'existence de cellules minces situées au fond des cryptes, entre les cellules de Paneth. Par des expériences de suivi cellulaire par irradiation ménagée à la thymidine tritiée, Cheng et Leblond ont montré que ces cellules, alors appelées « Crypt Base Columnar cells » (CBC), sont à l'origine de tous les types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal. Ces observations ont conduit ces auteurs à émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules CBC correspondent aux « véritables » cellules souches de l'intestin (Cheng and Leblond, 1974).

Ainsi, à la fin des années 1970, deux concepts s'affrontent quant à la localisation des cellules souches dans l'épithélium intestinal : celui des cellules LRC situées en position +4 au-dessus des cellules de Paneth, et celui des cellules CBC localisées entre les cellules de Paneth, à la base des cryptes.

1.2.2.4 Caractérisation des cellules souches intestinales et des progéniteurs

La position et l'identité des cellules souches intestinales dans l'épithélium ont longtemps alimenté la controverse au sein de la communauté scientifique et font encore aujourd'hui l'objet de recherches intensives. Néanmoins, les avancées technologiques, en particulier le développement de modèles murins transgéniques, ont permis de mieux caractériser ces deux populations cellulaires.

Les cellules CBC

Sur la base de la fonction jouée par la voie de signalisation Wnt chez la drosophile et le xénope, l'équipe de H. Clevers a émis l'hypothèse que cette voie pouvait être impliquée dans le renouvellement de l'épithélium intestinal. Cette voie sera détaillée dans la suite du manuscrit (p26). L'analyse du phénotype des souris déficientes pour le facteur de transcription TCF4 a permis de montrer que la voie Wnt est nécessaire pour le maintien et la fonction des cellules souches intestinales (Korinek et al., 1998). Afin d'identifier des cibles

transcriptionnelles de la voie Wnt, une analyse transcriptomique a été conduite sur des lignées cancéreuses coliques dans lesquelles la voie Wnt a été inactivée expérimentalement (Van de Wetering et al., 2002). Parmi les 80 gènes cibles de Wnt identifiés, le gène Lgr5 codant pour un récepteur de la R-spondin qui potentialise l'activation de la voie Wnt (Carmon et al., 2011), présente un profil d'expression particulier. Celui-ci est en effet spécifiquement exprimé au niveau des cellules CBC de l'intestin grêle décrites 33 ans plus tôt par Cheng et Leblond, et dans certaines cellules situées à la base des cryptes du côlon (Barker et al., 2007; Van der Flier et al., 2007). A partir de souris portant la construction inductible EGFP-IRES-Cre^{ERT2} dans le locus Lgr5 croisées avec des souris exprimant le gène lacZ inductible au tamoxifène dans le locus Rosa26, il a été montré que les cellules $Lgr5^+$ prolifèrent activement et sont capables de générer tous les types cellulaires différenciés de l'épithélium, apportant ainsi un argument fort en faveur de l'hypothèse selon laquelle les cellules CBC $Lgr5^+$ sont multipotentes et correspondent aux cellules souches de l'intestin (Barker et al., 2007; Gerbe et al., 2011). La preuve définitive de ce concept a été apportée en montrant qu'une cellule $Lgr5^+$ unique placée dans un milieu de culture approprié est capable de générer des organoïdes intestinaux, lesquels sont représentatifs de l'organisation crypto-villositaire de l'épithélium intestinal comprenant le compartiment des cellules $Lgr5^+$ associé aux progéniteurs prolifératifs et le compartiment de différenciation incluant tous les types cellulaires des lignages absorbant et sécréteur (Sato et al., 2009).

L'analyse transcriptomique des cellules CBC $Lgr5^+$ a par la suite permis d'identifier d'autres marqueurs spécifiques à cette population cellulaire, parmi lesquels la glycogroprotéine matricielle Olfm4, le facteur de transcription à domaine bHLH Ascl2, l'inhibiteur des facteurs BMP Smoc2, et les E3 ubiquitine ligase membranaires Rnf43 et Znrf3 (van der Flier et al., 2009; Muñoz et al., 2012).

Les cellules LRC

Par une approche de traçage à long terme des cellules exprimant une forme fluorescente de l'Histone H3, les équipes de R Fodde et de DJ Winton ont apporté la preuve que, contrairement au modèle proposé par AB Cairnie et par CS Potten, les cellules LRC de la zone +4 ne présentent pas les propriétés de cellules souches, mais représentent les précurseurs des cellules de Paneth (Buczacki et al., 2013; Li et al., 2016; Roth et al., 2012).

Des cellules souches dans la zone +4

Parallèlement aux travaux effectués sur les cellules Lg5^{+}, des études utilisant une approche similaire de lignage cellulaire ont été réalisées en ciblant des gènes susceptibles de répondre à des critères de cellules souches : Bmi1, un répresseur transcriptionnel appartenant au complexe polycomb 1 maintenant les cellules dans un état indifférencié ; la protéine homéotique atypique Hopx qui interfère avec les protéines de type SRF (Takeda et al., 2011); le récepteur membranaire Lrig1 qui inhibe l'activité des récepteurs à tyrosine kinase de la famille EGFR (Powell et al., 2012) ; et la télomérase Tert qui maintient la structure des extrémités des chromosomes pour assurer la survie cellulaire (Montgomery et al., 2011). Ces gènes s'expriment dans une population de cellules restreintes à la zone +4 et faiblement prolifératives, ce qui les différencie des cellules CBC Lgr5^{+}. Cependant, comme les cellules CBC, elles sont capables de générer l'ensemble des types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal. Ces cellules sont donc considérées comme des cellules souches de réserve par rapport aux cellules CBC qui sont les cellules souches actives.

Les cellules progénitrices

Des études d'expression génique par hybridation *in situ* ont identifié des cellules situées dans la zone +4 exprimant Dll1, un ligand de la voie de signalisation Notch (détaillée p32), mais distinctes des cellules LRC et n'exprimant pas les marqueurs de cellules souches de réserve. Le suivi de la descendance de ces cellules en insérant dans le locus Dll1 la cassette EGFP-Cre^{ERT2} a montré que ces cellules ont une durée de vie limitée (quelques jours seulement, contrairement aux cellules souches actives et aux cellules souches de réserve) et qu'elles produisent les cellules isolées différenciées du lignage sécréteur qui migrent jusqu'au sommet des villosités. Ces cellules représentent donc les progéniteurs des cellules sécrétrices (van Es et al., 2012a).

Par une approche similaire de lignage des cellules exprimant le gène Alpi qui code pour une enzyme digestive spécifiquement exprimée dans les cellules du lignage absorbant, les progéniteurs de ce lignage ont été identifiés au niveau de la zone +4 et plus haut dans la crypte. A la manière des progéniteurs Dll1^{+}, les progéniteurs du lignage absorbant ont une durée de vie réduite et ne correspondent à aucune population de cellules souches. Ces progéniteurs produisent des rubans de cellules absorbantes migrant jusqu'au sommet des villosités (Tetteh et al., 2016).

Plasticité cellulaire dans la crypte intestinale

L'organisation structurale et fonctionnelle de la crypte repose sur un agencement cellulaire précis où les cellules souches actives (CBC) occupent le fond des cryptes en compagnie des cellules de Paneth, et sont surmontées par la zone +4 qui comprend plusieurs types cellulaires : les cellules souches faiblement prolifératives (Bmi1$^+$), les cellules progénitrices du lignage absorbant, les cellules progénitrices du lignage sécréteur et les cellules LRC qui sont les précurseurs des cellules de Paneth **(Figure 4)**. Cet agencement permet de rendre compte du renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal en condition physiologique, mais pose la question des conséquences de la perte des cellules souches actives qui peut survenir en situation pathologique, par exemple suite à une infection, une inflammation, ou par irradiation.

L'élimination des cellules CBC par la toxine diphtérique associée au suivi des cellules Bmi1$^+$ a montré que cette population de cellules souches est capable de générer une nouvelle population de cellules CBC (Tian et al., 2011). Réciproquement, les organoïdes issus d'une cellule CBC Lgr5$^+$ unique comprennent des cellules exprimant Bmi1 (Takeda et al., 2011). L'ensemble de ces résultats indique que les cellules souches de la zone +4 représentent des cellules souches de réserve mobilisables en cas de déficience des cellules CBC et que ces cellules souches de réserve dérivent des cellules souches actives.

De façon similaire, l'ablation des cellules CBC par la toxine diphtérique ou par irradiation associée au suivi des progéniteurs du lignage absorbant Alpi$^+$ (Tetteh et al., 2016), des progéniteurs du lignage sécréteur Dll1$^+$ (van Es et al., 2012a) et des LRC (Roth et al., 2012) (Buczacki et al., 2013) a révélé que chacun de ces types cellulaires de la zone +4 engagé dans une voie de différenciation est capable de régénérer la population des cellules CBC, lesquelles vont repeupler l'ensemble de l'axe crypto-villositaire incluant tous les types cellulaires des lignages absorbant et sécréteur **(Figure 5)**.

L'homéostasie de la crypte intestinale repose donc sur un équilibre dynamique entre cellules souches actives (CBC), cellules souches de réserve (Bmi1$^+$) et cellules progénitrices des lignages absorbant et sécréteur, ainsi que sur la plasticité de l'ensemble du système pour pallier aux agressions aiguës.

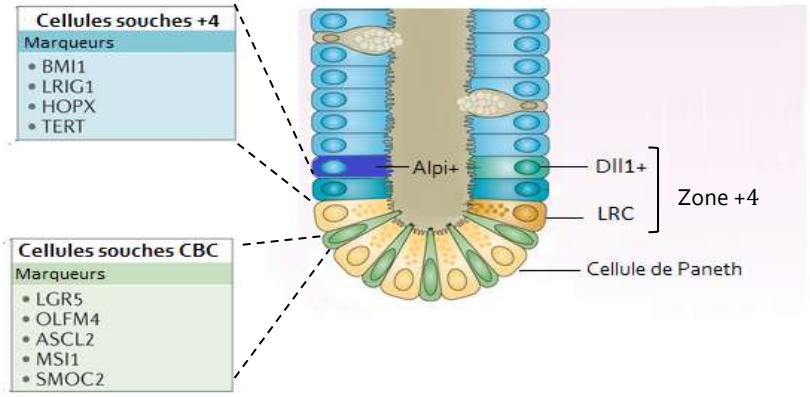

Figure 4 : Organisation structurale et fonctionnelle de la crypte intestinale.
Au fond des cryptes intestinales, les cellules souches actives CBC sont insérées entre les cellules de Paneth. Ces cellules sont surmontées, au niveau de la zone +4, des cellules souches de réserve, ainsi que des progéniteurs des lignages absorbant Alpi$^+$ et sécréteur Dll1$^+$ et des précurseurs des cellules de Paneth LRC (Adapté de Barker, 2014).

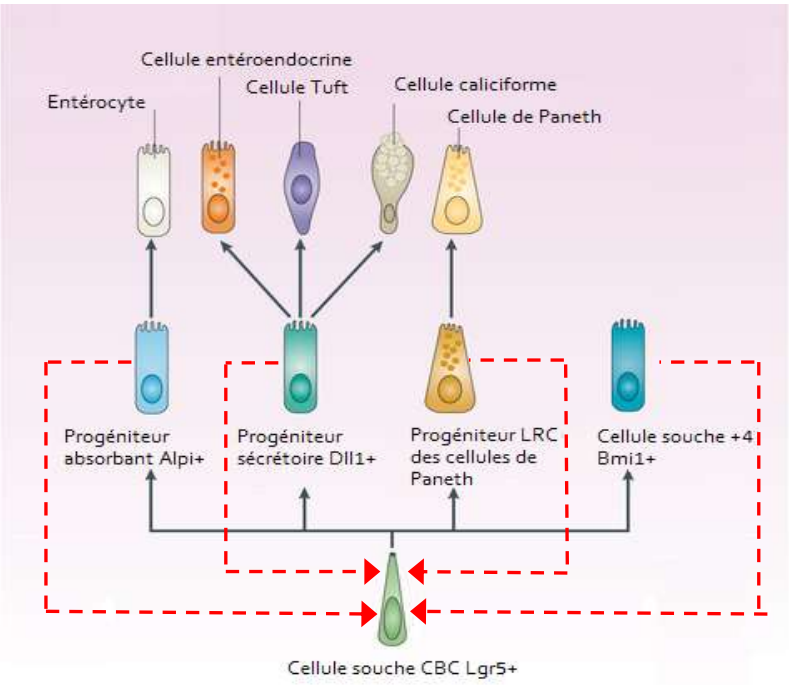

Figure 5: Plasticité cellulaire de l'épithélium intestinal.
Les cellules souches CBC sont capables de produire l'ensemble des progéniteurs des cellules sécrétrices et absorbantes, ainsi que les cellules souches de la zone +4. En cas de perte des cellules CBC par irradiation, infection ou inflammation, celles-ci peuvent être régénérées par ces progéniteurs ainsi que par les cellules souches de réserve de la zone +4 (pointillés rouges) (Adapté de Barker, 2014).

1.2.2.5 Division des cellules souches : symétrique ou asymétrique ?

Le maintien de l'homéostasie intestinale repose sur la capacité des cellules souches à s'auto-renouveler et à générer les différents types de cellules épithéliales différenciées. Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer les bases mécanistiques mises en jeu :

Dans le cadre du modèle déterministe, les cellules souches intestinales se divisent de façon asymétrique, générant invariablement une nouvelle cellule souche et une cellule progénitrice. Dans certaines situations, en particulier suite à une lésion de l'épithélium, les cellules souches peuvent se diviser de façon symétrique afin de générer deux cellules filles identiques qui conservent les propriétés des cellules souches (Booth and Potten, 2000). Dans ce modèle, la division asymétrique des cellules souches reposerait sur une ségrégation asymétrique de déterminants cellulaires et/ou sur une réorientation verticale du fuseau mitotique, lequel permettrait à la cellule-fille au contact de la niche de conserver ses potentialités de cellule souche et à la cellule-fille éloignée du stroma de s'engager vers la voie de la différenciation (Kaltschmidt et al., 2000; Neumüller and Knoblich, 2009). Ce modèle est soutenu par les travaux de Quyn et al., qui ont proposé une réorientation du fuseau mitotique perpendiculairement à la lame basale dans les cellules souches $Lgr5^+$ (Quyn et al., 2010). Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé dans une autre étude (Bellis et al., 2012).

A l'inverse, le modèle stochastique, ou probabiliste, propose que les cellules souches intestinales se divisent en générant de façon aléatoire deux cellules souches, deux cellules progénitrices, ou une cellule souche et une cellule progénitrice (Simons and Clevers, 2011). En accord avec ce modèle, deux études ont montré, par des techniques de lignage cellulaire, que les divisions symétriques des cellules souches $Lgr5^+$ sont des événements récurrents (Lopez-Garcia et al., 2010; Snippert et al., 2010). En outre, la mise en évidence d'une distribution asymétrique de la protéine mNumb dans 50% des cellules en mitose à la base des cryptes du côlon ouvre la possibilité de divisions asymétriques dans certaines cellules souches ou progénitrices (Bellis et al., 2012).

1.2.2.6 La niche des cellules souches

Le concept de niche des cellules souches a été proposé pour la première fois en 1978 par Schofield afin de décrire le microenvironnement local nécessaire à la maintenance de l'activité des cellules souches hématopoïétiques (Schofield, 1978). Peu après, Cheng et

Bjerknes ont suggéré l'existence d'une niche intestinale, laquelle a fait l'objet de recherches intensives au cours de ces dernières années (Bjerknes and Cheng, 1981).

Une niche est une structure complexe et dynamique, support d'interactions permanentes entre les cellules souches et les cellules du microenvironnement qui les entoure, lesquelles sécrètent des molécules solubles, voire des molécules de la matrice extracellulaire, nécessaires au maintien des propriétés et de l'activité des cellules souches (Lander et al., 2012). Dans l'intestin, les cellules souches actives $Lgr5^+$ sont localisées au fond des cryptes, entre les cellules de Paneth et à proximité immédiate des composants cellulaires du stroma sous-jacent. De nombreux types cellulaires sont ainsi susceptibles de réguler l'activité des cellules souches intestinales.

Les cellules de Paneth

Plusieurs études ont montré que la perte partielle des cellules de Paneth dans l'intestin de souris adultes entraîne une réduction massive du nombre de cellules souches, et limite leur potentiel de prolifération (Akcora et al., 2013; Huynh et al., 2009; Sato et al., 2011). Récemment, une étude *in vitro* a apporté la preuve définitive de l'importance des cellules de Paneth dans le maintien des cellules souches $Lgr5^+$. En effet, alors que les cellules souches $Lgr5^+$ isolées ont une probabilité relativement faible (7%) de produire des organoïdes, cette probabilité augmente fortement (75%) lorsque les cellules $Lgr5^+$ sont mises en culture en doublet avec des cellules de Paneth (Sato et al., 2011). En outre, l'analyse du transcriptome des cellules de Paneth montre que ces cellules produisent différents facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire tels que Wnt3a, Wnt11, EGF, TGF-α, et le ligand Notch Dll4, tandis que les cellules souches $Lgr5^+$ expriment les récepteurs à ces facteurs : Fzd7, Tnfrsf19 et Notch1. A la manière des cellules $Lgr5^+$ co-cultivées avec des cellules de Paneth, les cellules souches $Lgr5^+$ cultivées en présence de Wnt3a sont capables de former des mini-intestins (Sato et al., 2011). L'ensemble de ces résultats montre que les cellules de Paneth sont un composant majeur de la niche des cellules souches intestinales, par le biais des facteurs extrinsèques qu'elles sécrètent.

A l'inverse de l'intestin grêle, les cryptes du côlon sont dépourvues de cellules de Paneth. Cependant, il a été montré qu'une sous-population de cellules caliciformes $c\text{-}Kit^+$ sécrètent de l'EGF et les ligands de Notch Dll1 et Dll4 dans le côlon. Ces cellules sont intercalées entre les cellules $Lgr5^+$ et augmentent la capacité de ces dernières à générer des organoïdes *ex vivo*. Ainsi, les cellules $c\text{-}Kit^+$ du côlon semblent se substituer aux cellules de Paneth de l'intestin grêle (Rothenberg et al., 2012).

Si plusieurs travaux indiquent que les cellules de Paneth participent au maintien des cellules souches intestinales, deux études récentes suggèrent toutefois qu'elles ne sont pas indispensables et donc que d'autres facteurs moléculaires et/ou cellulaires font partie intégrante de la niche. En effet, la perte totale des cellules de Paneth par invalidation conditionnelle de Math1, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des cellules sécrétrices, n'affecte pas la capacité d'auto-renouvellement et l'expression des marqueurs spécifiques des cellules souches $Lgr5^+$ *in vivo* (Durand et al., 2012; Kim et al., 2012). Cependant, à l'inverse des cryptes intestinales issues de souris contrôles, les cryptes issues des souris déficientes pour le gène Math1 ne prolifèrent pas et sont incapables de former des organoïdes *ex vivo* (Durand et al., 2012). Ces résultats suggèrent qu'*in vivo*, le stroma intestinal fournit les facteurs nécessaires au maintien des cellules souches dans les cryptes dépourvues de cellules de Paneth.

Le stroma

Plusieurs études montrent l'importance des cellules du stroma comme élément de la niche des cellules souches intestinales. Par exemple, le niveau d'expression du facteur de transcription Foxf2 dans les cellules myofibroblastiques péri-cryptiques détermine le nombre de cellules CBC au fond des cryptes (Nik et al., 2013). En accord avec ces résultats, il a été montré que les cellules stromales produisent différents ligands Wnt dont les effets sur la maintenance des cellules souches intestinales sont redondants à ceux exercés par le facteur Wnt3 sécrété par les cellules de Paneth. Ainsi, les cellules mésenchymateuses purifiées et co-cultivées avec des cryptes intestinales déficientes en Wnt3 sont capables de soutenir la formation d'organoïdes (Farin et al., 2012). Enfin, outre les ligands Wnt pro-prolifératifs, les cellules stromales localisées à proximité des cryptes sécrètent des antagonistes des facteurs BMP antiprolifératifs, tels que Noggin, Gremlin1, Gremlin 2, et Chordin-like1, qui participent au maintien de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches (Kosinski et al., 2007; Scoville et al., 2008).

Il apparaît ainsi que la niche des cellules souches intestinales se compose des cellules de Paneth et des cellules stromales sous-épithéliales dont les fonctions sont au moins partiellement redondantes. Ceci explique que l'architecture des cryptes et l'activité des cellules souches soient préservées suite à la perte des cellules de Paneth *in vivo* mais que ces dernières soient requises pour le maintien des cellules souches *ex vivo*, dans des conditions où les cellules stromales sont absentes.

2. Bases moléculaires de l'homéostasie intestinale

Le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie intestinale repose sur l'existence d'un large réseau de communications intercellulaires au sein même de l'épithélium et avec le mésenchyme sous-jacent. Ces communications font intervenir cinq voies de signalisation majeures, Wnt, Notch, BMP, Hedgehog, et Hippo, dont l'activité conduit à l'expression d'un large panel de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration, la spécification des différents lignages, l'adhésion cellulaire, et l'apoptose.

2.1 La voie Wnt

Les facteurs Wnt sont des glycoprotéines sécrétées riches en cystéine qui jouent un rôle majeur dans la prolifération, la différenciation, la polarisation cellulaire et l'apoptose. Globalement, la liaison de ces protéines à un récepteur Fzd peut conduire à l'activation de trois voies de signalisation : la voie Wnt/β-caténine canonique, et les voies Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et Wnt/Ca^{2+} non canoniques, indépendantes de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine. Chez l'Homme, 19 ligands Wnt et 10 récepteurs Fzd ont été identifiés (Niehrs, 2012).

2.1.1 La voie Wnt canonique

2.1.1.1 Description de la voie

L'élément majeur de la transmission du signal Wnt canonique est la β-caténine. Dans les cellules épithéliales, cette protéine est essentiellement présente dans les complexes d'adhésion intercellulaires au niveau desquels elle interagit avec l'E-cadhérine transmembranaire et l'α-actinine associée au cytosquelette d'actine.

En absence de signal Wnt, la fraction de β-caténine cytoplasmique non mobilisée dans les complexes jonctionnels est phosphorylée par un complexe multimérique composé des protéines d'échafaudage Axine et Apc, et des kinases CK1 et GSK3β **(Figure 6)**. La phosphorylation de la β-caténine sur la Ser45 par CK1 puis sur les résidus Ser33, Ser37 et Thr41 par GSK3β entraîne son ubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase β-TrCP puis sa dégradation par le protéasome.

La voie Wnt canonique est activée par la liaison d'un ligand Wnt à un récepteur Fzd à 7 domaines transmembranaires et au corécepteur Lrp5/6. Cette interaction conduit d'une part à la phosphorylation du corécepteur par CK1γ et GSK3β, ce qui constitue un signal de recrutement de l'axine au niveau de la membrane, et d'autre part à l'activation de la protéine

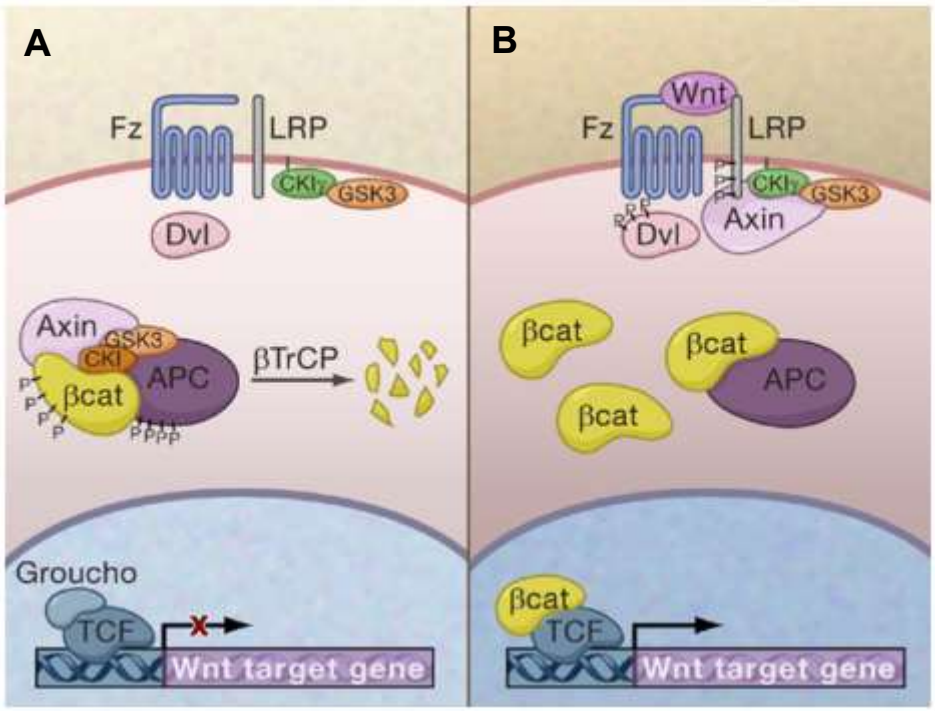

Figure 6: Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt canonique.
(A) En absence de signal Wnt, la β-caténine est phosphorylée au niveau d'un complexe multimérique puis dégradée par la voie du protéasome. **(B)** La liaison d'un ligand Wnt à un récepteur Fzd et son corécepteur Lrp5/6 induit la dissociation du complexe de dégradation, permettant à la β-caténine d'être transloquée dans le noyau où elle interagit avec les facteurs TCF/LEF pour activer l'expression des gènes cibles de la voie (Schuijers and Clevers, 2012).

cytoplasmique Dsh qui participe également à la relocalisation membranaire de l'axine. Le complexe de dégradation de la β-caténine se retrouve ainsi dissocié, ce qui conduit à l'accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme puis à sa translocation dans le noyau (Clevers, 2006). En absence de la β-caténine, les facteurs de transcription TCF et LEF sont associés au corépresseur transcriptionnel Groucho. Dans le noyau, la β-caténine déplace Groucho et forme un complexe avec les facteurs TCF/LEF afin d'activer la transcription de nombreux gènes cibles de la voie Wnt impliqués dans la prolifération cellulaire (c-Myc (He et al., 1998); cycline D1 (Tetsu and McCormick, 1999)), la survie (survivine (Zhang et al., 2001), WISP-1 (Xu et al., 2000)), l'adhésion cellulaire (E-cadhérine (Anna et al., 2003)), et la migration (Zeb1,(Sánchez-Tilló et al., 2015) Twist (Howe et al., 2003)). D'autres gènes cibles de la voie Wnt incluent des composants de la matrice extra-cellulaire (fibronectine (Gradl et al., 1999), MMP7 (Brabletz et al., 2002), MMP2 (Wu et al., 2007)) et le gène Lgr5 (Schuijers and Clevers, 2012).

2.1.1.2 Profil d'expression et fonction de la voie Wnt

Une localisation nucléaire de la β-caténine, témoin de l'activation de la voie Wnt canonique, est observée dans la partie basale des cryptes intestinales (Van de Wetering et al., 2002). L'analyse de la localisation des différentes acteurs de la voie Wnt par hybridation *in situ* montre que cette voie présente un gradient d'activité croissant le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin (Gregorieff et al., 2005).

Expérimentalement, la délétion du gène Tcf7l2 codant pour le facteur TCF4 conduit à une létalité périnatale consécutivement à la disparition du compartiment de prolifération au niveau de la région intervillositaire (Angus-Hill et al., 2011; Korinek et al., 1998). La perte de fonction de TCF4 dans l'intestin de souris adultes conduit à un phénotype similaire (van Es et al., 2012b). De la même manière, l'invalidation conditionnelle de la β-caténine (Fevr et al., 2007; Ireland et al., 2004) ou la surexpression de Dkk1, un antagoniste de Wnt (Kuhnert et al., 2004; Pinto et al., 2003), induit la perte des cryptes intestinales chez la souris adulte. Enfin, la perte du récepteur Fzd5, spécifique des cellules de Paneth, conduit à un défaut de positionnement et de différenciation de ces cellules (van Es et al., 2005a). A l'inverse, l'activation constitutive de la voie Wnt induite par invalidation du gène Apc conduit à une expansion du compartiment des cryptes et à une augmentation de la prolifération cellulaire (Andreu et al., 2005; Sansom et al., 2004). L'ensemble de ces résultats montre que la voie

Wnt est indispensable au maintien des cellules souches intestinales, et, plus largement, à l'homéostasie des cryptes intestinales.

La migration des cellules épithéliales le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin repose sur des interactions cellulaires qui font intervenir les ligands EphrinB et leurs récepteurs à activité tyrosine kinase EphB (Solanas and Batlle, 2011). L'interaction EphB/EphrinB conduit à une répulsion cellulaire par le biais d'un remodelage du cytosquelette d'actine (Kullander and Klein, 2002). Les récepteurs EphB2 et EphB3 sont des cibles transcriptionnelles de TCF4 exprimées dans le compartiment des cryptes, alors que les ligands EphrinB1 et EphrinB2, dont l'expression est réprimée par la voie Wnt, sont observés dans le compartiment villositaire (Batlle et al., 2002; Hatzis et al., 2008). La perte du récepteur EphB3 ou l'invalidation conditionnelle du récepteur Fzd5 conduit à un phénotype identique, caractérisé par une délocalisation des cellules de Paneth, alors distribuées aléatoirement le long de l'axe crypto-villositaire (Batlle et al., 2002; van Es et al., 2005a).
Ainsi, outre son rôle essentiel dans le maintien des cellules souches, la voie Wnt contrôle le positionnement des cellules le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin.

2.1.2 Les voies Wnt non canoniques

Bien moins caractérisées que la voie Wnt canonique, les voies Wnt non canoniques sont indépendantes de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine. Parmi les neuf voies Wnt non canoniques identifiées, les voies Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et Wnt/Ca^{2+} sont les mieux décrites (Semenov et al., 2007). Elles sont majoritairement activées par les facteurs Wnt 4, Wnt5a et Wnt 11.

La voie Wnt/PCP

La voie Wnt/PCP intervient d'une part dans la polarisation cellulaire planaire, par le biais de laquelle les cellules épithéliales s'orientent perpendiculairement à l'axe de polarité apico-basal, et contrôle d'autre part les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation et de la fermeture du tube neural de tous les vertébrés (Roszko et al., 2009).
La voie Wnt/PCP est activée suite à la liaison d'un ligand Wnt sur un récepteur Fzd, ce qui conduit au recrutement de la protéine Dsh au niveau de la membrane par le biais des protéines Strabismus, Prickle, Flamingo et Diego **(Figure 7)**. L'activation de Dsh conduit d'une part à l'activation de la GTPase Rho par le biais de la protéine Daam1, et d'autre part à l'activation de la GTPase Rac. L'activation des protéines Rho et Rac conduit respectivement à l'activation des kinases ROCK et JNK impliquées dans les réarrangements du cytosquelette d'actine

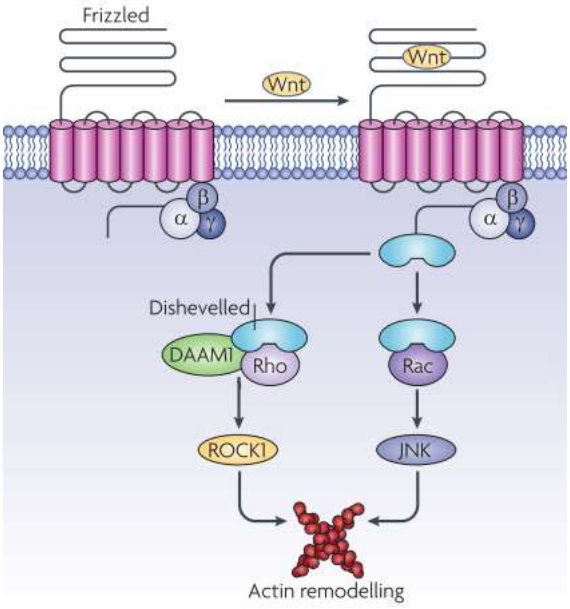

Figure 7: Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/PCP.
La liaison d'un facteur Wnt à son récepteur Fzd conduit au recrutement membranaire du facteur Dishevelled et à l'activation des kinases ROCK et JNK par le biais de l'activation des GTPases Rho et Rac, respectivement. Ceci conduit à un remodelage du cytosquelette d'actine. (Adapté de Angers and Moon, 2009).

(Angers and Moon, 2009; Miller and McCrea, 2010). Ainsi, les JNK régulent l'assemblage des complexes d'adhérence intercellulaires par le biais du remodelage du cytosquelette d'actine dans les cellules intestinales (Naydenov et al., 2009).

Les JNK sont par ailleurs impliquées dans l'activation de nombreux facteurs de transcription tels que c-Jun, p53, c-Myc, Bcl2, Bid, Bad et Bax, qui contrôlent la prolifération, la différenciation cellulaire, et l'apoptose (Wagner and Nebreda, 2009). Expérimentalement, la surexpression des JNK dans l'intestin de souris adultes stimule la prolifération et la migration cellulaire, à l'origine d'une expansion du compartiment villositaire. Dans ce modèle, l'activation des JNK conduit par ailleurs à une augmentation de l'expression de TCF4 ainsi que des gènes cibles de la voie Wnt Axin2 et Lgr5, suggérant une interaction entre les voies Wnt canonique et non canonique (Sancho et al., 2009). A l'inverse, la perte de fonction de c-Jun réduit la prolifération cellulaire et la taille des villosités intestinales (Sancho et al., 2009).

La voie Wnt/ Ca^{2+}

La voie Wnt/Ca^{2+} est impliquée dans la polarisation dorso-ventrale, l'adhésion cellulaire, et les mouvements cellulaires au cours du développement (De, 2011).

La liaison de Wnt au récepteur Fzd conduit au recrutement et à l'activation de protéines G. Il en résulte l'activation de la protéine Dsh puis de la PLC et la formation de DAG et d'IP3. En se fixant aux canaux calciques présents sur la membrane du réticulum endoplasmique, l'IP3 permet la libération et l'accumulation intracellulaire d'ions calcium à l'origine de l'activation de la kinase CaMKII. En outre, le flux de calcium et le DAG générés conduisent à l'activation de la kinase PKC. L'activation des kinases CaMKII et PKC permet l'activation des facteurs de transcription NF-κB, NFAT, et CREB, induisant la transcription de nombreux gènes impliqués dans la migration cellulaire, l'organisation du cytosquelette, l'inflammation et l'adhésion cellulaire (De, 2011).

La voie Wnt/Ca^{2+} peut par ailleurs inhiber la voie Wnt canonique par le biais de l'activation des kinases TAK1 et NLK qui bloquent l'activité transcriptionnelle du complexe β-caténine-TCF (Kohn and Moon, 2005).

De nombreux antagonistes extracellulaires participent à la régulation des voies Wnt canonique et non canoniques (Cruciat and Niehrs, 2013). Ces molécules peuvent interagir directement avec les facteurs Wnt afin d'empêcher leur liaison aux récepteurs Fzd (WIF-1, sFRP, Cerebrus) ou se lient alternativement aux corécepteurs Lrp5/6 afin d'empêcher leur interaction avec un facteur Wnt (SOST, Wise, Dkk1, Dkk3) (MacDonald et al., 2009). Enfin,

la signalisation Wnt peut être inhibée par de nombreux facteurs intracellulaires comme ICAT, NKD1, CXXC4 qui agissent à différents niveaux de la voie de signalisation (Tago et al., 2000). Dans ce cadre, il est important de mentionner le rôle du facteur de transcription homéotique HoxA5 dans la boucle de régulation négative de la voie Wnt canonique. En effet, l'expression de HoxA5, elle-même inhibée par la voie Wnt, se concentre dans les cellules différenciées des villosités. Dans ces cellules, HoxA5 active l'expression d'inhibiteurs intracellulaire et extracellulaire de Wnt comme Apcdd1, CXXC4 et NKD1, empêchant ainsi cette voie d'être active dans les cellules différenciées (Ordóñez-Morán et al., 2015).

2.2 La voie Notch

2.2.1 Description de la voie

La voie de signalisation Notch, encore appelée voie d'inhibition latérale, joue un rôle clé dans la spécification des lignages sécréteur et absorbant par le biais de contacts intercellulaires mettant en jeu des ligands et des récepteurs membranaires. Chez les mammifères, 4 récepteurs Notch (Notch 1-4) et 5 ligands Notch ont été identifiés. Ces derniers peuvent être classés en 2 sous-groupes : les ligands Delta-like (Dll-1, Dll-3 et Dll-4) et les ligands Serrated-like (Jagged-1 et Jagged-2).

L'interaction entre un récepteur Notch et un ligand Notch membranaire porté par une cellule voisine conduit à un changement conformationnel du récepteur à l'origine d'un double clivage (**Figure 8)** : le domaine extracellulaire du récepteur Notch est d'abord clivé par une métalloprotéase de la famille ADAM et libéré dans le milieu extracellulaire. Le complexe γ-sécrétase, composé des protéines Préseniline, Nicastrine, Aph1 et Pen2, réalise alors un deuxième clivage au niveau de la région transmembranaire du récepteur, ce qui conduit à la libération du domaine intracellulaire de Notch, NICD. Celui-ci est transloqué dans le noyau au niveau duquel il interagit avec le facteur de transcription CBF1/CSL (RBP-Jκ chez la souris) jusqu'alors associé à des répresseurs transcriptionnels tels que SMRT, CIR et SHARP. L'interaction de NICD avec CBF1 déplace les répresseurs transcriptionnels associés à CBF1 et conduit au recrutement de co-activateurs, telles que les protéines MAML et p300, permettant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie Notch. Ces derniers codent des répresseurs transcriptionnels de la famille Hes ou Herp/Hey à domaine bHLH. Les facteurs Hes et Hey répriment à leur tour l'expression d'activateurs transcriptionnels à domaine bHLH tels que Math et Mash (Vooijs et al., 2011).

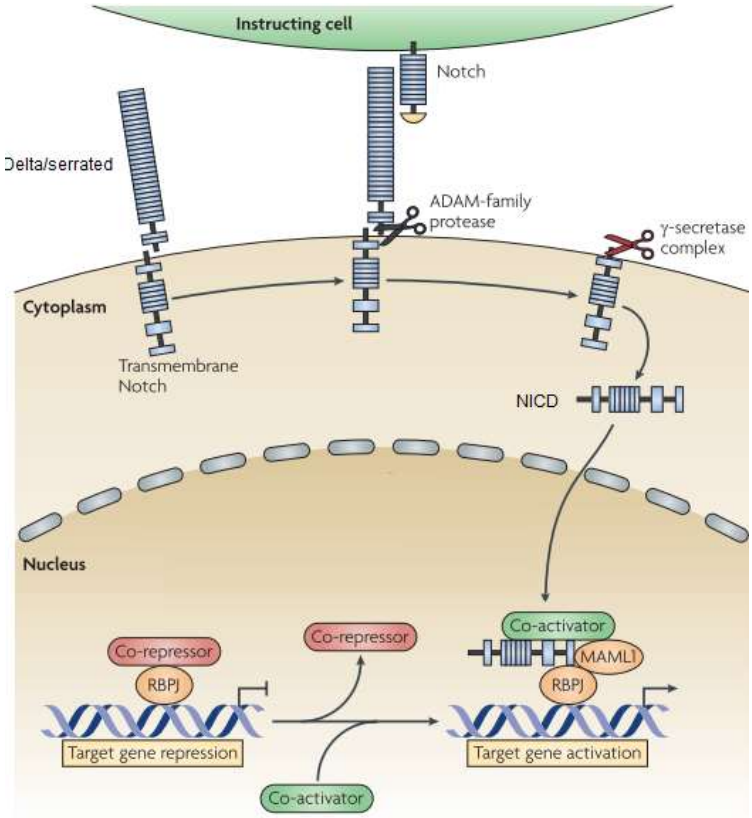

Figure 8: Représentation schématique de la voie de signalisation Notch.
L'interaction entre un ligand Notch et un récepteur porté par une cellule voisine conduit à un double clivage du récepteur et à la translocation nucléaire de son domaine intracellulaire NICD. Dans le noyau, le domaine NICD interagit avec le facteur de transcription RBP-Jκ/CBF-1/CSL pour activer l'expression des gènes cibles de la voie (Adapté de Amsen et al., 2009)

Math1 est un activateur transcriptionnel des ligands Dll1 et Dll4, dont l'expression est réprimée par le facteur de transcription Hes1 (Akiyama et al., 2010; Kazanjian et al., 2010). Ainsi, l'inhibition de l'expression de Math1 par activation de la voie Notch exerce un rétrocontrôle négatif sur cette voie.

2.2.2 Profil d'expression et fonctions de la voie Notch

L'étude du profil d'expression des différents composants de la voie Notch par hybridation *in situ* montre que cette voie est principalement activée dans les cellules souches et les cellules progénitrices des cryptes intestinales (Schröder and Gossler, 2002).

L'inactivation des facteurs de transcription Hes1 et Math1, cibles directe et indirecte de la voie Notch, révèle que Hes1 est un activateur de la prolifération des cellules des cryptes et un déterminant du lignage absorbant (Jensen et al., 2000), tandis que Math1 est un inhibiteur de la prolifération cellulaire et un déterminant du lignage sécréteur (Yang et al., 2001). La balance entre ces deux facteurs est contrôlée par la voie Notch comme le montrent les expériences visant à manipuler cette voie. L'inactivation de la voie Notch par invalidation conditionnelle de RBP-Jκ ou par utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques du complexe γ-sécrétase conduit à la perte des cellules souches et des cellules progénitrices, et s'accompagne d'une augmentation marquée du nombre de cellules sécrétrices (van Es et al., 2005b; Milano et al., 2004). De la même manière, l'invalidation conditionnelle inductible des récepteurs Notch-1 et-2 est associée à la perte d'expression de Hes1 et conduit au même phénotype (Riccio et al., 2008). A l'inverse, l'expression ectopique de NICD dans l'épithélium intestinal de souris transgéniques s'accompagne d'une augmentation d'expression de Hes-1 et d'une diminution d'expression de Math-1, associées à la perte des cellules du lignage sécréteur et à une expansion du compartiment de prolifération des cryptes (Fre et al., 2005; Stanger et al., 2005).

L'ensemble de ces résultats montre que la voie Notch est essentielle à la spécification des lignages sécréteur et absorbant, ainsi qu'au maintien des cryptes intestinales. Ainsi, les cellules progénitrices dans lesquelles la voie Notch est activée s'engagent vers un lignage absorbant, tandis que l'activation de la signalisation Notch dans les cellules souches permet leur maintien, en partie grâce à l'induction de l'expression des inhibiteurs de Cdk $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$ par le facteur Hes1 (Riccio et al., 2008). Il a été proposé que la spécification des cellules intestinales progénitrices en cellules absorbantes ou sécrétrices suive le modèle « d'inhibition latérale »: l'activation de la voie Notch dans une cellule progénitrice engage

celle-ci vers le lignage absorbant et réprime, par une boucle de rétrocontrôle négatif, l'expression des ligands Notch, limitant ainsi la capacité de cette cellule à activer la signalisation Notch dans la cellule progénitrice voisine qui s'engage alors vers le lignage sécréteur (Hauck et al., 2005).

2.3 La voie BMP

2.3.1 Description de la voie

Les protéines BMPs sont des facteurs de croissance appartenant à la famille du TGF-β. Plus de 20 facteurs BMPs ont été identifiés. Ils se lient sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères à un récepteur tétramérique à activité Serine/Thréonine kinase, composé d'un dimère de récepteurs de type 1 (ALK1 (Acvrl1), ALK2 (ActR1), ALK3 (BMPRIA), ALK4 (ActR1b) ou ALK6 (BMPRIB) et d'un dimère de récepteurs de type 2 (BMPRII, ActRIIA ou ActRIIB) **(Figure 9)**. La liaison de BMP à ce récepteur complexe induit la phosphorylation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2, qui phosphoryle à son tour les protéines cytoplasmiques SMAD-1,-5 ou -8. Celles-ci forment alors des complexes dimériques actifs avec SMAD4. Les complexes SMAD sont finalement transloqués dans le noyau au niveau duquel ils interagissent avec des co-activateurs ou des co-répresseurs transcriptionnels pour réguler l'expression des gènes cibles de la voie BMP, tels que SMAD-6 et -7, Noggin, Jun-B et Id1-3 (Bragdon et al., 2011; Miyazono et al., 2005; Zwijsen et al., 2003).

La voie BMP est finement régulée par des antagonistes extracellulaires et des protéines intracellulaires (Corradini et al., 2009). Ainsi, les facteurs sécrétés Noggin, Chordin, Follastin, Gremlin et Cerberus sont capables de se lier aux facteurs BMP et de bloquer l'activation de la voie en empêchant l'interaction de ces facteurs avec leur récepteur membranaire. Parmi les protéines intracellulaires impliquées dans la régulation de la voie BMP, citons la phosphatase PP1, responsable de la déphosphorylation du récepteur de type 1 activé, et les protéines SMAD-6 et -7, des inhibiteurs compétitifs des SMAD-1, -5, et -8 capables d'interagir avec le récepteur de type 1 afin d'empêcher sa phosphorylation ou de promouvoir sa dégradation. En stimulant l'expression des SMAD-6 et -7 et de Noggin, la voie BMP régule ainsi sa propre activation.

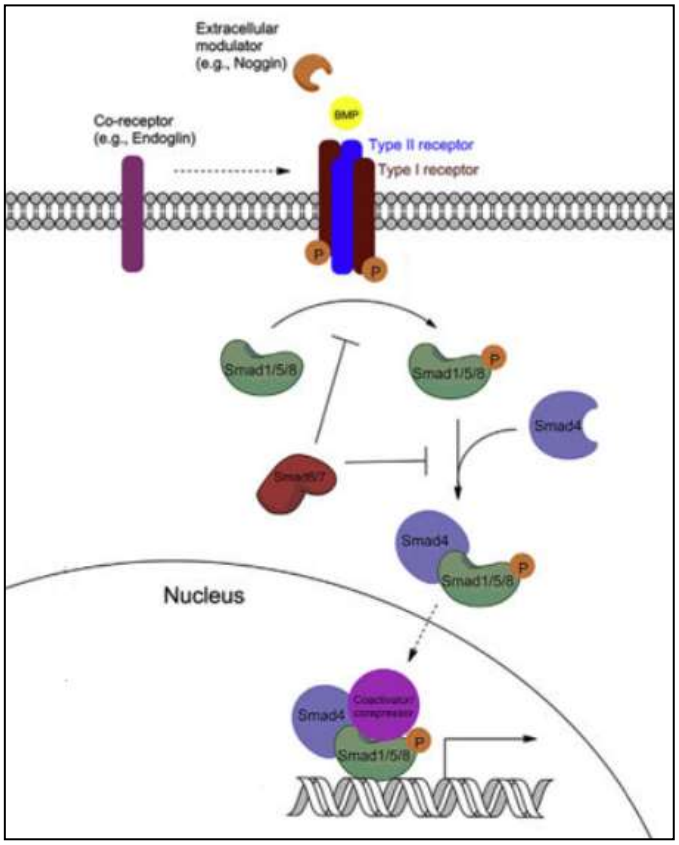

Figure 9: Représentation schématique de la voie de signalisation BMP.
La liaison d'un facteur BMP à son récepteur tétramérique entraîne la phosphorylation et l'activation des protéines SMAD-1,-5, ou -8 qui s'associent avec SMAD-4 pour activer dans le noyau l'expression des gènes cibles de la voie. Plusieurs facteurs, tels que Noggin ou les protéines SMAD-6 et -7 régulent négativement la voie BMP (Adapté de Wang et al., 2014). La voie de signalisation du TGF-β est également dépendante de la voie des MAPK (Javelaud and Mauviel, 2005).

2.3.2 Profil d'expression et fonctions de la voie BMP

L'analyse du profil d'expression des composants de la voie BMP montre globalement que les facteurs BMP sont produits par les cellules mésenchymateuses de la région inter-villositaire et que les récepteurs de type 1 et 2 et les protéines SMAD sont exprimés dans les cellules différenciées selon un gradient d'expression croissant vers le sommet des villosités (Haramis et al., 2004; Hardwick et al., 2004). A l'inverse, les antagonistes de la voie BMP sont exprimés au niveau des cellules mésenchymateuses des cryptes (Kosinski et al., 2007). La voie BMP présente ainsi un gradient d'expression inversement corrélé à celui des voies Wnt et Notch le long de l'axe crypto-villositaire.

L'inhibition de la voie BMP par surexpression de Noggin, un antagoniste des facteurs BMP, dans l'intestin de souris transgéniques conduit à la formation ectopique de cryptes dans la région villositaire et à l'apparition de polypes (Haramis et al., 2004). De la même façon, l'invalidation conditionnelle inductible du récepteur BMPRIA dans l'intestin adulte entraîne l'apparition de cryptes aberrantes et une hyperprolifération des cellules souches intestinales (He et al., 2004). Ces résultats montrent que la voie BMP empêche la prolifération des cellules différenciées des villosités et contribue donc, indirectement, à la localisation de la niche des cellules souches au fond des cryptes. Les mécanismes par lesquels la voie BMP exerce son effet antiprolifératif reposent en partie sur la stabilisation de l'inhibiteur de Cdk $p21^{Waf1}$ (Beck et al., 2007).

La perte du récepteur BMPRI1 conduit par ailleurs à la perte des cellules à mucus, des cellules entéroendocrines et des cellules de Paneth, suggérant que la voie BMP contrôle la différenciation terminale des cellules épithéliales vers le lignage sécréteur (Auclair et al., 2007).

2.4 La voie Hedgehog

2.4.1 Description de la voie

La voie Hedgehog est activée suite à la liaison d'un ligand Shh, Ihh ou Dhh sur son récepteur Ptch1 ou Ptch2 à 12 domaines transmembranaires.
En absence de ligand Hh, les récepteurs Ptch inhibent l'activité du récepteur Smo **(Figure 10)**. Ceci conduit à la phosphorylation cytoplasmique des facteurs de transcription de la famille Gli par les protéines kinases PKA, GSK3β et CK1. Phosphorylés, les facteurs Gli2 et

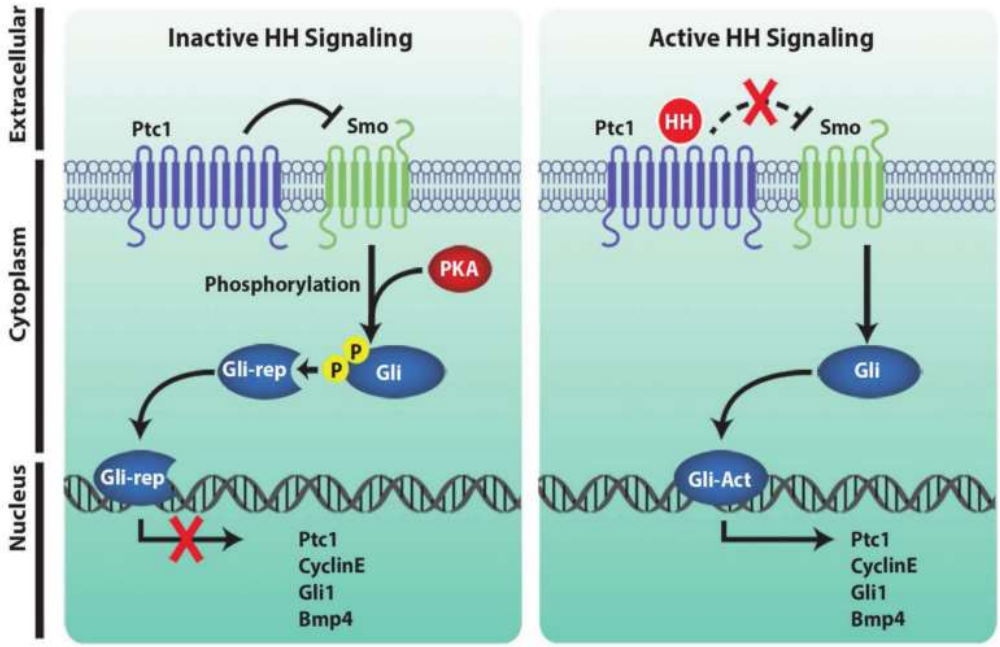

Figure 10: Représentation schématique de la voie de signalisation Hedgehog.
(A) En absence de ligand HH, le récepteur Ptch1 inhibe l'activité de la protéine Smo. Il en résulte la phosphorylation par la kinase PKA des facteurs de transcription Gli qui se comportent alors comme des répresseurs transcriptionnels. **(B)** La liaison d'un ligand HH sur le récepteur Ptch1 inhibe l'activité du récepteur, entraînant l'activation de la protéine Smo et la translocation nucléaire de la forme transcriptionnelle active des facteurs Gli qui activent l'expression des gènes cibles de la voie (Singh et al., 2015).

Gli3 sont des cibles de l'E3 ubiquitine ligase β-TrCP, entraînant leur dégradation partielle par le protéasome et la génération de formes tronquées qui fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels réprimant l'expression des gènes cibles de la voie Hedgehog. Chez les vertébrés, 3 facteurs de transcription Gli ont été identifiés, Gli2 et Gli3 étant les médiateurs majeurs de la voie Hedgehog et Gli1 une cible transcriptionnelle de cette voie.
L'interaction d'un ligand Hh avec un récepteur Ptch conduit à la phosphorylation et à l'activation du récepteur Smo par les protéines kinase GRK2 et CK1α. L'activation de Smo empêche la phosphorylation et le clivage de Gli2 et Gli3 ; les formes intactes de ces protéines, après translocation nucléaire, fonctionnent comme des activateurs transcriptionnels qui stimulent la transcription de leurs gènes cibles, tels que BMP, Bcl-2, cycline D, et Myc (Van Den Brink, 2007; Chen and Jiang, 2013). Parmi les gènes cibles de la voie Hedgehog, plusieurs sont par ailleurs impliqués dans sa propre régulation, tels que Gli1, Ptch et HHIP. Gli1 est un activateur transcriptionnel capable de se lier aux mêmes séquences cis-régulatrices que les facteurs Gli2 et Gli3, exerçant par conséquent un rétrocontrôle positif sur cette voie. A l'inverse, Ptch1 et HHIP sont des récepteurs membranaires qui exercent un rétrocontrôle négatif en interagissant avec les ligands Hedgehog, limitant ainsi la quantité disponible de ces facteurs (Merchant and Saqui-Salces, 2014).

2.4.2 Profil d'expression et fonction

Dans l'intestin, les ligands Hedgehog sont spécifiquement exprimés au niveau de l'épithélium intestinal, tandis que les récepteurs Ptch et les effecteurs Gli sont exprimés par les cellules mésenchymateuses (Madison et al., 2005). En particulier, le facteur Ihh est exprimé dans les cellules différenciées des villosités (Batts et al., 2006; Madison et al., 2005) alors que Shh est produit par les cellules situées à la base des cryptes (Van Den Brink, 2007; Gagné-Sansfaçon et al., 2014).

L'inhibition de la voie Hedgehog par invalidation conditionnelle des ligands Shh ou Ihh ou par surexpression de l'inhibiteur HHIP dans l'intestin de souris adultes conduit à des phénotypes intestinaux différents. L'invalidation conditionnelle de Shh dans l'épithélium intestinal entraîne ainsi une diminution de la longueur des villosités dans l'iléon, une réduction de la prolifération cellulaire, et une diminution du nombre de cellules du lignage sécréteur (Gagné-Sansfaçon et al., 2014). A l'inverse, l'invalidation conditionnelle du ligand Ihh (Kosinski et al., 2010) ou la surexpression de l'inhibiteur HHIP (Madison et al., 2005) conduit à l'apparition de cryptes aberrantes au niveau des villosités ainsi qu'à une

hyperprolifération des cellules épithéliales associée à une activation de la voie Wnt. De façon intéressante, les myofibroblastes sont anormalement localisés dans le stroma des villosités, à proximité des régions prolifératives, tandis que le nombre de cellulaires musculaires lisses est réduit dans le mésenchyme sous-jacent à l'épithélium. Enfin, l'épithélium intestinal de ces souris présente un défaut de différenciation des entérocytes.

En accord avec ces résultats, l'activation constitutive de la voie Hedgehog par invalidation conditionnelle inductible du récepteur Ptch1 (van Dop et al., 2009) ou par surexpression du ligand Ihh (Zacharias et al., 2012) induit une accumulation de myofibroblastes et de cellules musculaires lisses dans le stroma. L'invalidation de Ptch1 conduit par ailleurs à une différenciation précoce des entérocytes et à une hypoplasie des cryptes du côlon associée à une réduction de la prolifération cellulaire (van Dop et al., 2009).

L'ensemble de ces résultats montre que la voie Hedgehog, dont les ligands sont produits par les cellules épithéliales, est essentielle au maintien de la structure crypto-villositaire de l'intestin en stimulant la prolifération et la maturation des cellules stromales qui produisent en retour les facteurs nécessaires au maintien de la niche des cellules souches tels que les facteurs BMP (Sato et al., 2011).

2.5 La voie Hippo/YAP

2.5.1 Description de la voie

La protéine Hippo est une kinase dont l'activation contrôle la croissance des organes en régulant la prolifération cellulaire et la survie. Bien qu'imparfaitement caractérisée, cette voie est très conservée chez les mammifères.

En réponse à certains stimuli mécaniques, telle qu'un état de confluence cellulaire, les protéines kinases MST1 et MST2, orthologues de la protéine Hippo chez les mammifères, phosphorylent les protéines kinases LATS1 et LATS2, ainsi que les protéines adaptatrices MOB1 et SAV1 **(Figure 11).** LATS1 et LATS2 phosphorylent à leur tour les protéines YAP1 et TAZ, ainsi inactivées. YAP1 et TAZ sont des co-activateurs transcriptionnels qui, dans leur état non phosphorylé, sont capables d'interagir dans le noyau avec des facteurs de transcription tels que TEAD1-4, p73, et Tbx5 afin d'induire l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (CTGF, FGF1, AREG …), et la survie (Birc5, Bcl2l1…). Phosphorylés, les effecteurs YAP1 et TAZ sont transloqués dans le cytoplasme, séquestrés par les protéines 14-3-3, et éventuellement dégradés par la voie du

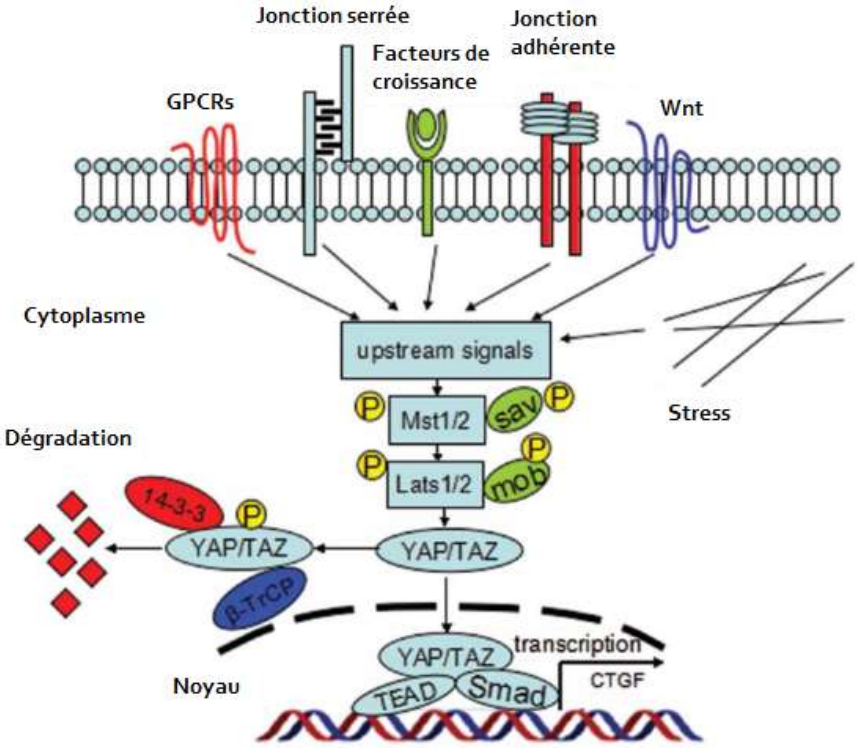

Figure 11: Représentation schématique de la voie de signalisation Hippo/YAP.
En réponse à différents stimuli, les protéines kinases Mst1/2 et Lats1/2 sont phosphorylées. La phosphorylation de Lats1/2 entraîne la séquestration des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ dans le cytoplasme. Dans leur état non phosphorylé, les facteurs YAP et TAZ interagissent dans le noyau avec différents facteurs de transcription pour induire l'expression de gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques. GPCR: Récepteur couplé aux protéines G (Adapté de Guo and Teng, 2015).

protéasome, empêchant ainsi l'expression de ces gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques (Pan, 2010; Piccolo et al., 2014).

2.5.2 Profil d'expression et fonction

Au niveau des cryptes intestinales, la protéine kinase MST1 est localisée dans le cytoplasme des cellules épithéliales alors que l'effecteur YAP1 s'accumule dans le noyau de ces cellules. A l'inverse, dans l'épithélium des villosités, MST1 est localisé dans le noyau alors que YAP1 est observé à l'état phosphorylé dans le cytoplasme, suggérant une activation de la voie Hippo dans les cellules différenciées et une répression de cette voie dans le compartiment des cryptes (Barry et al., 2013; Lee et al., 2008).

Expérimentalement, la surexpression inductible de YAP1 dans l'épithélium intestinal induit une hyperprolifération des cellules progénitrices et une perte des cellules du lignage sécréteur (Camargo et al., 2007). De la même manière, l'invalidation de MST1 et de MST2 dans l'intestin de souris adultes entraîne une expansion du compartiment des cellules souches et la perte des cellules sécrétrices. Ce phénotype peut cependant être contrebalancé par l'invalidation conjointe et ciblée de YAP1 dans l'épithélium intestinal, conformément au modèle selon lequel YAP1 est un effecteur du signal relayé par les kinases MST1 et MST2 (Zhou et al., 2011).

Il est intéressant de noter que l'invalidation ciblée de YAP1 n'affecte pas l'histologie et l'homéostasie intestinale (Cai et al., 2010). Cependant, YAP1 exerce un effet indiscutable mais variablement apprécié sur les processus de réparation de la muqueuse intestinale endommagée. Ainsi, les souris traitées au DSS, un détergent chimique induisant une inflammation de la muqueuse colique, présentent une expression marquée de YAP1 lors de la phase de régénération de l'épithélium intestinal. En outre, la perte de fonction de YAP1 compromet la réparation de l'épithélium colique ulcéré (Cai et al., 2010). A l'inverse, un autre groupe a récemment montré que la perte de YAP1 dans l'intestin de souris irradiées induit une hyperplasie des cryptes, et le développement de cryptes aberrantes lors de la phase de régénération de l'épithélium (Barry et al., 2013). Au regard de ces résultats contradictoires, des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux appréhender la fonction de YAP dans les processus de régénération de l'épithélium intestinal endommagé.

Globalement, ces résultats montrent que la voie Hippo participe au maintien de l'homéostasie intestinale en limitant la prolifération cellulaire au niveau du compartiment des cryptes et en participant aux processus de réparation tissulaire de l'intestin endommagé.

2.6 Interactions entre les voies de signalisation

Le long de l'axe crypto-villositaire, l'épithélium intestinal est organisé en compartiments fonctionnels distincts dont le maintien repose sur des interactions croisées entre les voies de signalisations décrites ci-avant. La complexité de ces interactions n'est pas encore parfaitement définie.

Les voies Wnt et Notch sont les principaux moteurs du maintien des cellules souches intestinales dans la mesure ou l'inhibition de l'une ou l'autre de ces voies conduit à la perte du compartiment des cryptes (van Es et al., 2005a; Korinek et al., 1998). L'hyperprolifération des cryptes observée suite à l'activation de la voie Notch par surexpression du récepteur Notch1 n'est pas maintenue en cas de perte de fonction simultanée de TCF4, l'effecteur majeur de la voie Wnt, ce qui indique que le maintien de l'état prolifératif est conditionné par l'activité coordonnée de ces deux voies (Fre et al., 2009).

Les voies BMP et Hedgehog définissent la niche intestinale en maintenant les cellules souches dans un état de prolifération limitée. Plusieurs études ont mis en évidence un effet inhibiteur des voies BMP et Hedgehog sur la voie Wnt.

La voie BMP régule indirectement l'activité de la voie Wnt canonique en inhibant la voie PI3K/Akt. En absence de signalisation BMP, la kinase PI3K est activée, ce qui conduit à la phosphorylation de l'effecteur Akt, qui phosphoryle à son tour la β-caténine afin d'augmenter son activité transcriptionnelle. L'activation de la voie BMP entraîne l'activation de PTEN, un inhibiteur de la voie PI3K/Akt, conduisant ainsi à une diminution de l'activité de la voie Wnt. Au fond des cryptes, des antagonistes des facteurs BMP tels que Noggin et Gremlin sont produits par les myofibroblastes du mésenchyme sous-jacent, permettant à la voie Wnt d'être particulièrement active dans ce compartiment (Kosinski et al., 2007; Scoville et al., 2008).

Plusieurs travaux suggèrent que la voie Hedgehog potentialise l'effet inhibiteur de la voie BMP sur la signalisation Wnt en stimulant l'expression des facteurs BMP2 et BMP4 dans les cellules du mésenchyme (Narita et al., 2000).

Des études récentes ont montré que la voie Hippo inhibe la voie de signalisation Wnt par au moins deux mécanismes distincts. Dans le cytoplasme, les facteurs YAP1 et TAZ, phosphorylés suite à l'activation de la voie Hippo, séquestrent la β-caténine, empêchant ainsi l'expression des gènes cibles de la voie Wnt dans le noyau (Imajo et al., 2012). Par ailleurs, le facteur TAZ phosphorylé interagit avec la protéine Dsh et inhibe sa phosphorylation, nécessaire à l'activation de la voie Wnt (Varelas et al., 2010).

En outre, la voie Wnt peut réguler en retour la voie Hippo/YAP. Dans le cytoplasme, les facteurs YAP1 et TAZ sont associés au complexe de phosphorylation et de dégradation de la β-caténine. L'activation de la voie Wnt induit une dissociation de ce complexe, permettant la translocation nucléaire des facteurs YAP1/TAZ, alors capables d'induire l'expression de leurs gènes cibles.

Enfin, il a été montré que la β-caténine et le facteur YAP1 phosphorylé par la tyrosine kinase YES1 interagissent avec un facteur de transcription commun, Tbx5, afin d'induire l'expression des gènes anti-apoptotiques Birc5 et Bcl2l2, ce qui indique que la voie Wnt et le facteur YAP1 peuvent exercer une fonction synergique sur l'expression de certains gènes (Rosenbluh et al., 2013).

Chapitre 2 : Les cancers de l'intestin

1. Epidémiologie et classification anatomopathologique

1.1 Epidémiologie et facteurs de risques

Le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé publique : avec près de 1.5 millions de nouveaux cas et 700 000 décès à travers le monde recensés en 2012, il se situe au 3ème rang des cancers les plus fréquents et au 4ème rang des cancers les plus meurtriers (Ferlay et al., 2015). D'ici 2030, le nombre de nouveaux cas et de décès imputables au CCR devrait augmenter de 55% (Arnold et al., 2016). La gravité du CCR est liée à sa propension à former des métastases principalement hépatiques et pulmonaires. Ainsi, si le taux de survie à 5 ans est de 90% pour les CCR diagnostiqués à un stade précoce, il n'est que de 10% pour les cancers diagnostiqués à un stade métastatique (Hollande et al., 2010).

Les études épidémiologiques suggèrent que différents facteurs influencent le risque de développement du CCR, parmi lesquels :

- l'âge : 90% des patients diagnostiqués sont âgés de plus de 50 ans (Haggar and Boushey, 2009)
- le mode de vie : la consommation d'alcool, l'obésité, le diabète, la sédentarité, un régime alimentaire riche en viandes rouges et le tabagisme augmentent le risque de développement de CCR de 20 à 60% (Huxley et al., 2009)
- les antécédents familiaux et personnels de CCR : bien que la majorité des CCR (75%) soit d'origine sporadique, environ 25% sont d'origine héréditaire (Lynch and de la Chapelle, 2003). Ainsi, les personnes dont un membre de la famille du premier degré a développé un CCR ont 2 à 3 fois plus de risques de développer la maladie (Butterworth et al., 2006)
- les maladies inflammatoires de l'intestin : les patients atteints de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique présentent une inflammation de la muqueuse intestinale qui augmente de 2 à 3 fois le risque de développer un cancer du côlon (Bernstein et al., 2001).

1.2 Classification histologique

Les systèmes de classification des tumeurs colorectales actuellement proposés sont d'un intérêt majeur pour établir un pronostic de la tumeur et/ou pour déterminer le protocole thérapeutique le plus adapté au patient. Dans cette perspective, la classification histologique

des tumeurs est très largement utilisée et tient compte du stade tumoral et/ou du grade tumoral.

1.2.1 Le stade tumoral

La classification TNM est un système de classification international standardisé qui rend compte de l'extension locale (T), ganglionnaire (N), et métastatique (M) de la tumeur (Markowitz et al., 2002) **(Figure 12).** Ces trois paramètres sont suivis d'un chiffre, ou de la lettre X lorsque l'évaluation est impossible. Ainsi, la profondeur de la tumeur primitive (T) est cotée de 1 (tumeur très localisée) à 4 (envahissement des organes du voisinage) ; l'envahissement ganglionnaire (N) est évalué de 0 (absence de métastases ganglionnaires) à 2 (un grand nombre de ganglions sont envahis) ; et l'existence de métastases (M) est cotée de 0 (absence de métastases) à 1 (formation de métastases à distance de la tumeur primitive).
La combinaison de ces trois paramètres permet de définir le stade tumoral qui témoigne de l'état d'avancement du cancer (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032814/).

1.2.2 Le grade tumoral

Le grade tumoral est un indicateur du degré de différenciation de la tumeur. Quatre grades de différenciation tumorale sont classiquement décrits : les tumeurs colorectales de bas grade (G1) correspondent à des tumeurs bien différenciées dans lesquelles les zones glandulaires sont conservées, alors que les tumeurs de haut grade sont peu différenciées (G3) voire indifférenciées (G4) (Derwinger et al., 2010). Tout comme le stade tumoral, le grade de différenciation tumorale est un facteur pronostic, les tumeurs de bas grade étant associées à un meilleur pronostic que les tumeurs de haut grade (Derwinger et al., 2010).

2. Altérations chromosomiques dans les CCR

Les CCR humains sont caractérisés par une instabilité génomique mettant en jeu trois mécanismes moléculaires non exclusifs : l'instabilité chromosomique (CIN), l'instabilité microsatellitaire (MSI) et l'instabilité épigénétique (CIMP). Environ 75% des CCR sont d'origine sporadique et 25% ont une origine familiale. En outre, seules 20% de ces formes familiales ont une origine génétique connue (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032767/).

A

Stade de la tumeur	TNM	Description
0	Tis N0 M0	Tumeur restreinte à la muqueuse
I	T1-T2 N0 M0	Atteinte de la sous-muqueuse ou de la musculeuse
II	T3-T4 N0 M0	Atteinte de la séreuse ou des organes avoisinants
III	T1-T4 N1-N2 M0	Envahissement ganglionnaire
IV	T1-T4 N0-N2 M1	Métastase(s) à distance

B

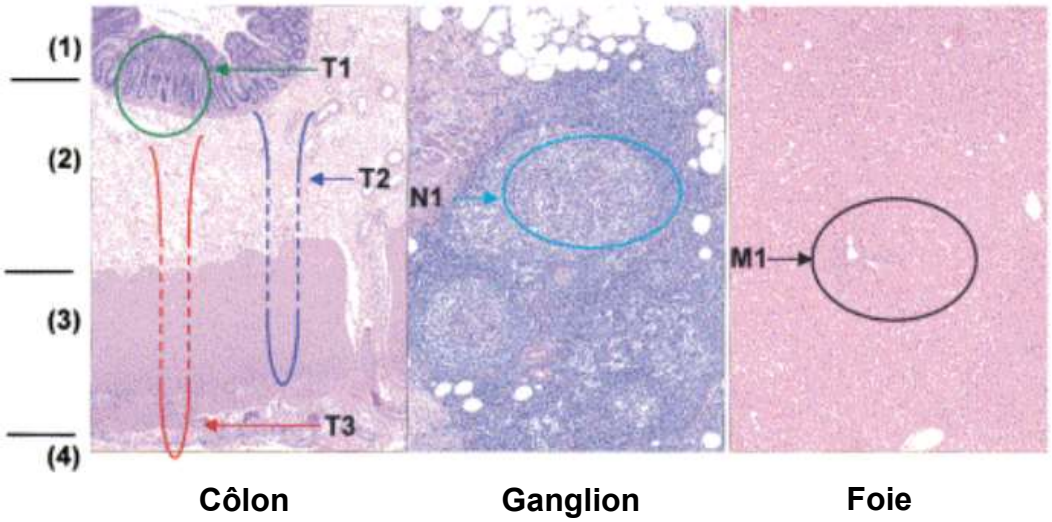

Figure 12: Evaluation du stade tumoral du cancer colorectal selon la classification TNM.
(A) Critères de définition des 5 stades tumoraux. Tis: Tumeur *in situ*
(B) L'image de gauche montre l'extension locale de la tumeur au niveau de la muqueuse (1), la sous-muqueuse (2), la musculeuse (3) et la séreuse (4). T1: la tumeur envahit la sous-muqueuse. T2: la tumeur envahit la musculeuse. T3: la tumeur envahit la séreuse. Les images centrale et de droite montrent un envahissement ganglionnaire et une métastase hépatique, respectivement. (Adapté de Markowitz et al., 2002).

2.1 Classification chromosomique des CCR

2.1.1 Les CCR de type CIN

Les cancers de type CIN représentent 65 à 70% de l'ensemble des CCR. Ils sont caractérisés par la perte ou l'amplification de régions chromosomiques conduisant à une aneuploïdie et à des pertes d'hétérozygoties (Lengauer et al., 1998). Ces pertes alléliques affectent en particulier les gènes Apc (5q), p53 (17p), et SMAD4 (18q) et sont par ailleurs associées à des mutations génétiques ponctuelles (Markowitz and Bertagnolli, 2009).
La tumorigénèse colorectale de type CIN suit le modèle d'accumulation de mutations génétiques séquentielles établi par Fearon et Vogelstein (Fearon and Vogelstein, 1990). Ainsi, la perte de fonction du gène suppresseur de tumeurs Apc est un événement précoce de la tumorigénèse. Celle-ci conduit à l'activation constitutive de la voie Wnt, à l'origine du développement de cryptes aberrantes au niveau de l'épithélium colique. La mutation ponctuelle de l'oncogène Kras intervient à un stade intermédiaire du développement tumoral, lors de la transition adénome précoce - adénome intermédiaire, tandis que les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs SMAD2/4 et p53 surviennent à des stades plus tardifs **(Figure 13)**.

2.1.1.1 Formes sporadiques

Des mutations somatiques du gène Apc sont retrouvées dans 70-80% des cas de CCR sporadiques de type CIN. Ces mutations sont principalement localisées entre les codons 1286 et 1513 et sont à l'origine de la production d'une protéine Apc tronquée (Miyoshi et al., 1992) **(Figure 14).** Une hyperméthylation du promoteur Apc a par ailleurs été rapportée dans 18% des cas de CCR, entraînant la perte d'expression du gène (Esteller et al., 2000). Enfin, des mutations activatrices de la β-caténine, acteur majeur de la voie Wnt et cible de la protéine Apc, ont été observées dans 48% des CCR sporadiques de type CIN dans lesquels le gène Apc est intact (Sparks et al., 1998).

2.1.1.2 Forme héréditaire

La polypose adénomateuse familiale (FAP) est une maladie génétique à transmission autosomique dominante, caractérisée par le développement de nombreux adénomes (>100) au niveau du côlon et du rectum (Fearon, 2011) **(Figure 15)**. Ces lésions se développent dès la puberté et conduisent inéluctablement au développement d'un CCR chez les patients non

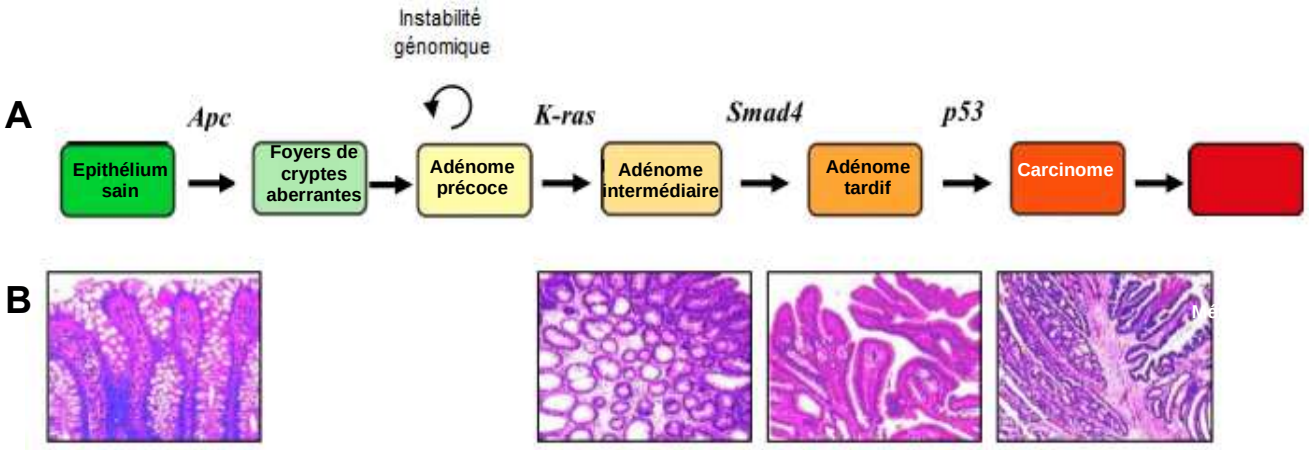

Figure 13: De la muqueuse intestinale saine au CCR.
(**A**) Représentation schématique des altérations génétiques survenant au cours de la progression d'un CCR de type CIN. (**B**) Histologie de la muqueuse intestinale saine, d'un adénome intermédiaire et tardif, et d'un adénocarcinome. (Adapté de Sancho et al., 2004).

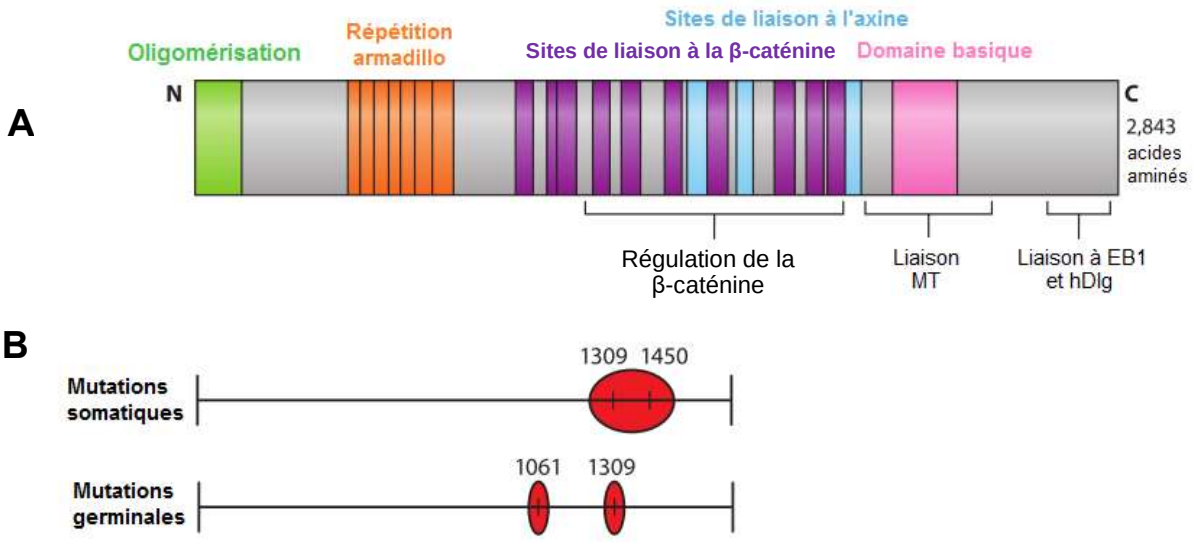

Figure 14: Représentation schématique de la protéine Apc et des mutations du gène chez l'homme.
(**A**) Domaines fonctionnels de la protéine Apc et des sites d'interactions. MT: Microtubules. (**B**) Localisation des principales mutations du gène Apc dans les tumeurs CIN (cercles rouges). Les mutations somatiques du gène affectent en particulier les codons 1309 et 1450 et les mutations germinales, les codons 1061 et 1309 (Adapté de Fearon, 2011).

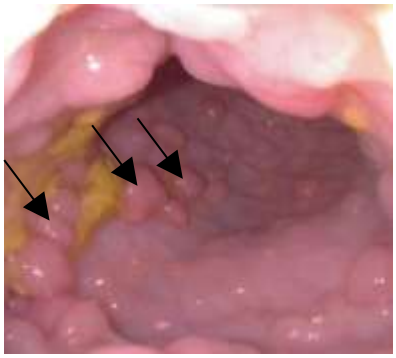

Figure 15: Adénomes coliques du syndrome de la polypose adénomateuse familiale.
Les adénomes sont indiqués par les flèches (Yang and Bialkowska, 2015).

traités par colectomie préventive. Ce phénotype s'accompagne parfois du développement de tumeurs dans d'autres organes digestifs tels que l'estomac, l'intestin grêle ou le pancréas, des tumeurs extra-digestives (thyroïde, système nerveux), des tumeurs desmoïdes, ainsi que d'une hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire de la rétine. Le syndrome FAP résulte de mutations germinales du gène Apc, dont la très grande majorité correspond à des mutations non-sens ou à ou décalage de la phase de lecture (« frameshift »), à l'origine de la production d'une protéine Apc tronquée non fonctionnelle (Fearon, 2011) **(Figure 14)**. La position de la mutation sur le gène Apc conditionne la sévérité du phénotype. Ainsi, si les mutations localisées entre les codons 1250 et 1464 sont associées à une polypose sévère (>1000 adénomes), celles survenant en amont du codon 157 ou après le codon 1595 conduisent au développement d'une forme atténuée du syndrome (10 à 20 adénomes) (Nieuwenhuis and Vasen, 2007). La FAP représente moins de 1% des cas de CCR (Half et al., 2009).

2.1.2 Les CCR de type MSI

Les CCR de type MSI résultent de mutations dans les gènes du système de réparation MMR des mésappariements et des insertions/délétions de bases de l'ADN. Chez les mammifères, le système MMR est constitué de 5 protéines Msh (Msh2 à Msh6) et de 4 protéines Mlh (Mlh1, Mlh3, Pms1, Pms2). La survenue de mutations dans l'un de ces gènes conduit à une instabilité des séquences microsatellites, de petites séquences d'ADN répétées et dispersées dans le génome qui, du fait de leur nature, sont fréquemment affectées par les erreurs de réplication de l'ADN (Bedeir and Krasinskas, 2011). L'instabilité microsatellitaire est définie comme un changement de la longueur d'une séquence d'ADN microsatellite consécutivement à des événements d'insertion ou de délétion de nucléotides, lesquelles sont à l'origine de l'apparition de mutations non-sens ou de décalage du cadre de lecture (« frameshift ») conduisant souvent à l'apparition d'une protéine tronquée (Boland and Goel, 2010). Les tumeurs colorectales de type MSI présentent ainsi fréquemment des mutations microsatellitaires dans les gènes Braf, Bax, TGFβR2 et Acvr2 (Jung et al., 2007).

2.1.2.1 Forme sporadique

Les CCR sporadiques de type MSI représentent environ 12% de l'ensemble des CCR (Boland and Goel, 2010). Ils sont associés à une hyperméthylation du promoteur du gène Mlh1 dans les cellules somatiques, conduisant à la perte d'expression du gène (Kane et al., 1997). Dans 40 à 50% des cas, l'hyperméthylation du promoteur Mlh1 est associée à la

mutation c.1799T>A de l'oncogène Braf entraînant l'activation constitutive de la protéine kinase Braf impliquée dans la croissance tumorale (Geiersbach and Samowitz, 2011).

2.1.2.2 Forme héréditaire

Le syndrome de Lynch, également appelé syndrome HNPPC, est une maladie génétique caractérisée par le développement précoce (entre 42 et 61 ans) de tumeurs principalement au niveau du côlon proximal et dans d'autres organes tels que l'estomac, l'intestin grêle, l'ovaire, l'endomètre, et les voies biliaires **(Figure 16)**. Ce syndrome est défini par cinq critères cliniques, dits d'Amsterdam II : (i) au moins trois apparentés ont été ou sont atteints d'un cancer colique ou extra-colique (ii) l'un des apparentés est un parent du premier degré des deux autres ; (iii) au moins l'un des apparentés a développé un cancer de type HNPCC avant l'âge de 50 ans ; (iv) au moins deux générations successives sont atteintes; (v) le diagnostic de FAP est exclu (Vasen et al., 1999). Les tumeurs coliques et extra-coliques qui se développent dans le cadre de ce syndrome sont caractérisées par une forte instabilité microsatellitaire associée à la présence d'une mutation bi-allélique dans les gènes Msh2, Mlh1, Pms2 ou Msh6 du système de réparation MMR des mésappariements de l'ADN. La contribution relative de chacun de ses gènes au développement d'un syndrome de Lynch est de 38%, 32%, 15% et 14%, respectivement (Palomaki et al., 2009). Plus récemment, des mutations germinales de la région 3' du gène Epcam ont été associées à la perte d'expression du gène Msh2 situé en aval par hyperméthylation du promoteur (Tutlewska et al., 2013). Le syndrome de Lynch est une maladie autosomique dominante à forte pénétrance. En effet, une mutation germinale mono-allélique de l'un des quatre gènes Msh2, Mlh1, Pms2 ou Msh6 n'affecte pas le phénotype mais augmente le risque de développement d'un CCR de 54-74% chez les hommes et de 30-52% chez les femmes, par mutation somatique du 2ème allèle du gène (Bellcross et al., 2012). Environ 3% de l'ensemble des CCR sont associés à un syndrome de Lynch (Geiersbach and Samowitz, 2011).

2.1.3 Les cancers de type CIMP

En marge de l'instabilité chromosomique et microsatellitaire, environ 20-30% des CCR présentent une instabilité épigénétique. Décrit pour la première fois en 1999, ce phénotype, dit CIMP, résulte d'une hyperméthylation des îlots CpG de l'ADN (Toyota et al., 1999). Retrouvés dans près de 50% des régions promotrices du génome humain, les îlots CpG correspondent à des dinucléotides CG, dont la méthylation participe à la répression de l'expression génique.

Figure 16: Adénocarcinome du côlon d'un patient atteint du syndrome de Lynch. L'adénocarcinome est indiqué par les flèches (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Dans le cadre des CCR de type CIMP, l'hyperméthylation des îlots CpG conduit à la perte d'expression de nombreux gènes, parmi lesquels les gènes suppresseurs de tumeurs CDKN2A (p16), CDH1 et VHL, et les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN MGMT et Mlh1 (Lao and Grady, 2011). Ainsi, le phénotype CIMP est fortement associé aux CCR sporadiques de type MSI présentant une hyperméthylation du promoteur du gène Mlh1 et des mutations du gène Braf.

2.1.4 Les autres formes héréditaires de CCR

Bien que le syndrome de Lynch et le syndrome FAP soient les formes héréditaires de CCR les plus représentées, d'autres syndromes héréditaires ont été décrits, associés à un risque élevé de CCR.

La polypose adénomateuse multiple associée au gène Mutyh (MAP) est une polypose adénomateuse à transmission autosomique récessive résultant de mutations bi-alléliques du gène Mutyh, impliqué dans le système de réparation BER de l'ADN (Al-Tassan et al., 2002). Ces mutations conduisent à l'accumulation de conversions G:C→T:A qui affectent en particulier le gène Apc (Jones et al., 2002). Ainsi, à l'instar du syndrome FAP, le syndrome MAP est caractérisé par l'émergence d'un nombre variable de polypes adénomateux au niveau du côlon et du rectum, associés à un risque accru de développement de CCR (Balaguer et al., 2007).

Le syndrome de Peutz-Jeghers est une polypose hamartomateuse rare affectant en moyenne 1 personne sur 150 000. Ce syndrome est caractérisé par une hyperpigmentation muco-cutanée caractéristique et par l'émergence de polypes hamartomateux majoritairement localisés au niveau de l'intestin grêle. Ce phénotype est associé à un risque accru de développer un cancer gastro-intestinal ou gynécologique (van Lier et al., 2010). Des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur Stk11/Lkb1 sont très largement impliqués dans l'émergence de la maladie et sont transmises selon un déterminisme autosomique dominant (Jenne et al., 1998).

La polypose juvénile est une affection rare à transmission autosomique dominante dont l'incidence est proche de celle du syndrome de Peutz-Jeghers (Schreibman et al., 2005). Dès l'enfance, les patients développent des polypes hamartomateux gastro-intestinaux préférentiellement localisés dans le côlon et le rectum, lesquels sont associés à un risque de développement de CCR de 40% (Brosens et al., 2007). Les mutations causales affectent en

particulier les gènes SMAD4 ou BMPR1A, impliqués dans la voie de signalisation des facteurs BMP et du TGF-β (Howe et al., 1998, 2001).

Le syndrome de Cowden est caractérisé par le développement d'hamartomes gastro-intestinaux, cutanés, mammaires, et thyroïdiens (Hobert and Eng, 2009). Ces lésions sont rarement associées au développement de CCR, mais prédisposent au cancer du sein et de la thyroïde. Les mutations dans le gène suppresseur de tumeurs PTEN, un inhibiteur de la kinase Akt, sont associées dans 80% des cas à l'émergence de la maladie et sont transmises selon un déterminisme autosomique dominant (Zhou et al., 2003).

2.2 Modèles murins de CCR

Afin de reproduire les altérations génétiques retrouvées dans les CCR humains et d'étudier les mécanismes moléculaires qui gouvernent leur progression, plusieurs modèles murins de cancers intestinaux ont été développés.

2.2.1 Les modèles génétiques

2.2.1.1 Modèles murins de CCR de type CIN

Les modèles de souris transgéniques pour le gène Apc

Les mutations du gène Apc sont très largement associées au développement des CCR sporadiques et héréditaires à instabilité chromosomique. La perte de fonction bi-allélique d'Apc chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce. Afin de mieux appréhender le rôle du gène Apc au cours de la cancérogénèse colorectale, différents modèles de souris transgéniques porteuses de mutations hétérozygotes de ce gène ont été établis. Ces modèles sont tous caractérisés par le développement d'adénomes et d'adénocarcinomes dans le tractus digestif dont le nombre et la localisation sont conditionnés par le type de mutation introduit (**Tableau 1**).

Le modèle murin Min, développé au début des années 1990 suite à des expériences de mutagénèse chimique aléatoire au N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), porte une mutation germinale non-sens T>A au niveau du codon 850 du gène Apc. Vers 10 ou 12 semaines, les souris $Apc^{+/Min}$ (ou $Apc^{+/\Delta 850}$) développent spontanément 30 +/- 10 polypes adénomateux dans l'intestin grêle, dont certains progressent en adénocarcinomes (Moser et al., 1990; Su et al., 1992).

Mutation Apc	Taille de la protéine Apc (acides aminés)	Nombre approximatif de tumeurs par souris	
		Intestin grêle	Côlon
Apc ^{WT}	2843	0	0
Apc^{Min} (ou *Apc* $^{\Delta 850}$)	850	30	3
Apc^{1638N}	0	3	0
Apc$^{\Delta 716}$	716	300	3
Apc$^{\Delta ex14}$	580	40	4
Apc$^{\Delta 474}$	474	30	3
Apc^{1322T}	1322	200	3
Apc$^{\Delta 15}$	650	175	8
Apc$^{\Delta SAMP}$	1322 + (2006–2843)	200	3
Apc^{1309}	1309	30	3
F344 (rat Pirc)	1137	15	10

Tableau 1: Modèles animaux transgéniques Apc muté. (Adapté de Johnson and Fleet, 2013).

D'autres modèles de souris transgéniques ont par la suite été développés par recombinaison homologue pour mimer les mutations fréquemment retrouvées chez l'homme. Les souris $Apc^{+/1638N}$ portent une mutation non-sens au niveau de l'exon 15 du gène Apc, conduisant à la production d'une protéine tronquée. Ces souris développent un nombre limité d'adénomes et d'adénocarcinomes invasifs dans l'intestin grêle (~ 3 polypes adénomateux à 20 semaines) (Fodde et al., 1994).

Les souris $Apc^{+/\Delta 716}$ portant une mutation non-sens au niveau du codon 716 du gène Apc développent un grand nombre de polypes (254 +/- 55 polypes à 16 semaines), très largement localisés dans l'intestin grêle et, dans une moindre mesure, dans le côlon (Oshima et al., 1995). L'analyse moléculaire de ces polypes indique une perte de l'allège sauvage du gène Apc, suggérant que l'émergence des adénomes dans ce modèle résulte de la perte d'hétérozygotie du gène.

La principale limite à l'utilisation des modèles murins $Apc^{+/Min}$, $Apc^{+/1638N}$ et $Apc^{+/\Delta 716}$ tient de la localisation des tumeurs intestinales, fondamentalement différente de celle des cancers intestinaux chez l'homme. En effet, alors que chez l'homme, les tumeurs intestinales sont très largement localisées dans le côlon, il apparaît que les souris $Apc^{+/Min}$, $Apc^{+/1638N}$ et $Apc^{+/\Delta 716}$ développent des tumeurs intestinales presque exclusivement localisées dans l'intestin grêle. Afin de mimer fidèlement le phénotype de tumorigénèse colique observé chez l'homme, d'autres modèles murins ont été développés.

Parallèlement aux modèles de mutagenèse aléatoire ou ciblée du gène Apc, des modèles permettant l'invalidation conditionnelle par la stratégie Cre-loxP ont été développés.
Le modèle dans lequel l'exon-14 du gène Apc est encadré par deux sites loxP permet la délétion conditionnelle homozygote de cet exon. A partir de cet allèle, la lignée de souris $Apc^{+/\Delta 14}$, utilisée dans le cadre de mon travail de thèse, a été établie. Ces souris portent une délétion mono-allélique de l'exon 14 du gène Apc conduisant au développement d'adénomes et d'adénocarcinomes localisés dans l'intestin grêle mais aussi, à l'inverse des modèles présentés ci-dessus, dans le côlon et le rectum (Colnot et al., 2004).

Plus récemment, un autre modèle murin de cancérogénèse colique a été établi par invalidation conditionnelle de l'exon 15 du gène Apc sous le contrôle du promoteur intestinal I-Fabp (Robanus-Maandag et al., 2010). Ces souris développent en moyenne 40 adénomes et adénocarcinomes intestinaux, dont la majorité (63%) est localisée dans le caecum, le côlon et le rectum.

Outre les modèles d'activation de la voie Wnt par perte de fonction du gène suppresseur de tumeurs Apc, un modèle d'activation de cette voie par expression d'une forme oncogénique de la β-caténine a été produit afin de mimer la situation rencontrée dans un nombre significatif de tumeurs CIN sans altération d'Apc (Harada et al., 1999).

Les altérations de Kras

Des mutations du gène Kras ont été identifiées dans approximativement 40% des CCR humains (Fearon, 2011). Afin d'étudier le rôle de Kras au cours de la cancérogénèse colique, différents modèles murins ont été établis.

La surexpression intestinale d'une forme constitutivement active de Kras (souris transgéniques Vil-Kras^{G12V}) conduit au développement d'adénomes et d'adénocarcinomes en faible nombre dans l'intestin grêle (93%) et le côlon (7%), associé à l'activation de la voie des MAPK (Janssen et al., 2002). De façon intéressante, aucune mutation du gène Apc n'a pu être mise en évidence dans ces lésions qui présentent cependant des mutations de p53. De plus, la combinaison de la mutation Kras^{G12V} avec la mutation Apc$^{+/1638N}$ augmente le nombre et l'agressivité des adénocarcinomes (Janssen et al., 2006).

Afin de replacer ces résultats dans un contexte plus physiologique, deux études ont analysé les effets de la mutation Kras^{G12V} placée sous le contrôle du promoteur endogène de Kras à partir des modèles murins Kras$^{+/LSL12V}$//AhCre$^{+/T}$ ou Kras$^{+/LSL12V}$//CMVCre$^{+/T}$ (Guerra et al., 2003; Sansom et al., 2006). Dans ces modèles, l'expression de la protéine constitutivement active Kras^{G12V} n'affecte pas l'histologie intestinale et ne prédispose pas au développement tumoral de l'intestin. De la même manière, l'invalidation conditionnelle conjointe du gène Apc chez les souris Kras$^{+/LSL12V}$//AhCre//Apc$^{f/f}$ conduit au développement de tumeurs intestinales dont le phénotype et l'incidence sont très comparables à ceux des tumeurs induites chez les souris contrôles invalidées pour Apc (Sansom et al., 2006).

Ces résultats suggèrent que les mutations de Kras ont un faible pouvoir initiateur de la carcinogenèse intestinale, mais sont un élément important de l'évolution maligne, conformément au modèle établi par Fearon et Vogelstein (Fearon and Vogelstein, 1990).

Les altérations de p53

La perte de fonction bi-allélique de p53 conduit au développement précoce de lymphomes et de sarcomes chez la souris, mais ne prédispose pas au développement de tumeurs intestinales (Donehower et al., 1992; Harvey et al., 1993). De la même manière, les souris doubles transgéniques Apc$^{+/Min}$//p53$^{-/-}$ présentent un phénotype similaire à celui des

souris $Apc^{+/Min}$ (Clarke et al., 1995). Ces résultats suggèrent que la perte de fonction de p53 n'est pas impliquée dans l'émergence des tumeurs intestinales mais constitue un événement tardif de la cancérogénèse colorectale humaine, associés à la transition adénome-carcinome (Fearon and Vogelstein, 1990).

2.2.1.2 Modèles murins de CCR de type MSI

A l'inverse des patients atteints du syndrome de Lynch, les souris porteuses de mutations mono-alléliques dans un gène du système de réparation MMR ne développent pas de tumeurs précoces, ce qui pourrait s'expliquer par l'espérance de vie réduite de ces animaux, limitant ainsi la probabilité de survenue de la seconde mutation somatique du gène.
Parmi les 5 homologues MutS (Msh2 à Msh6) et les 4 homologues MutL (Mlh1, Mlh3, Pms1, Pms2) seules des déficiences en Msh2, Msh6, Mlh1 ou Pms2 ont été mises en cause dans l'émergence du syndrome de Lynch chez l'homme. De la même manière, la perte de fonction de ces quatre gènes et de Mlh3 prédispose au développement d'un cancer chez la souris **(Tableau 2)**.

Les modèles de perte de fonction de Msh2

Si les souris hétérozygotes $Msh2^{+/-}$ ne développent pas de phénotype particulier et ont une espérance de vie similaire à celle des souris sauvages, la perte de fonction de Msh2 dans le modèle murin $Msh2^{-/-}$ est associée à une forte propension à développer des lymphomes T (80%), des tumeurs intestinales (70%) et des cancers de la peau (7%) de phénotype MSI (Reitmair et al., 1996; de Wind et al., 1995). En raison de l'agressivité des lymphomes, l'espérance de vie de ces souris est considérablement réduite (<1 an), ce qui rend l'étude des tumeurs gastro-intestinales difficile. Des extraits cellulaires issus de ces souris sont incapables de réparer les mésappariements et les insertions/délétions de bases de l'ADN, soulignant l'importance de Msh2 dans l'activité du système de réparation MMR.

Afin de contourner la mortalité précoce liée au développement tumoral dans les organes extra-intestinaux, un modèle murin d'invalidation conditionnelle de Msh2 dans l'intestin a été développé ($Msh2^{f/f}$//VilCre) (Kucherlapati et al., 2010). Ces souris présentent un phénotype similaire à celui observé chez les patients atteints du syndrome de Lynch : l'invalidation de Msh2 conduit en effet au développement de 1 à 2 adénomes ou adénocarcinomes à instabilité microsatellitaire dans l'intestin grêle au cours de la première année de vie.

Génotype	Fertilité M/F	Fréquence MSI mononucléotides	Fréquence MSI dinucléotides	Incidence tumorale	Spectre tumoral
Homologues de MutS					
Msh2$^{-/-}$	+/+	Elevée	Elevée	Elevée	Lymphomes, GI, cutané, autres
Msh6$^{-/-}$	+/+	Non détectée	Faible	Elevée	Lymphomes, GI, cutané, autres
Msh3$^{-/-}$	+/+	Modérée	Elevée	Faible	GI
Msh6$^{-/-}$ *Msh3*$^{-/-}$	+/+	Elevée	Elevée	Elevée	Lymphomes, GI, cutané, autres
Msh4$^{-/-}$	-/-	NR	NR	-	-
Msh5$^{-/-}$	-/-	NR	NR	-	-
Homologues de MutL					
Mlh1$^{-/-}$	-/-	Elevée	Elevée	Elevée	Lymphomes, GI, cutané, autres
Pms1$^{-/-}$	+/+	Faible	-	-	-
Pms2$^{-/-}$	-/+	Elevée	Elevée	Elevée	Lymphomes, sarcomes
Mlh3$^{-/-}$	-/-	Modérée	NR	Elevée	Lymphomes, GI, cutané, autres
Mlh3$^{-/-}$ *Pms2*$^{-/-}$	NR	Elevée	NR	Elevée	Lymphomes, GI
Protéines accessoires					
Exo1$^{-/-}$	-/-	Elevée	Faible	Modérée	lymphomes, GI, autres

Tableau 2: Phénotype des souris déficientes pour les gènes du système de réparation MMR.

M: Mâle; F: Femelle; NR: Non Renseigné; GI: Gastrointestinal. (Adapté de Taketo and Edelmann, 2009).

Plus récemment, un modèle d'invalidation conditionnelle de Msh2 dans les cellules CBC ($Msh2^{f/-}$//$Lgr5Cre^{ERT2}$) a été établi : ces souris développent des adénomes et des adénocarcinomes intestinaux dans lesquels l'expression de Msh2 est perdue et l'activité de réparation de l'ADN est réduite (Wojciechowicz et al., 2014).

Le modèle $Msh6^{-/-}$

La perte de fonction bi-allélique de Msh6 produit un phénotype similaire à celui observé chez les souris $Msh2^{-/-}$. Cependant, les tumeurs émergent plus tardivement, permettant aux souris $Msh6^{-/-}$ de survivre jusqu'à 18 mois (Edelmann et al., 1997, 2000). L'activité du système de réparation MMR est par ailleurs partiellement conservée. En effet, alors que la réparation des mésappariements de bases est compromise, l'activité de réparation des insertions/délétions de bases est intacte. Ainsi, les tumeurs développées ne présentent pas d'instabilité microsatellitaire. En outre, les femelles $Msh6^{-/-}$ développent des cancers de l'endomètre, à l'instar d'une proportion significative de patientes atteintes du syndrome de Lynch (Wijnen et al., 1999; de Wind et al., 1999).

Le modèle $Msh6^{-/-}$//$Msh3^{-/-}$

La perte de fonction de Msh3 n'affecte pas l'espérance de vie et n'induit pas de phénotype tumoral en raison des effets modérés de la déficience de Msh3 sur la réparation de l'ADN (Edelmann et al., 2000). Cependant, la perte de fonction simultanée de Msh3 et Msh6 (souris $Msh6^{-/-}$//$Msh3^{-/-}$) conduit à la perte complète de l'activité du système de réparation MMR et à l'apparition d'un phénotype similaire à celui des souris $Msh2^{-/-}$ (Edelmann et al., 2000; de Wind et al., 1999).

Le modèle $Mlh1^{-/-}$

Les souris $Mlh1^{-/-}$développent un phénotype similaire à celui des souris $Msh2^{-/-}$. La perte de fonction de Mlh1 conduit en effet au développement de lymphomes T, de tumeurs intestinales et de cancers de la peau, associés à une espérance de vie réduite (<12 mois) et à une stérilité (Baker et al., 1996; Edelmann et al., 1999; Prolla et al., 1998). En outre, ces tumeurs présentent une instabilité microsatellitaire associée à une perte complète de l'activité du système de réparation MMR.

Le modèle $Pms2^{-/-}$

Les souris $Pms2^{-/-}$ présentent une espérance de vie significativement réduite en comparaison aux souris sauvages (<18 mois) et un phénotype tumoral qui diffère de celui des souris $Msh2^{-/-}$, $Msh6^{-/-}$ et $Mlh1^{-/-}$. Ainsi, la perte de fonction de Pms2 conduit au

développement tardif de lymphomes et de sarcomes à instabilité microsatellitaire, mais elle n'est pas associée au développement de tumeurs intestinales (Baker et al., 1995; Prolla et al., 1998). En outre, l'invalidation de Pms2 est associée à une fréquence mutationnelle deux à trois fois plus faible que celle observée chez les souris $Mlh1^{-/-}$ (Yao et al., 1999). De la même manière, les patients atteints du syndrome de Lynch par mutation du gène Pms2 présentent un risque de cancer modéré, associé à une émergence tardive des tumeurs (Senter et al., 2008).

Les modèles $Mlh3^{-/-}$ et $Mlh3^{-/-}$//$Pms2^{-/-}$

Chez l'homme, des mutations du gène Mlh3 n'ont été que très rarement mises en cause dans l'émergence du syndrome de Lynch (Hienonen et al., 2003; Wu et al., 2001). Les souris $Mlh3^{-/-}$développent tardivement des lymphomes ainsi que des cancers de l'intestin grêle et de la peau dont l'instabilité microsatellitaire est modérée voire faible en comparaison aux souris $Pms2^{-/-}$ et $Mlh1^{-/-}$ (Chen et al., 2005). La perte de fonction conjointe du gène Pms2 augmente cependant l'instabilité microsatellitaire à des niveaux comparables à ceux observés chez les souris $Mlh1^{-/-}$ (Chen et al., 2005).

Le modèle $Exo1^{-/-}$

L'exonucléase 1, ou Exo1, est une protéine accessoire du système de réparation MMR de l'ADN impliquée dans l'excision des mésappariements et dont la contribution dans l'émergence du syndrome de Lynch est contestée (Jagmohan-Changur et al., 2003).
Les souris déficientes pour Exo1 sont prédisposées au développement tardif de lymphomes et de tumeurs gastrointestinales (Wei et al., 2003). Ces tumeurs présentent une instabilité microsatellitaire associée à un défaut de réparation des mésappariements et des insertions/délétions d'une seule base, mais à une activité de réparation conservée des insertions/délétions de plusieurs bases. Ce phénotype suggère l'existence d'exonucléases additionnelles dont les effets seraient redondants à ceux exercés par l'exonucléase 1 sur le système de réparation MMR.

2.2.2 Les modèles chimio-induits

Outre les modèles génétiques de tumorigénèse intestinale, les modèles de cancérogénèse chimio-induits sont fréquemment utilisés. Ces modèles reposent sur l'administration d'un ou de plusieurs agents chimiques cancérogènes entraînant l'apparition de mutations de l'ADN ou une inflammation. Le phénotype tumoral induit par ces composés est étroitement lié à la nature et à la dose de l'agent carcinogène administré, à la durée du traitement, et au fond génétique des souris traitées.

Les modèles AOM et DMH

L'azoxyméthane (AOM) est l'agent carcinogène le plus fréquemment utilisé dans le cadre des modèles de tumorigénèse chimio-induits. Ce composé est un métabolite du DMH, ensuite transformé par hydroxylation en Methylazoxyméthanol (MAM), lequel méthyle l'ADN au niveau des positions O6 et N7 des résidus guanine (De Robertis et al., 2011). Ces adduits génèrent des mutations ponctuelles par substitution de la paire de bases G:C en A:T (Takahashi and Wakabayashi, 2004).

L'AOM et le DMH induisent l'apparition de foyers de cryptes aberrantes dans l'intestin, considérées comme des lésions prénéoplasiques, et génèrent à plus long terme (30 semaines après traitement) des adénocarcinomes, dont certaines caractéristiques histopathologiques sont similaires à celles des CCR humains. Les tumeurs chimio-induites par ces agents présentent fréquemment des mutations dans les gènes K-Ras et β-caténine mais sont en revanche très rarement associées à des mutations dans les gènes Apc et p53 (Takahashi and Wakabayashi, 2004).

Globalement, les tumeurs intestinales chimio-induites avec ces composés sont localisées dans le côlon distal (De Robertis et al., 2011). La charge tumorale est proportionnelle à la durée du traitement, et dépend par ailleurs du fond génétique des souris traitées. Ainsi, les souris de souche AKR/J sont plus résistantes au développement tumoral chimio-induit que les souches A/J et SWR/J (Bissahoyo et al., 2005).

Le modèle DSS

Le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) est un détergent chimique induisant une ulcération de l'épithélium intestinal associée à une forte réaction inflammatoire. Ce composé est ainsi classiquement utilisé chez la souris pour mimer les pathologies inflammatoires humaines de la muqueuse digestive.

L'administration répétée de DSS provoque des cycles d'inflammation et de réparation de la muqueuse intestinale. Ceci s'accompagne du développement de lésions cancéreuses allant de la dysplasie de haut grade au carcinome invasif (Okayasu et al., 2002). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas caractérisés.

Le modèle de traitement combiné AOM+DSS

Chez la souris, l'administration intra-péritonéale d'AOM conciliée à l'ajout de DSS dans l'eau de boisson conduit au développement de nombreuses tumeurs intestinales dès la 10ème semaine de traitement. Le temps de latence tumorale est ainsi considérablement réduit en comparaison au modèle murin traité exclusivement à l'AOM (Neufert et al., 2007).

En outre, ce modèle reproduit plusieurs aspects histopathologiques et moléculaires de la tumorigénèse intestinale humaine. Le traitement AOM+DSS initie ainsi la tumorigénèse à partir de cryptes aberrantes dont certaines évoluent en adénomes puis en adénocarcinomes, permettant l'étude des processus impliqués dans la cancérogénèse intestinale à différents stades du développement tumoral (De Robertis et al., 2011).

A l'instar des tumeurs intestinales humaines, les tumeurs chimio-induites par traitement AOM+DSS sont majoritairement localisées dans la partie distale du côlon et présentent une perte d'expression de p53. Cependant, elles ne sont que très rarement invasives et métastatiques (Tanaka et al., 2003).

Autres modèles chimio-induits

De nombreux autres agents carcinogènes peuvent être utilisés pour induire un développement tumoral dans l'intestin. Parmi eux, citons le DMBA, un amine aromatique, et les alkylnitrosamides MNU et MNNG. Ces trois composés induisent l'apparition d'adénomes et d'adénocarcinomes dans le côlon (Narisawa et al., 1974; Reddy and Ohmori, 1981). La principale limite à l'utilisation de ces agents tient de leur efficacité limitée (développement de 1 à 3 tumeurs intestinales) et de la nécessité de procéder à des injections répétées sur plusieurs semaines (Reddy and Ohmori, 1981; Reddy et al., 1975b). Le DMBA présente par ailleurs un manque de spécificité, illustré par le développement d'adénocarcinomes mammaires, de lymphomes et de sarcomes (Rosenberg et al., 2009).

De la même manière, les composés amines hétérocycliques PhIP et IQ induisent des tumeurs de l'intestin grêle et du côlon, mais également des cancers de la glande mammaire et de la prostate ainsi que des lymphomes (Esumi et al., 1989; Rosenberg et al., 2009). En outre, l'incidence tumorale ne dépasse pas 30% après 52 semaines de traitement (Reddy and Rivenson, 1993).

3. Apport des données transcriptomiques

Jusqu'au début des années 2000, les systèmes de classification des CCR reposaient exclusivement sur des analyses histologiques, chromosomiques ou moléculaires de seulement quelques marqueurs tumoraux. Le développement récent des techniques de séquençage à haut débit a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives quant à la classification des CCR. Le séquençage à haut débit permet de séquencer rapidement l'intégralité du génome ou du transcriptome des cellules tumorales afin de dresser un profilage des tumeurs servant de support à une classification moléculaire des cancers. Ce type de classification a pour objectif

d'optimiser la prise en charge des patients en leur proposant une thérapie ciblée dans le cadre d'un traitement personnalisé.

Six études réalisées à grande échelle ont tenté de stratifier les CCR en différents groupes en fonction des similitudes de leur profil génomique et transcriptomique (Budinska et al., 2013; Marisa et al., 2013; Roepman et al., 2014; Sadanandam et al., 2013; Schlicker et al., 2012; De Sousa E Melo et al., 2013). Les systèmes de classification proposés variaient cependant considérablement : chacune de ces études proposait en effet un nombre de sous-types de CCR différent, associés à des caractéristiques moléculaires et cliniques elles aussi différentes. En 2015, une classification moléculaire consensus des CCR a été élaborée par le consortium CMS en combinant ces six systèmes de classification (Guinney et al., 2015). Un total de 3962 tumeurs colorectales a ainsi été analysé et quatre sous-types consensus de CCR ont été proposés **(Figure 17)**:

- Le sous-type CMS1 (MSI-immune) représente 14% de l'ensemble des CCR. Les tumeurs de ce groupe présentent un taux de mutations élevé, une forte instabilité microsatellitaire et sont associées à une forte activation du système immunitaire.

Les trois autres sous-types de CCR correspondent à des CCR dont le phénotype microsatellite est globalement stable.

- Le sous-type CMS2 (canonical), représente 37% de l'ensemble des CCR. Ces tumeurs sont enrichies en cellules épithéliales présentant une activation des voies Wnt et Myc et sont par ailleurs caractérisées par la perte de gènes suppresseurs de tumeurs et par un gain génétique d'oncogènes.

- Le sous-type CMS3 (metabolic), représente 13% de l'ensemble des CCR. Les tumeurs de ce groupe sont enrichies en cellules épithéliales présentant une dérégulation des voies de signalisation impliquées dans le métabolisme et sont souvent caractérisées par un taux de mutation élevé. En outre, ces tumeurs sont fréquemment associées à des mutations de l'oncogène Kras et à un phénotype CIMP-low.

- Le sous-type CMS4 (mesenchymal) représente 23% de l'ensemble des CCR. Les tumeurs de ce groupe, souvent invasives, sont caractérisées par une forte expression des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, par l'activation de la voie du TGF-β et par une activation des voies de l'inflammation induites par le complément. Ces tumeurs sont de mauvais pronostic et sont associées à une survie sans récidive plus courte en comparaison aux autres sous-types.

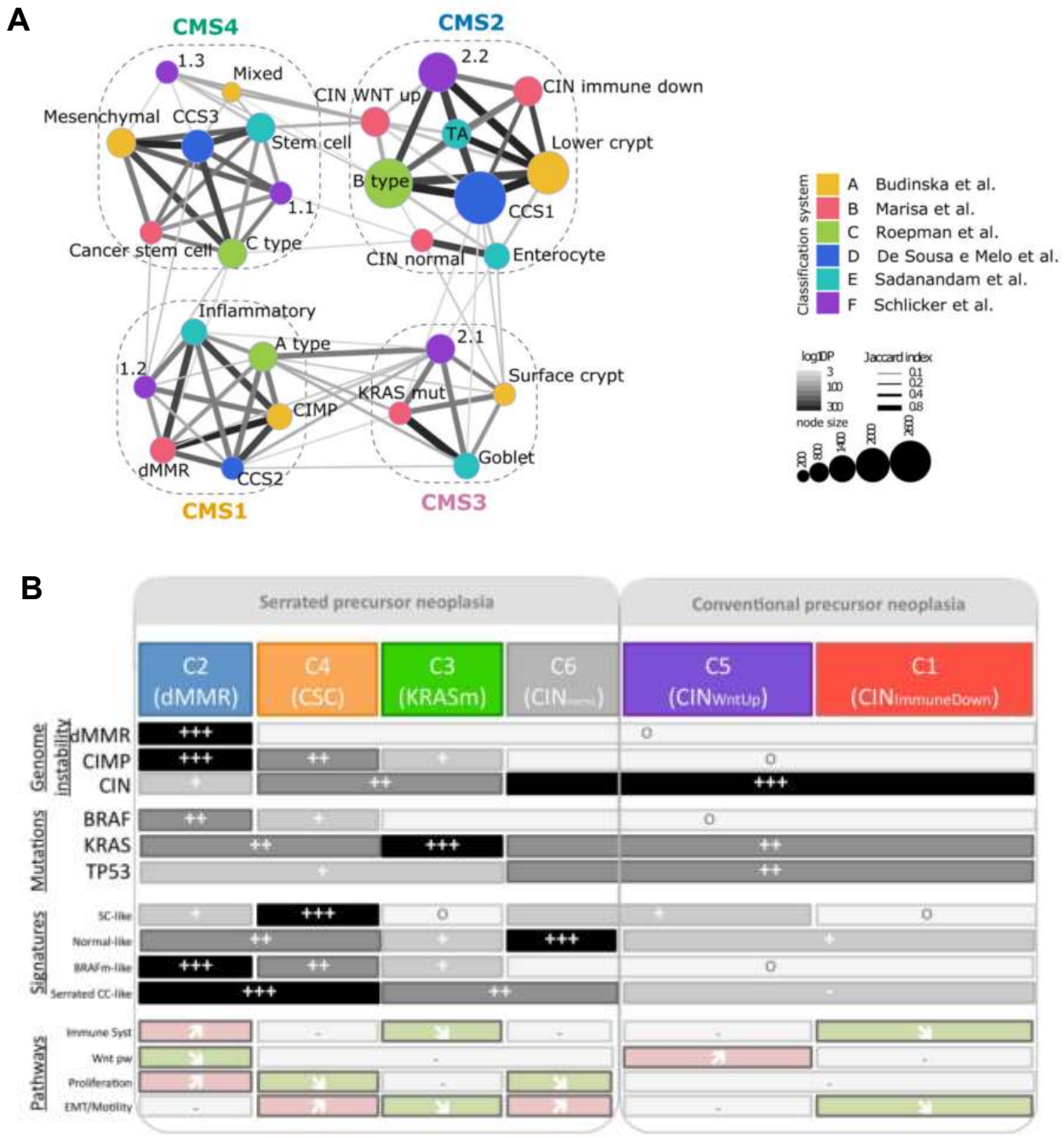

Figure 17: Classification moléculaire des CCR humains.
(A) Etablissement de la classification moléculaire consensus des CCR. Les cercles de couleur représentent les 27 sous-types de CCR identifiés par 6 études transcriptomiques. La largeur du trait reliant chaque sous-type est représentative du degré de similitude entre chacun d'eux. Sur la base de cette analyse, 4 sous-types consensus ont été proposés (CMS1-4) (Guinney et al., 2015). **(B)** Caractéristiques moléculaires des 6 sous-types de CCR identifiés par le programme Carte d'identité des tumeurs de la Ligue contre le cancer. SC: Cellule souche (Marisa et al., 2013).

Enfin, environ 13% des tumeurs analysées présentent un phénotype mixte et n'ont pas pu être affiliées à un sous-type de CCR.

Ces résultats montrent que le CCR n'est plus à considérer comme une maladie unique, mais comme un ensemble de formes distinctes et complexes de par leurs caractéristiques moléculaires et leur pronostic.

4. L'écosystème des CCR

4.1 L'hétérogénéité tumorale : concept de la cellule souche cancéreuse

4.1.1 Cellule souche cancéreuse : historique et définition

L'hypothèse selon laquelle les cancers auraient pour origine une cellule souche cancéreuse (CSC) ou cellule initiatrice de tumeur (CIT) a pour la première fois été fois suggérée en 1963. Dans leurs travaux, Bruce et Van der Gaag montrent que seule une petite fraction de cellules issues de lymphomes murins était capable de proliférer dans la rate de souris receveuses (Bruce and Van der Gaag, 1963).
Ce n'est que 30 ans plus tard que cette hypothèse fut reprise par le groupe de Dick, au cours d'une étude ayant montré qu'une sous-population rare (1 cellule sur 100 000) de cellules isolées du sang de patients atteints d'une leucémie aigüe myéloïde est capable de reformer la pathologie chez des souris immunodéficientes NOD/SCID. En outre, ces cellules sont toutes de phénotype $CD34^+$ $CD38^-$ (Lapidot et al., 1994). Peu après, cette même équipe a montré que ces cellules partagent plusieurs caractéristiques fonctionnelles des cellules souches, en ce sens qu'elles sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier pour générer les différents lignages du tissu hématopoïétique (Bonnet and Dick, 1997). Les mots sont posés, le concept de la cellule souche cancéreuse est né. Depuis le début des années 2000, ce concept s'est imposé dans de nombreux autres cancers, tels que ceux du sein, du pancréas, de la prostate, de l'ovaire, du poumon, de l'estomac et du côlon (Hu and Fu, 2012).

Une cellule souche cancéreuse se définit comme une cellule tumorale capable de s'auto-renouveler et de reproduire l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur en question (Clarke et al., 2006). En dépit d'un nombre croissant d'études, l'origine de la cellule souche cancéreuse est encore très discutée : cette cellule pourrait en effet être le fruit de mutations dans les cellules souches « normales », ou alternativement, dans les cellules différenciées (Martínez-Climent et al., 2006). En outre, plusieurs études suggèrent que ces cellules seraient impliquées dans la

résistance aux traitements anti-cancéreux à l'origine de l'échappement tumoral, et constitueraient ainsi une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des cancers (Hu and Fu, 2012).

4.1.2 Origine de la cellule souche cancéreuse du CCR

Les premières données expérimentales suggérant l'existence de CSC dans les CCR ont été obtenues à partir de lignées cancéreuses greffées chez des souris immunodéficientes (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Elles ont conduit à l'identification de la population de cellules $CD133^+$ capables d'initier la tumorigénèse en greffe.

La mise en évidence des CSC pose la question de leur origine. L'identification de marqueurs des cellules souches intestinales a permis ces 10 dernières années de tester l'hypothèse selon laquelle les cellules souches physiologiques seraient à l'origine des cellules initiatrices du développement tumoral. A l'appui de cette hypothèse, la perte de fonction conditionnelle du gène suppresseur de tumeurs Apc dans les cellules CBC $Lgr5^+$ conduit au développement de microadénomes qui évoluent rapidement en adénomes puis en adénocarcinomes, tandis que la perte d'Apc dans les cellules intestinales progénitrices entraîne la formation de micro-adénomes qui dégénèrent spontanément et n'évoluent que rarement en cancer (Barker et al., 2009). De la même manière, la perte d'Apc dans les cellules souches de réserve $Lrig^+$ (Powell et al., 2012) et $CD133/Prominin^+$ (Zhu et al., 2009), ou l'expression d'une forme constitutivement active de la β-caténine dans les cellules $Bmi1^+$ (Sangiorgi and Capechhi, 2008) induit la formation d'adénomes dans l'intestin, tandis que la perte d'expression d'Apc, même couplée à l'activation oncogénique de Kras, n'induit pas de processus tumoral à partir des cellules progénitrices du lignage absorbant dans l'intestin grêle (Tetteh et al., 2016).

Globalement, ces résultats suggèrent que l'activation de la voie pro-oncogénique Wnt dans les cellules souches intestinales est suffisante pour induire un développement tumoral et supportent l'hypothèse selon laquelle les cellules souches intestinales correspondraient aux cellules initiatrices du CCR.

Cependant, cette conclusion mérite d'être pondérée par les résultats d'études récentes suggérant que le CCR peut également être initié à partir de cellules intestinales différenciées. En effet, il a été montré que la perte conditionnelle du gène Apc dans les cellules en houppes $Dclk1^+$ est insuffisante pour initier la tumorigénèse colorectale mais facilite le développement d'adénocarcinomes coliques suite au traitement DSS (Westphalen et al., 2014). De plus,

l'activation conjointe des voies de signalisation Wnt et NFκB, la principale voie de réponse aux médiateurs de l'inflammation, conduit au développement de structures cryptiques ectopiques au niveau des villosités exprimant des marqueurs des cellules CBC dont Lgr5, qui évoluent secondairement en adénocarcinomes (Schwitalla et al., 2013). Il apparaît ainsi que les cellules intestinales différenciées dans lesquelles les voies Wnt et NFκB sont activées puissent réacquérir des propriétés de cellules souches favorisant un développement tumoral, lequel pourrait être relayé par l'induction de l'enzyme iNos (Shaked et al., 2012). L'expression ectopique de Grem1, un antagoniste de la voie BMP, entraîne également l'apparition de progéniteurs prolifératifs (mais pas de cellules CBC) au niveau des cellules différenciées des villosités qui sont à l'origine du développement de polypes adénomateux et cystiques (Davis et al., 2015). Enfin, très récemment, un nouveau modèle murin de perte d'Apc combinée à l'expression d'une forme oncogénique de Kras à la surface de l'épithélium du caecum et du côlon proximal a confirmé la possibilité de développer des adénocarciomes à partir des cellules différenciées de la surface épithéliale (Tetteh et al., 2016).

L'ensemble de ces données expérimentales indique que l'origine des cellules CBC est multiple: celles-ci peuvent en effet dériver des cellules souches de la crypte ainsi que de cellules différenciées qui ont retrouvé des propriétés de cellules souches ou progénitrices suite à l'activation de plusieurs voies de signalisation oncogéniques. Cette plasticité des cellules épithéliales différenciées rappelle le modèle « top-down » de cancérogenèse colique humaine proposé par l'équipe de B Vogelstein (Shih et al., 2001).

4.2 Impact du microenvironnement tumoral

Si le CCR repose sur des altérations génétiques affectant en particulier des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes, le microenvironnement tumoral impacte fortement la tumorigénèse colorectale. Celui-ci se définit comme l'ensemble des éléments entourant la tumeur (fibroblastes, cellules endothéliales, vaisseaux lymphatiques, cytokines, cellules immunitaires, microbiote…) et avec lesquels les cellules tumorales sont en constante interaction. En particulier, un nombre croissant d'études montre que le système immunitaire et le microbiote sont largement impliqués dans l'initiation et la progression des tumeurs coliques.

4.2.1 Le système immunitaire

La présence de cellules immunitaires et inflammatoires dans les tumeurs a pour la première fois été observée au XIX siècle par Rudolf Virchow (Balkwill and Mantovani, 2001). Pour autant, l'impact du système immunitaire sur le développement tumoral a longtemps été sous-estimé. Ainsi, en 2000, parmi les 6 critères énoncés comme déterminants pour la progression tumorale, aucun ne faisait référence au système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2000). Des données expérimentales chez la souris ont par la suite suggéré l'importance du système immunitaire dans la cancérogenèse colique. En effet, l'ablation de SMAD4, un médiateur de la voie du TGF-β dans les cellules épithéliales, n'induit pas de transformation tumorale, tandis que son invalidation spécifique dans les lymphocytes T conduit au développement d'adénocarcinomes au niveau du côlon et du duodénum (Kim et al., 2006a). Ainsi, ce n'est qu'au cours de ces 10 dernières années que l'importance du système immunitaire dans le processus de cancérogénèse fut reconnue (Mantovani, 2009).

4.2.1.1 L'immunoédition

Le système immunitaire prévient le développement tumoral en identifiant et en éliminant les cellules transformées. Ce mécanisme, appelé immunosurveillance, met en jeu de nombreuses populations cellulaires. Parmi ces dernières, citons les cellules NK, qui éliminent les cellules tumorales n'exprimant plus les molécules du CMH-I de façon rapide et immédiate (Zamai et al., 2007), les lymphocytes T $CD8^+$ qui reconnaissent et éliminent les cellules exprimant des antigènes tumoraux (Pardoll, 2002), les lymphocytes LTh1 $CD4^+$ qui stimulent l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) et produisent des cytokines favorisant la réponse anti-tumorale (IFN-γ, IL-4) (Sun et al., 2013), les lymphocytes LTh17 $CD4^+$ qui activent les LTC (Ankathatti Munegowda et al., 2011) et les lymphocytes T régulateurs (LTreg) qui ont un effet anti-inflammatoire (Erdman et al., 2005). En outre, les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle clé dans la réponse anti-tumorale en présentant les antigènes tumoraux internalisés aux lymphocytes T $CD4^+$ et aux lymphocytes T $CD8^+$.

Si cette réponse anti-tumorale permet l'élimination d'un grand nombre de cellules transformées, elle crée cependant une pression de sélection favorisant l'émergence de cellules tumorales capables de se soustraire au système immunitaire. Une phase de latence ou « d'équilibre » pouvant durer plusieurs années se met alors en place, pendant laquelle le développement de la tumeur est contrôlé par le système immunitaire. Finalement, les cellules

tumorales mettent en place des mécanismes qui leur permettent d'échapper au système immunitaire (diminution d'expression des molécules du CMHI et/ou des antigènes tumoraux, expression de facteurs immunosuppressifs…), conduisant au développement d'une tumeur cliniquement décelable.

Ces interactions réciproques entre le système immunitaire et les cellules tumorales sont modélisées par la théorie de l'immunoédition, ou théorie des trois E -Elimination, Equilibre, Echappement **(Figure 18)** (Dunn et al., 2004).

4.2.1.2 Les cellules immunitaires comme facteurs pronostic du CCR

Plusieurs études récentes se sont attachées à caractériser le contexte immunitaire des tumeurs colorectales. Les CCR présentent un infiltrat immunitaire constitué de l'ensemble des sous-populations de cellules immunitaires, mais dont les proportions relatives et la localisation dans la tumeur varient entre chaque patient (Fridman et al., 2012). En outre, la densité et la localisation intra-tumorale de certains sous-types de cellules immunitaires fournit une puissante information pronostique. Ainsi, une forte infiltration des tumeurs coliques par les cellules NK et les LTreg est associée à un bon pronostic (Coca et al., 1997; Shang et al., 2015). De la même manière, un travail mené par l'équipe du Dr Galon a montré que l'absence d'invasion métastatique précoce (invasion vasculaire, lymphatique et périneurale) est associée à une forte infiltration lymphocytaire et à une augmentation de l'expression des cibles de la réponse Th1 (Pagès et al., 2005). En particulier, de fortes densités de lymphocytes T cytotoxiques $CD3^+$ $CD8^+$ et de lymphocytes T mémoires $CD45RO^+$ sont associées à une survie sans récidive plus longue et à un allongement de la survie globale (Galon et al., 2006). A l'inverse, la présence intra-tumorale de LTh17 exerçant une activité pro-inflammatoire est associée à un mauvais pronostic (Liu et al., 2011; Tosolini et al., 2011). Enfin, les tumeurs coliques présentant de fortes densités intra-tumorales de macrophages peuvent être de bon ou de mauvais pronostic selon la polarisation des macrophages (M1 ou M2) infiltrant la tumeur (Owusu et al., 2015).

Au regard de ces résultats, un test « immunoscore » représentatif du pronostic des tumeurs a été développé (Pagès et al., 2009). Ce test repose sur la quantification par immunomarquage des populations de lymphocytes T $CD8^+$ et de lymphocytes T mémoires $CD45RO^+$ au centre et en marge de la tumeur. La puissance pronostique de l'immunoscore a été évaluée sur des tumeurs colorectales de stades I à IV (Pagès et al., 2009) (Mlecnik et al., 2011) : les patients présentant une forte infiltration lymphocytaire au niveau du centre et de la

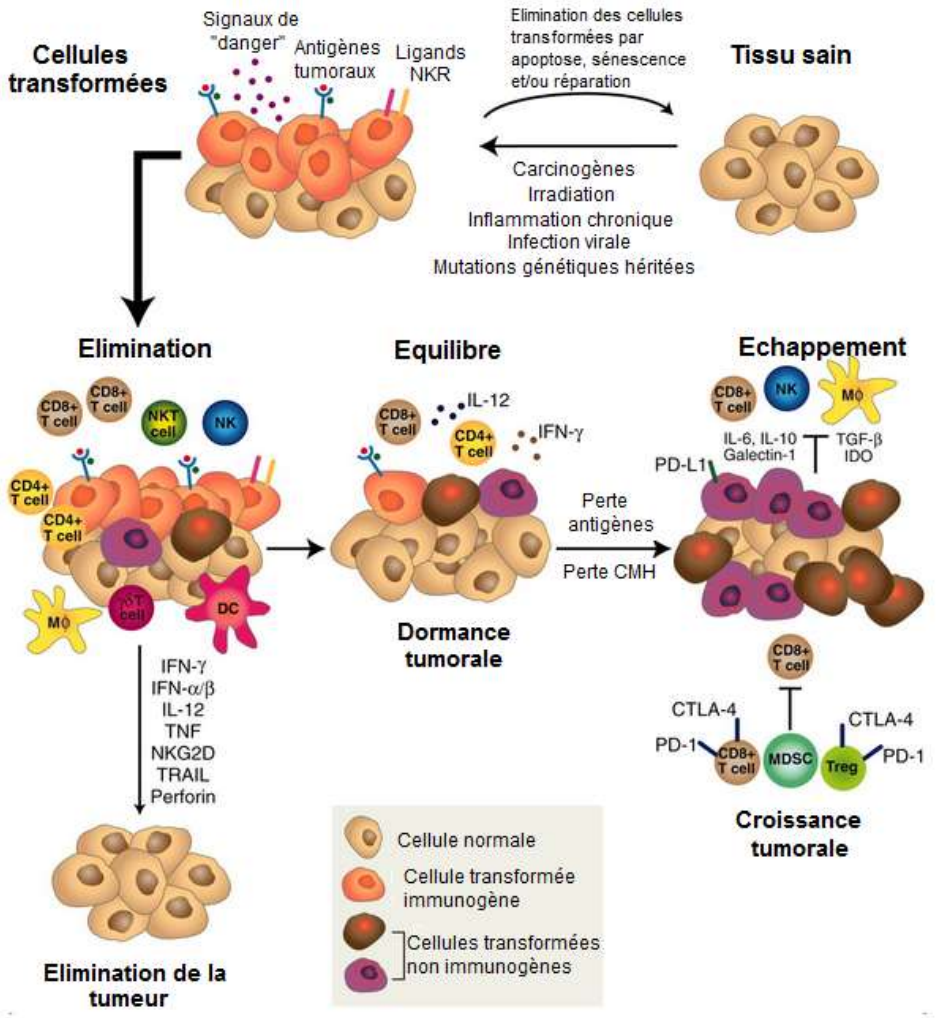

Figure 18: Concept de l'immunoédition.

Le processus d'immunoédition se compose de 3 étapes successives. Au cours de la phase d'élimination, les cellules transformées sont reconnues et éliminées par les effecteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. Lorsque les cellules tumorales ne sont pas complètement éliminées, une phase d'équilibre se met en place, pendant laquelle la croissance tumorale est contrôlée par le système immunitaire adaptatif. Le système immunitaire exerce ainsi une pression de sélection favorisant l'émergence de cellules tumorales agressives capables de lui échapper au cours de la phase d'échappement.

DC: Cellule dendritique; MΦ: Macrophage; MDSC: Cellules myéloïdes suppressives.

(Adapté de Schreiber et al., 2011).

marge d'invasion de la tumeur présentent une survie sans récidive de 95.2%, alors que celle-ci n'est que de 25% chez les patients présentant une faible infiltration lymphocytaire dans ces deux régions (Pagès et al., 2009). La valeur pronostique de ce test est par ailleurs supérieure à celle de la classification histologique TNM des tumeurs (Mlecnik et al., 2011).

Très récemment, une étude transcriptomique rétrospective menée sur 1 388 tumeurs coliques a tenté d'intégrer les composantes du microenvironnement tumoral à la classification moléculaire des CCR proposée en 2015 par Guinney (Becht et al., 2016). Globalement, les résultats obtenus montrent que chaque sous-type tumoral présente une signature immunitaire spécifique, par ailleurs associée à des pronostics différents. Ainsi, les tumeurs du sous-type CMS1 (MSI-immune) de bon pronostic sont caractérisées par une surexpression de marqueurs des lymphocytes cytotoxiques. En outre, bien que les tumeurs du sous-type CMS4 (Mesenchymal) de mauvais pronostic expriment des marqueurs lymphocytaires et des marqueurs de monocytes, elles sont caractérisées par l'activation de voies de signalisation immunosuppressives ainsi que par l'activation des voies de l'inflammation et de l'angiogénèse. Enfin, les tumeurs de sous-types CMS2 ou CMS3 de pronostic intermédiaire sont associées à une faible signature immunitaire et inflammatoire.

4.2.2 Le microbiote

L'intestin est un écosystème ouvert qui comporte 100 000 milliards de bactéries, soit dix fois plus de bactéries que l'organisme ne compte de cellules (Savage, 1977). Cette communauté bactérienne, par ailleurs très diversifiée, forme, avec d'autres types de microorganismes (champignons, levures et virus) le microbiote intestinal. Dans des conditions physiologiques, un équilibre harmonieux (eubiose) s'installe entre le microbiote et l'intestin qui l'héberge. Un nombre croissant d'études montre que la rupture de cet équilibre (dysbiose) est associée au développement de pathologies intestinales, en particulier du CCR.

4.2.2.1 Le microbiote dans l'intestin sain

La composante bactérienne du microbiote intestinal est constituée de plus de 500 espèces de bactéries, dont les plus abondantes appartiennent aux phyla Firmicutes et Bacteroites (Gagnière et al., 2016). La colonisation du tube digestif débute dès la naissance et évolue jusqu'à l'âge de 4 ans, où le microbiote individuel quasi-définitif est constitué (Campeotto et al., 2007). La composition de celui-ci peut cependant être à tout moment affectée par de nombreux facteurs externes tels que les changements des habitudes alimentaires, le stress, les

traitements médicamenteux (antibiothérapie, chimiothérapies…), l'environnement (germes indésirables, résidus de pesticides, métaux lourds…), et l'âge (Conlon and Bird, 2015). En outre, un grand nombre de facteurs micro-environnementaux incluant le pH, la disponibilité des substrats alimentaires, le péristaltisme, le degré d'aérobiose ou encore le mucus, influencent profondément le nombre et le type de bactéries le long de l'axe antéro-postérieur de l'intestin (Gerritsen et al., 2011). Ainsi, la densité bactérienne augmente progressivement de l'oesophage (10^2-10^4 / gramme de contenu) au côlon distal (10^{10}-10^{12} / gramme de contenu), lequel est principalement colonisé par des bactéries anaérobies strictes **(Figure 19).** De la même manière, la composition du microbiote varie considérablement le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin, les espèces bactériennes présentes dans le mucus de surface étant différentes de celles retrouvées dans la lumière (Gerritsen et al., 2011).

Cette communauté microbienne est en équilibre stable avec l'intestin qui l'héberge. Ainsi, l'intestin fournit aux bactéries les éléments nécessaires à leur croissance, tandis que celles-ci produisent des facteurs vitaminiques (vitamines K et B12) et soutiennent les fonctions digestives en dégradant par exemple les polysaccharides issus des fibres alimentaires en acides gras à chaînes courtes (Nicholson et al., 2012). Le microbiote participe par ailleurs au renforcement de la barrière intestinale en produisant des bactériocines et en stimulant la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth (cathelicidines, lectines de type C, defensines) et de mucines par les cellules caliciformes (Kaiko and Stappenbeck, 2014; Mack et al., 2003, 1999; Salzman et al., 2007). Enfin, les bactéries intestinales contribuent au développement des réponses immunitaires innées et adaptatives, en stimulant par exemple la production de sIgA par les cellules dendritiques (Macpherson and Uhr, 2004).

4.2.2.2 Le microbiote dans les CCR

L'existence d'un lien étroit entre le microbiote intestinal et le développement d'un CCR a pour la première fois été démontrée en 1975. Dans cette étude, des rats axéniques (dépourvus de microbiote) élevés dans des conditions stériles développent moins de tumeurs intestinales chimio-induites que les rats conventionnels, suggérant un effet pro-tumoral du microbiote (Reddy et al., 1975a). Des résultats similaires ont par la suite été obtenus à partir de modèles génétiques de prédisposition au CCR et d'autres modèles chimio-induits **(Tableau 3).**
L'implication du microbiote dans la cancérogénèse intestinale pourrait faire appel à trois mécanismes distincts non exclusifs :

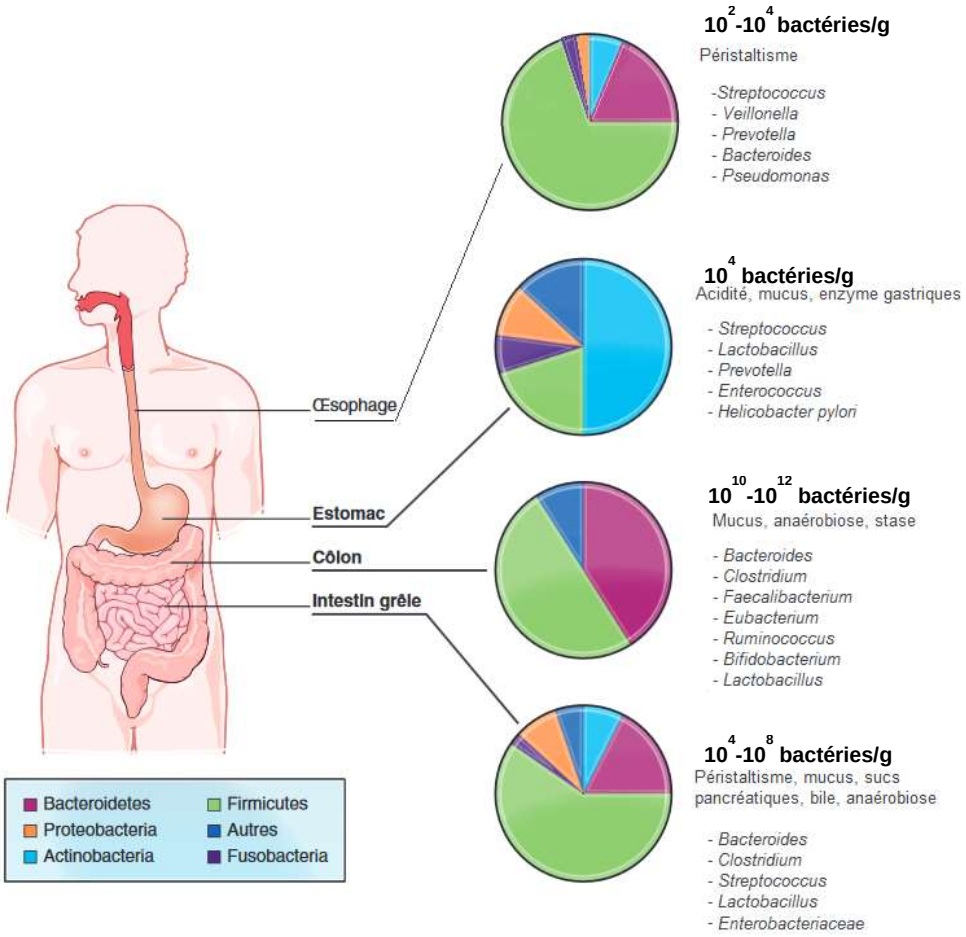

Figure 19: Composition et densité du microbiote intestinal.
Le microbiote intestinal est principalement composé de bactéries, dont la densité augmente de l'œsophage jusqu'au côlon. La composition du microbiote le long du tube digestif dépend de plusieurs paramètres micro-environnementaux chimiques et mécaniques. (Adapté de Dave et al., 2012; Jandhyala et al., 2015).

Modèle d'induction de la tumorigénèse intestinale	Résultats	Références
Cancérogénèse spontanée chez des rats axéniques	Réduction du nombre de tumeurs intestinales	Sacksteder et al., 1976
Modèles génétiques		
Souris axéniques TCRβ$^{-/-}$ p53$^{-/-}$	Réduction du nombre de tumeurs intestinales	Kado et al., 2001
Souris axéniques IL10$^{-/-}$		Balish et al., 2002
Souris axéniques TGFβ1$^{-/-}$ Rag2$^{-/-}$		Engle et al., 2002
Souris axéniques Gpx1$^{-/-}$ Gpx2$^{-/-}$		Chu et al., 2004
Souris Nod1$^{-/-}$ traitées avec un cocktail d'antibiotiques		Chen et al., 2008
Souris Apc$^{+/F}$ Cdx2-Cre traitées avec un cocktail d'antibiotiques		Grivennikov et al., 2012
Souris axéniques Apc$^{+/min}$		Li et al., 2012
Modèles chimio-induits		
Rats axéniques traités au DMH	Réduction du nombre de tumeurs intestinales	Reddy et al., 1975a
Rats axéniques traités au MAM-GlcUA		Laqueur et al., 1981
Rats axéniques traités à l'AOM		Vannucci et al., 2008
Souris traitées à l'AOM + DSS et avec un cocktail d'antibiotiques		Klimesova et al., 2013
Modèles génétiques chimio-induits		
Souris axéniques IL10$^{-/-}$ traitées à l'AOM	Réduction du nombre de tumeurs intestinales	Uronis et al., 2009

Tableau 3: Exemples de travaux montrant le rôle pro-tumoral du microbiote dans la tumorigénèse intestinale.

1) Création d'un micro-environnement pro-inflammatoire

Il est aujourd'hui bien établi qu'une inflammation chronique favorise l'initiation et la progression tumorale (Kuraishy et al., 2011). Un nombre croissant d'études suggère que l'altération qualitative et/ou fonctionnelle du microbiote (dysbiose) pourrait contribuer au développement tumoral en induisant une réponse pro-inflammatoire ou immunosuppressive. Ainsi, il a été montré que la bactérie commensale enterotoxigenic Bacteroides fragilis stimule la réponse inflammatoire des LTh17 (Wu et al., 2009). De la même manière, une autre bactérie commensale, Bacteroide fragilis, induit l'activation des LTreg à fonction immunosuppressive (Kamada and Núñez, 2014). De nombreux microorganismes, tel que Fusobacterium nucleatum, sont par ailleurs susceptibles d'activer la voie de signalisation NF-κB, très largement impliquée dans l'inflammation des cancers (DiDonato et al., 2012; Kostic et al., 2013).

2) Production de composés mutagènes

Indépendamment de leurs effets pro-inflammatoires, certaines espèces bactériennes produisent des composés mutagènes affectant la stabilité génomique. Parmi ces facteurs, citons la colibactin produite par des bactéries du genre Enterobacteriaceae, la toxine Bft produite par enterotoxigenic Bacteroides fragilis, et la toxine Cdt produite par différentes espèces de ε- et γ-proteobacteria. La colibactin et la toxine Cdt induisent des cassures double brin de l'ADN (Guerra et al., 2011), alors que le facteur Bft favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant induire des mutations oncogéniques (Goodwin et al., 2011).

3) Activation de voies de signalisation oncogéniques

Plusieurs espèces bactériennes produisent des facteurs protéiques capables d'activer des voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse intestinale. Fusobacterium nucleatum est une bactérie commensale anaérobie qui se lie aux cellules épithéliales par le biais du facteur de virulence FadA. Cette interaction conduit à l'activation de la β-caténine, médiateur majeur de la voie de signalisation pro-oncogénique Wnt (Rubinstein et al., 2013). De la même manière, enterotoxigenic Bacteroides fragilis stimule le clivage de la E-cadhérine par le biais du facteur Bft, participant ainsi à l'activation de cette même voie (Sears, 2009).

5. Traitements des CCR

Le traitement des cancers du côlon repose en première intention sur la chirurgie. Lorsque le diagnostic est suffisamment précoce (CCR de stade I), la résection de la tumeur est souvent curative. En cas d'envahissement ganglionnaire ou de métastases (CCR de stade II-IV), l'acte

chirurgical est associé à une chimiothérapie adjuvante composée de plusieurs molécules anti-cancéreuses. Dans le cas de CCR de stade II ou III, la chimiothérapie associe classiquement de l'acide folinique à du 5FU et de l'oxaliplatine (protocole FOLFOX). Dans le cas de CCR de stade IV, la chimiothérapie est palliative et consiste le plus souvent en un mélange d'acide folinique, de 5FU, et d'irinotécan (protocole FOLFIRI). En fonction des caractéristiques moléculaires de la tumeur primaire, une thérapie ciblée, composée d'anticorps monoclonaux humanisés dirigés spécifiquement contre les cellules tumorales, peut être proposée au patient. Le bevacizumab (commercialisé sous le nom Avastin®) et le ramucirumab (Cyramza®) exercent un effet anti-angiogénique en ciblant respectivement le VEGF et son récepteur VEGFR2, tandis que le cetuximab (Erbitux®) et le panitumumab (Vectibix®) exercent un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire et la survie en ciblant le récepteur à l'EGF. Le plus souvent, ces thérapies sont administrées au patient en association avec un traitement chimiothérapeutique (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032814/). Malheureusement, l'efficacité des thérapies ciblées est relative et souvent limitée dans le temps, ce qui s'explique en partie par l'accumulation de nouvelles mutations conduisant à l'acquisition d'un phénotype résistant (Hammond et al., 2016).

Chapitre 3: Le gène homéotique Cdx2

1. Les gènes homéotiques

1.1 Définition

Un gène homéotique est un gène qui détermine le plan d'organisation d'un organisme au cours du développement embryonnaire, c'est-à-dire dont l'altération entraîne une homéose (Lewis, 1978; Stein et al., 1996). Parmi les gènes homéotiques, les gènes à homéo-boîtes (« homeobox genes ») codent pour des facteurs de transcription caractérisés par un domaine hautement conservé de 60 acides aminés, l'homéodomaine, organisé en trois hélices alpha arrangées en hélice-tour-hélice et capable d'interagir avec l'ADN au niveau d'une séquence riche en nucléotides A et T (Qian et al., 1989) **(Figure 20)**.

Chez l'Homme, plus de 200 gènes à homéo-boîte, organisés en clusters ou dispersés dans le génome, ont été décrits. Parmi eux, citons les 39 gènes du type Hox, regroupés en 4 clusters (A, B, C et D), et les 6 gènes du type ParaHox Gsx1, Gsx2, Pdx1, Cdx1, Cdx2 et Cdx4, situés sur 4 chromosomes différents chez l'homme, Gsx1, Pdx1 et Cdx2 étant regroupés dans le cluster ParaHox (Garcia-Fernàndez, 2005) **(Figure 21).**

1.2 Structure du gène et de la protéine Cdx2

Parmi les nombreux gènes à homéo-boîte identifiés chez la drosophile, le gène Caudal (Cad) participe à la mise en place de l'axe antéro-postérieur et au développement de l'intestin au cours de l'embryogénèse (Wu and Lengyel, 1998) . Des homologues du gène Cad ont par la suite été identifiés chez plusieurs espèces animales : CdxA, CdxB et CdxC chez le poulet, Xcad1, Xcad2 et Xcad3 chez le xénope, et Cdx1, Cdx2 et Cdx4 chez les mammifères (le gène Cdx3 correspond à Cdx2 chez le cochon d'Inde).

Le gène Cdx2, porté par le chromosome 13 chez l'homme et le chromosome 5 chez la souris, est constitué de trois exons séparés par deux introns et s'étend sur environ 7.2 kb.

La protéine correspondante est constituée de 313 acides aminés et comporte trois domaines fonctionnels **(Figure 22)**. Le domaine de transactivation correspond à la moitié N-terminale de la protéine et comprend un site de phosphorylation qui module l'activité transcriptionnelle en liant différents partenaires (Rings et al., 2001). L'homéodomaine assure la liaison de Cdx2 au promoteur de ses gènes cibles, au niveau d'une séquence consensus A/CTTTATATA/G parfois soumise à des modifications mineures (Margalit et al., 1993; Verzi et al., 2010). Enfin,

Figure 20: Représentation schématique de la structure de l'homéodomaine des gènes homéotiques.
La structure tertiaire de l'homéodomaine est de type hélice-tour-hélice, capable d'interagir avec le sillon majeur de l'ADN.

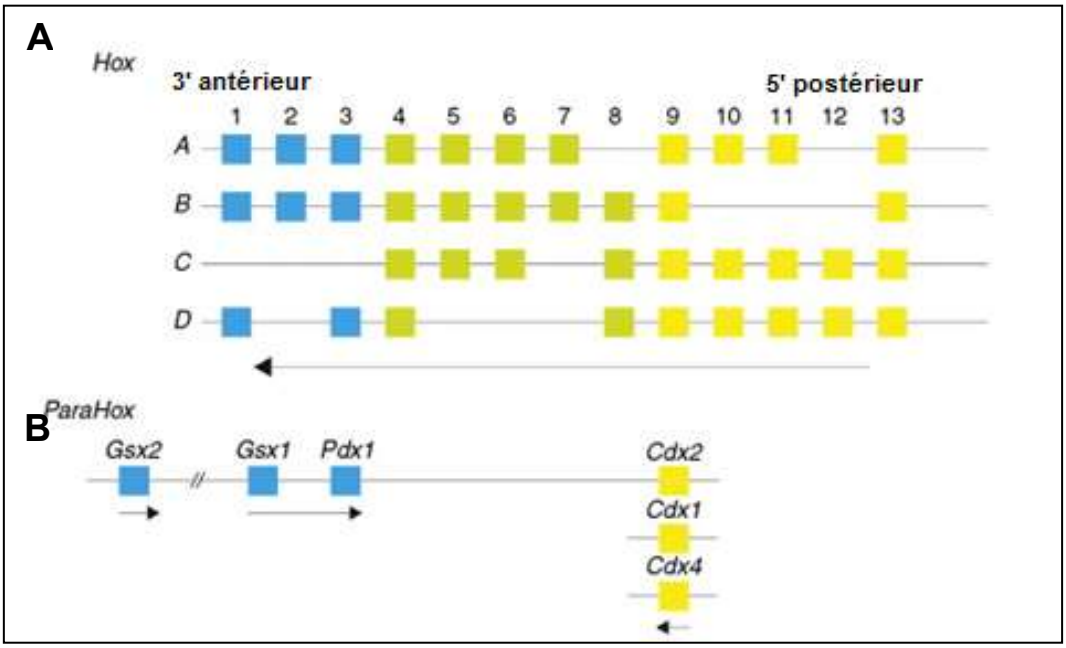

Figure 21: Représentation schématique des clusters Hox et ParaHox chez la souris.
(A) Les 39 gènes Hox, représentés par les rectangles colorés, sont répartis en 4 clusters (A, B, C et D) localisés sur 4 chromosomes différents. Les chiffres indiquent le numéro du gène sur le cluster. **(B)** Les 6 gènes ParaHox sont situés sur 3 chromosomes différents, le cluster comprenant les gènes Gsx1, Gsx2, Pdx1 et Cdx2 étant localisé sur un même chromosome. Contrairement à la souris, le gène Gsx2 est situé sur un autre chromosome chez l'homme (Adapté de Young and Deschamps, 2009).

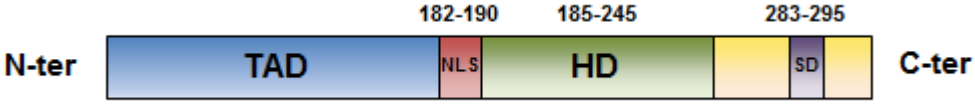

Figure 22: Représentation schématique de la protéine Cdx2 humaine.
La protéine Cdx2 de 313 acides aminés est composée d'un domaine de transactivation (TAD), d'un signal de localisation nucléaire (NLS), d'un homéodomaine (HD), et d'un domaine de stabilisation (SD) dans la partie C-terminale. Les chiffres indiquent le positionnement des domaines fonctionnels dans la protéine. Les tailles respectives des domaines n'est pas à l'échelle (Adapté de Renouf et al., 2012).

l'extrémité C-terminale porte des sites de phosphorylation qui régulent la demi-vie de la protéine (Gross et al., 2005).

2. Cdx2 au cours du développement embryonnaire

2.1 Profil d'expression de Cdx2 pendant l'embryogénèse

Cdx2 est le premier gène Cdx exprimé au cours de l'embryogénèse. Chez la souris, son expression débute dès le stade 8 cellules et se poursuit dans le trophectoderme (Beck et al., 1995). A partir du stade E8.5, Cdx2 est exprimé dans les trois feuillets embryonnaires de la partie caudale de l'embryon, au niveau de la plaque neurale postérieure, de l'endoderme intestinal, de la base de l'allantoïde, et dans le mésoderme paraxial non segmenté. Enfin, à partir de la mi-gestation, soit au stade E12.5, l'expression de Cdx2 se restreint progressivement à l'endoderme intestinal (Beck et al., 1995) et est maintenue spécifiquement dans l'épithélium intestinal tout au long de la vie (James et al., 1994; Silberg et al., 2000).

2.2 Fonctions de Cdx2

2.2.1 Cdx2 détermine le lignage trophectodermique

Les protéines Cdx2 et Oct3/4 sont détectées dans les morula dès le stade 8 cellules. Entre les stades 10-16 cellules et 18-22 cellules, Cdx2 disparaît des cellules de la masse interne et s'accumule dans les cellules extérieures du trophectoerme ; la restriction inverse de Oct3/4 dans les cellules de la masse interne débute après la perte de Cdx2 (Niwa et al., 2005). Ceci suggère que Cdx2 joue un rôle crucial dans la détermination et le maintien de l'intégrité du trophectoderme, ce qui se traduit par une létalité embryonnaire précoce des souris $Cdx2^{-/-}$ due à un défaut d'implantation des embryons (Chawengsaksophak et al., 1997; Strumpf et al., 2005). En effet, chez ces mutants, la perte de fonction de Cdx2 conduit à une différenciation incomplète des cellules du trophectoderme, caractérisée par une perte d'expression de certains marqueurs tels que Eomes et Krt8 (Ralston and Rossant, 2008; Strumpf et al., 2005). A l'inverse, l'expression forcée de Cdx2 dans les cellules embryonnaires ES induit leur différenciation en cellules du trophectoderme en se fixant sur la région promotrice de Oct4, un marqueur des cellules de la masse cellulaire interne, et en inhibant son expression (Niwa et al., 2000, 2005).

2.2.2 Cdx2 participe à la mise en place de l'axe antéro-postérieur

Afin de contourner la létalité embryonnaire précoce des souris Cdx2$^{-/-}$, un modèle murin chimérique a été développé par agrégation d'embryons tétraploïdes sauvages avec des cellules souches embryonnaires (ES) Cdx2$^{-/-}$ (Chawengsaksophak et al., 2004). Dans ce modèle, l'intégrité du trophectoderme formé à partir des cellules tétraploïdes est préservée, permettant ainsi l'implantation des embryons et l'étude de leur développement à partir des cellules Cdx2$^{-/-}$. Dans ce modèle, la perte de fonction de Cdx2 conduit à une mortalité embryonnaire vers le stade E11.5 consécutivement à un défaut de développement de l'allantoïde. De plus, les embryons présentent à ce stade des anomalies au niveau de la région caudale, caractérisées par un défaut de développement des somites et des membres postérieurs. L'invalidation conditionnelle de Cdx2 au stade E5.5 reproduit le même phénotype (Savory et al., 2009). Ces résultats témoignent de l'importance de Cdx2 dans la régionalisation de l'axe antéro-postérieur de l'embryon et sont renforcés par les caractéristiques phénotypiques des souris Cdx2$^{+/-}$. En effet, l'haplo-insuffisance de Cdx2 induit des anomalies du squelette axial, caractérisées par une antériorisation des vertèbres thoraciques, voire des côtes surnuméraires, ainsi que par une queue raccourcie **(Figure 23A)** (Chawengsaksophak et al., 1997).

Plusieurs études ont montré que les gènes Cdx, dont Cdx2, participent à la mise en place de l'axe antéro-postérieur en régulant l'expression de gènes Hox tels que Hoxb8 et Hoxa5 (van den Akker et al., 2002; Charité et al., 1998; Tabariès et al., 2005). En outre, Cdx2 participe à la régionalisation de cet axe à travers la voie de signalisation Wnt. En effet, la perte d'expression de Cdx2 est associée à une diminution d'expression de Wnt3a dans la partie caudale de l'embryon, Cdx2 étant capable d'interagir avec le promoteur de ce gène (Savory et al., 2009; Young et al., 2009). Parallèlement, Cdx2 inhibe l'expression de Cyp26a, un membre de la famille des cytochromes p450 oxydases intervenant dans la dégradation de l'acide rétinoïque, et inhibe ainsi son activité antériorisante dans la partie postérieure de l'embryon (Savory et al., 2009; Young et al., 2009).

2.2.3 Cdx2 détermine l'identité intestinale

Outre les altérations du squelette axial, les souris hétérozygotes Cdx2$^{+/-}$ présentent dès la naissance un phénotype intestinal caractéristique. En effet, l'haplo-insuffisance de Cdx2 conduit au développement d'hétéroplasies gastro-œsophagiennes non cancéreuses au niveau de la région péri-caecale qui témoignent d'une transformation homéotique de l'intestin **(Figure 23B)** (Beck et al., 1999). Bien que la copie résidentielle de Cdx2 soit intacte dans ces

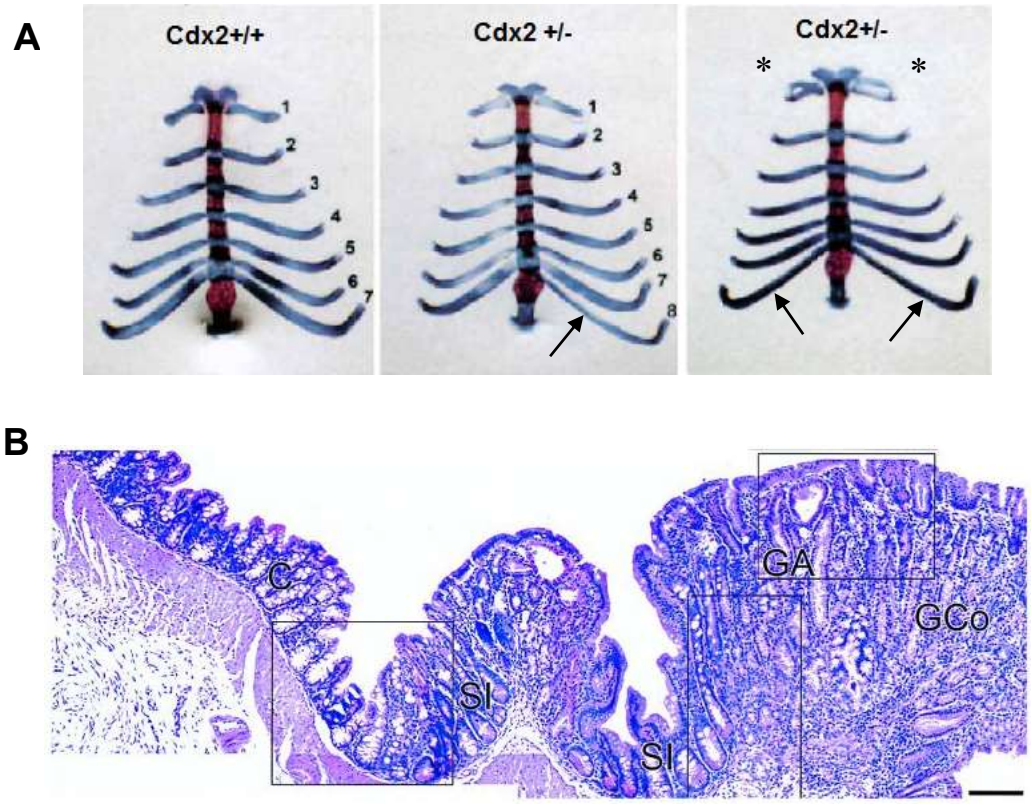

Figure 23 : Conséquences phénotypiques de l'haploinsuffisance de Cdx2

(A) Les souris hétérozygotes Cdx2$^{+/-}$ présentent des anomalies du squelette axial, caractérisées par la présence de côtes surnuméraires (flèches) ou par des fusions partielles entre deux paires de côtes (astérisques) (Chawengsaksophak et al., 1997).

(B) Histologie d'une hétéroplasie gastro-oesophagienne du côlon proximal d'une souris Cdx2$^{+/-}$. L'haploinsuffisance de Cdx2 conduit à l'apparition de structures gastriques séparées de la muqueuse colique saine par un épithélium de transition qui présente les caractéristiques histologiques de l'intestin grêle. C: Côlon; SI: Intestin grêle, GA: Antre gastrique; GCo: Corpus gastrique (Beck et al., 1999).

lésions, l'ARN et la protéine associés n'y sont pas exprimés. De façon similaire, la perte de fonction locale de Cdx2 au cours du développement de l'intestin humain conduit au développement d'hétéroplasies gastriques non cancéreuses présentant des similitudes avec les lésions caecales des souris $Cdx2^{+/-}$ (Martin et al., 2010).

Afin de mieux appréhender les fonctions de Cdx2 dans l'intestin en développement, différents modèles murins d'invalidation conditionnelle de Cdx2 dans l'endoderme ont été développés. Ainsi, l'invalidation précoce (E9) de Cdx2 dans l'endoderme entraîne un défaut de développement du côlon associé à une perte des villosités intestinales et à la disparition des différents types cellulaires différenciés des villosités, remplacés par un épithélium stratifié kératinisé de type œsophagien (Gao et al., 2009). L'invalidation de Cdx2 à un stade plus tardif (E11) induit des anomalies de la morphologie du tube digestif (côlon dédoublé ou non abouché à l'anus), un raccourcissement des villosités, et une transformation de l'épithélium intestinal en épithélium de gastrique (Saandi et al., résultats non publiés). De la même manière, l'invalidation de Cdx2 au stade E13,5 entraîne un raccourcissement des villosités, une perte de polarité des entérocytes et une transformation de l'épithélium intestinal en épithélium de type gastrique (Grainger et al., 2010). Dans ces trois modèles, la perte de fonction de Cdx2 entraîne une létalité périnatale **(Figure 24)**.

Globalement, ces résultats montrent que Cdx2 détermine l'identité intestinale au cours du développement en ce sens que la perte de fonction du gène conduit à la mise en place d'un programme de différenciation gastrique ou œsophagien de l'endoderme en fonction du stade auquel est induite l'invalidation. Il est intéressant de remarquer que cette fonction est spécifique de Cdx2 et n'est pas compensée par Cdx1, le second gène de la famille Cdx à être exprimé dans l'endoderme intestinal. En effet, l'invalidation constitutive de Cdx1 n'entraîne pas de phénotype intestinal (Subramanian et al., 1995) tandis que celle de Cdx2 provoque la perte d'expression de Cdx1 (Gao et al., 2009).

3. Cdx2 dans l'intestin adulte

3.1 Profil d'expression de Cdx2 dans l'intestin

Chez l'adulte, Cdx2 est normalement spécifiquement exprimé au niveau de l'épithélium intestinal selon un gradient d'expression antéro-postérieur. L'expression de Cdx2 augmente ainsi du duodénum jusqu'au côlon proximal, puis diminue dans le côlon distal. Cdx2 est par ailleurs exprimé tout le long de l'axe crypto-villositaire, principalement dans les cellules

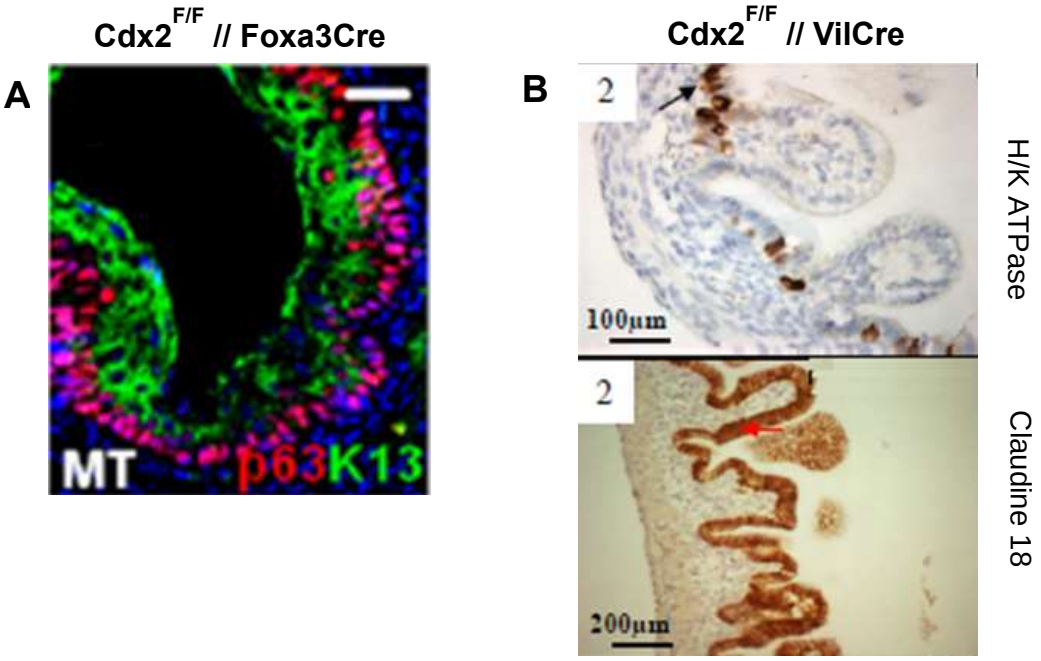

Figure 24 : Conséquences phénotypiques de la perte de fonction intestinale de Cdx2 au cours du développement.
(A) L'invalidation de Cdx2 à un stade précoce du développement (E9) entraîne une différenciation kératinocytaire de l'endoderme semblable à l'oesophage (Gao et al., 2009). **(B)** L'invalidation plus tardive de Cdx2 (E11) induit une différenciation gastrique de l'endoderme (Saandi et al., résultats non publiés).

différenciées des villosités, à l'exception des cellules de Paneth (San Roman et al., 2015; Silberg et al., 2000).

3.2 Cdx2 : un régulateur majeur de l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Les fonctions exercées par Cdx2 dans l'intestin adulte ont été explorées à travers différents modèles murins de perte et de gain de fonction du gène.

L'invalidation ciblée massive de Cdx2 dans l'épithélium intestinal adulte, induite par le tamoxifène chez les souris Villine-Cre^{ERT2}// Cdx2$^{f/f}$, est létale. Ces souris présentent en effet une perte de la fonction digestive consécutivement à la transformation de l'épithélium intestinal en épithélium de type gastrique (Hryniuk et al., 2012; Verzi et al., 2010, 2011).
En revanche, l'invalidation mosaïque de Cdx2 dans l'intestin à l'aide du modèle Ah-Cre^{ERT}//Cdx2$^{f/f}$ permet la survie des animaux, autorisant ainsi l'étude des effets de la perte de fonction de Cdx2 sur le long terme (Stringer et al., 2012). Bien que l'architecture de la muqueuse intestinale soit préservée dans la semaine qui suit l'invalidation, ces souris présentent une perturbation du renouvellement cellulaire ainsi qu'une perte du phénotype intestinal au profit d'un phénotype de type gastrique, spécifiquement au niveau des régions de l'épithélium invalidées pour Cdx2 **(Figure 25A).** A partir de la 4ème semaine suivant l'invalidation, cet épithélium de type gastro-intestinal est remplacé par un épithélium ré-exprimant Cdx2 grâce à la prolifération des cellules des cryptes ayant échappé à l'invalidation. Une minorité de cryptes invalidées pour Cdx2 perdure cependant sous la forme de vésicules cystiques enfouies dans la muqueuse. Ces cystes présentent une perte d'expression de marqueurs intestinaux au profit de marqueurs gastriques et une prolifération cellulaire réduite **(Figure 25 B).** Les structures invalidées pour Cdx2 perdent progressivement l'expression de Cdx1. Expérimentalement, la perte de fonction de Cdx1 associée à l'invalidation mosaïque de Cdx2 ne modifie pas de façon notable le phénotype lié à la perte de Cdx2, ce qui indique que chez l'adulte, comme chez l'embryon, la fonction de Cdx2 dans l'intestin est prépondérante par rapport à celle de Cdx1.

L'invalidation de Cdx2 dans les cellules CBC chez les souris Cdx2$^{f/f}$//Lgr5Cre^{ERT2} conduit à un phénotype similaire à celui des souris AhCre^{ERT}//Cdx2$^{f/f}$ (Stringer et al., 2012). Ceci démontre le rôle essentiel joué par ce gène homéotique dans les cellules souches actives. De plus, dans le milieu de culture adapté au développement des organoïdes, les CBC invalidées pour Cdx2 forment des structures anormales sphériques bordées d'un épithélium simple n'exprimant pas Cdx2, et dépourvues de cellules de Paneth**.** En outre, ces structures

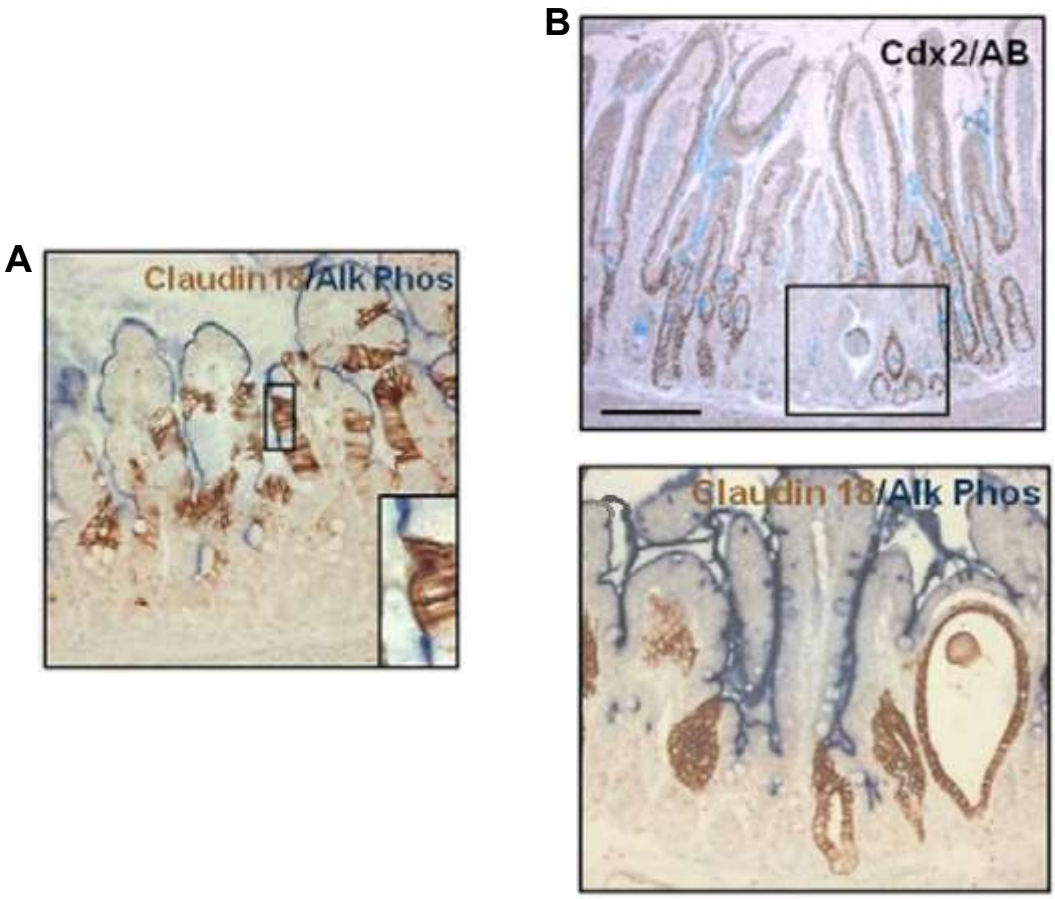

Figure 25 : Conséquences phénotypiques de la perte de fonction mosaïque de Cdx2 dans l'intestin adulte.
(A) Une semaine après l'invalidation de Cdx2, l'architecture intestinale est préservée. Le marqueur gastrique Claudine18 s'exprime dans les régions villositaires de l'intestin grêle qui n'expriment pas le marqueur intestinal phosphatase alcaline. **(B)** Huit semaines après l'invalidation, les cryptes qui n'expriment pas Cdx2 restent confinées dans des vésicules cystiques (image du haut, encadré). Ces cystes expriment la Claudine18 au détriment de la phosphatase alcaline (image du bas) (Stringer et al., 2012).

sont caractérisées par une prolifération cellulaire réduite, empêchant leur maintien en culture (Stringer et al., 2012). L'analyse moléculaire et fonctionnelle ultérieure de ces structures a montré qu'il s'agit d'organoïdes de type pyloriques capables de former des « mini-estomacs » dans le milieu de culture adéquat (Simmini et al., 2014).

Si la perte de fonction de Cdx2 conduit à une perte de l'identité intestinale, sa surexpression dans l'intestin adulte induit à l'inverse une maturation précoce de l'épithélium, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules caliciformes et une désorganisation du compartiment des cryptes marquée par la perte des cellules de Paneth (Crissey et al., 2011). En conséquence, les souris surexprimant fortement Cdx2 meurent au moment du sevrage.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de Cdx2 dans le contrôle de l'homéostasie intestinale : (i) il détermine l'identité intestinale des cellules souches, (ii) participe à l'organisation cellulaire de la niche des cellules souches, (iii) régule la prolifération cellulaire et (iv) assure la différenciation terminale des cellules matures.

4. Modes d'action de Cdx2

4.1 Activité transcriptionnelle de Cdx2

Cdx2 est un facteur de transcription spécifique de l'intestin qui contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans le maintien des fonctions propres à cet organe.
Ainsi, il a été montré par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine que Cdx2 est susceptible de se lier à plus de 16 000 sites génomiques dans l'épithélium intestinal (Verzi et al., 2010). La grande majorité de ces sites (13755) est spécifique des cellules différenciées, certains (2443) se retrouvent à la fois dans les cellules prolifératives et différenciées, et un nombre limité (679) est spécifique des cellules prolifératives. Les sites occupés par Cdx2 sont préférentiellement localisés à proximité des sites de fixation pour les facteurs GATA dans les cellules prolifératives et pour les facteurs HNF4 dans les cellules différenciées, ce qui montre que l'activité de Cdx2 dépend du contexte cellulaire et nucléaire (Verzi et al., 2010). L'analyse détaillée des cellules CBC indique que Cdx2 se fixe et contrôle l'expression d'un petit nombre de gènes (137) dans ces cellules et que la protéine homéotique se fixe également à un grand nombre de sites chromatiniens en prévision de l'expression ultérieure des gènes correspondant dans les cellules différenciées (San Roman et al., 2015).

Cdx2 participe au maintien de l'homéostasie intestinale en régulant l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Ainsi, Cdx2 peut interagir avec le

promoteur de $p21^{Waf1/Cip1}$, un inhibiteur de Cdk, et stimuler son expression *in vitro* (Bai et al., 2003). Des études plus récentes ont par ailleurs montré que Cdx2 est un inhibiteur de la voie Wnt en stimulant d'une part l'expression de Mucdhl, une protocadhérine capable d'interagir avec la β-caténine afin d'inhiber son activité transcriptionnelle, et d'autre part l'expression de l'axine2 et Apc, deux composants majeurs du complexe de dégradation de la β-caténine (Boyd et al., 2010; Hinkel et al., 2012; Olsen et al., 2013).

Cdx2 participe également à la détermination des lignages sécréteur et absorbant de l'épithélium en activant l'expression des facteurs de transcription Klf4 (Dang et al., 2001; Katz et al., 2002) et Math1 (Mutoh et al., 2006), nécessaires à la différenciation des cellules progénitrices en cellules sécrétrices, et du ligand de la voie Notch Dll1, participant à la détermination du lignage absorbant (Grainger et al., 2012).

Enfin, Cdx2 est un élément majeur de la différenciation terminale des cellules épithéliales matures. Parmi les gènes cibles de Cdx2, citons ceux codant pour des enzymes digestives (saccharase isomaltase (Suh et al., 1994), lactase (Troelsen et al., 1997), phospholipase A/lysophospholipase (Taylor et al., 1997)…), pour des transporteurs nécessaires à l'absorption et au passage des nutriments dans la circulation systémique (Glut2 (Uesaka et al., 2004), Asbt (Ma et al., 2012), hephaestine (Hinoi et al., 2005)…), pour des mucines entrant dans la composition du mucus (Muc2 (Yamamoto et al., 2003), Muc4 (Jonckheere et al., 2007)), pour des récepteurs membranaires (FXR (Modica et al., 2014), IRS2 (Modica et al., 2009), IL2RB (Uesaka et al., 2004) …), ou encore pour des protéines d'adhésion cellulaire (LI-cadhérine (Hinoi et al., 2002), E-cadhérine (Keller et al., 2004), Claudine-2 (Sakaguchi et al., 2002)…). Cette liste, bien que non exhaustive, illustre l'importance de Cdx2 dans le maintien de l'état différencié de l'épithélium intestinal.

Globalement, ces résultats montrent que Cdx2 est un acteur essentiel de l'homéostasie intestinale en déterminant l'identité tissulaire des cellules souches et en régulant l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire. Ces résultats sont renforcés par des observations faites *in vitro* à partir de cellules en culture. En effet, la surexpression de Cdx2 dans les cellules intestinales indifférenciées IEC-6, Caco2/TC7 ou Colo205 induit l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'acquisition d'un phénotype différencié caractérisé d'une part par l'apparition de microvillosités recouvertes de glycocalyx dans la région apicale, et d'autre part par l'expression d'enzymes digestives et de molécules d'adhésion (Keller et al., 2004; Lorentz et al., 1997; Suh and Traber, 1996). A l'inverse, la perte d'expression de Cdx2 par shARN

dans les cellules Caco-2 conduit à la perte du phénotype polarisé associée à un défaut du transport endo-lysosomal (Gao and Kaestner, 2010).

4.2 Activités non transcriptionnelles de Cdx2

En marge des fonctions transcriptionnelles exercées par Cdx2, plusieurs études ont mis à jour l'existence de fonctions non-transcriptionnelles de la protéine. Celles-ci reposent en grande partie sur des interactions de Cdx2 avec différents partenaires protéiques.

Des travaux récents ont montré que Cdx2 inhibe la réparation non fidèle des cassures double brin de l'ADN de type NHEJ par au moins deux mécanismes distincts. Ainsi, en interagissant par le biais de son homéodomaine avec les protéines Ku70/80, impliquées dans la reconnaissance des extrémités libres de l'ADN, Cdx2 inhibe l'activité de la machinerie de réparation des cassures de l'ADNdb de type NHEJ et induit la mort des cellules par apoptose (Renouf et al., 2012).
Une étude très récente a par ailleurs montré que Cdx2 est susceptible d'interagir avec HoxB7, un autre facteur de transcription homéotique stimulant la réparation de type NHEJ par des mécanismes liés à son activité transcriptionnelle (Soret et al., 2016). En interagissant avec HoxB7, Cdx2 empêche la liaison de ce dernier aux promoteurs de ses gènes cibles et inhibe la réparation de type NHEJ.
Il ressort de ces résultats que Cdx2 participe au maintien de l'intégrité génomique en inhibant la réparation non fidèle de type NHEJ des cassures double brin de l'ADN susceptible de générer une instabilité génomique propice au développement tumoral.

L'effet antagoniste exercé par Cdx2 sur la reconnaissance par HoxB7 de ses cibles chromatiniennes se rapproche de ce qui a été décrit dans le cas de NF-κB. En effet, la protéine Cdx2 est capable de former un complexe avec la sous-unité p65 de NF-κB et de bloquer l'interaction de ce dernier avec le promoteur de son gène cible COX-2, une enzyme clé de la synthèse des prostaglandines activée lors des processus inflammatoires et impliquée dans la cancérogenèse colique (Kim et al., 2004; Mutoh et al., 2007).

D'autres travaux ont souligné l'importance des activités non-transcriptionnelles de Cdx2 dans sa fonction anti-prolifération. Ainsi, en interagissant avec la β-caténine, Cdx2 empêche la formation du complexe [β-caténine/TCF4] et l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (Guo et al., 2010). De plus, Cdx2 stabilise l'inhibiteur de Cdk $p27^{Kip1}$ en empêchant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Aoki et al., 2011).

5. Régulation de l'expression et de l'activité de Cdx2

Le gène Cdx2 présente un profil d'expression complexe lié à des fonctions spécifiques au cours du développement embryonnaire puis dans l'intestin adulte. La perte d'expression ou la surexpression de Cdx2 sont létales, ce qui souligne la nécessité d'une régulation importante et appropriée de ce gène. Les mécanismes régulant l'expression et l'activité de Cdx2 ont fait l'objet de recherches intensives et ne sont aujourd'hui que partiellement définis. Globalement, ces études montrent que l'expression du gène Cdx2 et l'activité de la protéine associée sont finement régulées par des mécanismes agissant à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel.

5.1 Régulation transcriptionnelle de Cdx2

Afin d'identifier les régions promotrices responsables de l'expression intestinale de Cdx2, différents segments de promoteur du gène ont été testés *in vivo* dans des souris transgéniques pour leur aptitude à induire l'expression du gène.
La région promotrice s'étendant sur 5kb en amont du site d'initiation de la transcription de Cdx2 est nécessaire à l'expression du gène dans la région caudale de l'embryon au cours de la gastrulation. A partir de la mi-gestation jusqu'au stade adulte, l'expression intestin-spécifique de Cdx2 requiert cependant une région de promoteur plus étendue de 9,3kb qui n'est cependant pas suffisante pour permettre l'expression de Cdx2 dans le trophectoderme (Benahmed et al., 2008). Cette région comporte une séquence de 250pb située à environ 8.5kb du site d'initiation de la transcription et contient des éléments de réponse aux facteurs de transcription HNF4α, GATA6, et TCF4/β-caténine. En se liant au promoteur de Cdx2, ces facteurs agissent de façon synergique afin de stimuler son expression (Benahmed et al., 2008; Boyd et al., 2009; Saandi et al., 2013). Des études antérieures ont par ailleurs montré que Cdx2 peut se lier à son propre promoteur afin d'activer sa propre transcription (da Costa et al., 1999; Xu et al., 1999).

5.2 Régulation post-transcriptionnelle de Cdx2

Le contrôle de l'expression de Cdx2 fait également appel à différents mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

Un variant d'épissage alternatif de Cdx2, Cdx2/AS, a récemment été mis en évidence. Celui-ci résulte d'un changement de phase de lecture et est caractérisé par un domaine homéotique de liaison à l'ADN tronqué et un domaine C-terminal riche en résidus sérine et

arginine qui présente environ 30% d'homologie avec les facteurs d'épissage de la famille des protéines SR (Witek et al., 2014). Ce variant est inactif sur les cibles transcriptionnelles de Cdx2 mais stimule *in vitro* et *in vivo* l'épissage de minigènes.

Par ailleurs, notre équipe a récemment mis en évidence l'existence d'un autre variant d'épissage alternatif de Cdx2, miniCdx2, comprenant le même domaine de liaison à l'ADN que Cdx2 mais dépourvu du domaine de transactivation. Ce variant se comporte comme un dominant négatif sur les cibles transcriptionnelles de Cdx2 et exerce des activités à la fois antagonistes et similaires à celles de Cdx2. J'ai largement participé à la caractérisation des mécanismes moléculaires qui régulent cet épissage alternatif. Les résultats de ces travaux sont décrits dans le manuscrit « Fine-tuning and autoregulation of an intestinal homeobox gene, CDX2, by alternative splicing » présenté en Annexe (p.162).

Un niveau supplémentaire de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de Cdx2 fait intervenir des processus d'interférence à l'ARN.
Ainsi, l'ARNm de Cdx2 est susceptible d'interagir avec les miARN miR-9, miR-16 et miR-22 induits par Cdx1 dans la lignée cancéreuse colique SW480 (Tagawa et al., 2012). L'interaction du transcrit Cdx2 avec ces miARN conduit à sa dégradation, ce qui suggère que Cdx1 peut indirectement inhiber l'expression de Cdx2 par un mécanisme d'interférence à l'ARN.

Par ailleurs, il a été montré que l'ARNm de Cdx2 est la cible de MEX3A, un membre de la famille des protéines de liaison à l'ARN exprimé spécifiquement dans les cellules CBC. MEX3A est capable de lier l'ARNm de Cdx2 au niveau de sa région 3'UTR et contrôle ainsi la demi-vie du transcrit en l'acheminant vers des structures cytoplasmiques de dégradation des ARNm, les corps P (P-bodies) (Buchet-Poyau et al., 2007; Pereira et al., 2013).

5.3 Régulations post-traductionnelles de Cdx2

Bien que l'ARNm de Cdx2 soit exprimé tout le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin, la protéine associée est principalement observée dans les cellules différenciées des villosités, ce qui témoigne de l'existence de mécanismes de régulation de l'activité et de la demi-vie de la protéine Cdx2 (Boulanger et al., 2005).

Plusieurs études ont montré que la demi-vie de Cdx2 peut être régulée par des modifications post-traductionnelles. Ainsi, la phosphorylation de Cdx2 par la kinase Cdk2 au niveau du groupe de Serine 281-293 entraîne l'ubiquitination de Cdx2 et sa dégradation par le

protéasome (Gross et al., 2005). Erk1/2 est également capable de phosphoryler Cdx2 et d'induire sa dégradation, bien que le site de phosphorylation reste à identifier (Krueger et al., 2009). A l'inverse, l'inhibiteur de Cdk $p27^{Kip1}$ est susceptible d'interagir avec Cdx2 et de stabiliser la protéine en empêchant sa phosphorylation par Cdk2 (Boulanger et al., 2005). A cet égard, il est intéressant de remarquer que le profil d'expression de $p27^{Kip1}$ est corrélé à celui de Cdx2 le long de l'axe crypto-villositaire, alors que l'activité enzymatique des kinases Erk1/2 et Cdk2 est inversement corrélée au gradient d'expression de Cdx2 le long de cet axe (Boulanger et al., 2005).

Outre les phosphorylations régulant la demi-vie de Cdx2, d'autres phosphorylations contrôlent l'activité transcriptionnelle de la protéine. Ainsi, la phosphorylation de la Serine 60 du domaine de transactivation inhibe l'activité transcriptionnelle de Cdx2 dans les cellules souches intestinales (Rings et al., 2001). A l'inverse, la phosphorylation de Cdx2 par la MAPK p38 stimule son activité transcriptionnelle au niveau des cellules différenciées des villosités (Houde et al., 2001).
Globalement, ces résultats suggèrent que les mécanismes de régulation post-traductionnelle de Cdx2 participent à la différenciation des cellules intestinales en inhibant l'activité transcriptionnelle de la protéine dans les cellules souches et en stimulant l'expression de ses gènes cibles dans les villosités.

5.4 Impact du microenvironnement sur l'expression de Cdx2

Des expériences de xénogreffes de cellules cancéreuses coliques humaines chez la souris immunodéprimée ont montré que le niveau d'expression de Cdx2 dans les greffons dépend du site d'implantation (Benahmed et al., 2007). Bien que les mécanismes soient loin d'être compris, ceci suggère que l'expression de Cdx2 peut également être affectée par des facteurs d'origine extracellulaire. Ainsi, le butyrate, un acide gras à chaîne courte issu de la fermentation des fibres alimentaires par le microbiote, stimule l'expression de Cdx2 *in vitro* (Domon-Dell et al., 2002). De la même façon, la laminine-1, un constituant majeur de la lame basale, stimule l'expression de Cdx2 dans les cellules intestinales Caco2-TC7 en culture (Lorentz et al., 1997), alors que le collagène I inhibe son expression par une voie dépendante de la cascade de signalisation intégrine β1/FAK (Brabletz et al., 2004). Enfin, l'expression de Cdx2 est diminuée dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses coliques cultivées en hypoxie, indépendamment de l'activation des facteurs HIF1α et HIF2α (Derbal-Wolfrom et al., 2013).

6. Cdx2 et pathologies

6.1 Cdx2 dans les cancers colorectaux (CCR)

6.1.1 Profil d'expression de Cdx2 dans les CCR

Il est aujourd'hui bien établi que les gènes homéotiques sont fréquemment associés au processus d'oncogénèse lorsque leur expression est dérégulée (Abate-Shen, 2002). Cdx2 étant un régulateur majeur de l'homéostasie intestinale, de nombreuses études ont été menées afin d'évaluer son implication potentielle dans les CCR. Ces études montrent que l'expression de Cdx2 est diminuée et fortement hétérogène dans les CCR (Mallo et al., 1997; Subtil et al., 2007) (**Figure 26A**). Elle est par ailleurs corrélée au degré de différenciation de la tumeur, la présence de structures glandulaires étant généralement associée à une expression conservée de Cdx2 (Baba et al., 2009; Olsen et al., 2016). De façon intéressante, alors que l'expression de Cdx2 est maintenue dans la région centrale des tumeurs différenciées, elle est fortement réduite dans les cellules invasives situées à l'interface tumeur-hôte, et rétablie dans les métastases différenciées formées à distance (Brabletz et al., 2004) (**Figure 26B**). Ainsi, la perte d'expression de Cdx2 dans les cellules invasives est transitoire et réversible et s'explique, au moins en partie, par des régulations négatives de l'expression du gène par le microenvironnement tumoral (Brabletz et al., 2004). En outre, alors que Cdx2 est normalement exprimé dans le noyau des cellules intestinales, une localisation cytoplasmique diffuse de la protéine est fréquemment observée dans les CCR. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce profil d'expression dans les tumeurs intestinales restent à ce jour inconnus.

Globalement, une expression réduite de Cdx2 est observée dans les CCR avancés de haut grade présentant une instabilité microsatellitaire, une invasion des ganglions lymphatiques et un phénotype CIMP (Baba et al., 2009; Bakaris et al., 2008; Olsen et al., 2016; De Sousa E Melo et al., 2013). Une diminution de l'expression de Cdx2 dans les CCR est par ailleurs associée à un mauvais pronostic et à une survie sans récidive réduite (Bae et al., 2015; Dalerba et al., 2016; De Sousa E Melo et al., 2013).

Il convient de remarquer que le profil d'expression de Cdx2 dans plusieurs modèles murins de tumorigénèse intestinale est similaire à celui observé dans les tumeurs colorectales humaines. Une expression réduite de Cdx2 a ainsi été rapportée dans les tumeurs intestinales chimio-induites par traitement à l'AOM, dans les tumeurs de l'intestin grêle et du côlon des souris $Apc^{+/\Delta 14}$, $Apc^{+/Min}$, $Apc^{+/\Delta 716}$ et $PTEN^{+/-}$, ainsi que dans les tumeurs coliques qui se développent chez des souris soumises à un traitement répété avec un agent inflammatoire, le

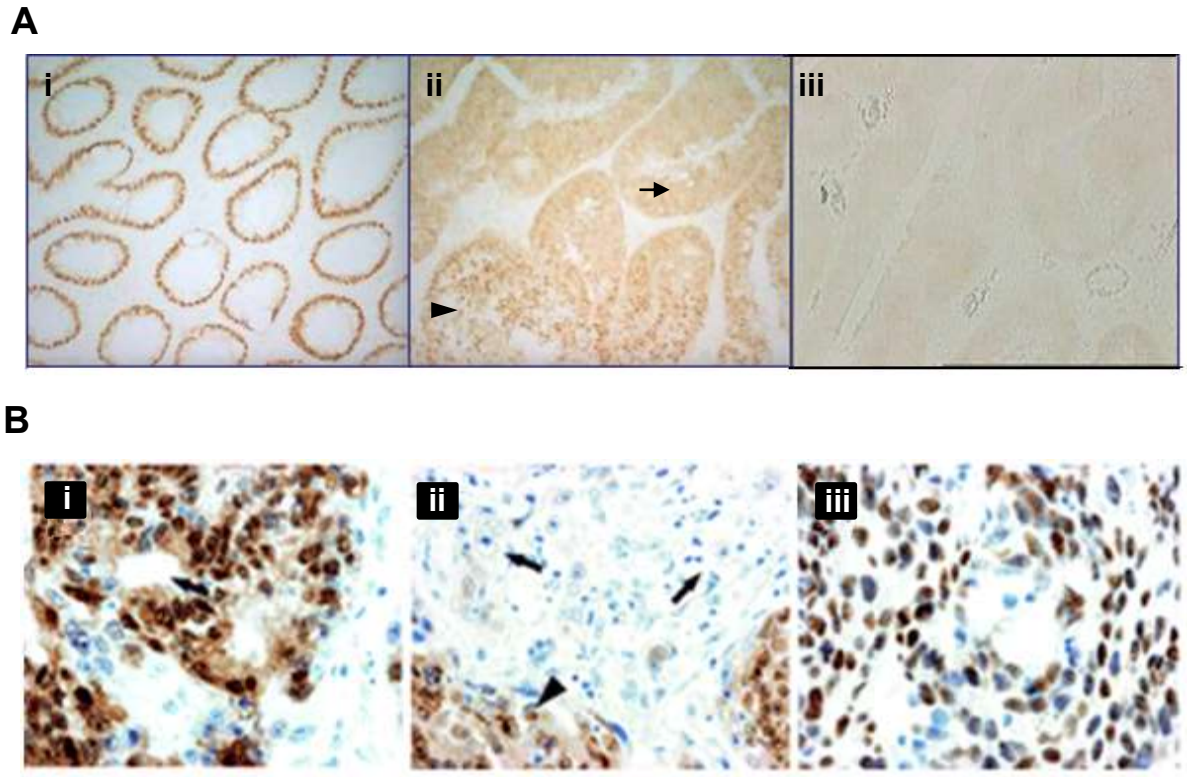

Figure 26 : Profil d'expression de la protéine Cdx2 dans les CCR humains
(A) Expression hétérogène de Cdx2 dans les CCR. (i) Dans la muqueuse colique saine, Cdx2 est exprimé dans le noyau des cellules épithéliales. (ii) Dans une tumeur colorectale moyennement différenciée, l'expression de Cdx2 est conservée mais hétérogène, avec une localisation nucléaire (tête de flèche) et cytoplasmique (flèche) de la protéine. (iii) Dans les tumeurs non différenciées, l'expression de Cdx2 est perdue (Subtil et al., 2007). **(B)** Perte d'expression de Cdx2 dans les cellules invasives du front tumoral. (i) La partie centrale des tumeurs colorectales est caractérisée par des structures tubulaires (flèche) et une expression conservée de Cdx2. (ii) Dans les cellules invasives du front tumoral, l'expression de Cdx2 est perdue (flèches), contrairement aux cellules du centre de la tumeur où Cdx2 est exprimé (tête de flèche). (iii) Dans une métastase hépatique, Cdx2 est ré-exprimé (Brabletz et al., 2004).

DSS (Aoki et al., 2003; Bonhomme et al., 2003; Calon et al., 2007; Kim et al., 2002; Saandi et al., 2013). En outre, la greffe orthotopique de cellules cancéreuses coliques LS174T dans la paroi caecale de souris Nude induit le développement de tumeurs présentant une expression conservée de Cdx2 dans la partie centrale de la masse tumorale et une perte d'expression dans les cellules invasives (Brabletz et al., 2004).

6.1.2 Mécanismes de la perte d'expression de Cdx2 dans les CCR

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer si la diminution, voire la perte d'expression de Cdx2 observée dans les CCR, pouvait être associée à des altérations du gène. Il ressort de ces études que le locus Cdx2 est rarement affecté par des mutations ponctuelles (Sivagnanasundaram et al., 2001; Wicking et al., 1998; Yagi et al., 1999). Les réarrangements chromosomiques au locus Cdx2 sont en revanche fréquents dans les CCR de phénotype CIN (Subtil et al., 2007). Ils se caractérisent par une amplification du locus du gène consécutivement à l'amplification du bras long du chromosome 13. Cependant, ces réarrangements ne sont pas prédictifs du niveau d'expression de Cdx2 dans les tumeurs.
Ces résultats suggèrent ainsi que la réduction d'expression de Cdx2 observée dans les CCR repose sur l'existence de mécanismes de régulations négatives de l'expression du gène. A cet égard, plusieurs études ont montré que l'expression de Cdx2 pouvait être inhibée *in vitro* par différentes voies de signalisation oncogéniques impliquées dans la cancérogénèse colique. Ainsi, l'expression de Cdx2 est inhibée par la voie Ras dans des cellules cancéreuses coliques en culture, consécutivement à l'activation de la PKC et des protéines kinases Erk1/2 (Krueger et al., 2009; Lorentz et al., 1999). L'activation de la voie PI3K/Akt inhibe également l'expression de Cdx2 par le biais du recrutement du facteur de transcription NF-κB p65/p50 sur le promoteur de Cdx2 (Kim et al., 2002). De plus, il a été montré que l'activation oncogénique de la voie Wnt ainsi que l'augmentation de l'expression du facteur de transcription Sox9, une cible transcriptionnelle de la voie Wnt, inhibent l'expression de Cdx2 par un (des) mécanisme(s) qui reste(nt) à définir (Blache et al., 2004; da Costa et al., 1999).

Plus récemment, il a été montré que l'expression du facteur de transcription HNF4α, qui participe à la régulation de Cdx2, est réduite dans les CCR humains et dans différents modèles animaux de tumorigénèse intestinale (Saandi et al., 2013). Enfin, l'expression de Cdx2 peut être altérée en fonction de l'environnement extracellulaire local comme la présence de collagène de type I ou le degré d'hypoxie (Benahmed et al., 2007; Brabletz et al., 2004; Derbal-Wolfrom et al., 2013).

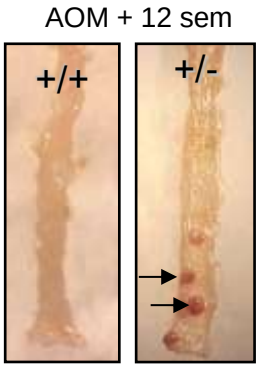

Figure 27 : Sensibilité des souris Cdx2$^{+/-}$ à développer des tumeurs intestinales chimio-induites.

Douze semaines après traitement à l'azoxyméthane (AOM), les souris Cdx2$^{+/-}$ développent des tumeurs au niveau du côlon distal (flèches) (Bonhomme et al., 2003).

Il ressort de ces résultats que de multiples mécanismes de régulation sont susceptibles de perturber l'expression de Cdx2 dans les CCR en fonction des altérations moléculaires spécifiques des cellules tumorales ainsi que de leur microenvironnement.

6.1.3 Cdx2, un gène à fonction suppresseur de tumeurs dans l'intestin

Compte-tenu de l'importance majeure de Cdx2 dans le maintien de l'homéostasie intestinale et de l'altération de son expression dans les CCR, plusieurs études se sont attachées à déterminer l'impact de la réduction d'expression de Cdx2 sur l'émergence et le développement des tumeurs intestinales. Dans cette perspective, différents modèles ont été développés :

Le modèle de souris $Cdx2^{+/-}$ traitées à l'AOM

Les souris hétérozygotes $Cdx2^{+/-}$ représentent un modèle de réduction (x1/2) constitutive de l'expression de Cdx2 dans l'épithélium intestinal. Ces souris ne développent pas spontanément d'adénomes ou d'adénocarcinomes intestinaux, mais présentent dans la région péri-caecale des hétéroplasies de type gastro-oesophagien qui n'évoluent jamais en cancer (Beck et al., 1999; Chawengsaksophak et al., 1997)**.** Ce phénotype indique que la réduction d'expression de Cdx2 est insuffisante pour initier la tumorigénèse colorectale. En revanche, lorsque ces souris sont traitées avec un agent chimique carcinogène, l'azoxyméthane (AOM), pour initier le processus tumoral, elles présentent des tumeurs dans le côlon distal en plus grand nombre et plus précocement que les souris sauvages (Bonhomme et al., 2003) **(Figure 27)**. Ces tumeurs correspondent à des adénocarcinomes invasifs au niveau desquels l'expression de Cdx2 est diminuée et hétérogène. Ces résultats montrent que Cdx2 exerce une fonction suppresseur de tumeurs dans l'intestin, en ce sens qu'une réduction de son expression facilite, mais n'initie pas, le développement de tumeurs intestinales. L'épithélium colique des souris $Cdx2^{+/-}$ étant par ailleurs plus résistant à l'apoptose induite par irradiation γ, l'activité anti-tumorale de Cdx2 pourrait en partie reposer sur son aptitude à réguler le processus apoptotique (Bonhomme et al., 2003). Cette observation est à rapprocher des résultats obtenus ultérieurement par Renouf *et al* qui montrent que la surexpression de Cdx2 stimule l'apoptose des cellules exposées à un stress génotoxique (Renouf et al., 2012).

Le modèle de souris $Cdx2^{+/-}$//$Apc^{+/\Delta 716}$

L'activité suppresseur de tumeurs de Cdx2 a par la suite été confirmée dans le modèle murin $Cdx2^{+/-}$//$Apc^{+/\Delta 716}$. Ces souris développent en effet 6 fois plus de polypes adénomateux au niveau du côlon distal que les souris $Apc^{+/\Delta 716}$, ce qui montre qu'une diminution

d'expression de Cdx2 est capable d'initier la tumorigénèse colorectale dans un contexte génétique de prédisposition au cancer (Aoki et al., 2003). De façon intéressante, l'expression de Cdx2 est significativement réduite dans l'épithélium sain du côlon distal des souris $Cdx2^{+/-}$ // $Apc^{+/\Delta 716}$ comparativement aux souris sauvages, ce qui conduit à l'activation de la voie mTOR, à l'origine de l'entrée prématurée des cellules intestinales en phase S du cycle cellulaire génératrice d'une instabilité chromosomique. Ces résultats suggèrent que Cdx2 pourrait s'opposer au développement tumoral en contrôlant le cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité génomique, deux activités majeures de la protéine démontrées dans d'autres études et discutées dans le paragraphe 4.1 et 4.2 (p.88-90).

Le modèle de xénogreffe de cellules inductibles chez la souris Nude

Afin de comprendre l'impact de la réduction d'expression de Cdx2 observée par Brabletz et al dans les cellules invasives des CCR humains (Brabletz et al., 2004), un modèle cellulaire d'expression inductible de Cdx2 a été développé et testé *in vitro* et *in vivo* pour sa propension à migrer et à former des métastases. L'expression forcée de Cdx2 dans ces cellules réduit leur pouvoir de migration *in vitro* et leur capacité à se disséminer et à former des métastases dans un modèle de xénogreffe chez la souris Nude. A l'inverse, la perte d'expression de Cdx2 dans des cellules cancéreuses coliques augmente leur potentiel migratoire *in vitro* (Gross et al., 2008). Ainsi, par-delà sa fonction suppresseur de tumeurs dans l'intestin, Cdx2 exerce également une fonction « anti-métastatique ».

L'activité « anti-migratoire » de Cdx2 a par ailleurs été illustrée dans le modèle de souris $Cdx2^{+/-}$ traitées au DSS, un agent pro-inflammatoire. Les souris $Cdx2^{+/-}$ présentent en effet une hypersensibilité à l'inflammation induite par le DSS, cependant contrebalancée par une réparation plus rapide de l'épithélium intestinal ulcéré, qui résulte d'une migration cellulaire facilitée par la réduction d'expression de Cdx2 (Calon et al., 2007).

6.2 Cdx2 dans les pathologies extra-intestinales

6.2.1 Cdx2 dans les métaplasies intestinales

Bien que Cdx2 soit physiologiquement spécifiquement exprimé dans l'épithélium intestinal au stade adulte, une expression ectopique du gène peut être observée dans l'estomac ou l'œsophage, respectivement dans le cadre d'une infection à H.pylori ou de reflux gastro-œsophagiens (Bai et al., 2002; Lord et al., 2005; Vauhkonen et al., 2008). Ces résultats sont à rapprocher de ceux d'autres études ayant montré que l'expression ectopique de Cdx2 dans

l'estomac de souris transgéniques induit l'apparition de métaplasies intestinales, ce qui montre que Cdx2 est nécessaire et suffisant à l'établissement du phénotype intestinal (Mutoh et al., 2002; Silberg et al., 2002). En revanche, l'expression ectopique de Cdx2 dans l'épithélium œsophagien de souris transgéniques ne permet pas le développement de lésions de type métaplasique (Kong et al., 2011).
Les métaplasies intestinales de l'estomac et de l'œsophage sont considérées comme des lésions précancéreuses en ce sens qu'elles évoluent le plus souvent en carcinomes.

Une expression ectopique de Cdx2 a par ailleurs été rapportée dans différents types de cancers, tels que les adénocarcinomes du pancréas, de l'œsophage, de l'estomac, de la vessie, dans des cholangiocarcinomes, ainsi que dans de rares cas de cancers ovariens, des poumons, de la prostate, de la fente olfactive (Franchi et al., 2004; Moskaluk et al., 2003; Saad et al., 2011; Vang et al., 2006; Werling et al., 2003).

Bien que les mécanismes moléculaires responsables de l'expression ectopique de Cdx2 dans les métaplasies intestinales restent à définir, ces observations suggèrent que Cdx2 exerce une fonction pro-oncogénique lorsqu'il est exprimé en dehors de son contexte physiologique. Néanmoins, à l'image de ce qui est observé au cours de la cancérogénèse colique, l'expression de Cdx2 diminue lors de la progression des métaplasies intestinales en adénomes puis en cancers gastriques (Kim et al., 2006b; Park et al., 2010; Xin et al., 2008). En outre, une expression conservée de Cdx2 dans les cancers gastriques est associée à un bon pronostic, ce qui suggère que Cdx2 exerce une fonction suppresseur de tumeurs dans les cancers gastriques établis (Mizoshita et al., 2003; Wang et al., 2012).

6.2.2 Cdx2 dans les leucémies

Une expression ectopique de Cdx2 a également été décrite dans plus de 80% des leucémies aigües lymphoïdes et myéloïdes et est associé à un mauvais pronostic (Scholl et al., 2007; Thoene et al., 2009). Tandis que l'inhibition de l'expression de Cdx2 par shARN dans différentes lignées leucémiques induit une diminution de la prolifération cellulaire et du pouvoir clonogénique *in vitro* (Scholl et al., 2007; Thoene et al., 2009), l'expression forcée de Cdx2 dans les cellules de moelle osseuse transplantées à des souris irradiées conduit au développement d'une leucémie aigüe myéloïde et à la mort des animaux (Rawat et al., 2004; Scholl et al., 2007).

Ces résultats montrent que Cdx2 exerce une activité oncogénique en situation d'expression ectopique dans le tissu hématopoïétique.
L'activité leucémogène de Cdx2 nécessite l'activité transcriptionnelle de la protéine et repose sur une dérégulation des gènes Hox et de la voie PPARγ, ainsi que sur la répression du facteur de transcription Klf4 dans le lignage hématopoïétique (Faber et al., 2013; Rawat et al., 2004; Scholl et al., 2007). En outre, alors que la protéine Cdx2 interagit avec le complexe Ku70/80 dans les cellules intestinales afin d'inhiber la réparation non fidèle des cassures double brin de l'ADN de type NHEJ, expliquant en partie son rôle suppresseur de tumeurs dans l'intestin, l'interaction entre Cdx2 et le complexe Ku70/80 ne se produit pas dans les cellules leucémiques, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, la dualité de fonction de cdx2 dans l'intestin et le tissu hématopoïétique (Renouf et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats montre que Cdx2 est un facteur de transcription versatile qui exerce des fonctions opposées en termes de cancérogénèse. Ainsi, alors qu'il est suppresseur de tumeurs dans son site d'expression physiologique, l'intestin, Cdx2 a un effet pro-oncogénique lorsqu'il est exprimé en dehors de son contexte physiologique, dans le tissu hématopoïétique.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

La gravité du cancer colorectal (CCR) tient de sa propension à développer des métastases hépatiques et/ou pulmonaires ainsi que de l'échec relatif des stratégies thérapeutiques existantes. Plusieurs études récentes réalisées à grande échelle ont montré qu'il existe différents types de CCR, correspondant à autant de formes distinctes de la maladie. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui gouvernent ces différentes formes de CCR et le développement de modèles précliniques correspondants constituent deux enjeux majeurs de la recherche en cancérologie afin de permettre la mise au point de thérapies plus efficaces et innovantes dans le cadre d'une médecine personnalisée.

Dans cette perspective, l'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué mon travail de thèse étudie depuis plusieurs années le rôle du facteur de transcription homéotiques Cdx2 dans l'homéostasie intestinale et le développement des pathologies intestinales, en portant une attention particulière aux CCR. Les études menées au laboratoire suggèrent que Cdx2 exerce une fonction suppresseur de tumeurs et de métastases dans l'intestin (Bonhomme et al., 2003; Gross et al., 2008). Ces études ont été réalisées à partir d'un modèle de souris dans lequel l'expression de Cdx2 est réduite et à partir d'un modèle cellulaire de restauration de l'expression de Cdx2 dans des cellules cancéreuses coliques.

De façon intéressante, plusieurs études récentes ont montré qu'une forte réduction d'expression de Cdx2 dans les CCR est un facteur de mauvais pronostic (Bae et al., 2015; Dalerba et al., 2016; De Sousa E Melo et al., 2013). Cependant, l'importance fonctionnelle de la perte de Cdx2 dans ces tumeurs n'est pas connue.

Sur cette base, mon travail de thèse a consisté à établir les conséquences pathologiques de la perte de fonction de Cdx2 dans l'intestin adulte.

RESULTATS

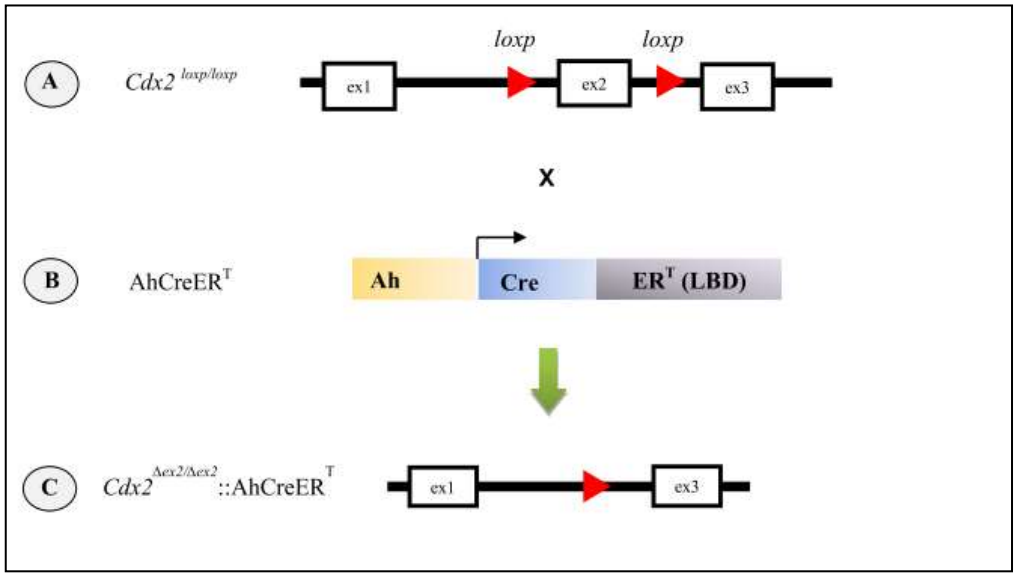

Figure 28 : Schéma descriptif du modèle d'invalidation de Cdx2 dans l'intestin adulte.
Les souris $Cdx2^{f/f}$ portant le gène Cdx2 flanqué de 2 sites loxP (A) ont été croisées avec des souris $AhCre^{ERT}$ (B) afin d'obtenir des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$. L'invalidation de Cdx2 est induite par une injection intra-péritonéale journalière de 1,6mg de β-naphtoflavone combiné à 1,6mg de tamoxifène pendant 5 jours (C).

1. Résumé des résultats obtenus

A. Caractérisation des CCR humains présentant une forte réduction de l'expression de Cdx2

En collaboration avec la Ligue contre le cancer (programme Carte d'Identité des Tumeurs), nous avons analysé le profil d'expression de Cdx2 dans les 6 sous-types de CCR identifiés par analyse transcriptomique au sein d'une collection de 566 CCR (Marisa et al., 2013). Il en ressort que l'expression de Cdx2 est la plus fortement réduite dans le sous-type correspondant à des tumeurs festonnées présentant un phénotype de cellule souche. Ce sous-type regroupe les tumeurs de plus mauvais pronostic.

B. Caractérisation des lésions caecales résultant de la perte d'expression de Cdx2 dans l'intestin chez la souris

L'invalidation massive de Cdx2 dans l'épithélium intestinal adulte étant létale (Hryniuk et al., 2012; Verzi et al., 2010), les conséquences de la perte de fonction de Cdx2 ont été étudiées à partir du modèle murin d'invalidation conditionnelle mosaïque $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ établi par Stringer et al. (Stringer et al., 2012). Ce modèle a été obtenu en croisant des souris $Cdx2^{f/f}$ avec des souris exprimant la recombinase Cre sous le contrôle de l'élément de promoteur intestinal Ah qui permet la synthèse du cytochrome p450 1A1 de rat en réponse à des xénobiotiques hydrophobes tels que le β-naphthoflavone. Dans ce modèle, la recombinase Cre a été fusionnée au domaine LBD du récepteur des œstrogènes muté de souris (ER^T) (Littlewood et al., 1995) **(Figure 28).** L'invalidation de Cdx2 chez ces souris est induite par injection intrapéritonéale journalière de β-naphthoflavone et de tamoxifène pendant 5 jours.

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que l'invalidation de Cdx2 chez ces souris transforme à court terme l'épithélium intestinal en épithélium de type gastrique (Stringer et al., 2012). Cependant, à plus long terme, soit 6 mois après l'invalidation de Cdx2, ces souris développent des lésions polypoïdes au niveau du caecum. J'ai caractérisé et évalué la pathogénicité de ces lésions par des approches transcriptomique (RNA-Seq) et protéique (immunohistochimie) en les comparant à des échantillons de muqueuses colique et gastrique saines. Les résultats montrent que ces lésions correspondent à des métaplasies incomplètes de type gastrique et qu'elles n'évoluent jamais spontanément en cancer, même à long terme (12 à 18 mois après l'invalidation de Cdx2).

C. Etude de l'évolution des lésions dans un fond génétique $Apc^{+/\Delta 14}$

Puisque les lésions caecales n'évoluent pas spontanément en cancer, j'ai évalué leur pathogénicité en les plaçant dans un contexte génétique de prédisposition au cancer intestinal. Pour cela, les souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ ont été croisées avec des souris $Apc^{+/\Delta 14}$ qui développent spontanément des adénocarcinomes principalement localisés au niveau de l'intestin grêle consécutivement à la perte du second allèle Apc. Six mois après l'invalidation de Cdx2, les souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ développent des lésions caecales dans des proportions similaires à celles des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ mais en moyenne deux fois plus de tumeurs de l'intestin grêle que les souris $Apc^{+/\Delta 14}$.

L'étude histologique des lésions caecales et des tumeurs de l'intestin grêle des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ révèle une structure similaire, formée de la juxtaposition de zones de type gastrique avec des zones de type adénocarcinomateux. Cette structure mixte diffère de celle des lésions caecales des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ qui présentent uniquement une structure de type gastrique, et des tumeurs de l'intestin grêle des souris $Apc^{+/\Delta 14}$ qui présentent uniquement une structure adénocarcinomateuse.

L'analyse immunohistologique de ces tumeurs mixtes montre que la β-caténine est exclusivement membranaire dans les zones de type gastrique alors qu'elle est cytoplasmique voire nucléaire dans les zones adénocarcinomateuses. Cette observation témoigne de l'activation de la voie oncogénique Wnt, par ailleurs confirmée par l'analyse transcriptomique. La microdissection puis le génotypage pour le gène Apc des différentes zones des tumeurs mixtes indiquent que la translocation cytoplasmique/nucléaire de la β-caténine dans les zones adénocarcinomateuses est la conséquence de la perte du second allèle Apc dans ces régions, comme cela a déjà été décrit dans les adénocarcinomes des souris $Apc^{+/\Delta 14}$.

D. Effet suppresseur de tumeur « cellulaire-non autonome » de Cdx2

L'analyse immunohistologique des tumeurs mixtes montre que la protéine Cdx2 est absente des zones de type gastrique, conformément au fait que le gène y a été invalidé, tandis qu'une expression résiduelle hétérogène subsiste dans les zones adénocarcinomateuses, ce qui suggère que celles-ci dérivent de cellules qui n'ont pas été invalidées pour Cdx2. Afin de confirmer cette hypothèse, le devenir des cellules invalidées pour Cdx2 dans les tumeurs mixtes a été étudié en produisant des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$//$RosaCAG^{tdTomato}$ dont les cellules invalidées pour Cdx2 apparaissent fluorescentes. Six mois après

l'invalidation, seules les zones de type gastrique sont fluorescentes tandis que les zones adénocarcinomateuses restent dépourvues de fluorescence.

Ces résultats indiquent que les zones adénocarcinomateuses et les zones de type gastrique des tumeurs mixtes ont une origine cellulaire différente. Il apparaît ainsi que la perte de fonction de Cdx2 dans une cellule épithéliale intestinale est insuffisante pour initier la cancérogénèse. Cependant, elle crée un microenvironnement qui favorise la transformation maligne de cellules voisines intactes pour Cdx2 et prédisposées à la tumorigénèse par la perte de fonction du gène Apc. Ce résultat démontre une propriété nouvelle et originale de Cdx2 : sa fonction suppresseur de tumeurs agissant de manière « cellulaire non-autonome » dans l'intestin.

E. La perte de fonction Cdx2 crée un microenvironnement pro-oncogénique

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires qui relayent la fonction suppresseur de tumeurs « cellulaire non-autonome » de Cdx2, le profil transcriptomique des lésions caecales des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ a été réexaminé et comparé à celui de la muqueuse colique saine, en portant une attention particulière aux molécules impliquées dans les interactions cellulaires. Cette analyse a permis de mettre en évidence une surexpression dans les lésions caecales d'un nombre important de gènes codant pour des composants de la matrice extra-cellulaire et pour des cytokines dont l'implication dans les processus de tumorigénèse a déjà été rapportée dans d'autres études. Ces modifications du microenvironnement moléculaire s'accompagnent de modifications du microenvironnement cellulaire, caractérisées par la présence de LTreg infiltrant les lésions, et par l'absence de LTC, un phénotype associé à un mauvais pronostic dans les CCR humains.

Par des analyses immunohistologiques, l'impact de la surexpression des médiateurs solubles observée dans les lésions sur différentes voies de signalisation a été étudié. Nos résultats indiquent une activation de la voie NF-κB dans l'épithélium de surface des lésions, spécifiquement au niveau des cellules non-invalidées pour Cdx2. A cet égard, des études récentes ont montré que la tumorigénèse intestinale peut être initiée dans les cellules différenciées post-mitotiques suite à la co-activation des voies de signalisation NFκB et Wnt et que ce mécanisme est relayé par l'induction de iNos dont l'activité facilite la perte du gène Apc (Schwitalla et al., 2013; Shaked et al., 2012). L'analyse transcriptomique comparative des lésions caecales avec la muqueuse colique saine montre une forte induction de iNos dans les lésions et l'analyse immunohistologique indique que iNos est exprimé dans les cellules de l'épithélium de surface des lésions co-exprimant Cdx2 et NF-κB.

F. Les zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes se développent selon un modèle « top-down »

Les résultats décrits ci-dessus suggèrent que les régions adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes se développent à partir de la surface des lésions. Afin de confirmer cette hypothèse, la position relative des aires adénocarcinomateuses dans les tumeurs mixtes de souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ a été analysée.

Les résultats obtenus montrent que les aires adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes sont systématiquement connectées à l'épithélium de surface ou sont situées immédiatement sous cet épithélium et s'étendent en profondeur dans le stroma vers la couche musculaire intestinale, ce qui montre que les zones adénocarcinomateuses se développent à partir de la surface des tumeurs mixtes.

Globalement, ces résultats montrent que le gène homéotique Cdx2 exerce une fonction de suppresseur de tumeur « cellulaire non-autonome » dans l'intestin en ce sens que sa perte de fonction induit le développement de lésions métaplasiques de type gastrique n'évoluant pas spontanément en cancer mais qui influencent le microenvironnement notamment inflammatoire facilitant la transformation maligne de cellules adjacentes, intactes pour Cdx2, localisées à la surface de ces lésions.

2. Publication

L'ensemble de ces résultats est en cours de soumission :

« Non-cell-autonomous tumor suppressor activity of a homeobox gene, Cdx2, in the gut »

Camille Balbinot, Olivier Armant, Laetitia Marisa, Aurélien de Reyniès, Elisabeth Martin, Thoueiba Saandi, Jacqueline Deschamps, Felix Beck, Jean-Noël Freund, Isabelle Duluc.

Biological Science

Cell biology

Non-Cell-Autonomous Tumor Suppressor Activity of the Homeobox Gene Cdx2 in the Gut

Camille Balbinot[a], Olivier Armant[b], Nabila Elarouci[c], Laetitia Marisa[c], Elisabeth Martin[a], Etienne De Clara[a], Jacqueline Deschamps[d], Felix Beck[e], Jean-Noël Freund[a,1,2], Isabelle Duluc[a,1]

[a] Université de Strasbourg, Inserm, UMR_S1113, 67000 Strasbourg, France

[b] Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxicology and Genetics, 76021 Karlsruhe, Germany

[c] ‘‘Cartes d’Identité des Tumeurs’’ Program, Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

[d] Hubrecht Institute, Developmental Biology and Stem Cell Research, 3584 CT Utrecht, The Netherlands

[e] Barts and The London School of Medicine and Dentistry, London E1 2ES, UK

[1] These authors contributed equally to the work

[2] Correspondence: jean-noel.freund@inserm.fr +33 388 277 727
Inserm Unit 1113, 3 avenue Molière
67200 Strasbourg, France

Abstract

Homeobox genes encode developmental transcription factors and are also involved in adult tissue homeostasis. Their alteration can contribute to carcinogenesis although their role in the disease is not fully understood. In human colon cancers, we observed that a strong reduction in the expression of the Cdx2 homeobox gene correlates with poor prognosis. In mice, mosaic conditional inactivation of the Cdx2 gene in the adult intestinal epithelium induces the outgrowth of incomplete gastric-type metaplasias. These metaplasias do not spontaneously progress in cancer, but they facilitate the appearance of adenocarcinomas developing from adjacent Cdx2-intact cells at the surface of the metaplasic lesions in a top-down process. This is associated with the remodeling of the microenvironment leading to the activation of NFkB and to the onset of iNOS in the Cdx2-intact surface cells. These results highlight a new property of the intestinal homeobox gene Cdx2 in the gut, namely its non-cell-autonomous tumor suppressor activity. They also present a novel paradigm in that metaplasic lesions, generally considered as precancerous, can induce carcinogenesis from adjacent non-metaplasic cells without themselves progressing to malignancy.

Keywords:
Metaplasia, microenvironment, NFkB, iNOS

Significance

In the context of cancer screening, it is important to establish the pathological relevance of early lesions. Based on data showing that colon cancer patients with a strong decrease of the homeobox gene Cdx2 are of poor prognosis, we developed mice in which this gene was invalidated in the adult intestinal epithelium. The absence of Cdx2 led to the appearance of incomplete gastric-type metaplasias that did not spontaneously undergo malignant transformation. However, in a tumor-prone context these lesions indirectly induced carcinogenesis in neighboring Cdx2-intact cells. The results demonstrate the metaplasia, generally considered as precancerous lesions, can increase the risk to develop a cancer not by progressing themselves into malignancy, but by triggering the malignant sequence in adjacent non-metaplasic cells.

Introduction

Colon cancer (CC) is the third most frequent cancer and a leading cause of death worldwide. Recently, genome-wide studies have revealed the extent and complexity of the molecular alterations arising in CCs, leading to a consensus view of the existence of several CC subtypes with different properties and prognosis (1). These changes not only relate to intrinsic genetic alterations affecting CC cells, but also to modifications of their molecular and cellular environment (2). Elucidating the pathophysiological relevance of the intrinsic alterations and of their interaction with the microenvironment represents a major challenge in developing novel and efficient therapeutic strategies targeting different subtypes of CCs.

The homeotic transcription factor Cdx2 is an important and specific actor in the maintenance of dynamic homeostasis in the adult gut epithelium, providing tissue identity to the stem cells and coordinating cell proliferation and differentiation (3–5). Its expression is frequently altered in human CCs and in mouse models of intestinal cancers (6–9), resulting in reduced protein levels, heterogeneous distribution within the tumor and/or inefficient targeting to the nucleus. Functional studies using animal and cell models have established that reducing the Cdx2 level facilitates intestinal carcinogenesis and renders the malignant cells more aggressive, which is indicative of a tumor suppressor activity in the gut (10–13). Multiple molecular mechanisms are involved since the Cdx2 protein not only regulates the transcription of a large panel of genes (14), but it also non-transcriptionally interferes with key cellular processes like intracellular signaling (15, 16), cell proliferation (17) and DNA repair (18, 19) . In a subset of CC cases, the residual expression of Cdx2 in cancer cells reaches a very low level (6) and this has been correlated with poor prognosis (20, 21). However, the manner in which the loss of Cdx2 expression influences the nature of CCs is still elusive.

In the present study, combining data obtained from a collection of human CCs with functional studies performed in mice, we uncovered a novel and original property for the homeobox gene Cdx2 in that its loss generates non-cancerous metaplasic lesions that modify the microenvironment and facilitate the malignant transformation of adjacent Cdx2-expressing cells. Our results provide experimental evidence for the notion that metaplasias do not themselves progress to malignancy but rather, act to induce carcinogenesis in neighboring non-metaplasic cells.

Results

Serrated-like colon cancers with a stem cell signature exhibit a strong reduction of Cdx2

A previous study conducted on the CIT program cohort (the French multicenter Carte d'Identité des Tumeurs cohort) has classified human CCs into 6 subtypes, based on specific molecular properties and prognostic values (22). They have been integrated into a consensus classification (1). Analyzing the Cdx2 levels in the 6 subtypes (566 samples) of this cohort showed a particularly strong reduction of expression in the C4 subtype (Figure S1a,b) associated with serrated precursor neoplasia exhibiting a stem-cell-like signature and a poor prognosis (22). Using an unsupervised approach, the patients of the whole CIT cohort with low Cdx2 had a worse disease-free survival than patients with a high expression (Figure S1c), and this was even more pronounced within the C4 subtype (Figure S1d). Thus, the reduction of Cdx2 in CCs correlates with a bad prognosis, which is particularly severe in patients of the C4 subtype.

Loss of function of Cdx2 induces incomplete gastric-type metaplasias in the caecum, unable to spontaneously progress to neoplasia

We and others have previously investigated the impact of a moderate (2-fold) reduction of Cdx2 expression on intestinal carcinogenesis using heterozygous $Cdx2^{+/-}$ mice (10, 11). The finding that human CCs with the worst prognosis have a strong reduction in Cdx2 levels prompted us to investigate here the pathological relevance of complete long-term loss of function of Cdx2 in mice. We used $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice in which gene invalidation was conditionally induced at the age of 3 months by β-Naphthoflavone / Tamoxifen (βNF+Tam) injection. Cre activity driven by $AhCre^{ERT}$ is mosaic in the intestinal epithelium, allowing mice to survive in the long-term.

As previously reported (4), $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice treated with βNF+Tam developed 1 or 2 sessile polypoid lesions in the caecum and occasionally in the very distal ileum and proximal colon after 4-6 months, consisting of glandular structures devoid of Cdx2 and entrapped Cdx2-intact glands, reflecting the mosaic deletion of the gene (Figure 1a,b). The transcriptomic profile of these lesions was analyzed and related to normal caecum and stomach and to the caecal foregut-type heteroplasia induced during embryogenesis in the constitutionally mutated heterozygous $Cdx2^{+/-}$ mice (23, 24). A large number of genes (5,915) genes showed an altered pattern as compared with the normal caecum (Table S1), which is

consistent with the Cdx2 protein being a major regulator of intestinal homeostasis and binding to ~14,000 chromatin sites across the genome of enterocytes (14). Intestinal transcripts were reduced, i.e. Alpi, Muc3/13, Cdh17, Cdhr2/5, Fabp2, Slc51a/b, Cdx1 and Isx, whereas gastric transcripts were turned on, among which those for Cldn18, Ctse, Gkn1/2/3, Muc1/6, Ptprn2, Tff1/2, Vsig1, Gsdma2, Krt23, Fxyd3 and the transcription factor of gastric differentiation Foxq1 (Figure S2a, Table S2). Immunohistochemistry corroborated these results (Figure S2b). However, compared with normal stomach and also with the heteroplasia of $Cdx2^{+/-}$ mice, the lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice exhibited a lower and more heterogeneous pattern of gastric makers, while several typical gastric markers failed to turn on, like Gsdma2, Muc5ac, Pga5, Pgc, Nkx6-2 and Sox2. Atp4a/b and Gif were absent in both lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice and heteroplasia of $Cdx2^{+/-}$ mice. In line with the shift in differentiation, more than 45% (173/384) of the transcripts of the intestinal stem cell signature (25) were altered in the caecal lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice, indicating a profound impact of the loss of Cdx2 on the stem cell compartment (Table S2). Thus, the mosaic conditional invalidation of Cdx2 in adults produces in the long term caecal lesions representing incomplete gastric-type metaplasias.

Since metaplasias are commonly considered as precancerous in many organs, we questioned the pathological significance of the caecal lesions. Histological evaluation failed to reveal any trait of malignancy. Ki67 labelled proliferating cells concentrating in the upper half of the lesions, as would be expected in the gastric mucosa but unlike classical adenocarcinomata, and β-catenin remained at the plasma membrane without evidence of cytoplasmic/nuclear translocation (Figure 1d). However, the transcriptomic data were intriguing (Figure 1c, Table S1). On the one hand, Gene Ontology terms related to cancer, neoplasia, cell transformation, cell proliferation, cell survival and growth of tumors were enriched. This correlated with increase of transcripts for Wnt cascade molecules (Wnt2B/5A/7B/9B, Rspo3, Fzd1/3/4/6/7/9, LRP5, Tcf3) and targets (Cyclin-D1, c-Myc, N-Myc, CD44, Bmp4, Gja1/Cx43, Gjb1/Cx32, Id2, Mmp7, Snail1/2, Sox9, Twist1/2, Wisp1/2), with the upregulation of Cyclin genes (Cyclin-D1, -D2, -A1/2 and -B1/2) and downregulation of Cyclin Inhibitors (Cdkn1/2, Ccdbp1/GCIP, Rb1, Rbl2), and with the downregulation of TTLL3 whose loss of expression facilitates colon tumorigenesis (26) and upregulation of Grem1 causative of the Hereditary Mixed Polyposis Syndrome (27). On the other hand, the transcripts for molecules capable of counteracting the canonical Wnt pathway were increased, including members of the noncanonical Wnt pathway (Wnt4/11, Ror2,

Vangl1) and Wnt signaling inhibitors (Dkkl1 and Wif1), as were those for 3 out of the 4 major genes involved in tumor cell dormancy (NR2F1, Sox9, Zfp423) (28). Facing these data, the potential of the caecal lesions to progress to malignancy was evaluated by allowing $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice to age up to 15 months (12 months after the Cdx2 invalidation). Neither any neoplasic transformation nor any change in cell proliferation and β-catenin localization occurred, indicating that the caecal lesions resulting from Cdx2 loss in the adult gut do not spontaneously progress to cancer. This is consistent with the absence of malignant evolution of the foregut-type heteroplasia developing in the gut of $Cdx2^{+/-}$ chimeric mice (29).

Malignant evolution of the Cdx2 lesions in a tumor-prone context

The caecal lesions were next explored in a cancer-prone context. For this purpose triple transgenic mice, $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$, were generated and compared with $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ and with $Apc^{+/\Delta 14}$ littermates that develop adenocarcinomatous polyps in the small intestine but only rarely in the caecum (only 1/10 $Apc^{+/\Delta 14}$ animal had 1 caecal adenocarcinoma). Macroscopic examination 6-8 months after βNF+Tam administration revealed a similar number of polyps in the caecum of $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ compared to $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice, but twice more polyps in the small intestine of $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice than in $Apc^{+/\Delta 14}$ littermates (Figure 2a). Polyps in the triple transgenics revealed a typical histology characterized by the juxtaposition of areas resembling the metaplasic lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice and areas resembling the adenocarcinomas of $Apc^{+/\Delta 14}$ mice (Figure 2b). Collectively, they are referred to hereafter as mixed tumors. Transcriptomic analysis corroborated the pathohistological observations (Table S3). The caecal mixed tumors showed more upregulated components of the Wnt pathway than the metaplasic lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice (Axin2, Cldn1, Dsc3, Fosl1, Fst, Fzd10, IL6, Lef1, Nkd1, Prox1, Tbx1, Tnfrsf19, Wnt6), and the small intestinal mixed tumors showed the induction of gastric genes (Atp4a, Car2, Ctse, Gif, Gkn1/2/3, Gsdma2, Muc1/6, Pgc, Ptprn2, Tff1/2, Vsig1) when compared with small intestinal adenocarcinomas of $Apc^{+/\Delta 14}$ mice. These results indicate that the loss of Cdx2 sensitizes the intestinal mucosa to carcinogenesis in a cancer-prone context, by potentiating the development of adenocarcinomatous structures in the caecum otherwise barely susceptible to malignant transformation, and increasing the number of polyps in the small intestine.

Non-cell-autonomous effect of Cdx2 on intestinal tumorigenesis

The juxtaposition of metaplasic and adenocarcinomatous areas in mixed tumors results either from the evolution of metaplasic cells into adenocarcinomatous cells due to the presumed negative effect of the cumulative loss of function of Cdx2 and Apc within a given cell, or from detrimental interactions between adjacent cells losing the Cdx2 and Apc functions respectively. β-catenin localization clearly demarcated the adenocarcinomatous (nuclear / cytoplasmic) and metaplasic (membranous) structures within mixed tumors (Figure 2c). An intriguing observation involved Cdx2 since the protein was absent in the metaplasic structures, as expected, but heterogeneously expressed in the adenocarcinomatous areas, as in adenocarcinoma of $Apc^{+/\Delta 14}$ mice (Figure 2c). This suggested that the metaplasic cells may not be the cells of origin of the adenocarcinomatous areas in the mixed tumors.

To address this issue, quadruple transgenic mice $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ were generated with the aim of tracing the fate of the descendants of the Cdx2-knockout cells in the tumor-prone context, since βNF+Tam treatment should simultaneously disrupt the Cdx2 gene and remove the Lox-Stop-Lox cassette to turn on Tomato expression. Two series of control experiments were conducted to validate this approach. First, $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ mice were treated with βNF+Tam to prove the perfect correlation between cells that have lost Cdx2 and cells expressing Tomato (Figure S3a). Second, $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ mice were treated with βNF+Tam to ensure Tomato expression in adenocarcinomatous cells, thus demonstrating the preservation of the transcriptional activity of the Rosa26 locus in the oncogenic context (Figure S3b). Having validated the cell tracing approach, $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ mice were analyzed 6-8 months after βNF+Tam treatment. The results obtained in mixed tumors of the small intestine (Figure 3) and caecum (Figure S3c) led to the following conclusions: (i) cells expressing Tomato were devoid of Cdx2 and exhibited membranous β-catenin only; (ii) strong and homogenous staining of Cdx2 was restricted to glands exhibiting membranous β-catenin and absence of Tomato; (iii) Cdx2 was low and heterogeneous in the areas with cytoplasmic/nuclear β-catenin; (iv) cells with cytoplasmic/nuclear β-catenin never expressed Tomato. Together, these data unambiguously demonstrate that the adenocarcinomatous cells are not the result of malignant progression of cells invalidated for Cdx2. The Cdx2-depleted cells of the metaplasic lesions do not themselves undergo malignant change, but they create a context that

stimulates the malignant transformation of adjacent Cdx2-wildtype $Apc^{+/\Delta 14}$ tumor-prone cells. Thus, Cdx2 has a non-cell-autonomous tumor suppressor activity in the gut.

The loss of Cdx2 modifies the microenvironment towards pro-oncogenic properties

Previous studies have emphasized the impact of Cdx2 on the gut microenvironment (30, 31). To search for molecules potentially involved in such non-cell-autonomous activity, the transcriptomic profile of the caecal lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice was reconsidered to identify mediators of intercellular communication. This revealed the upregulation of a number of Extra-Cellular Matrix genes (Figure S4a; Table S2), whose abnormal dynamics are involved in tumor growth and malignancy (32). The transcripts for cytokines were also upregulated, among which are Tnf family members, chemokines of the CCL and CXCL families and interleukins (Figure S4b; Table S2). Of special interest is the increased expression of the IL6 family members (IL6, IL11, Osm, Lif) considered as potent drivers of cancer progression, in particular IL11 reported to be dominant over IL6 in colon carcinogenesis (33). Indeed, while 19/66 genes reported for the common signature of IL11 and IL6 in mouse colon cancer (33) were upregulated in the caecal lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice, none of the 9 genes specific of the IL6 signature but all 3 genes specific of the IL11 signature (Chst4, Reg3g, Spp1) were changed in these caecal lesions (Table S2). Conversely, IL15 and -18 with anticancer activity (34, 35) were downregulated. In line with this, the cellular microenvironment was also modified, as illustrated by the widespread infiltration of macrophages, and by the concentration underneath the surface of the lesions of CD4+ T lymphocytes and focally FoxP3+ T lymphocytes, in contrast to CD8+ lymphocytes which were barely detected (Figure S5).

Tnf, cytokines and interleukins activate signaling pathways involving important mediators like Erk, STATs and NFκB. Phospho-Erk1/2, present in crypt base epithelial cells in the normal caecal, shifted to an irregular pattern at the surface of the $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ lesions and occasionally in subjacent glands, either depleted or not in Cdx2 (Figure S6). Phospho-STAT3 labeled infiltrating cells in the stroma and also glandular cells irrespective of the Cdx2 status (Figure S6). Importantly, the pattern of nuclear NFκB was profoundly modified in the lesions (Figure 4): indeed, besides the presence of numerous NFκB-expressing cells within the stroma, nuclear NFκB increased and became clearly detected in the surface epithelium of the lesions when this was composed of Cdx2-intact cells, in contrasts with the normal caecum. Particularly interesting regarding this result are the recent findings that

carcinogenesis can be initiated from non-stem cells instead of stem cells by combining Wnt and NFκB activation, and that this associates iNOS/nos2 induction (36, 37). This prompted us to analyze iNOS expression in the caecal lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice. Transcriptomic data revealed a ~6-fold increase of this transcript compared to the normal caecum ($q<0.0001$). This increase reflected not only the presence of iNOS-positive cells infiltrating the stroma, but also a clear focal induction of iNOS in the Cdx2-intact surface epithelium co-expressing NFκB (Figure 4). Besides iNOS, COX-2/Ptgs2 is another important determinant of colon carcinogenesis related to the Tnf /Interleukins /NFκB pathways (38). Transcriptomic data showed a strong increase in the lesions (FC=13.5; q=3,82E-25), linked to the concentration of COX-2-expressing cells in the stroma underneath the surface epithelium (Figure 5).

Surface origin of carcinogenesis induced after Cdx2 deficiency

In the mixed tumors, the oncogenic cytoplasmic/nuclear translocation of β-catenin marked the adenocarcinomatous areas. In intestinal cancers, β-catenin translocation often results from the loss of function of Apc, although it can occur despite Apc preservation, as in Juvenile Polyposis Syndrome (39). To explore the mechanisms of β-catenin translocation in adenocarcinomatous cells in the vicinity of Cdx2-depleted cells, metaplasic and adenocarcinomatous glands of mixed tumors of $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice were microdissected to determine the genomic status of Apc (Figure 5a). β-catenin and Cdx2 immunostaining in adjacent sections ascertained the identity of the microdissected samples. In control experiments, genomic PCR confirmed the presence of the Apc^{wt} allele in the normal caecal crypts and in Cdx2-depleted glands of the caecal lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice; both Apc^{wt} and $Apc^{\Delta 14}$ alleles were displayed in the normal epithelium of $Apc^{+/\Delta 14}$ mice whereas the Apc^{wt} allele was lost in the adenocarcinoma of these mice. In the $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice, the Apc^{wt} and $Apc^{\Delta 14}$ alleles were present in the normal caecal epithelium and in the metaplasic glands of the mixed tumors; however, the adenocarcinomatous glands of these tumors have lost the Apc^{wt} allele. Thus, the oncogenic activation of β-catenin in the adenocarcinomatous areas of the mixed tumors is associated with genomic rearrangements at the Apc locus, as it is in standard adenocarcinomas of $Apc^{+/\Delta 14}$ mice.

The adenocarcinomatous areas within mixed tumors of $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice emerge from Cdx2-intact cells and are associated with loss of the Apc^{wt} allele. Furthermore, Cdx2-intact cells at the surface of the metaplasic lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice exhibit

NFκB activation and iNOS induction, which was previously shown to accelerate Apc loss and intestinal carcinogenesis (36). Thus, the question arises as to whether the emergence of adenocarcinomatous glands in the mixed tumors originates from Cdx2-intact cells at the surface of the lesions or randomly from Cdx2-intact cells in the vicinity of Cdx2-depleted glands in the depth of lesions. To address this issue, histological sections of 9 mixed tumors coming from 7 $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice were examined to determine the position of the adenocarcinomatous areas, labelled by cytoplasmic / nuclear β-catenin, along the height of the tumors (Figure 5b). The location of 77 of these structures was recorded and plotted on a diagram (Figure 5c). It resulted that all the adenocarcinomatous glands were connected to or located immediately underneath the surface layer and extended more or less deeply within the mixed tumors. No adenocarcinomatous structure was located randomly or reached the bottom of the tumors. This uneven distribution strongly supports that adenocarcinomas emerge at the surface of the mixed tumors and progress according to a top-down process.

Discussion

Carcinomas contain many different cell types besides malignant epithelial cells: normal epithelial cells, cancer-associated fibroblasts, endothelial cells, immune cells, i.a., embedded in extracellular matrix as well as a variety of growth factors. Malignant cells, themselves, are heterogeneous, due to the clonal expansion of mutant cells and to the diversity of the cancer stem cells progeny. All these components interact in the tumor mass, which is structurally organized but anatomically and functionally abnormal compared to healthy organs (40). Cell-autonomous mechanisms, whereby mutations and acquisition of malignant properties directly involve cancer cells, play an important role in the progression of the disease. However, increasing attention is being paid on non-cell-autonomous mechanisms through complex networks of interactions between cancer cells and their environment. These interactions can implicate distinct cell types within the tumor (41), but they can also involve a crosstalk between epithelial sub-clones within the tumor, as recently demonstrated in a xenograft model in mice (42). We and others have already reported that the homeobox gene Cdx2 has a tumor suppressor activity in the gut, based on $Cdx2^{+/-}$ mice in which the constitutive homogenous 2-fold reduction of gene expression sensitizes the intestinal epithelium to pro-oncogenic stress (10, 11). In the present study, we have investigated the pathological relevance of the local loss of Cdx2 expression instead of homogeneous reduction, which relates to the situation observed in the subtype of human CCs with the worst prognosis. We provide evidence by immunohistology, tissue microdissection and lineage tracing that the loss of function of Cdx2 in intestinal epithelial cells produces in the long term incomplete gastric-type metaplasic structures which do not themselves progress in cancer but increase the propensity of adjacent Cdx2-intact premalignant ($Apc^{+/-}$) cells to evolve in malignancy. This formally demonstrates, in an endogenous model of cancer, the existence of deleterious interactions between distinct epithelial cell types enabling carcinogenesis. Consequently, it highlights a novel property of the homeobox gene Cdx2, namely its non-cell-autonomous tumor suppressor activity in the gut.

The mechanism(s) whereby Cdx2-deficient cells exert their non-cell autonomous tumor suppressor effect is likely indirect, as suggested by the profound modification of the microenvironment of the lesions resulting from the conditionally-loss of Cdx2. This is reflected by the abundance of macrophages and regulatory non-cytotoxic lymphocytes, which is considered of bad prognosis (43, 44), and by the increased expression of ECM molecules and cytokines. Although the precise role of each cytokine is not elucidated, a number of them

have been involved in cancer. For instance, it is the case for IL11 (33) which mediates non-cell-autonomous subclonal tumor heterogeneity (42) and for CCL2 and CXCL4 which shape a tissue permissive microenvironment and suppress anti-tumor immunity (45, 46). Along with cytokines, inflammatory cells infiltrate and concentrate beneath the surface epithelium of Cdx2-deficient lesions; they exhibit NFκB activation and express its downstream target COX-2 known to contribute to intestinal carcinogenesis (47). Strikingly, the NFκB pathway is activated not only in stromal cells but also in epithelial cells, specifically in Cdx2-intact cells at the surface of the lesions, which also turn on iNOS, another target of NFκB. This is highly relevant because chronic activation of NFκB accelerates Apc loss and triggers carcinogenesis from non-stem tumor-prone $Apc^{+/-}$ cells through iNOS activity (36, 37). Together, these data converge to a model in which the local deficiency of Cdx2 in the intestinal epithelium modifies the stroma towards pro-oncogenic properties, which subsequently activates NFκB and turns on iNOS in adjacent surface Cdx2-intact epithelial cells, thus rendering them more sensitive to Apc loss and malignant change. The onset of carcinogenesis in the surface epithelium represents an alternative to the model of tumor initiation in stem cells (48) and is in line with previous descriptions of top-down morphogenesis of colon cancers in human (49).

Here, human CCs with a strong reduction of Cdx2 were principally associated with a worse prognosis, a serrated subtype and a stem cell signature. This corroborates recent studies (20, 21, 50). Interestingly, a number of serrated type CCs show ectopic gastric markers (51–53), and gastric genes expression was also observed in the CCs with low Cdx2 levels in the current human cohort (Anxa10, Ctse, Tff2, Cldn18, Muc1). Thus, the mouse model developed in this study, in which incomplete gastric-type metaplasic structures facilitate progression of adenocarcinomas, might recapitulate to some extent the pathological process at work in serrated tumors in man. This is further reinforced by the fact that the lesions developing in these mice also share stromal and immune properties with the serrated type of human CCs (54) a high expression of ECM molecules, of the myeloid chemokine Ccl2, of complement components (C1qb, C1qc, C1ra, C1rb, C1s, C3, Cfh, Cfi), of angiogenic factors (Vegfb, Pdgfb, Pdgfc, Pdgfd) and of immunosuppressive molecules (Tgfb2, Tgfb3, Lgals1, Lgals2) (Table S1). Metaplasias are often considered as precursors of cancer, particularly in the digestive tract, based on the increased risk to develop a cancer in patients followed up for this type of abnormal lesions. The present study corroborates this notion since incomplete gastric-type metaplasias resulting from the loss of homeobox gene Cdx2 facilitate adenocarcinomatous development. However, they provide experimental evidence for a novel

paradigm in that metaplasic cells can induce the cancerous process without themselves progressing in malignancy but through indirect interactions that trigger the malignant transformation of adjacent non-metaplasic cells. These findings are important for the characterization of precancerous lesions displayed more and more frequently in cancer screening, as well as for the development of appropriate preventive strategies and cancer treatments.

Acknowledgements

We thank Prof DJ Winton (Cancer Research UK, Cambridge, UK) for providing the AhCre^{ERT} mice. This work was supported the Ligue contre le Cancer du Haut-Rhin (France) and by the Fondation ARC (France). C.B. was funded by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) and by the Ligue contre le Cancer (France). The authors thank A De Reynes (''Cartes d'Identité des Tumeurs'' Program, Ligue contre le Cancer, Paris, France) for fruitful discussions.

Author contributions

All authors contributed to current study including intellectual input, conducting experiments, result analysis, and writing and editing the manuscript. C.B., O.A., N.E., L.M., E.M., E.D.D and I.D. performed experiments. C.B., O.A., N.E., L.M., E.D.D, J.N.F. and I.D. analyzed data. C.B., F.B., J.D., J.N.F. and I.D. conceived and designed research. C.B., F.B., J.N.F. and I.D. wrote the draft manuscript. All authors approved the content of the manuscript.

Methods

Human CC samples and analysis

The 566 transcriptomic profiles (GSE39582) reported by Marisa et al (22) were analyzed. For statistical analyses, the comparison of the expression levels of Cdx2 between the C4 CC subtype and the others subtypes was performed using the independent 2-group t-test (function t.test, stats R package). Disease-Free Survival was used and defined as the time from surgery to the first recurrence. Survival curves were obtained according to the method of Kaplan and Meier (function Surv, R package survival) and differences between survival distributions were assessed by Log-rank test.

Mouse strains and analyses

Mice of the appropriate genotype (see SI Material & Methods) were housed according to the guidelines of the Comité Régional d'Ethique en Matière d'Exprimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS, CEEA 35). At the age of 3 months, they were given a combined intraperitoneal injection of 1.6 mg TAM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 1.6 mg βNF (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in corn oil, once daily for 4 days. They were euthanized by cervical dislocation and analyzed as described in SI Material & Methods.

References

1. Guinney J, et al. (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21(11):1350–1356.

2. Biswas S, et al. (2015) Microenvironmental control of stem cell fate in intestinal homeostasis and disease. *J Pathol* 237(2):135–145.

3. Verzi MP, Shin H, Ho L-L, Liu XS, Shivdasani RA (2011) Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Mol Cell Biol* 31(10):2026–2039.

4. Stringer EJ, et al. (2012) Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Dev Camb Engl* 139(3):465–474.

5. Simmini S, et al. (2014) Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun* 5:5728.

6. Subtil C, et al. (2007) Frequent rearrangements and amplification of the CDX2 homeobox gene in human sporadic colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Lett* 247(2):197–203.

7. Brabletz T, et al. (2004) Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Res* 64(19):6973–6977.

8. Kim S, et al. (2004) Down-regulation of the tumor suppressor PTEN by the tumor necrosis factor-alpha/nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-inducing kinase/NF-kappaB pathway is linked to a default IkappaB-alpha autoregulatory loop. *J Biol Chem* 279(6):4285–4291.

9. Saandi T, et al. (2013) Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4α in intestinal cancer. *Oncogene* 32(32):3782–3788.

10. Bonhomme C, et al. (2003) The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 52(10):1465–1471.

11. Aoki K, Tamai Y, Horiike S, Oshima M, Taketo MM (2003) Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc+/Delta716 Cdx2+/- compound mutant mice. *Nat Genet* 35(4):323–330.

12. Gross I, et al. (2008) The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* 27(1):107–115.

13. Hryniuk A, Grainger S, Savory JGA, Lohnes D (2014) Cdx1 and Cdx2 function as tumor suppressors. *J Biol Chem* 289(48):33343–33354.

14. Verzi MP, et al. (2010) Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Dev Cell* 19(5):713–726.

15. Kim SP, et al. (2004) Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 315(1):93–99.

16. Guo R-J, Funakoshi S, Lee HH, Kong J, Lynch JP (2010) The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. *Carcinogenesis* 31(2):159–166.

17. Aoki K, et al. (2011) Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res* 71(2):593–602.

18. Renouf B, et al. (2012) Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucleic Acids Res* 40(8):3456–3469.

19. Soret C, et al. (2016) Distinct mechanisms for opposite functions of homeoproteins Cdx2 and HoxB7 in double-strand break DNA repair in colon cancer cells. *Cancer Lett* 374(2):208–215.

20. Bae JM, Lee TH, Cho N-Y, Kim T-Y, Kang GH (2015) Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 21(5):1457–1467.

21. Dalerba P, et al. (2016) CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med* 374(3):211–222.

22. Marisa L, et al. (2013) Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 10(5):e1001453.

23. Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB (1999) Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U A* 96(13):7318–7323.

24. Stringer EJ, Pritchard CA, Beck F (2008) Cdx2 initiates histodifferentiation of the midgut endoderm. *FEBS Lett* 582(17):2555–2560.

25. Muñoz J, et al. (2012) The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent "+4" cell markers. *EMBO J* 31(14):3079–3091.

26. Rocha C, et al. (2014) Tubulin glycylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. *EMBO J* 33(19):2247–2260.

27. Jaeger E, et al. (2012) Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet* 44(6):699–703.

28. Sosa MS, et al. (2015) NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RARβ-driven quiescence programmes. *Nat Commun* 6:6170.

29. Beck F, et al. (2003) A study of regional gut endoderm potency by analysis of Cdx2 null mutant chimaeric mice. *DevBiol* 255(2):399–406.

30. Lorentz O, et al. (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 139(6):1553–1565.

31. Gao N, White P, Kaestner KH (2009) Establishment of Intestinal Identity and Epithelial-Mesenchymal Signaling by Cdx2. *DevCell* 16(4):588–599.

32. Lu P, Weaver VM, Werb Z (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196(4):395–406.

33. Putoczki TL, et al. (2013) Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell* 24(2):257–271.

34. Bahri R, et al. (2015) IL-15 suppresses colitis-associated colon carcinogenesis by inducing antitumor immunity. *Oncoimmunology* 4(9):e1002721.

35. Salcedo R, et al. (2010) MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* 207(8):1625–1636.

36. Shaked H, et al. (2012) Chronic epithelial NF-κB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(35):14007–14012.

37. Schwitalla S, et al. (2013) Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152(1–2):25–38.

38. Kraus S, Arber N (2009) Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 9(4):405–410.

39. Iwamoto M, et al. (2005) Nuclear accumulation of beta-catenin occurs commonly in the epithelial cells of juvenile polyps. *Pediatr Res* 57(1):4-9–3.

40. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010) Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Dev Cell* 18(6):884–901.

41. Lujambio A, et al. (2013) Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* 153(2):449–460.

42. Marusyk A, et al. (2014) Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* 514(7520):54–58.

43. Kang J-C, Chen J-S, Lee C-H, Chang J-J, Shieh Y-S (2010) Intratumoral macrophage counts correlate with tumor progression in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 102(3):242–248.

44. Suzuki H, et al. (2010) Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother CII* 59(5):653–661.

45. Chun E, et al. (2015) CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep* 12(2):244–257.

46. Zhang Y, et al. (2015) CXCL4 mediates tumor regrowth after chemotherapy by suppression of antitumor immunity. *Cancer Biol Ther* 16(12):1775–1783.

47. Oshima M, et al. (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87(5):803–809.

48. Barker N, et al. (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457(7229):608–611.

49. Shih IM, et al. (2001) Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *ProcNatlAcadSciUSA* 98(5):2640–2645.

50. De Sousa E Melo F, et al. (2013) Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 19(5):614–618.

51. Matsuda M, et al. (2010) Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. *Pathol Int* 60(10):673–680.

52. Sentani K, et al. (2013) Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: a characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion. *Histopathology* 62(7):1018–1027.

53. Kim JH, et al. (2015) Gastric-type expression signature in serrated pathway-associated colorectal tumors. *Hum Pathol* 46(5):643–656.

54. Becht E, et al. (2016) Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 22(16):4057–4066.

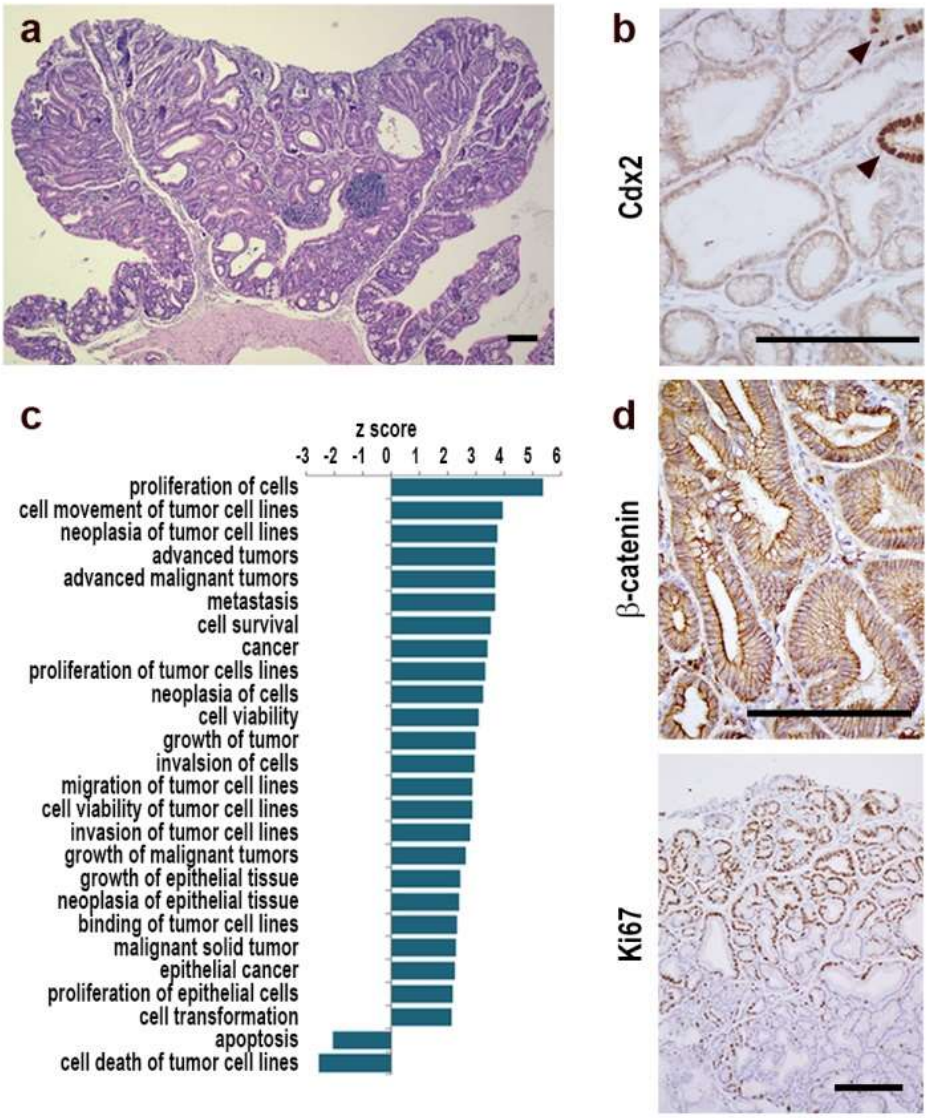

Figure 1

Caecal lesion induced by the loss of function of Cdx2 in the adult gut epithelium

a. Histology of a caecal lesion in an AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mouse 4 months after βNF+Tam administration.

b. Immunodetection of Cdx2 in the lesions. The Cx2 protein is absent, except for few glands with intact Cdx2, entrapped in the lesions (arrowheads). Bars are 100 µm.

c. Gene Ontology enrichment analysis for terms related to cancer in the transcriptome of caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to the caecum of wild type mice.

d. Immunodetection of β-catenin and Ki67 in the lesions. Bars are 100 µm.

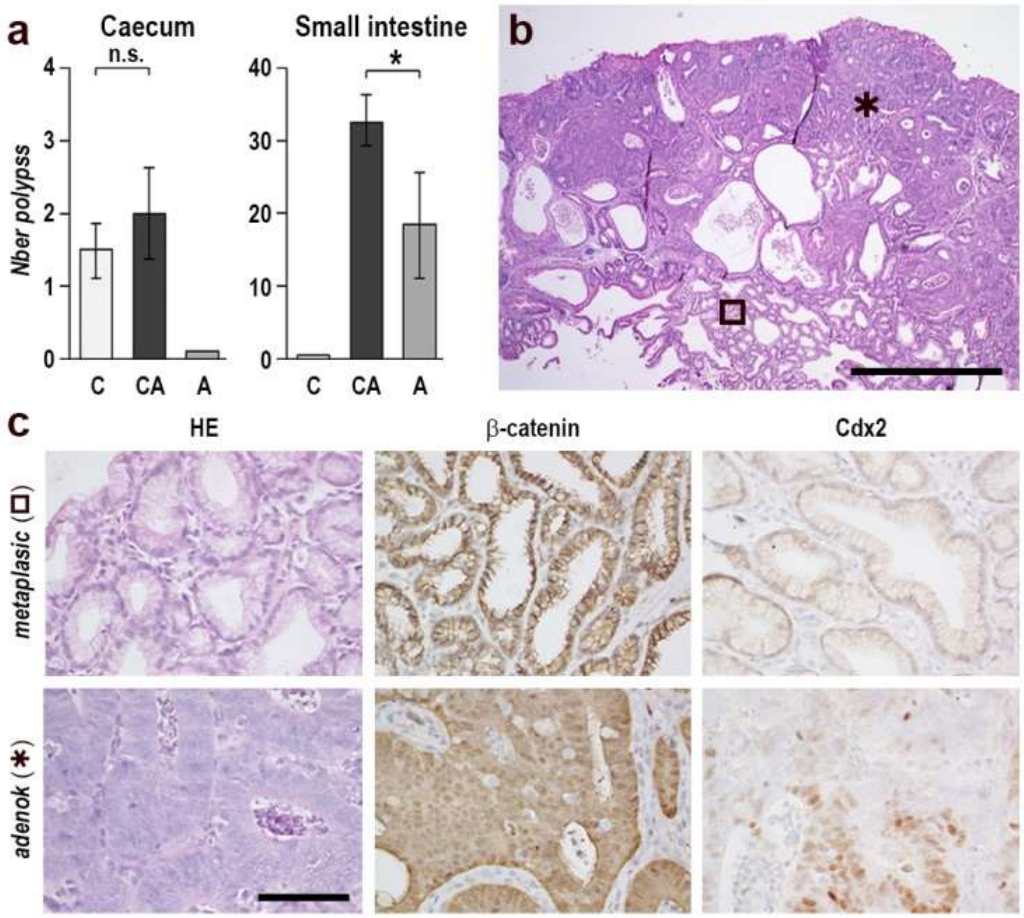

Figure 2

Mixed tumor developing by loss of function of Cdx2 combined with Apc heterozygosity

a. Number of macroscopic abnormalities (polyps) in the caecum and small intestine of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ (C), Apc$^{+/\Delta 14}$::AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ (CA) and Apc$^{+/\Delta 14}$ (A) mice. N=10 mice in each group; n.s., not significant; *, p=0.02 (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

b. Histology of a caecal mixed tumor in an Apc$^{+/\Delta 14}$::AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mouse illustrating the juxtaposition of metaplasic (open square) and adenocarcinomatous (asterisk) areas. Bar is 500 µm.

c. Immunostaining of β-catenin and Cdx2 in the metaplasic and adenocarcinomatous areas in a mixed tumor. Bar is 50 µm.

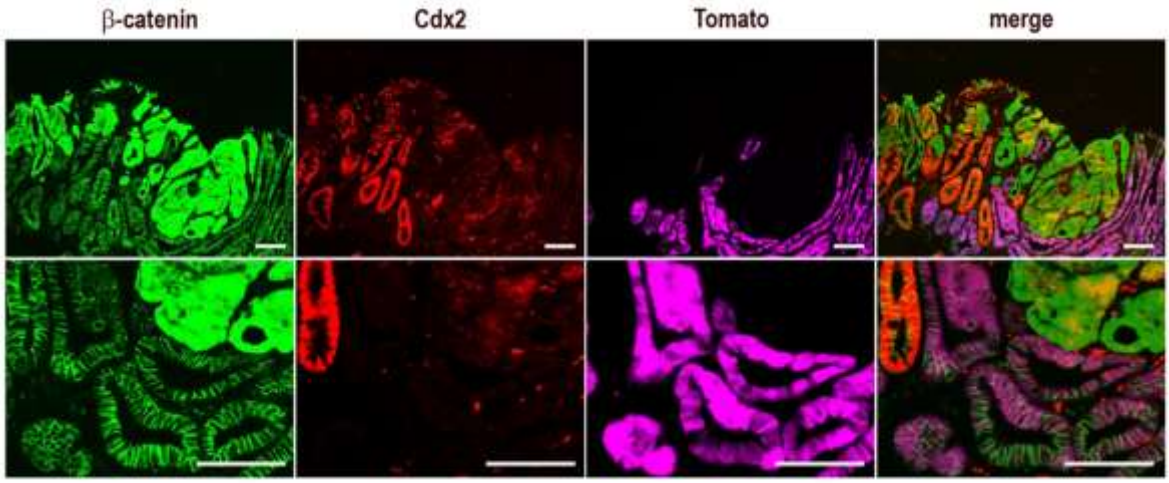

Figure 3

Tracing of Cdx2-depeted cells in mixed tumors

Co-detection of β-catenin, Cdx2 and Tomato proteins in a small intestinal mixed tumor of an $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ mouse. Tomato was detected by direct fluorescence emission, and β-catenin and Cdx2 by indirect immunofluorescence. The bottom panel corresponds to a higher magnification of the upper one. Bars are 100 µm.

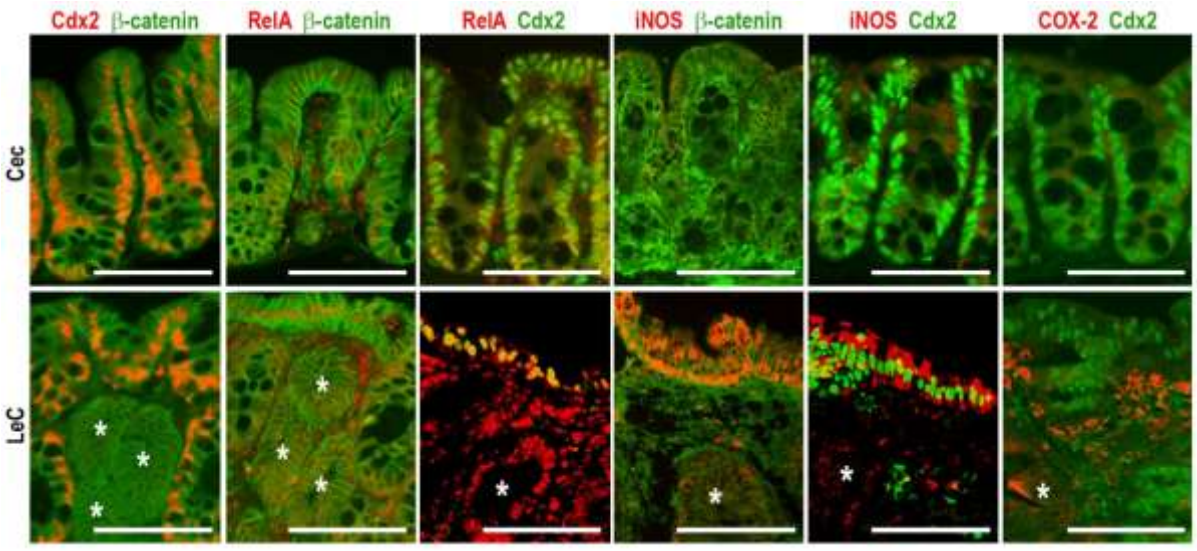

Figure 4

NFκB activation and its downtsream targets iNOS and COX-2 in the caecal lesions of $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice

Co-immunodetection of the indicated proteins, namely Cdx2 and β-catenin, RelA (NFκB) and β-catenin, iNOS and β-catenin, RelA and Cdx2, iNos and Cdx2, and COX-2 and Cdx2, in the normal caecum (Cec) and in the caecal lesion of an $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ (LeC) mouse. Asterisks point to Cdx2-depleted glands. Bars are 100 µm.

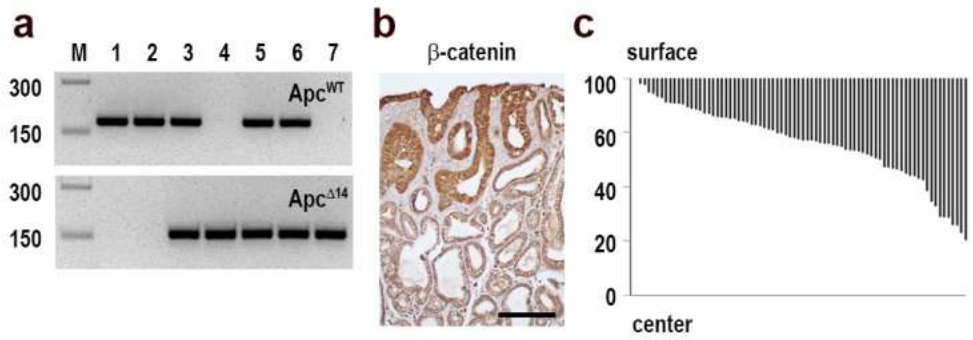

Figure 5

Top-down progressions of the adenocarcinomatous structures in the mixed tumors

a. Genotyping of microdissected glands for the Apc^{WT} (upper panel) and $Apc^{\Delta 14}$ alleles (lower panel) : (1) normal caecal gland and (2) Cdx2-depleted metaplasic gland in the LeC of an $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mouse; (3) normal epithelium and (4) adenocarcinomatous gland of an $Apc^{+/\Delta 14}$ mouse; (5) normal caecal gland, (6) metaplasic gland and (7) adenocarcinomatous gland in the mixed tumor of an $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mouse.

b. Localization of the adenocarcinomatous glands in a mixed tumor by β-catenin immunostaining, showing cytoplasmic / nuclear accumulation in the adenocarcinomatous glands connected to the surface epithelium, but membranous localization in the deeper metaplasic glands. Bar is 100 µm.

c. Schematic representation of the localization of adenocarcinomatous glands: each bar represents the localization of an adenocarcinomatous structure along the surface-center axis of mixed tumors of $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$ mice. Results are expressed as percentage of the height of the tumors.

SUPPORTING INFORMATION

SI Material and Methods

Mice genotyping

$Cdx2^{f/f}$ (1), $Apc^{+/\Delta 14}$ (2) and $AhCre^{ERT}$ (3) mice have been described. $RosaCAG^{tdTomato}$ mice (strain Ai9) were provided by the Jackson Laboratory. Mice were genotyped by PCR amplification of tail DNA (Viagene, DirectPCR Lysis Reagent mouse tail, Euromedex, Strasbourg, France) using the following primers: $Cdx2^{wt}$ and $Cdx2^{f}$ alleles TGGGGCAATCTTAATGGGTA / TGTAGCCTCGACTTGGCTTT; Apc^{wt} allele: CTGTTCTGCAGTATGTTATCA / CTATGAGTCAACACAGGATTA. $Apc^{\Delta 14}$ allele: CTGTTCTGCAGTATGTTATCA / TATAAGGGCTAACAGTCAATA; $AhCre^{ERT}$ allele: GCCTGGTCTGGACACAGTCC / GGTTCAGCATCCAACAAGGC; $RosaCAG^{tdTomato}$ allele CTGTTCCTGTACGGCATGG / GGCATTAAAGCAGCGTATCC; $Rosa^{wt}$ allele: AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA / CCGAAAATCTGTGGGAAGTC. Mice aged 3 months were given a combined intraperitoneal injection of 1.6 mg tamoxifen (TAM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 1.6 mg β-Naphthoflavone (βNF, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in corn oil, once daily for 4 days. They were euthanized by cervical dislocation at the indicated time after βNF+Tam administration.

RNA extraction and analysis by RNAseq

Tissue samples were homogenized (Polytron, Kinematica GmbH, Eschbach, Germany) and RNA was extracted with Tri Reagent (Euromedex, Strasbourg, France). Integrity of the total RNA samples was checked on nano RNA chips run on a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). 1µg of total RNA was used for each sample for the construction of the mRNAseq libraries with Illumina's TruSeq RNA sample kit following manufacturer's instructions (Illumina, Eindhoven, The Netherlands). Briefly, the mRNA fraction was extracted by two rounds of poly(A) RNA selection using poly-dT coated magnetic beads, followed by fragmentation and first strand cDNA synthesis with Superscript II (ThermoFisher Scientific, Schwerte, Germany) using random hexamer primers. The cDNA fragments were subjected to end-repair and dA-tailing, ligated to indexed bar-coded adapters and subjected to 12 cycles of PCR. Concentration and validation of the libraries were made with a DNA1000 chips loaded on a Bioanalyser 2100. Paired end 50 bp reads were obtained

with a HiSeq1000 by multiplexing three libraries on one lane. Demultiplexing and generation of raw fastq files were performed with CASAVA v1.7. Mapping against the reference mouse genome GRCm38 was performed with tophat 2 (4) using the options --b2-sensitive -a 5 -p 5 --library-type fr-unstranded -r 180 –mate-std-dev 80 and exon-exon reference from Ensembl v75. Quantification of the reads was performed with HTSeq version 0.5.3p3 (5) with the options --stranded=no --mode=union and using the reference gene annotation from Ensembl v75. Normalization and differential expression analysis was made with DESeq2 (6). To increase the power of the differential expression analysis, the variance stabilized data obtained from DESeq2 were submitted to a principal component analysis and the two best biological replicates selected for each genotype. Unless otherwise stated, genes with a log2(Fold Change [FC]) >=1 and adjusted p-value (q-value) less than 0.01 were considered as differentially expressed. Data analysis was performed using Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Les Ulis, France).

Histology and immunohistology

Tissue samples were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5µm) were treated for antigen retrieval 10 minutes in 10 mmol/L sodium citrate, pH 6 in a microwave oven when indicated, and blocked in 5% Normal Goat Serum-0.1% Triton–phosphate buffered saline 1 hour at room temperature. Slides were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in 0.1% Triton–phosphate buffered saline and then washed 3 times in this saline buffer. Primary antibodies are listed in the Table S4. Antibodies produced against Cdx1 and against Tff1 and Tff2 have previously been described (7, 8). For immunohistochemical detection, secondary biotynylated anti-mouse, anti-rabbit, anti-rat or anti-goat immunoglobulins (Vector Laboratories, Burlingame, CA, dilution 1:250 in 0.1% Triton–phosphate buffered saline) were added for 1 hour at room temperature. After 3 washes in this buffer, immunostaining was developed with the kit VectaStain ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as recommended by the supplier. Immunofluorescence detection was performed by incubating the slides 1 hour at room temperature with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies labelled with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568 (dilution 1:1000 in 0.1% Triton–phosphate buffered saline), washed 3 times in this buffered, stained with 4’-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and mounted in FluorSave Reagent (Millipore- Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For the combined detection of Tomato, β-catenin and Cdx2 proteins, tissue sections were deparaffinized, covered with 0.1% Triton–phosphate buffered saline and a direct fluorescence

picture of the distribution of Tomato protein was taken; then sections were treated for antigen retrieval and processed for immunofluorescence staining and visualization of Cdx2 and β-catenin.

Tissue microdissection for genomic PCR analysis

Sections of 10 µm of tissue fixed in 4% Paraformaldehyde and embedded in paraffin were sliced on FrameSlides PET Membrane slides (Leica). They were treated by Harris staining to reveal the histology. Adjacent sections were immunostained for β-catenin and Cdx2, as described above, to ascertain the identity of normal, metaplasic and adenocarcinomatous glands. Areas of approximatively one hundred cells were selected and microdissected using a Leica LMD 6000 laser microscope (Leica Microsystems SAS, Wetzlar, Germany). Genomic DNA was extracted from the microdissected glands using QIAamp DNA FFPE Tissue kit according to the recommendations of the manufacturer (Qiagen, Les Ulis, France). Allelic identification of the Apc^{wt} and $Apc^{\Delta 14}$ alleles in the microdissected material was performed by PCR using the primers indicated above, for 45 cycles, each cycle being 30 sec at 95°C, 45 sec at 39°C and 45 sec at 72°C.

SI Figures and Tables

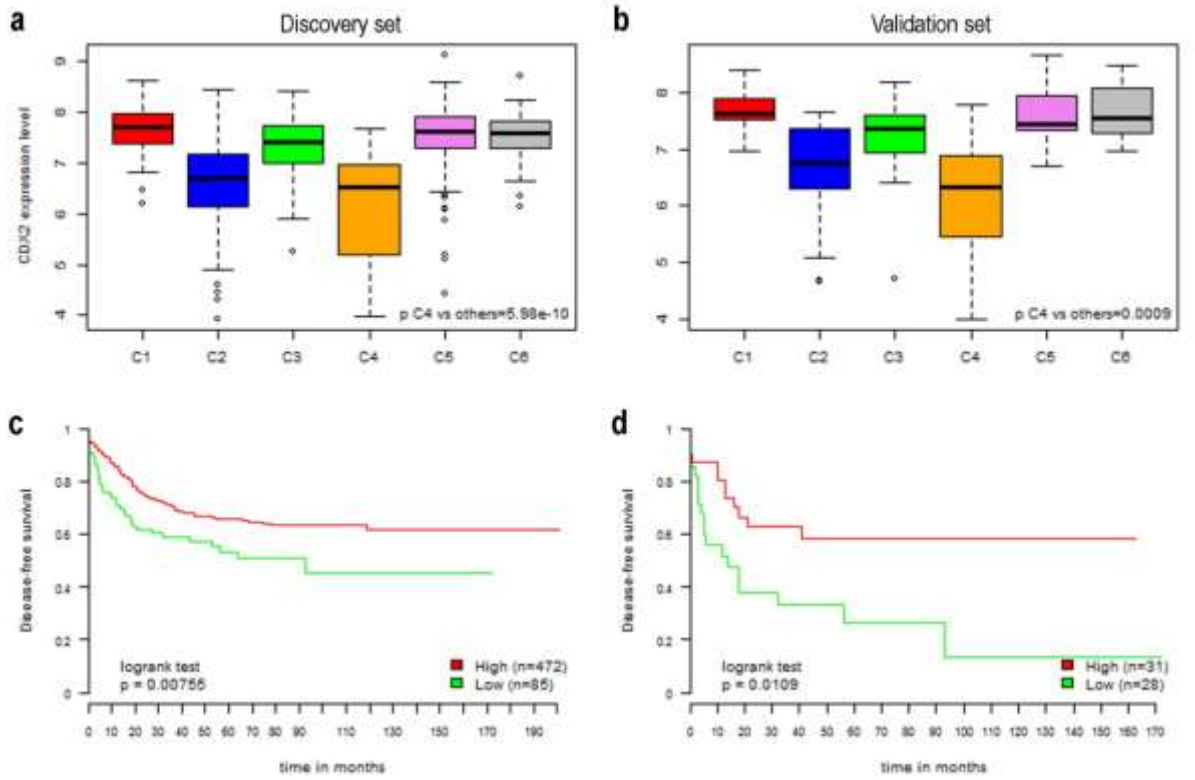

Figure S1

CDX2 gene expression level in 566 human colon cancers of the GSE39582 dataset

a. Boxplot comparing the CDX2 expression level in the 443 samples of the discovery set organized in 6 subtypes. The CDX2 level in the C4 subtype is significantly lower than in the other subtypes (p=5.98E-10).

b. Boxplot comparing the CDX2 expression level in the 123 samples of the validation set organized in 6 subtypes. The CDX2 level in the C4 subtype is significantly lower than in the other subtypes (p=0.0009).

c. Disease-free survival comparing CDX2high versus CDX2low colon cancers in the GSE39582 dataset. The cutoff for low versus high Cdx2 expression is fixed at the median of the C4 group. CDX2low patients exhibit a significantly reduced disease free survival (p=0.00755).

d. Disease-free survival comparing CDX2high versus CDX2low colon cancers in the C4 subtype. CDX2low patients exhibit a significantly reduced disease free survival (p=0.0109). The cutoff for low versus high Cdx2 expression is fixed at the median of the C4 group.

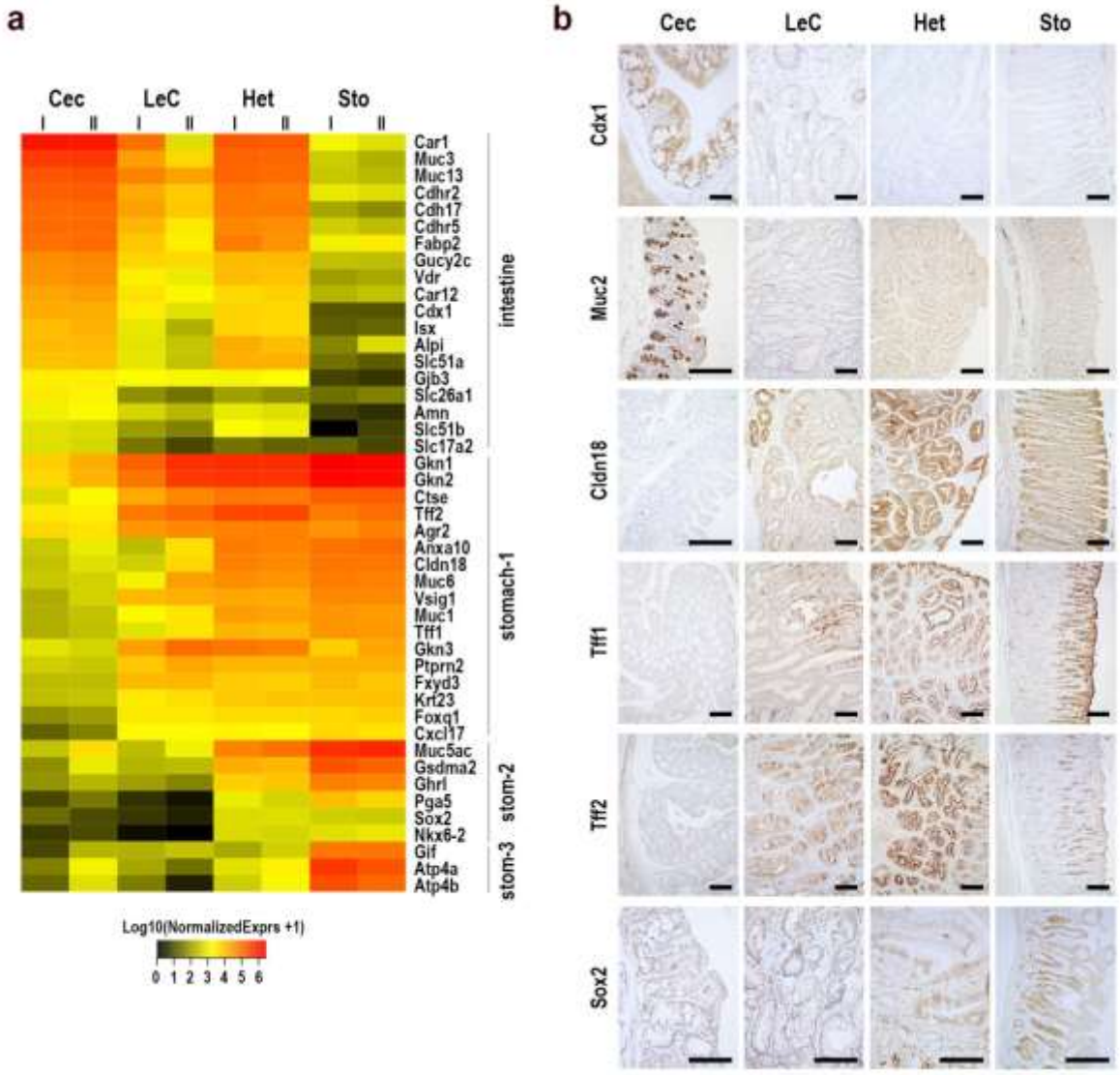

Figure S2

Gastric-type transformation of the caecal lesions

a. Heatmap comparison of transcriptomic data for intestinal and gastric genes in the caecum of wild type mice (Cec), in caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice (LeC), in caecal heteroplasia of Cdx2$^{+/-}$ mice (Het) and in the stomach of wild type mice (Sto). Stomach-1 represents gastric genes upregulated in both LeC and Het compared to Cec; Stom-2 represents gastric genes upregulated in Het but not in LeC; Stom-3 represents gastric genes neither upregulated in LeC nor in Het.

b. Immunodetection of intestinal proteins (Cdx1, Muc2) and gastric proteins (Cldn18, Tff1, Tff2, Sox2) in the caecum of wild type mice (Cec), in caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice (LeC), in caecal heteroplasia of Cdx2$^{+/-}$ mice (Het) and in the stomach of wild type mice (Sto). Bars are 100 µm.

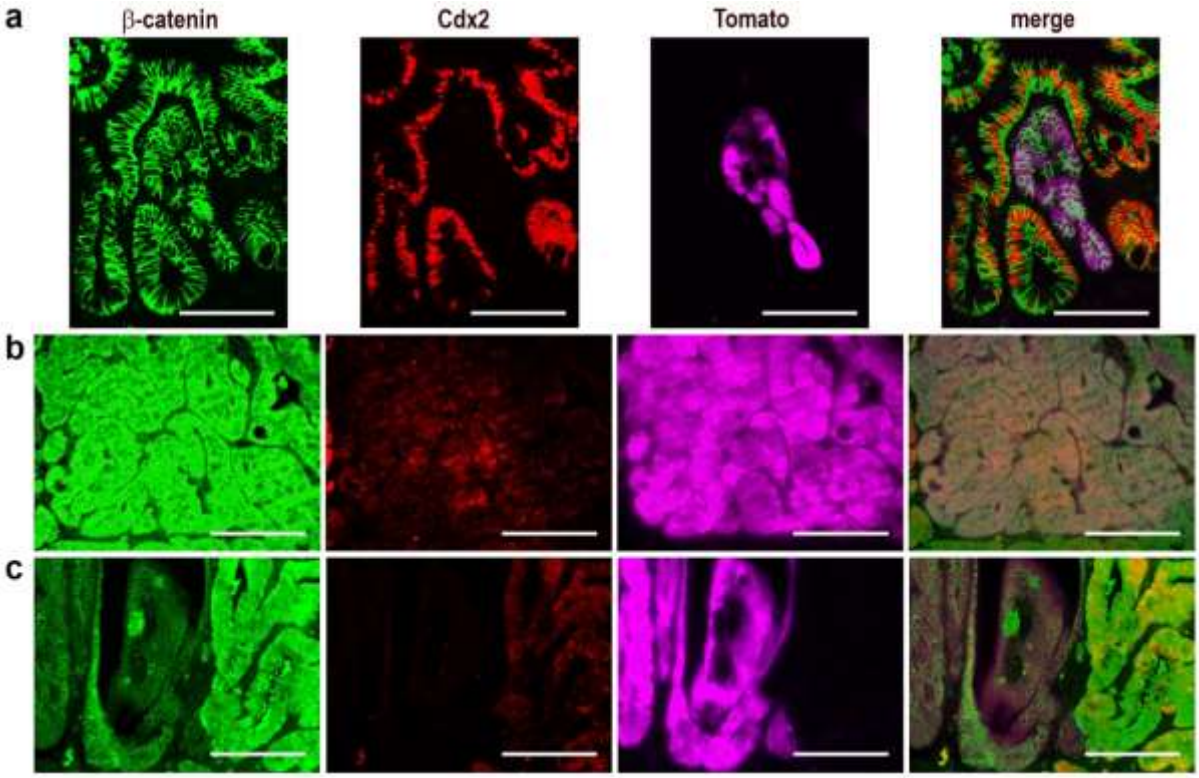

Figure S3

Validation of the cell tracing approach

a. Co-detection of β-catenin, Cdx2 and Tomato proteins in the small intestine of an $AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ mouse.

b. Idem in the small intestinal adenocarcinoma of an $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ mouse.

c. Idem in the caecal mixed tumor of an $Apc^{+/\Delta 14}$::$AhCre^{ERT}$::$Cdx2^{f/f}$::$RosaCAG^{tdTomato}$ mouse.

Tomato was detected by direct florescence emission, and β-catenin and Cdx2 by indirect immunofluorescence. Bars are 100 µm.

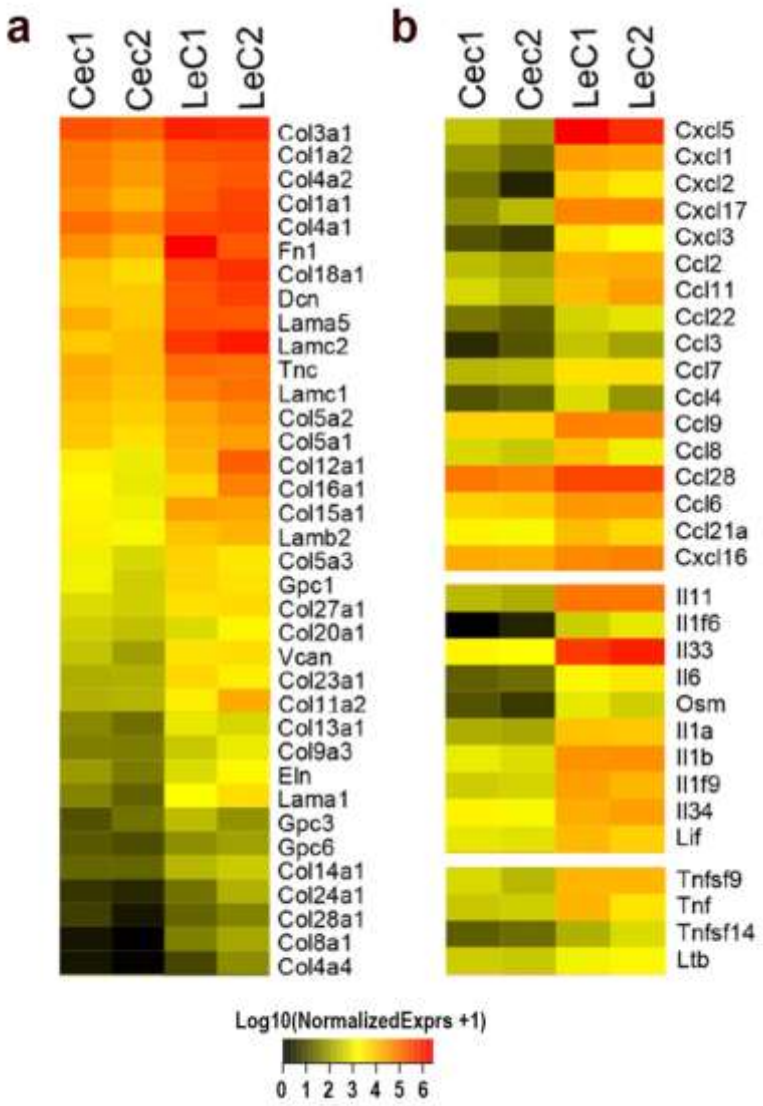

Figure S4

Extracellular matrix molecules and cytokines in the caecal lesions

a. Heatmap comparison of transcriptomic data for ECM genes in the caecum of wild type mice (Cec) and in caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice (LeC).

b. Same for the transcripts of cytokines.

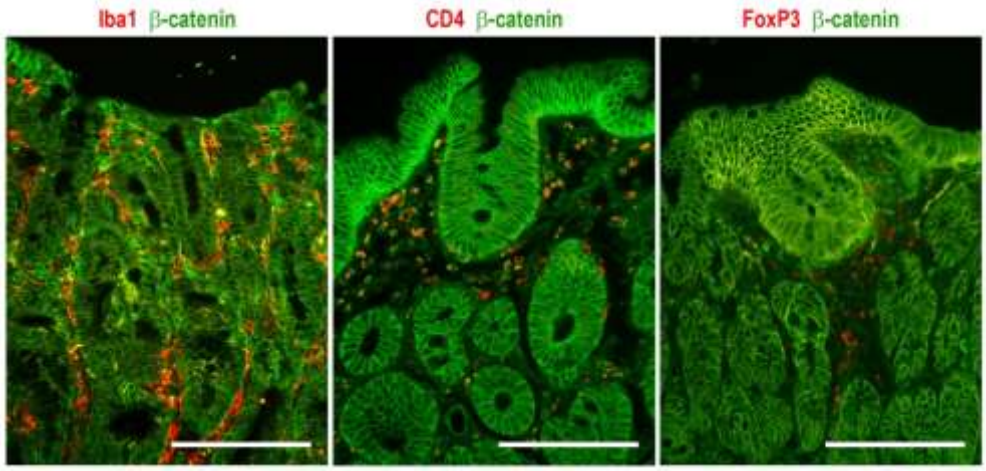

Figure S5

Infiltrating cells in the stroma of caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice

Co-immunodetection of β-catenin and Iba1 (macrophages), CD4 (T helper lymphocytes) or FoxP3 (T regulatory lymphocytes) in the caecal lesion of an AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mouse. Bars are 100 µm.

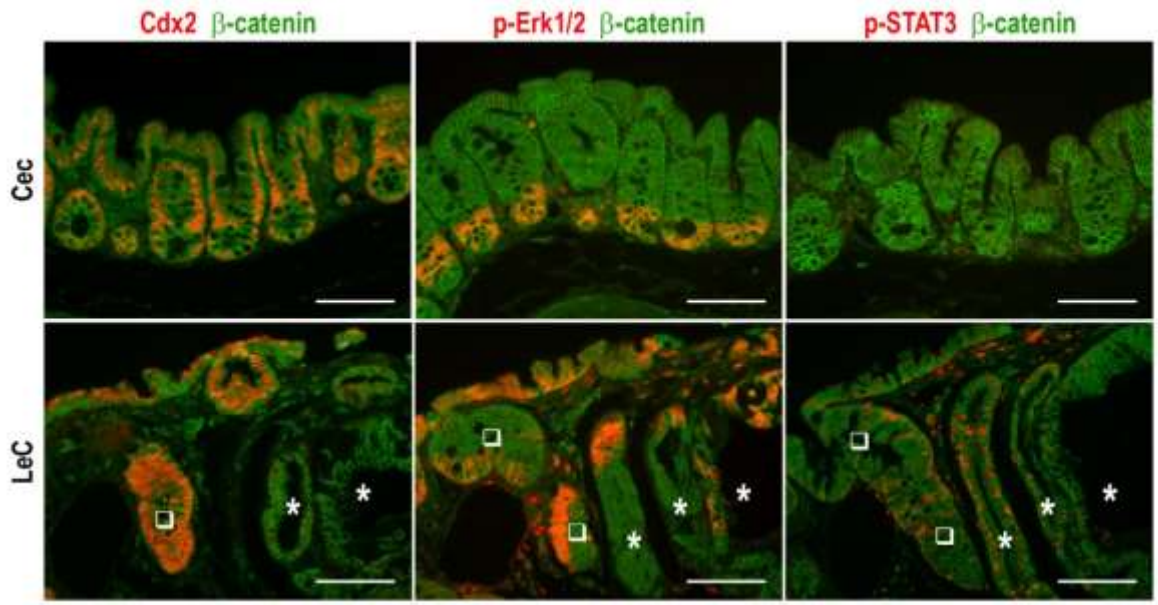

Figure S6

Erk1/2 and STAT3 activation in caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice

Co-immunodetection of β-catenin and either Cdx2, phospho-Erk1/2 or phospho-STAT3 in the normal caecum (Cec) and in the caecal lesion of an AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mouse (LeC). The asterisks and the squares respectively show Cdx2-depleted and Cdx2-intact glands. Bars are 100 µm.

Table S1

List of genes differentially expressed by RNA-seq in the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice (LeC) compared to the caecum of wild type mice (Cec); Fold change (FC)>2; q<0.01.

Table S2

Selection of genes differentially expressed by RNA-seq:

> sheet 1: intestinal vs gastric genes in the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to normal caecum (LeC vs Cec), in the in the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to normal stomach (LeC vs Sto), in the caecal heteroplasia of Cdx2$^{+/-}$ mice compared to normal caecum (Het vs Cec), and in the caecal heteroplasia of Cdx2$^{+/-}$ mice compared to normal stomach (Het vs Sto)

> sheet 2: genes of the stem cell signature, according to Munoz et al (9), differentially expressed in the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to normal caecum (LeC vs Cec)

> sheet 3: genes encoding extracellular matrix proteins, in the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to normal caecum (LeC vs Cec)

> sheet 4: genes encoding cytokines, in the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to normal caecum (LeC vs Cec)

> sheet 5: genes of the IL11 vs IL6 signature, according to Putoczky et al (10), in the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to normal caecum (LeC vs Cec).

Fold change (FC)>2; q<0.01.

Table S3

List of genes differentially expressed by RNA-seq:

(1) in the mixed tumors of Apc$^{+/\square 14}$::AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to the caecal lesions of AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice (MT vs LeC),

(2) in the mixed tumors of Apc$^{+/\Delta 14}$::AhCre^{ERT}::Cdx2$^{f/f}$ mice compared to the adenocarcinomas of Apc$^{+/\Delta 14}$ mice (MT vs Adk).

Fold change (FC)>2; q<0.05.

Table S4

List of primary antibodies used for this study.

References

1. Stringer EJ, et al. (2012) Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Dev Camb Engl* 139(3):465–474.

2. Colnot S, et al. (2004) Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 84(12):1619–1630.

3. Ireland H, et al. (2004) Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* 126(5):1236–1246.

4. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinforma Oxf Engl* 25(9):1105–1111.

5. Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl* 31(2):166–169.

6. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15(12):550.

7. Bonhomme C, et al. (2003) The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 52(10):1465–1471.

8. Karam SM, Tomasetto C, Rio M-C (2004) Trefoil factor 1 is required for the commitment programme of mouse oxyntic epithelial progenitors. *Gut* 53(10):1408–1415.

9. Muñoz J, et al. (2012) The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers. *EMBO J* 31(14):3079–3091.

10. Putoczki TL, et al. (2013) Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell* 24(2):257–271.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

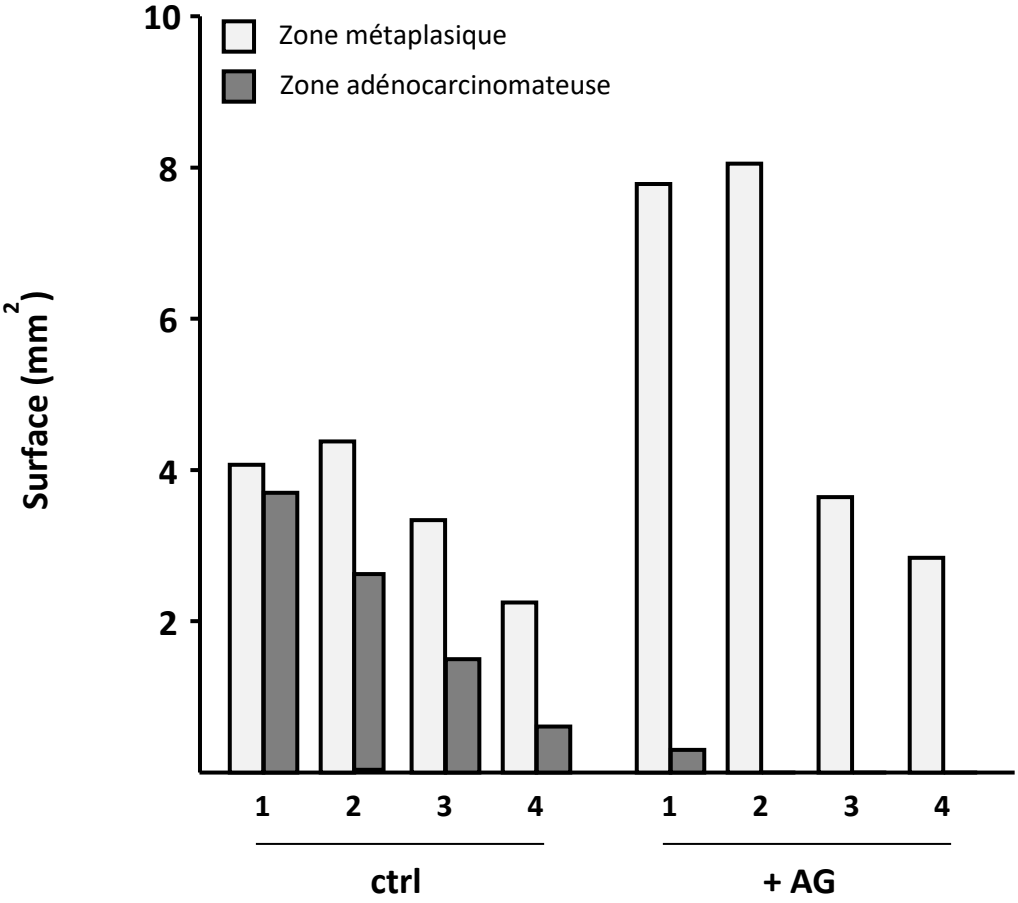

Figure 29: Effet d'un inhibiteur de iNos sur le développement des tumeurs mixtes du caecum.

Les souris Cdx2$^{f/f}$//AhCre^{ERT}//Apc$^{+/\Delta 14}$ ont été traitées 15 jours après l'invalidation de Cdx2 avec 2g/L d'aminoguanidine (+AG), un inhibiteur de iNos, administré dans l'eau de boisson. Les surfaces des zones métaplasiques et adénocarcinomateuses de 4 tumeurs mixtes du caecum ont été mesurées après 10 à 12 semaines de traitement et comparées à celles des souris Cdx2$^{f/f}$//AhCre^{ERT}//Apc$^{+/\Delta 14}$ invalidées pour Cdx2 non traitées avec de l'AG (ctrl).

Afin de démontrer formellement l'implication de iNos dans le développement des zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes, des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ ont été traitées 15 jours après l'invalidation de Cdx2 avec un inhibiteur de iNos. Après 10 à 12 semaines de traitement, 4 lésions au niveau du caecum ont été analysées. Celles-ci sont globalement de plus petite taille que les tumeurs mixtes des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ invalidées pour Cdx2. De plus, 3 des 4 lésions caecales des souris traitées avec l'inhibiteur de iNos ne présentent aucune zone adénocarcinomateuse, contrairement aux souris non traitées qui développent systématiquement des tumeurs mixtes. La 4ème lésion présente un phénotype mixte dont la taille de la zone adécarcinomateuse est significativement réduite en comparaison à celle des souris non traitées **(Figure 29).**

Ces observations démontrent formellement l'implication de iNos dans l'émergence et le développement des zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ invalidées pour Cdx2.

DISCUSSION / PERSPECTIVES

Chez l'adulte, le gène homéotique Cdx2 est spécifiquement exprimé dans l'épithélium intestinal en constant renouvellement, dont il maintient l'identité et contrôle l'homéostasie. Des études antérieures menées au laboratoire ont par ailleurs montré que la réduction constitutive de l'expression de Cdx2 chez les souris $Cdx2^{+/-}$ sensibilise ces animaux à la cancérogénèse colorectale chimio-induite tandis que le rétablissement de son expression dans une lignée de cellules cancéreuses coliques humaines réduit les capacités de migration cellulaire et de dissémination métastatique (Bonhomme et al., 2003; Gross et al., 2008). Ces résultats suggéraient que Cdx2 exerce une fonction suppresseur de tumeurs et de métastases dans l'intestin. Cependant, ce modèle murin est imparfait car la réduction d'expression de Cdx2 dès le stade embryonnaire ne récapitule pas la situation des cancers colorectaux (CCR) chez l'homme où l'expression de Cdx2 est normale jusqu'à l'émergence du tissu tumoral. De plus, ce modèle d'haplo-insuffisance génétique couplé à une induction de la cancérogenèse par un agent chimique cancérogène ne permet pas de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels la réduction de l'expression de Cdx2 facilite le développement tumoral. Dans ce contexte, mon travail de thèse visait à établir les conséquences pathologiques de la perte de fonction de Cdx2 dans l'intestin adulte.

I. Cdx2, un gène à fonction suppresseur de tumeurs dans l'intestin

En utilisant le modèle murin $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ d'invalidation mosaïque inductible de Cdx2, nos résultats montrent que la perte d'expression locale de Cdx2 induit à long terme le développement de métaplasies de type gastrique dans la région péri-caecale de l'intestin qui n'évoluent pas spontanément en cancer. Ceci indique que Cdx2 n'est pas un gène suppresseur de tumeurs tel que défini au sens génétique du terme, en ce sens que l'invalidation bi-allélique de ce gène n'est pas suffisante pour initier le processus tumoral. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/). Lorsqu'elles sont placées dans un contexte génétique de prédisposition à la cancérogénèse intestinale $Apc^{+/\Delta 14}$, ces lésions caecales présentent cependant un phénotype mixte, caractérisé par la présence de zones adénocarcinomateuses situées à proximité immédiate des zones métaplasiques de type gastrique. Les souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ développent par ailleurs des tumeurs de l'intestin grêle en plus grand nombre que les souris $Apc^{+/\Delta 14}$ présentant de surcroît un phénotype mixte similaire à celui des tumeurs du caecum. Ces résultats indiquent que la perte de fonction de Cdx2 facilite la cancérogénèse intestinale et démontrent formellement la fonction suppresseur de tumeurs exercée par Cdx2 dans l'intestin.

II. Cdx2 exerce sa fonction suppresseur de tumeurs de façon « cellule non-autonome » en modifiant le microenvironnement inflammatoire

A. Effet suppresseur de tumeurs cellule-non-autonome de Cdx2

Deux hypothèses pouvaient être formulées quant à l'origine des zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes du caecum et de l'intestin grêle des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$: ces aires néoplasiques pouvaient résulter de l'évolution maligne des cellules métaplasiques invalidées pour Cdx2 et sensibilisées à la cancérogénèse Apc, ou alternativement de la transformation maligne de cellules adjacentes intactes pour Cdx2 par perte du deuxième allèle Apc. Par une approche génétique originale de suivi des cellules invalidées pour Cdx2 couplée à des analyses immunohistologiques, nos résultats montrent que les zones métaplasiques et les zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes ont une origine cellulaire différente: alors que les premières dérivent de cellules invalidées pour Cdx2, les secondes dérivent de cellules intactes pour Cdx2. Ces résultats mettent en avant une fonction nouvelle et originale de Cdx2 : son rôle suppresseur de tumeurs « cellule-non autonome » dans l'intestin.

Il est aujourd'hui bien établi que le développement tumoral ne résulte pas uniquement de dysrégulations cellulaires autonomes mais repose également sur des interactions cellulaires au sein même de la tumeur primaire (Tabassum and Polyak, 2015). Une étude récente a ainsi montré à partir d'un modèle de xénogreffe de cellules cancéreuses mammaires que seuls quelques clones cellulaires soutiennent la croissance tumorale et l'expansion clonale des autres clones de la tumeur (Marusyk et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré que l'activité suppresseur de tumeurs des gènes p53 et PTEN est en partie relayée par des mécanismes « cellule non-autonome ». La protéine p53 stimule ainsi l'élimination des cellules sénéscentes par les macrophages M1 en induisant l'expression et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (Lujambio et al., 2013). A l'inverse, la protéine PTEN exerce sa fonction suppresseur de tumeurs « cellule non-autonome » par un mécanisme paracrine reposant sur la sécrétion de ce facteur qui agit alors sur une cellule du voisinage afin d'inhiber la prolifération cellulaire par le biais de l'inhibition de la voie PI3K-Akt (Hopkins et al., 2013; Putz et al., 2012).

En marge de son activité suppresseur de tumeurs « cellule non-autonome », des travaux antérieurs du laboratoire suggèrent que l'activité suppresseur de tumeurs de Cdx2 repose également sur des mécanismes « cellule autonome ». Ainsi, Cdx2 inhibe la réparation non

fidèle pro-mutagène de type NHEJ de l'ADN en interagissant avec le complexe Ku70/80 (Renouf et al., 2012) et avec le facteur de transcription homéotique HoxB7 (Soret et al., 2016) dans les cellules intestinales. En outre, Cdx2 stimule l'expression de gènes anti-prolifératifs tels que $p21^{Waf1/Cip1}$ (Bai et al., 2003) et inhibe la voie Wnt pro-oncogénique en stimulant par exemple l'expression de Mucdhl, une protocadhérine atypique inhibitrice de la voie Wnt (Hinkel et al., 2012) et en interagissant avec la β-caténine afin d'inhiber l'expression des gènes cibles de cette voie (Guo et al., 2010). Ces observations, couplées à nos résultats, démontrent l'étendue des mécanismes relayant l'activité suppresseur de tumeurs de Cdx2, laquelle repose sur des mécanismes cellule autonome et cellule non-autonome faisant appel aux activités transcriptionnelles et non-transcriptionnelles de Cdx2.

B. Impact du microenvironnement

Nos résultats montrent que la fonction suppresseur de tumeurs cellule non-autonome de Cdx2 est indirecte et relayée par le microenvironnement. Ainsi, la perte de fonction de Cdx2 modifie le microenvironnement stromal, illustré par l'augmentation de l'expression de plusieurs composants de la matrice-extra-cellulaire dans les lésions, et inflammatoire. En particulier, les modifications du microenvironnement inflammatoire conduisent à l'activation de la voie de signalisation NF-κB et à l'induction de iNos dans les cellules de l'épithélium de surface exprimant Cdx2 à l'origine du développement tumoral.

L'inflammation relayée par la voie de signalisation NF-κB est très largement impliquée dans la tumorigénèse colorectale (Hoesel and Schmid, 2013; Wang et al., 2009). L'activation de cette voie conduit en effet à l'expression d'enzymes telles que iNos et COX-2 dont l'activité stimule la croissance tumorale et l'angiogénèse et inhibe l'apoptose par le biais de la production d'oxyde nitrique et de prostaglandines, respectivement (Janakiram and Rao, 2014; Kostourou et al., 2011). En outre, la voie NF-κB stimule l'expression de gènes anti-apoptotiques (IAP) ou impliqués dans l'angiogénèse (VEGF et VEGFR) et l'invasion (MMPs). Enfin, l'activation de cette voie induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, dont l'expression est augmentée dans les lésions caecales des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ et dont l'implication dans la cancérogénèse colorectale a été clairement démontrée (Waldner et al., 2012). Les principaux facteurs susceptibles d'activer la voie NF-κB sont les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF-α, principalement produites par les macrophages, par ailleurs fortement concentrés sous l'épithélium de surface des lésions des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$, et le LPS, un composant majeur de la paroi des bactéries Gram négatif.

A cet égard, les zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ se développent à partir de l'épithélium de surface des lésions, soit au contact du microbiote de la lumière intestinale. De nombreuses espèces bactériennes du microbiote, dont quelques exemples ont été décrits en introduction (p.77), peuvent être impliquées dans la cancérogénèse colorectale en induisant une réponse pro-inflammatoire ou immunosuppressive. En particulier, certaines espèces telles que Fusobacterium nucleatum (Kostic et al., 2013; Zhang and Rudney, 2011), enteropathogenic Escherichia coli (Savkovic et al., 1997), et Bacteroides fragilis (Kim et al., 2006c) sont susceptibles d'activer la voie de signalisation NF-κB. De la même manière, l'espèce commensale Bacteroide fragilis induit l'activation des LTreg à fonction immunosuppressive (Kamada and Núñez, 2014), lesquels sont retrouvés en quantité importante sous l'épithélium de surface des lésions des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$.

En outre, des travaux menés au laboratoire ont montré que l'épithélium intestinal des souris hétérozygotes $Cdx2^{+/-}$ traitées au DSS est plus perméable que celui des souris sauvages (Calon et al., 2007), ce qui indique qu'une réduction de l'expression de Cdx2 altère la barrière intestinale. Au regard de ce résultat, il est raisonnable de penser que la perte d'expression locale de Cdx2 dans le modèle murin $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$ augmente la perméabilité de l'épithélium intestinal au niveau des lésions caecales, qui devient alors permissif au passage de composés microbiens, voire de micro-organismes entiers susceptibles de stimuler la réponse inflammatoire afin de promovoir la tumorigénèse intestinale.

Il apparaît ainsi que le développement des zones adénocarcinomateuses dans les tumeurs mixtes des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ repose sur des interactions complexes entre plusieurs composantes du microenvironnement tumoral, en particulier inflammatoire et stromal, mais également très vraisemblablement microbien, consécutivement à la perte d'expression de Cdx2.

III. Un modèle murin qui supporte le modèle de tumorigénèse intestinale top/down

Pendant longtemps, deux modèles d'émergence des CCR ont été proposés : le modèle « top-down » propose que les altérations génétiques se produisent dans la partie supérieure des cryptes intestinales ou au niveau des cellules différenciées des villosités puis que le développement de la tumeur se propage vers le fond de la crypte (Shih et al., 2001). A

l'inverse, le modèle « bottom-up » propose que le développement tumoral est initié dans les cellules souches du fond des cryptes puis s'étend vers le sommet des villosités (Preston et al., 2003). Les arguments en faveur de chacun de ces deux modèles ont été exposés en introduction (p.68/69).

Par des analyses histologiques et immunohistologiques, nous avons montré que les zones adénocarcinomateuses des tumeurs mixtes des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ se développent à partir de l'épithélium de surface des lésions, soutenant le modèle de cancérogénèse « top-down ».

Au cours de ces 5 dernières années, il a été montré que les cellules souches de réserve $Bmi1^{+}$, les progéniteurs LRC des cellules de Paneth, ainsi que les progéniteurs des lignages absorbant $Alpi^{+}$ et sécréteur $Dll1^{+}$ sont capables de régénérer la population des cellules CBC (Buczacki et al., 2013; van Es et al., 2012a; Tetteh et al., 2016; Tian et al., 2011). Ceci témoigne de la très grande plasticité cellulaire de l'épithélium intestinal qui pourrait être le moteur du modèle de cancérogénèse « top-down ». En effet, une étude récente a montré que l'activation conjointe des voies de signalisationWnt et NF-κB induit un développement tumoral à partir de cellules différenciées des villosités qui réacquièrent un phénotype de cellules souches, caractérisé par l'expression de certains marqueurs des cellules CBC tels que Lgr5, Ascl-2 et Rnf43 (Schwitalla et al., 2013).

De façon intéressante, notre analyse transcriptomique a montré que la perte d'expression de Cdx2 dans les lésions caecales s'accompagne d'une augmentation de l'expression de 128/384 marqueurs de cellules souches, soit de 1/3 de ces marqueurs, selon la liste proposée par Muñoz (Muñoz et al., 2012).

Ainsi, il semble que la très gande plasticité cellulaire de l'épithélium intestinal constitue le chaînon manquant entre les modèles « top-down » et « bottom-up » de la cancérogénèse intestinale et permette de réconcilier ces deux modèles.

IV. Un modèle murin représentatif d'un sous-type de CCR humain ?

Plusieurs études transcriptomiques menées à grande échelle, dont celle de la Ligue contre le cancer (programme Carte d'Identité des Tumeurs) (Marisa et al., 2013), ont montré la très grande diversité des CCR humains. La mise au point de modèles animaux représentatifs de chacune de ces formes de CCR est essentielle pour comprendre les bases mécanisitiques

mises en jeu et pour le développement de thérapies spécifiques et efficaces dans le cadre d'une médecine personnalisée.

En collaboration avec la Ligue contre le cancer, nous avons observé que le sous-type de CCR de plus mauvais pronostic est corrélé à la réduction d'expression la plus importante de Cdx2. Ce résultat est à rapprocher de ceux d'autres études ayant montré qu'une réduction de l'expression de Cdx2 est associée à un mauvais pronostic (Bae et al., 2015; Dalerba et al., 2016; De Sousa E Melo et al., 2013).

Nos résultats indiquent par ailleurs que les CCR humains dans lesquels l'expression de Cdx2 est la plus faible expriment certains marqueurs gastriques tels que Anxa10, Ctse, Cldn18, Tff2 et Muc1. Ces résultats sont renforcés par ceux d'une autre étude ayant montré qu'une minorité (4%) de CCR présente un phénotype de type gastrique caractérisé par l'expression du marqueur gastrique Cldn18 et la perte d'expression de Cdx2, associées à un mauvais pronostic (Matsuda et al., 2010).

De façon intéressante, le sous-type de CCR humain de plus mauvais pronostic identifié par le programme CIT regroupe des tumeurs festonnées (Marisa et al., 2013) lesquelles sont fréquemment associées à l'expression de marqueurs gastriques tels que Muc5ac, Ctse, Anxa 10, Tff1 etTff2 (Delker et al., 2014)(Kim et al., 2015). Une étude récente suggère que le gène Anxa10, dont l'expression est augmentée dans le sous-type de CCR de mauvais pronostic, est impliquée dans la différenciation gastrique des tumeurs festonnées et est associée à la réduction voire à la perte d'expression de Cdx2 (Tsai et al., 2015). De la même manière, il a été montré que la perte d'expression de Cdx2 pourrait être impliquée dans le développement des tumeurs festonnées (Dawson et al., 2014).

Les tumeurs du caecum et de l'intestin grêle des souris $Cdx2^{f/f}$//$AhCre^{ERT}$//$Apc^{+/\Delta 14}$ invalidées pour Cdx2 ne présentent pas de phénotype festonné mais un phénotype mixte, caractérisé par la juxtaposition de zones métaplasiques et de zones adénocarcinomateuses. Un tel phénotype n'a pour l'heure jamais été décrit dans les CCR humains. Cependant, ces souris présentent un phénotype gastrique incomplet au niveau des zones métaplasiques, partiellement représentatif des tumeurs colorectales humaines festonnées de type gastrique.

En outre, ce modèle murin pourrait reproduire certains aspects de la tumorigénèse intestinale observée dans le cadre du syndrome de la polypose juvénile. Une étude a montré que les mutations des gènes SMAD4 ou BMPRA1 mises en cause dans cette pathologie

conduisent au développement de polypes intestinaux dans lesquels l'expression de Cdx2 est fortement réduite et dont certains sont susceptibles d'évoluer en CCR (Barros et al., 2009). Nos résultats soutiennent cette observation, en ce sens que la perte de fonction locale de Cdx2 dans notre modèle murin conduit au développement de métaplasies de type gastrique qui facilite le développement d'adénocarcinomes. Notre étude permet par ailleurs de concevoir un nouveau mode d'évolution tumorale des lésions métaplasiques : les cellules de ces lésions ne subiraient pas elles-mêmes de transformation oncogénique mais favoriseraient la transformation maligne de cellules adjacentes non-métaplasiques.

V. Conclusion générale

Mon travail de thèse a abordé un problème majeur en cancérologie, le CCR, dont les études récentes montrent qu'il n'est plus à considérer comme une maladie unique, mais comme un ensemble de formes distinctes et complexes touchant un même organe. Ce travail reposait sur l'observation que l'une des formes les plus agressives de CCR s'accompagne d'une forte réduction de l'expression du gène homéotique Cdx2. Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que Cdx2 agit comme un suppresseur de tumeurs de façon cellule non-autonome, c'est-à-dire que la perte de sa fonction dans une cellule épithéliale intestinale ne rend pas cette cellule maligne, mais facilite la transformation maligne de cellules adjacentes en modifiant le microenvironnement moléculaire et cellulaire. En outre, la réalisation de ce travail m'a permis de développer un modèle murin préclinique reproduisant plusieurs caractéristiques d'une forme particulièrement agressive de CCR. Ce modèle pourrait servir de rationnel pour des études translationnelles ultérieures visant à développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblées dans la perspective de la médecine personnalisée.

ANNEXE : miniCdx2, un variant d'épissage alternatif de Cdx2

I. Contexte

Des études antérieures menées au laboratoire ont montré que l'expression du gène Cdx2 est régulée par des mécanismes transcriptionnels (Benahmed et al., 2008) et que l'activité et la demi-vie de ce facteur de transcription sont régulées par des modifications post-traductionnelles de la protéine (Gross et al., 2005). Plus récemment, un mécanisme original de régulation post-transcriptionnelle de Cdx2 a été mis en évidence au laboratoire. Celui-ci repose sur la production d'un variant de Cdx2, miniCdx2, par épissage alternatif du pré-messager au niveau d'un site donneur d'épissage qui chevauche le codon d'initiation de la traduction de Cdx2. Il en résulte la production d'une protéine de plus petite taille que Cdx2 dont la traduction est initiée à partir d'un codon alternatif situé en amont de celui initiant la traduction de Cdx2. La protéine miniCdx2 comporte le même domaine de liaison à l'ADN (homéodomaine) et le même domaine C-terminal que Cdx2, mais le domaine de transactivation de 185 acides aminés est remplacé par une petite séquence peptidique de 12 acides aminés.

Dans les cellules cancéreuses coliques en culture, le transcrit miniCdx2 est bien moins abondant que le transcrit Cdx2. La protéine miniCdx2 est par ailleurs spécifiquement exprimée dans le noyau des cellules de la base des cryptes de l'épithélium intestinal, alors que Cdx2 est également exprimé dans les cellules de l'épithélium de surface.

Fonctionnellement, miniCdx2 se comporte comme un dominant négatif sur les cibles transcriptionnelles de Cdx2 en entrant en compétition avec Cdx2 pour sa fixation sur ses gènes cibles. En revanche miniCdx2 exerce les mêmes fonctions non-transcriptionnelles que Cdx2 (stabilisation de p27Kip1 ; inhibition de la réparation de type NHEJ de l'ADN par interaction avec le complexe Ku70/80).

II. Contribution au projet et résumé des principaux résultats obtenus

Ma participation à ce travail est double :

J'ai mis au point une méthode de détection et de quantification de l'expression de miniCdx2 par RT-qPCR. Ceci m'a permis de montrer que l'ARNm miniCdx2 est 5 à 20 fois moins abondant que l'ARNm Cdx2 le long de l'intestin de souris.

La mise en évidence d'un profil d'expression distinct des protéines Cdx2 et miniCdx2 le long de l'axe antéro-postérieur et crypto-villositaire de l'intestin indique que l'épissage alternatif du pré-messager est régulé. Ceci est corroboré par le fait que les lésions

hétéroplasiques non-cancéreuses qui se développent dans l'intestin des souris $Cdx2^{+/-}$ se caractérisent par une perte d'expression de Cdx2 tandis que l'expression de miniCdx2 y est maintenue. Afin d'étudier le mécanisme de régulation de l'épissage alternatif, un système rapporteur plasmidique a été développé. Celui-ci comporte, en aval du promoteur CMV, les 3 exons du gène Cdx2 ainsi que l'intron1, cible de l'épissage alternatif, et une séquence Flag en C-terminale permettant la quantification relative des deux protéines produites par western-blot au moyen d'un anticorps anti-Flag. La fonctionnalité des sites d'épissage alternatifs a été démontrée par mutagenèse de ce plasmide. Grâce à ce système rapporteur, nous avons montré que les protéines Cdx2 et miniCdx2 sont des régulateurs négatifs de la production du variant miniCdx2 et qu'elles sont capables d'interagir physiquement et de manière indépendante de l'ARN avec les facteurs d'épissage ASF/SF2 et SRp30c. En particulier, Cdx2 renforce l'interaction entre les facteurs SRp30c et ASF/SF2 afin d'inhiber l'effet stimulateur du facteur SRp30c sur l'épissage alternatif.

III. Conclusion

Des études antérieures à ce travail ont montré que l'expression et l'activité de la protéine Cdx2 sont régulées aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel. Nos résultats montrent que le contrôle de Cdx2 fait également intervenir un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle par production d'un variant d'épissage alternatif, miniCdx2, à partir d'un codon alternatif d'initiation de la traduction. En particulier, nous avons montré que la protéine miniCdx2 contrôle l'activité de Cdx2 en exerçant des fonctions à la fois antagonistes et similaires à celles de Cdx2 et en régulant négativement sa propre production.

Une étude récente a identifié un autre variant d'épissage de Cdx2, Cdx2A/S, qui est inactif sur les cibles transcriptionnelles de Cdx2 et qui stimule *in vitro* et *in vivo* l'épissage de mini-gènes (Witek et al., 2014).

Globalement, ces résultats montrent que le gène Cdx2 code pour des variants d'épissage dont il sera important de tenir compte pour les futures études fonctionnelles de ce gène.

IV. Publication

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article en cours de soumission:

« Fine-tuning and autoregulation of an intestinal homeobox gene, CDX2, by alternative splicing"

Camille Balbinot, Marie Vanier, Asmaa Nair, Olivier Armant, Christine Soret, Elisabeth Martin, Julien Pénichon, Thoueiba Saandi, Jean-Marie Reimund, Jacqueline Deschamps, Felix Beck, Claire Domon-Dell, Isabelle Gross, Isabelle Duluc, Jean-Noël Freund.

Fine-tuning and autoregulation of an intestinal homeobox gene, *CDX2*, by alternative splicing

Camille Balbinot[1,†], Marie Vanier[1,†], Asmaa Nair[1], Olivier Armant[2,§], Christine Soret[1], Elisabeth Martin[1], Julien Pénichon[1], Thoueiba Saandi[1], Jean-Marie Reimund[1], Jacqueline Deschamps[3], Felix Beck[4], Claire Domon-Dell[1], Isabelle Gross[1], Isabelle Duluc[1,*], Jean-Noël Freund[1,*]

[1] Université de Strasbourg, Inserm, UMR_S1113, 67000 Strasbourg, France

[2] Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxicology and Genetics, Postfach 3640, 76021 Karlsruhe, Germany

[3] Hubrecht Institute, Developmental Biology and Stem Cell Research, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands

[4] Barts and The London School of Medicine and Dentistry, London E1 2ES UK

[§] Present address: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance 13115, France

[†] These authors contributed equally to the work

[*] These authors contributed equally to the work

For correspondence jean-noel.freund@inserm.fr
3 avenue Molière
67200 Strasbourg, France

Major subject areas

Cell biology; Developmental biology & stem cells

Abstract

Based on phylogenetic analyses, we uncovered a variant of the *CDX2* homeobox gene in the gut epithelium, generated by alternative splicing coupled to alternative translation initiation. This variant, miniCDX2, contains the DNA-binding homeodomain but is devoid of transactivation domain. It is predominantly expressed in the proliferating cells of the crypts whereas the CDX2 protein is also present in differentiated villous cells. Functional studies revealed a dominant-negative effect exerted by miniCDX2 on the transcriptional activity of CDX2, and conversely similar effects regarding several transcription-independent functions of CDX2. In addition, a regulatory role played by the CDX2 and miniCDX2 homeoproteins on their pre-mRNA splicing is displayed, through interactions with splicing factors. This study demonstrates that the activity of the *CDX2* homeobox gene is both fine-tuned and auto-regulated by alternative splicing. It highlights the relevance of alternative splicing to generate protein diversity for proper control of the dynamic homeostasis of the intestinal epithelium.

Introduction

RNA metabolism is a matter of active research since the discovery of the multiple types and functions of RNA molecules present in a cell. Alternative splicing of pre-messenger RNA concerns the majority of genes and is an important facet of RNA metabolism for the generation of structural and functional protein diversity (Kelemen et al., 2013; Nilsen and Graveley, 2010). It is involved in every biological process from embryonic development to tissue homeostasis, and also in diseases (Chepelev and Chen, 2013; Cieply and Carstens, 2015). Yet, despite the importance attributed to alternative splicing, it remains largely underrated because most of the variants generated from a given gene are only identified by their sequence without knowledge on their function(s).

The intestinal epithelium is a complex cellular system in constant renewal whose dynamic homeostasis involves multiple and complementary factors and pathways (Clevers, 2013; Li and Jasper, 2016). Among them, the transcription factor encoded by the homeobox gene *CDX2* is central, since it is the primary determinant of intestinal identity of the presumptive midgut/hindgut endoderm in embryos (Beck et al., 1999; Gao et al., 2009), and later a major regulator of epithelial homeostasis in the postnatal gut: *CDX2* controls the organization of the stem cell niche, provides tissue identity to the gut stem cells, and regulates cell proliferation and differentiation (San Roman et al., 2015; Simmini et al., 2014; Stringer et al., 2012; Verzi et al., 2011). Its expression and function need to be tightly regulated, as demonstrated by the lethality resulting from both its loss and over-expression (Crissey et al., 2011; Verzi et al., 2011). *CDX2* is also relevant in pathological settings. Indeed, human colon tumors with a strong reduction of this homeobox gene are of poor prognosis (Bae et al., 2015; De Sousa E Melo et al., 2013), and functional studies performed in mice suggest a tumor suppressor role in the gut (Aoki et al., 2003; Bonhomme et al., 2003; Gross et al., 2008; Hryniuk et al., 2014). Inversely, *CDX2* can be abnormally expressed outside the gut to induce precancerous metaplasic lesions in the stomach (Mutoh et al., 2002; Silberg et al., 2002) and even be an oncogene in leukemia (Scholl et al., 2007; Thoene et al., 2009).

Alternative splicing is still poorly documented in the gut. Here, we showed the importance of alternative splicing at the genome-wide level, and we identified and analyzed the functional relevance of an alternative splicing variant of the *CDX2* homeobox gene.

Results

The *CDX2* homeobox gene encodes an alternative mRNA variant, *miniCDX2*

Most of the genes are thought to undergo alternative splicing (Kelemen et al., 2013). However, the extent and relevance of this process are far from been elucidated, especially in the dynamic homeostasis of the gut epithelium. Searching for novel transcript isoforms in the mouse intestine, 490 Millions of high quality paired-end reads were generated from 3 independent samples of the cecum. They corresponded to 16822 consistently-expressed genes (> 10 normalized reads in all replicates), and represented 43% of all annotated genes in the mouse genome including for instance most (98%) of the intestinal stem cells markers (Muñoz et al., 2012). The comparison to the reference transcripts annotation led us to identify 4799 possible novel exon-exon junctions corresponding to 1802 genes (Supplementary Table 1). This highlights the potential of alternative splicing in the gut to generate protein diversity and function.

Among the genes potentially exhibiting alternative splicing is the *CDX2* homeobox gene which is a major regulator of the development and dynamic homeostasis of the gut epithelium. This gene contains 3 exons (Figure 1A). To explore its fine structure, we performed RT-PCRs with a panel of primers, together with RT-qPCR and northern blot studies, on RNA extracted from human colon cancer cell lines, Caco2-TC7, SW480 and T84, and mouse intestine (Figure 1B). This led to the identification of a variant, referred to as *miniCDX2*. By northern blot, the level of this variant was far below that of the *CDX2* mRNA. RT-qPCR showed a 15-times lower abundancy compared to the *CDX2* transcript in proliferating Caco2-TC7 cells (3 days in culture), and its proportion further decreased in differentiated cells (14 days in culture). The *miniCDX2* mRNA was up to 20-times less abundant than the *CDX2* mRNA along the murine intestine.

MiniCX2 corresponds to an evolutionary-conserved alternative splicing variant

The Figure 2 – figure supplement 1 illustrates the sequence of the RT-PCR product derived from the human *miniCDX2* mRNA, and its alignment with the *CDX2* mRNA. The process generating this variant involves a canonical GU splicing donor site located within the Exon-1, instead of the standard donor site located at the end of Exon-1 used for the *CDX2* mRNA. Thus, the production of the *CDX2* or *miniCDX2* transcripts results from alternative pre-mRNA splicing by alternative usage of splicing donor sites, changing the boundary of the first

exon. Remarkably, the alternative 5' donor site used to generate the *miniCDX2* mRNA overlaps the translation initiation codon of the CDX2 protein in the *CDX2* mRNA (referred thereafter to as AUG_2), so that this translation start site is split and destroyed in the *miniCDX2* mRNA. Yet, the sequence of the *CDX2* gene contains one additional AUG located 29-pb upstream of AUG_2. This AUG, referred thereafter to as AUG_1, is out-of-frame with AUG_2, but in-frame with the open reading frame of the Exon-2 and -3 in the configuration of the alternatively-spliced *miniCDX2* transcript. In addition, in the *CDX2* mRNA unlike the *miniCDX2* variant, a translation stop codon (Stop1) is located 4 nucleotides downstream of AUG_2, thus being out-of-frame with the CDX2 open reading frame, but in-frame with the upstream AUG_1.

It should be emphasized that the motif composed of (i) the canonical GU splicing donor site overlapping the translation start codon of the CDX2 protein, (ii) the putative upstream and out-of-frame translation start site and (iii) the translation stop codon in-frame with the upstream AUG, is evolutionary conserved (Figure 2A; Figure 2 – supplement figure 2). Indeed, the sequence comparison of 40 *caudal*-related genes identified this motif in every *CDX2*-type gene from coelacanth to human, in marsupials, birds, reptiles, amphibians, the bichir (the most basal extant ray-finned fish) and the bowfin (the immediate outgroup to teleost fish). However, it was neither found in *CDX1*-type genes, except for *Cdx1b* in teleost fishes (*Danio rerio*), nor in *CDX4*-type genes. The conservation and specificity of this motif in *CDX2* paralogues strengthens the notion that this group of homeobox genes is subjected to alternative splicing.

The *miniCdx2* splicing variant encodes a truncated form of the CDX2 homeoprotein

The presence of the upstream out-of-frame AUG_1 prompted us to investigate if it is actually active for translation and to compare its activity with the start site AUG_2 used for CDX2 translation. For this purpose, reporter plasmids were constructed in which the 5'-untranslated sequence of the *CDX2* gene ending at ATG_1 or ATG_2 was linked to the Luciferase coding sequence (Figure 2Ba). The translation initiation activity of AUG_2, normally used for the synthesis of the CDX2 protein, was evidenced by the production of Luciferase in cells transfected with the plasmid pATG1-ATG2 that recapitulates the configuration found in the *CDX2* mRNA with AUG_2 being in-frame with the reporter sequence and the upstream AUG_1 being out-of-frame. Interestingly, the plasmid pATG1 ending at ATG_1 and representing the

miniCDX2 configuration produced an even higher luciferase activity compared to pATG1-ATG2. This activity was abolished by mutating ATG_1 into TAG in pATG1m. Moreover, changing ATG_1 into TAG in pATG1m-ATG2 increased luciferase compared to pATG1-ATG2. Thus, AUG_1 is translationally active and, in the context of the *CDX2* mRNA, it partially hinders the translational activity of the downstream AUG_2.

In the *CDX2* mRNA, the start codon used for the CDX2 protein, AUG_2, is preceded by the translationally-competent AUG_1. While ribosomes generally start translation at the first AUG after cap-dependent scanning of the 5'-untranslated region, they can skip it for a second site by leaky scanning (Kozak, 2002) or reach an internal codon using a cap-independent Internal Ribosome Entry Site (Stoneley et al., 2001). To compare the cap-dependency of AUG_1 and AUG_2, uncapped and m7G-capped reporter RNAs named RNA_{AUG1} and $RNA_{AUG1\text{-}AUG2}$ were *in vitro* transcribed from PCR templates derived from pATG1 and pATG1-ATG2, respectively. After RNA transfection, luciferase activity was higher for capped *vs* uncapped RNA_{AUG1}, as well as for capped *vs* uncapped $RNA_{AUG1\text{-}AUG2}$; in addition, destroying AUG_1 in $RNA_{AUG1m\text{-}AUG2}$ increased luciferase compared to $RNA_{AUG1\text{-}AUG2}$ (Figure 2Bb). Thus, the activity of AUG_1 and that of AUG_2 are both cap-dependent, suggesting that in the configuration of the *CDX2* mRNA, ribosomes reach AUG_2 to initiate the translation of the CDX2 protein by leaky scanning through AUG_1.

In the *miniCDX2* splice variant, the use of the alternative 5'-splicing site in association with the acceptor site of Intron-1 places AUG_1 in frame with the open reading frame of the Exons-2/3 (Figure 1 – figure supplement 1). This transcript is predicted to encode a protein variant, miniCDX2, in which a 12-aa segment replaces the 181-aa transactivation domain of the CDX2 homeoprotein (Figure 3A). We raised an antibody (C2T) against this 12-aa segment and validated it using expression plasmids (Figure 3Ba), peptide competition and conditional *CDX2* knockout mice (not shown). In cells transfected with the plasmid pFlag-miniCDX2, immunofluorescence staining with the C2T antibody revealed the miniCDX2 protein in the nucleus, consistent with the fact that it contains a DNA-binding homeodomain (Figure 3Bb). In mice, C2T immunolabelling also stained cell nuclei in the intestine, and its expression profile was different from that of CDX2. MiniCDX2 appeared perinataly at the level of the intervillous epithelium at the origin of the crypts and remained in the bottom half of the crypts in the small intestine and colon throughout life, unlike CDX2 also present in the small

intestinal villi and colonic cuff (Figure 3Ca,b). Double immunofluorescence labelling at the crypt bottom showed cells co-expressing miniCDX2 and CDX2 (Figure 3Cc).

MiniCDX2 participates in the control of intestinal homeostasis

A transgenic mouse, the *jojo-Flag-miniCDX2* mouse, was generated to investigate *in vivo* the function of miniCDX2 using an inducible overexpression approach (Figure 4A). Crossing the *jojo-Flag-miniCDX2* mice with *Sox2Cre* animals to broadly express Flag-miniCDX2 in the zygote caused embryonic death, which is reminiscent of the phenotype resulting from the *CDX2* knockout (0 double-transgenics were born over more than 80 descendants of *jojo-Flag-miniCDX2* x *Sox2Cre* crosses). In the adult gut of *jojo-Flag-miniCDX2* mice (three independent founders), GFP immunostaining revealed the activity of the CAG promoter only in very few villi (less than 1%, Figure 4 – supplement figure 1Aa). Consequently, crossing the *jojo-Flag-miniCDX2* mice with *VilCre* mice allowed the induction of Flag-miniCDX2 only in rare villi. In those with the highest level of miniCDX2, the epithelium exhibited a loss of intestinal Alkaline Phosphatase accompanied by the ectopic expression of gastric Claudin-18 (Figure 4B). This reproduced the differentiation switch reported by conditional knockout of *CDX2* in the gut epithelium (Stringer et al., 2012), suggesting that miniCDX2 with its DNA binding homeodomain but devoid of transcriptional domain, is able to antagonize the transcriptional potential of CDX2 *in vivo*.

Brunner's glands (BGs) are glandular downgrowths of crypts in the floor of the proximal duodenum, arranged in mice in a coma shape mass immediately after the pyloric sphincter. BGs express both CDX2 and miniCDX2 at low levels (not shown). Interestingly, GFP immunostaining in the BGs of *jojo-Flag-miniCDX2* mice revealed a strong activity of the CAG promoter in these glands, in contrast to the rare expression in villi (Figure 4 – supplement figure 1A), thus allowing a widespread expression of Flag-miniCDX2 protein in the BGs of *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice (Figure 4 – supplement figure 1B). In these mice, the increased expression of Flag-miniCDX2 led to a 2.5-fold enlargement of the territory of the BGs (Figures 4C). This was accompanied by a higher expression of *PDX1*, an important regulator of the morphogenesis of these structures (Offield et al., 1996) (Figure 4D). However, there was no modification in cell proliferation, as assessed by the absence of significant phospho-Histone3 labeling, and no change in cell differentiation illustrated by the staining of neutral mucins (Figure 4E).

To address any possible pathological outcome of the overgrowth of the BGs, mice were left to age until 18-24 months (n=19). Fifty-two percent (10/19) of the *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice developed 1-2 polyps in the pyloric region (Figure 5Aa), in contrast to control *jojo-Flag-miniCDX2* animals (1/12). These polyps exhibited low to high grade dysplasia, without sign of neoplasia. As shown in Figures 5Ab and 5B, they were formed by expanded BGs extending even under the gastric mucosa, intermingled with disorganized proliferative crypts from the overlying duodenal epithelium, and covered by a surface epithelium exhibiting foregut-type properties, as illustrated by the expression of gastric Claudin-18 and occasionally the formation of squamous stratified epithelium expressing P63. Proliferating cells labelled by phospho-Histone-3 principally concentrated in the disorganized crypts of the intermediary zone. There was no evidence of oncogenic cytoplasmic / nuclear translocation of β-catenin in any area of the polyps. BGs produce EGF, while the deletion of the EGF-Receptor inhibitor Lrig1 in the duodenum causes adenomas development in mice (Powell et al., 2012). RT-qPCR revealed a 4 to 18 times higher level of EGF mRNA in the polyps of *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice compared to the duodenal mucosa of control animals (n=3). Linked to that, the intermediary zone with proliferating cells showed elevated levels of phospho-EGF-Receptor immunostaining in the lateral cell membranes, in contrast to the BG area and the surface epithelium of the polyps, and unlike normal duodenal crypts (Figure 5C). Thus, the overexpression of miniCDX2 results in the expansion of BGs and the overproduction of EGF, leading to the activation of the EGFR and hyperproliferation of the overlaying crypts, ultimately forming polyps exhibiting a shift towards foregut-type differentiation at their surface.

Opposite and similar molecular functions of the miniCDX2 protein compared to CDX2

As a transcription factor, the CDX2 protein activates the promoter and mRNA expression of a large number of downstream targets among which the Sucrase-Isomaltase (SI) gene. In colon cancer cell lines transfected with the plasmid pFlag-miniCDX2 and/or pFlag-CDX2, the miniCDX2 protein, unlike CDX2, failed to stimulate the level of endogenous *SI* mRNA as well as the activity of the *SI* gene promoter assayed using an *SI* luciferase reporter; however it dose-dependently abolished the stimulatory effect exerted by the CDX2 protein (Figures 6Aa,b). Chromatin immunoprecipitation revealed that miniCDX2 exhibited the capacity to bind the same chromatin targets as CDX2, e.g. the *SI*, *Li-cadherin* and *Muc2* promoters

(Figure 5Ba). In addition, it reduced the binding of CDX2 to the *SI* promoter (Figure 5Bb). Thus, miniCDX2 is transcriptionally inefficient but acts as a dominant-negative regulator of the transcriptional potential of CDX2 by competing for DNA binding. This is consistent with the antagonist effect observed above for miniCDX2 in transgenic mice.

Beyond regulating transcription through direct DNA binding, CDX2 exerts broader functions (Freund et al., 2015). Among them, it can bind β-catenin to prevent its interaction with Tcf4, thus impeding the canonical Wnt/β-catenin pathway (Guo et al., 2010). In line with this, CDX2 opposed the stimulation of the *Mmp7* mRNA, a Wnt target, as well as the activity of the TOP-Flash Wnt reporter by β-catenin/Tcf4 (Figures 7Aa,b). Unlike CDX2, miniCDX2 failed to interfere with the β-catenin/Tcf4 stimulation of *Mmp7* mRNA and TOP-Flash activity. However, contrary to its dominant-negative effect exerted on the transcriptional potential of CDX2, miniCDX2 failed to relieve the inhibitory effect of CDX2 on β-catenin/Tcf4 (Figures 7Aa,b). Corroborating this observation, co-immunoprecipitation experiments showed that miniCDX2 did neither interact with β-catenin nor prevent β-catenin/Tcf4 interaction, in contrast to CDX2 (Figures 7Ac,d). Thus, miniCDX2 is neutral with respect to the inhibitory function exerted by CDX2 on β-catenin/Tcf4 signaling.

CDX2 also exerts transcription-independent functions including the increase of $P27^{KIP1}$ to compromise cell proliferation (Aoki et al., 2011). Like CDX2, miniCDX2 increased the level of $P27^{KIP1}$ protein without changing its mRNA (Figures 7Ba,b). Corroborating this result, miniCDX2 reduced cell growth in a colony formation assay, as did the CDX2 protein (Figure 7Bc). The CDX2 protein has also been reported to inhibit the repair activity of double-stranded DNA breaks in colon cancer cells HCT116 by interacting with the KU70/80 complex (Renouf et al., 2012). Here, we extended these observations by showing in SW480 colon cancer cells that miniCDX2, like CDX2, was also able to co-immunoprecipitate with the KU70/80 protein; it also hampered the DNA repair activity of nuclear extracts assayed *in vitro* for the capacity to circularize linear DNA or form concatemers (Figures 7Ca,b).

Thus, miniCDX2 fine-tunes the activity of the CDX2 protein in that it exerts different effects with respect to the multifaceted functions of this homeoprotein: it is dominant-negative on the transcriptional function of CDX2, it is neutral as regards the inhibitory role of CDX2 on β-catenin/Tcf4 interaction, and it exerts similar transcription-independent effects as CDX2 on

cell growth inhibition by $P27^{KIP1}$ and on double-stranded DNA break repair through KU70/80.

Auto-regulation of the *CDX2* pre-mRNA splicing

A shift to a foregut-type differentiation has been reported in the heteroplasia developing in the caecum of heterozygous *Cdx2*$^{+/-}$ mice (Beck et al., 1999). In these lesions, the expression of the CDX2 protein turns off but the underlying mechanism still remains elusive since one wild type copy of the gene is preserved. The fact that the duodenal lesions resulting from miniCDX2 overexpression in *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice also exhibit a shift towards a foregut-type differentiation prompted us to analyze the expression of miniCDX2 in the heteroplasia of *Cdx2*$^{+/-}$ mice (Figure 8A). Immunohistochemistry confirmed the total absence of CDX2 protein in the heteroplasic glands, in contrast to the normal adjacent epithelium. As expected, miniCDX2 was present in the normal caecal epithelium; however, unlike CDX2, it was also detected in the heteroplasic structures (Figure 8A), being high at the border of these lesions and heterogeneous in depth. This result points to a shift in favor of the miniCDX2 variant in the heteroplasias, which indicates that the splicing of the pre-mRNA to produce either the *CDX2* or the *miniCDX2* mRNA is a regulated instead of a constitutive process. In addition, it raised the possibility that the balance between both splicing forms might be controlled by the CDX2 protein itself.

To investigate the mechanism of pre-mRNA splicing, we constructed the plasmid eC2I1 overlapping the Exon-1, Intron-1 and the fused Exons2/3 of the *CDX2* gene, and having a Flag coding sequence preceding the Stop codon in Exon3 (Figure 8B). When eC2I1 was transfected in HCT116 colon cancer cells, both CDX2-Flag and miniCDX2-Flag variants were detected with the anti-Flag antibody (Figure 8C). Their respective identity was confirmed using the anti-CDX2 and C2T antibodies (Figure 8C), and by sequencing the RT-PCR products obtained from both transcripts encoded by eC2I1 (not shown). Mutating the GT alternative splicing donor site of eC2I1 into GA to give eC2I1m strongly compromised the production of miniCDX2-Flag (Figure 8D). These data validated eC2I1 as an appropriate reporter system of the alternative splicing of the *CDX2* pre-mRNA.

Interestingly, transfecting eC2I1 in two different human colon cancer cell lines, HCT116 and SW480, produced different levels of miniCDX2-Flag compared to CDX2-Flag, and this ratio inversely correlated to the amount of endogenous CDX2 protein produced in these cells

(Figure 8E). This observation supported a possible role of the CDX2 protein in the regulation of its pre-mRNA splicing. To directly address this issue, HCT116 cells were cotransfected with eC2I1 and the plasmid coding for HA-CDX2. As shown in Figure 8F, HA-CDX2 reduced the amount of miniCDX2-Flag produced from eC2I1. Moreover, cotransfection with the plasmid encoding the transcription-deficient protein HA-miniCDX2 instead of HA-CDX2 also reduced the production of miniCDX2-Flag, yet less efficiently. Thus, the CDX2 and miniCDX2 proteins participate in the regulation of their pre-mRNA splicing through a mode of action being at least in part transcription-independent.

The sequence around the alternative splicing donor site of the *CDX2* pre-mRNA was analyzed for the presence of putative binding elements to splicing factors (Figure 9 – figure supplement 1). Several elements are conserved between human and mouse, in particular for SRp30c and ASF/SF2, located close downstream of the alternative splicing site in the region being exonic in case of the *CDX2* mRNA but intronic when splicing leads to the *miniCDX2* mRNA. These factors are expressed in intestinal cell lines (Figure 9A). They were then tested for their effect on pre-mRNA splicing by transfecting HCT116 cells with eC2I1 and the plasmids encoding His-ASF/SF2 or His-SRp30c. As illustrated in Figure 9Ba, His-ASF/SF2 inhibited the splicing leading to miniCDX2 whereas His-SRp30c stimulated it. In addition, the stimulatory effect exerted by His-SRp30c was abolished by His-ASF/SF2 (Figure 9Bb). Moreover, CDX2 also counteracted the effect of SRp30c (Figure 9Ba). The opposite outcomes of SRp30c and ASF/SR2 prompted us to investigate if these factors can be found in a common molecular complex. In cells cotransfected with the corresponding plasmids, His-SRp30c co-immunoprecipitated with His-ASF/SF2 (Figure 9Ca). A similar result was obtained with the endogenous SRp30c and ASF/SF2 proteins (Figure 9Cb). Interestingly, treating the nuclear extracts with RNase prior to immunoprecipitation increased the amount of co-precipitated complex (Figure 9Cb), suggesting an interaction essentially RNA-independent. We then investigated if the CDX2 protein can also interact with ASF/SF2 and/or with SRp30c. In cells transfected with pHA-CDX2, HA immunoprecipitation carried with CDX2 the endogenous ASF/SF2 protein (Figure 9Da) as well as SRp30c (Figure 9Ea), and the amounts of these complexes increased by RNase treatment. A similar result was obtained with HA-miniCDX2, indicating that the transactivation domain of CDX2 is dispensable for the interaction with splicing factors (Figures 9Db, 9Eb). Finally, we investigated the impact of CDX2 and miniCDX2 on the molecular complex formed between ASF/SF2 and SRp30c. To this end, cells were transfected with pHA-CDX2 or pHA-miniCDX2 or the control empty vector, and

the nuclear extracts were processed for immunoprecipitation with anti-ASF/SF2 antibody after RNase treatment. As illustrated in Figure 9F, the amount of endogenous SRp39c co-immunoprecipitated with ASF/SF2 increased in the presence of HA-CDX2 or HA-miniCDX2, respectively by 1.7- and 1.6-fold compared to the control. These results suggest that the CDX2 and miniCDX2 proteins stimulate the interaction of ASF/SF2 with SRp30c which subsequently compromises the selection of the alternative splicing donor site used to produce the *miniCDX2* mRNA from the pre-mRNA.

Discussion

Based on transcriptomic analyses, this work reports a large number of novel exon-exon junctions for genes expressed in the gut, which deserves future studies of RNA processing and splicing to get a better understanding of the functioning of the intestine. Focusing on the homeobox gene *CDX2*, a major actor of gut development and homeostasis (Gao et al., 2009; Stringer et al., 2012b; Verzi et al., 2011), we identified a novel variant, miniCDX2, resulting from the combination of alternative pre-mRNA splicing and alternative translation initiation. This variant has different effects regarding the multiple functions of the original CDX2 protein: it antagonizes the transcriptional activity of CDX2 through DNA binding competition, it is neutral with respect to the inhibitory function exerted by CDX2 on β-catenin/Tcf4 signaling, and it has the same activities as CDX2 on cell proliferation through P27 and on DNA repair through KU70/80. Thus, miniCDX2 differentially impacts the transcription-dependent and -independent activities of CDX2. In addition, evidence is provided here that both CDX2 and miniCDX2 proteins participate in the control of the splicing of their pre-mRNA by a mechanism depending on the interaction of these homeoproteins with splicing factors. Altogether, these results lead to the conclusion that the function of the *CDX2* homeobox gene is both fine-tuned and auto-regulated by alternative splicing. This work highlights the relevance of alternative splicing to generate protein diversity involved in intestinal homeostasis.

The production of the miniCDX2 variant by alternative splicing and alternative translation initiation is based on a sequence motif that is conserved among *CDX2* paralogues in vertebrates, but absent in other members of the *caudal* family of homeobox genes including the *CDX1* and *CDX4* paralogues, with the exception of *Cdx1b* in teleost fishes. Interestingly, in teleosts the *CDX2*-type gene has been lost and replaced by a duplicated version of *CDX1* (*Cdx1b* in *Danio rerio*) which is functionally equivalent to the mammalian *CDX2* gene for intestinal development (Flores et al., 2008). Thus, *Cdx1b*, unlike *Cdx1a*, might have acquired a similar structural motif as *CDX2* around the translation start site, although being a gene of the *CDX1*-type. The conserved motif present in the *CDX2*-type genes has implications for translation initiation. Indeed, in the configuration of the *CDX2* mRNA, ribosomes have to reach the AUG_2 codon for translation initiation of the CDX2 protein while this codon is preceded by the upstream and out-of-frame AUG_1. AUG_1 is active to synthetize the miniCDX2 protein from the *miniCDX2* transcript, but it is still an open question whether it is

also active in the configuration of the *CDX2* mRNA. In this case, a short peptide of 13 aminoacids should be produced from the open reading frame ending at the codon Stop1. Short upstream open reading frames are relatively frequent; they can control the translation of the downstream open reading frame and even be involved in diseases (Wethmar et al., 2010).

The function of CDX2 needs to be tightly regulated in the gut since both its loss of expression and its excessive expression are lethal (Crissey et al., 2011; Verzi et al., 2011). Previous studies have shown the importance of the transcriptional level of regulation of the gene (Benahmed et al., 2008; Saandi et al., 2013), while posttranslational regulation through protein phosphorylation has also been reported (Gross et al., 2005; Rings et al., 2001). Between gene transcription and protein modification, this study adds a posttranscriptional level leading to the production of the truncated and transcriptionally-inactive variant miniCDX2. This variant can compete with CDX2 for DNA binding to limit its transcriptional activity. Interestingly, miniCDX2 is prominently expressed in the crypts, like the S60-phosphorylated form of CDX2 exhibiting a reduced transcriptional activity (Rings et al., 2001). This suggests the need of preventing excessive activity of this homeoprotein in stem/progenitor cells to ensure the correct process of cell renewal.

Beyond the transcriptional activity, recent studies have attributed non-transcriptional functions to the CDX2 protein (Freund et al., 2015). Here, the results obtained with miniCDX2 confirm that a transcription-deficient form of CDX2 can modulate DNA repair and cell proliferation (Aoki et al., 2011; Renouf et al., 2012), which reinforces the notion that CDX2 plays transcription-independent functions beyond its transcriptional activity. Moreover, we uncovered a novel transcription-independent function of CDX2 and miniCDX2 through their capacity to interact with splicing factors and regulate the splicing machinery. Recently, another variant of CDX2 has been described, CDX2/AS, in which a shift in the reading frame at the end of the second exon replaces the 3rd alpha-helix of the homeodomain and the downstream sequence by a novel carboxy-terminal domain enriched in serine and arginine residues. This transcription-deficient variant has been shown to modulate the splicing of Tra2β-1 or CD44v5 minigene reporters (Witek et al., 2014); however, it was without significant effect on the splicing of the *CDX2* pre-mRNA, as assayed using the eC2I1 reporter (data not shown). Together, these data indicate that the CDX2 protein and its variants

miniCDX2 and CDX2/AS represent novel splicing regulators, which might considerably broaden the sphere of activity of the *CDX2* homeobox gene.

Overexpressing miniCDX2 in the Brunner's glands increases the gland's territory and generates duodenal polyps in the long-term. The increased gland size is accompanied by a rise in *PDX1* expression, the group-3 gene member of the *paraHox* cluster in which *CDX2* is the posterior member, that is involved in Brunner's glands morphogenesis (Offield et al., 1996). It suggests molecular interactions within the *paraHox* cluster, and the participation of the couple CDX2 / miniCDX2, together with PDX1, in shaping the gastric-intestinal boundary. In the long-term, miniCDX2 overexpression generates duodenal polyps, which is associated with the increased production of EGF by the Brunner's gland and the activation of the EGFR in the overlaying crypts. Interestingly, these polyps exhibit gastric-type differentiation and even squamous stratified differentiation, but they do not spontaneously progress in cancer, at least during the lifespan of mice. In line with this, the foregut-type heteroplasia developing in the caecum of *Cdx2*$^{+/-}$ mice (Beck et al., 1999) and the caecal gastric-type lesions generated by conditional *Cdx2* knockout in the adult murine intestinal epithelium (Stringer et al., 2012) also fail to spontaneously progress to malignancy. Thus, the overexpression of the dominant-negative variant miniCDX2 or the loss of function of CDX2 do not represent oncogenic events *per se*, even if the perturbation of *Cdx2* in mice facilitates genetically- and chemically-induced colon carcinogenesis (Aoki et al., 2003; Bonhomme et al., 2003; Balbinot et al., unpublished), and if a strong reduction of CDX2 in colon cancer patients is a marker of poor prognosis (Bae et al., 2015; Dalerba et al., 2016).

Splicing variants have been described for a number of intestinal transcription factors including Tcf4, HNF4α and PPARγ; however none has been functionally studied in detail like miniCDX2 in this work. An alternative splicing variant of SOX9 has also been linked to malignant transformation in colon cancer (Abdel-Samad et al., 2011). Based on the data reported here, the protein diversity generated by alternative splicing might be considered as a significant way to modulate the function of important intestinal transcription factors during the constant renewal of the gut epithelium and possibly also in digestive diseases.

Material and Methods

Mice and generation of transgenic animals

To generate *jojo-Flag-miniCDX2* mice, the Flag-miniCDX2 sequence of plasmid pFlag-miniCDX2 (see below) was PCR amplified using the primers AAAAGTCGACTACCATGGACTACAAAGACGATGA / AAAAGTCGACTCAGCCTGGAATTGCTCTGCCG containing each a SalI restriction site. The resulting SalI fragment was inserted in the XhoI site of the vector *jojo* (Collombat et al., 2007) to get plasmid jojo-Flag-miniCDX2. The eluted 8,010-bp SalI fragment containing the transgene was injected in mouse eggs at the Mouse Clinic Institute (Illkirch, France). Mice were PCR genotyped with primers 39 / hC2E3R (AGTCATAGCTGTCCCTCTTC / TCAGCCTGGAATTGCTCTGC).

Cdx2$^{+/-}$ (Chawengsaksophak et al., 1997) and *VilCre* mice (El Marjou et al., 2004) have been described. *Sox2Cre* mice were obtained from The Jackson Laboratory. Animals were housed according to guidelines of the Ethic Committee of the University of Strasbourg (CREMEAS).

Cell lines, colony formation assays

Human colon cancer cells Caco2TC7 (Chantret et al., 1994), HCT116 (Brattain et al., 1981), SW480 (Leibovitz et al., 1976) and T84 (Murakami and Masui, 1980), and human embryonic kidney cells HEK293 (Graham et al., 1977) were grown as recommended. Colony formation assays were performed on HCT116 cells transfected with the indicated plasmids, as previously described (Gross et al., 2005).

Plasmids

pFlag-CDX2 and pFlag-miniCDX2. RNA extracted from Caco2-TC7 cells was subjected to RT-PCR using Platinum TaqPCRx DNA polymerase (Promega Inc., Madison, WI) with the primers AAAAAAGCTTTACGTGAGCTACCTCCTGGACAAGG and AAAATCTAGATCAGCCTGGAATTGCTCTGC to amplify the human CDX2 coding sequence, and with the primers AAAAAAGCTTGTGAGGTCTGCTCCCGGACCCTCGC and AAAATCTAGATCAGCCTGGAATTGCTCTGC to amplify the miniCDX2 coding sequence. PCR fragments were inserted in pCRII-TOPO (TA cloning kit, Life Technologies

Invitrogen, Grand Island, NY), giving respectively pCRII-TOPO-CDX2 and pCRII-TOPO-miniCDX2. These plasmids were cut with HindIII and the fragments inserted in the HindIII site of pFlag-CMV2 (Sigma Aldrich, St Louis, MO) to get the plasmids pFlag-CDX2 and pFlag-miniCDX2, respectively.

pATG1-ATG2 and pATG1m-ATG2. To construct pATG1-ATG2, the 5'-untranslated region of the mouse *Cdx2* gene up to the codon ATG_2 was PCR amplified from pSL1190-9.47 (Benahmed et al., 2008) with the primers TTTTAAGCTTAAGGCCGCTGGCCTGGGACTCCGCGA / TTTTCCATGGTGGCGAGGGACCCAGAGCAGA containing respectively HindIII and NcoI sites. The PCR fragment was cut with HindIII and NcoI and inserted in the corresponding sites of pGl3-control (Promega Inc.) to give pATG1-ATG2. pATG1m-ATG2 was derived from pATG1-ATG2 by site directed mutagenesis using the Quick Change IIXL Site Directed Mutagenesis Kit (BD Biosciences, San Rose, CA) with the primer TCAACGTTTGTCCCCAGACACCTAGGTGAGGTCTGCTCTGGGT to change the ATG_1 start codon into TAG.

pATG1 and pATG1m. Plasmid pATG1 containing the 5'-untranslated region of the murine *Cdx2* gene up to the codon ATG_1 was constructed as above by PCR amplification with the primers TTTTAAGCTTAAGGCCGCTGGCCTGGGACTCCGCGA and TTTTCCATGGTGTCTGGGGACAAACGTTGT in which the sequence was changed for one nucleotide to create a NcoI cloning site. After insertion of the PCR fragment in the HindIII and NcoI sites of pGl3-control, the correct sequence was restored by point mutagenesis with the primer TTTGTCCCCAGACAGCATGGAAGACGCCAAAAACAT to give pATG1. pATG1m was derived from pATG1 by mutation with the primer TTTGTCCCCAGACACCTAGGAAGACGCCAAAAACAT to change the ATG_1 start codon into TAG.

eC2I1 and eC2I1m. The human *CDX2* minigene overlapping the Exon-1, the Intron-1 and the fused Exons2/3 and having the Flag coding sequence inserted before the Stop codon in the Exon-3 was sequentially constructed using 3 overlapping fragments generated by PCR using Platinum® TaqPCRx DNA Polymerase (Life Technologies Invitrogen): the fragment A and B were respectively amplified by PCR from human genomic DNA with the primers Af (GTTTAAACTTAAGCTTGCTCCGCACGCCAGCCTGT) / Ar (TCACAGGTCAGAGGTTCAGAG) and with the primers Bf (CTCTGAACCTCTGACCTGTGA) / Br (TCCGTGTACACCACTCGATATTT); the

fragment C was amplified from pFlag-CDX2 DNA using the primers Cf (AGTGGTGTACACGGACCACC) and Cr (GCCCTCTAGACTCGAGTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCTGGGTGACGGTG GGGTTTA). Af contains 15 nucleotides complementary to the cloning site of the vector pcDNA4/TO followed by 20 nucleotides complementary to the 5'extremity of the *CDX2* gene; Cr contains 15 nucleotides complementary to the cloning site of pcDNA4/TO followed by a translation Stop codon, 24 nucleotides complementary to the Flag sequence and 20 nucleotides complementary to the *CDX2* gene; the primers Ar / Bf are partially complementary over 15 nucleotides, as the primers Br / Cf . The 3 PCR fragments A, B and C and the vector pcDNA4/TO cut with HindIII and XhoI were purified by agarose gel electrophoresis, mixed and incubated with the In-Fusion® HD Cloning kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA). The resulting plasmid eC2I1 was verified by sequencing. eC2I1m was derived from eC2I1 using the primer ACCCTCGCCACCATGAACGTGAGCTACCTCC to change the GT splicing site into GA.

Other plasmids were: pS33A-βcatenin encoding activated β-catenin (Aberle et al., 1997), pcDNA3-TCF4E-myc encoding Myc-tagged Tcf4 (Tetsu and McCormick, 1999), the reporter plasmids TOPFlash (van de Wetering et al., 1997), pSI-Luc (Rodolosse et al., 1996), pHis-SRp30c and pHis-ASF/SF2 (Paradis et al., 2007), and commercially-available pEGFP (Clontech Laboratories Inc.), pGl3-basic, pGl3-control, pRL-Null (Promega Inc.) and pCMV-Flag2 (Sigma-Aldrich).

Antibodies

The antibody against the miniCDX2 protein was obtained by immunizing rabbits with the synthetic peptide MVRSAPGPSPP-Cystein coupled to KLH (Eurogentech SA, Seraing, Belgium). C2T anti-peptide antibody was purified by affinity chromatography. The peptide was reduced by TCEP (Tris-(2-carboxyethyl) phosphine) using Immobilized TCEP-Disulfide Reducing gel (Pierce Biotechnology, Rockford, lL). 2.5 mg of reduced peptide were incubated with 2 mL sulfonyl-agarose (SulfoLink Trial kit, Pierce Biotechnology) during one hour and the affinity gel was equilibrated in Tris 50 mM / NaCl 0.15 M pH 7.3 buffer. 2 mL of rabbit immune serum were passed through the affinity column, washed with Tris 50 mM / NaCl 0.15 M – 0.5 M pH 7.3. Specific immunoglobulins were eluted with glycine 0.2M pH

2.7 and neutralized with 50µL Tris 1M pH 8 buffer. The C2T antibody raised against the Nter part of miniCDX2 was used at 15 µg/mL.

Commercial antibodies were against: Actin (clone C4, Millipore, St Quentin-en-Yvelines, France), ASF/SF2 (sc-33652, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), β-catenin (mouse clone 14, BD Transduction Lab, San Rose, CA), CDX2 (mouse clone 392M, BioGenex, San Ramon, CA), Claudin-18 (Life Technologies Invitrogen), Flag (mouse clone M2, Sigma Aldrich), GFP (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), HA (clone 3F10, Roche Applied Science), KU70 (rabbit clone EPR4027, Abcam, Cambridge, MA), KU80 (rabbit clone EPR3468, Abcam), Myc (mouse clone 9E10, Santa Cruz Biotechnology Inc.), p27KIP1 (mouse clone 57, BD Transduction Lab), PDX1 (rabbit, Abcam ab47267), phospho-EGFR (Cell Signaling Millipore), phospho-Histone-3 (Ser10 mitosis marker, Millipore Upstate), and SRp30c (sc-134046, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA).

Cellular RNA preparation and in vitro RNA transcription

RNA was prepared using TRI Reagent (Life Technologies Ambio, Houston, TX) and treated with DNAse (RQ1 RNAse-free DNAse, Promega Inc.).

For in vitro transcription of capped and uncapped RNA, DNA templates were amplified using Platinum TaqPCRx DNA polymerase from the plasmids pATG1, pATG1-ATG2, pATG1m-ATG2 and pGL3-control with Tption-f / Tption-r (TTTTTTTTTTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAG CTT / $(T)_{42}$CACTGCATTCTAGTTGTG) containing respectively the T7 promoter and polydT sequences. After purification (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, Venio, The Netherlands), 1µg of each PCR fragment was in vitro transcribed with or without m7G(5')ppp(5')G RNA Cap (S1404S BioLabs, Ipswich, MA) in the ratio of 1 GTP / 4 GTPcap, in 25 µL using HiScribe T7 In Vitro Transcription kit (BioLabs). After treatment with DNAse (RQ1 RNAse-free DNAse, Promega Inc.) treatment, RNAs were precipitated in NH4-acetate 2,5M on ice, washed in 70% ethanol and solubilized in 5 µL RNAse free water.

RNAseq analysis

RNA integrity was checked on nano RNA chips with a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and no sign of RNA degradation was detected. 1µg of

total RNA was used to construct the mRNAseq libraries with Illumina's TruSeq RNA sample kit following manufacturer's instructions. Libraries were validated and quantified on DNA1000 chips and a Bioanalyser 2100. 50bp paired end reads were obtained with a HiSeq1000 by multiplexing 3 libraries on one lane. Demultiplexing and generation of raw fastq files were performed with CASAVA v1.7. Mapping against the reference mouse genome GRCm38 was performed with tophat 2.0.11 and bowtie2 using the options --b2-sensitive -a 5 -p 5 --library-type fr-unstranded -r 180 --mate-std-dev 80. Quantification of the reads was performed with HTSeq and DESeq2 using the reference gene annotation from ensembl v75. Genes with > 10 normalised reads in the 3 replicates as given in DESeq2 were considered as significantly detected. De novo transcripts assembly was performed with cufflinks v2.2.1 with the options -u --library-type fr-firststrand and providing the reference genome fasta file and gene annotation from ensembl v75. Search of novel exon-exon jonctions was made with cuffcompare and consensus novel junctions found in all biological triplicates obtained with bedtools. The resulting bed file was then imported in R as a Grange object for gene annotation.

Northern blots, RT-PCR and RT-qPCR

PolyA+ RNA (PolyATract System, Promega Inc) was separated by electrophoresis on 2 % agarose / 2 M Formaldehyde gels (10 µg polyadenylated RNA / lane) and transferred to nylon membranes. Hybridization and revelation was performed as described (Lefebvre et al., 1999) with 100ng/mL of DIG-labeled antisense cRNA probe. This probe overlapped the 3'-untranslated region of the Exon-3 of the human *CDX2* gene, and was in vitro transcribed by T7 RNA polymerase from plasmid pCRII-TOPO-miniCDX2 linearized with BsrGI. A DIG-labeled human GAPDH probe was used for normalization.

Reverse transcription was performed with 2 µg RNA using SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Invitrogen) and Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen).

RT-PCR used 1/10th of the RT solution. Concomitant amplification of the two splicing forms of the human *CDX2* gene was performed with primers CDX21F/CCR (GCAGCCTCCAGCGTCGGTC / TCAGCCTGGAATTGCTCTGC) for 35 cycles (30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 1.5 min at 68°C). Specific amplification of the mouse *CDX2* mRNA and *miniCDX2* mRNA respectively used the primer pairs mhC2Flf / mhC2E3r

(CCCTCGCCACCATGTACG / CTCTGCGGTTCTGAAACCA) and mhC2Tqf (CCCTCGCCACCATTGAAAA) / mhC2E3r.

For RT-qPCR, 2 µg of mouse intestinal RNA or 1 µg of human Caco2-TC7 cell RNA were reverse transcribed in 20 µL using the AMV Reverse Transcriptase kit (Life Technologies, Invitrogen) and oligo-dT. RT-qPCR was performed on 1 µL of RT reaction in 20 µL using Syber Green PCR Master Mix (Life Technologies Applied Biosystems) and 7500 Real-time PCR System (Life Technologies Applied Biosystems). For mouse RNA, the cycles were 95°C 15 sec, 57°C 1 min, with the primers: CCCTCGCCACCATTGAAAA / GTGATGTATCGACTAAAGTG for *miniCDX2*, CTAGGAAGCCAAGTGAAAAC / GTGATGTATCGACTAAAGTG for *CDX2*, and CCCCACAACTCTTCCATTCT / GCAGGAGTGATAGGGGTCAT for *TBP*. For Caco2TC7 cell RNA, the cycles were 95°C 15 sec, 68°C 1 min with the primers: CCCTCGCCACCATTGAAAA / TGCCTCTCAGAGAGCCCCAGCGTGG for *miniCDX2*, CTCGGCAGCCAAGTGAAAAC / GTGATGTAGCGACTGTAGTG for *CDX2*, and TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA / CACATCACAGCTCCCCACCA for *TBP*.

Quantification of the Sucrase-Isomaltase (SI), MMP7, P27KIP1, EGF, and TBP transcripts was performed by RT-qPCR using diluted RT products (5-10x) mixed with TaqMan Master Mix, gene-specific TaqMan probe and the primers sets (TaqMan Gene Expression assays, Life Technologies Applied Biosystems): SI, Hs00356112_m1; MMP7, Hs01042795_m1; P27KIP1, Hs01597588_m1; EGF, Hs01099999_m1; TBP, Hs99999910_m1.

Analysis of the results (triplicates) was performed with the 7500 software v2.0.1 (Life Technologies Applied Biosystems) using the relative ΔΔCt quantification method.

DNA and RNA transfections, luciferase assays

Plasmid DNA transfection was performed during 48 h with JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France). RNA transfection was performed for 3h with 100 to 500 ng of in vitro transcribed RNA (see below) using 0.25 to 1.25 µl TransIT mRNA and 0.375 to 1.875 µl of boost (Mirus Bio, Madison, WI) on cells at 80% confluence. Firefly and Renilla luciferase activities were measured at least three times in triplicate using a dual reporter luciferase assay (Promega Inc.) in cell extracts prepared 48h after DNA transfection or 3h after RNA transfection. Means are given ±SD.

Immunostaining

Immunochemical staining and/or immunofluorescence detection were performed on paraffin-embedded tissue sections (Benahmed et al., 2008). Histochemical staining used the Vectastain ABC kit (Vector Labs, Peterborough, UK) and DAB 0.3 mg/mL / H2O2 0.03%. Double-immunofluorescence staining used secondary Alexa488-labelled anti-mouse antibody and Alexa688-labelled anti-rabbit antibody (Life Technologies Invitrogen) coupled to fluorescence amplification with the TSA Fluorescent Plus System (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Co-immunoprecipitations (coIP), Western blots

Transfected cells were lysed in buffer containing 50 mM Tris buffer pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). The buffer additionally contained 1% Triton X-100 for β-catenin and Flag immunoprecipitation, or 1% Triton X-100 and 1% NP-40 for ASF/SF2 immunoprecipitation, or 1% NP-40 for HA immunoprecipitation. Lysates were cleared by centrifugation at 12000g for 20 mn at 4°C, and the protein extracts were then treated with 1 µL of 0.1 mg/mL RNaseA for 30 min on ice when indicated. Immunoprecipitation was performed using 1 mg of lysate supernatant incubated overnight at 4°C with gentle rocking in 1 mL of lysis buffer with the appropriate antibody: anti-Flag antibody (5 µg of clone M2, Sigma Aldrich), anti-β-catenin antibody (1 µg of clone 14, BD Biosciences), anti-HA antibody (20 µL of agarose beads coupled to clone 3F10, Roche Applied Science), anti ASF/SF2 antibody (3 µg of sc-33652, Santa Cruz Biotechnology Inc.). After adding 25 µL of Protein-G-agarose beads (Roche Applied Science) for 2 hours at 4°C, the beads were washed in lysis buffer. The immunoprecipitated material was eluted using SDS-PAGE sample loading buffer and analyzed by Western blots performed as described (Gross et al., 2005).

Chromatin immunoprecipitations (ChIP)

Transfected HCT116 cells were fixed with 1% (v/v) formaldehyde for 10 min at RT and quenched with 0.125 M Glycine for 5 min. ChIPs were carried out using the EZ-Magna ChIP™ G Chromatin Immunoprecipitation kit (Upstate Millipore, Billerica, MA). Sheared crosslinked chromatin from ~ 10^6 cells was incubated overnight at 4°C with 1 µg of normal

mouse IgG (Upstate Millipore) or the appropriate antibody. Input corresponds to non-immunoprecipitated sheared crosslinked chromatin from 10^5 cells. PCR analysis was performed with 1/25th of immunoprecipitated DNA as template and primers located in the human SI promoter (GGCTGGTAAGGGTGCAATAA / GCCTGTTCTCTTTGCTATGTTG; annealing: 55 °C).

In vitro DNA repair assays

Cell free extracts were prepared as follows. $3x10^7$ transfected cells were washed in cold PBS, suspended in four packed cell volumes of cold hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT, 5 mM MgCl2, 1 mM EDTA and protease inhibitors), incubated for 40 min on ice and disrupted using a Dounce homogenizer (40 strokes). Sucrose was added to reach 250 mM. Extracts were centrifuged 10 min at 1000 g to discard cell debris and washed again in hypotonic lysis buffer containing 250 mM sucrose. Nuclear pellet was then suspended in two volumes of nuclear extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 20% glycerol, 500 mM NaCl and protease inhibitors) and incubated for 30 minutes on ice. Nuclear extracts were clarified by 30 min centrifugation at 21000 g and dialyzed overnight against 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol, 25 mM NaCl and 0.2 mM PMSF.

End-joining reaction was performed in 30 µL by incubating 50 ng of BamHI-linearized pcDNA3 plasmid with 5 mg of nuclear extract for 1 h at 25°C in 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM MgCl2, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 50 mM dNTP, 80 mM NaCl and protease inhibitors. Reaction was stopped by RNAse treatment (0.25 mg mL-1 of RNAse for 10 min at 37°C) followed by proteinase K (0.5% SDS, 50 mM EDTA and 1 mg mL-1 of proteinase K at 37°C for 1 h). DNA was purified by phenol and chloroform extraction, recovered by ethanol precipitation and analyzed by electrophoresis on a 0.85% agarose gel.

Statistical analyses

P-value calculation indicated significant differences tested by the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Acknowledgements

The Genbank accession number of human *miniCDX2* is KJ531444. This work was supported by the INSERM and the Fondation ARC (grants 3759 and 4872). A.N., C.B. and C.S. were funded by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, France. T.S. was also funded by the Worldwide Cancer Research, UK (AICR, 08-0199), and C.B. by the Ligue contre le Cancer (France). We thank Dr MA Birling (MCI, Illkirch, France) for generating the *jojo-Flag-miniCdx2* mice, Prof MP Chenard (CHU de Strasbourg-Hautepierre, France) for pathological evaluation of the mice, Dr S Robine (CNRS, UMR 144, Institut Curie, Paris, France) for the *VilCre* mice, Prof B Chabot (Université de Sherbrooke) for the plasmids pHis-SRp30c and pHis-ASF/SF2, and Dr JF Launay (Inserm U682, Strasbourg, France) for help in C2T antibody purification.

The authors declare no financial competing interest.

References

Abdel-Samad, R., Zalzali, H., Rammah, C., Giraud, J., Naudin, C., Dupasquier, S., Poulat, F., Boizet-Bonhoure, B., Lumbroso, S., Mouzat, K., et al. (2011). MiniSOX9, a dominant-negative variant in colon cancer cells. Oncogene *30*, 2493–2503.

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. *16*, 3797–3804.

Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2003). Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc+/Delta716 Cdx2+/- compound mutant mice. Nat. Genet. *35*, 323–330.

Aoki, K., Kakizaki, F., Sakashita, H., Manabe, T., Aoki, M., and Taketo, M.M. (2011). Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. Cancer Res. *71*, 593–602.

Bae, J.M., Lee, T.H., Cho, N.-Y., Kim, T.-Y., and Kang, G.H. (2015). Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. World J. Gastroenterol. *21*, 1457–1467.

Beck, F., Chawengsaksophak, K., Waring, P., Playford, R.J., and Furness, J.B. (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in cdx2 mutant mice. Proc Natl Acad Sci U A *96*, 7318–7323.

Benahmed, F., Gross, I., Gaunt, S.J., Beck, F., Jehan, F., Domon-Dell, C., Martin, E., Kedinger, M., Freund, J.N., and Duluc, I. (2008). Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. Gastroenterology *135*, 1238–1247, 1247.

Bonhomme, C., Duluc, I., Martin, E., Chawengsaksophak, K., Chenard, M.-P., Kedinger, M., Beck, F., Freund, J.-N., and Domon-Dell, C. (2003). The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. Gut *52*, 1465–1471.

Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J., and Brattain, D.E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. Cancer Res *41*, 1751–1756.

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., and Rousset, M. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose- dependent negative regulation. JCell Sci *107*, 213–225.

Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V.E., Kontgen, F., and Beck, F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. Nature *385*, 84–87.

Chepelev, I., and Chen, X. (2013). Alternative splicing switching in stem cell lineages. Front. Biol. *8*, 50–59.

Cieply, B., and Carstens, R.P. (2015). Functional roles of alternative splicing factors in human disease. Wiley Interdiscip. Rev. RNA *6*, 311–326.

Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. Cell *154*, 274–284.

Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P.L., Serup, P., and Mansouri, A. (2007). Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. J Clin Invest *117*, 961–970.

Crissey, M.A.S., Guo, R.-J., Funakoshi, S., Kong, J., Liu, J., and Lynch, J.P. (2011). Cdx2 levels modulate intestinal epithelium maturity and Paneth cell development. Gastroenterology *140*, 517–528.e8.

Dalerba, P., Sahoo, D., Paik, S., Guo, X., Yothers, G., Song, N., Wilcox-Fogel, N., Forgó, E., Rajendran, P.S., Miranda, S.P., et al. (2016). CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. N. Engl. J. Med. *374*, 211–222.

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

El Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., 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.

Flores, M.V., Hall, C.J., Davidson, A.J., Singh, P.P., Mahagaonkar, A.A., Zon, L.I., Crosier, K.E., and Crosier, P.S. (2008). Intestinal differentiation in zebrafish requires Cdx1b, a functional equivalent of mammalian Cdx2. Gastroenterology. *135*, 1665–1675.

Freund, J.N., Duluc, I., Reimund, J.M., Gross, I., and Domon-Dell, C. (2015). Extending the functions of the homeotic transcription factor Cdx2 in the digestive system through nontranscriptional activities. World J Gastroenterol *21*, 1436–1443.

Gao, N., White, P., and Kaestner, K.H. (2009). Establishment of Intestinal Identity and Epithelial-Mesenchymal Signaling by Cdx2. Dev.Cell *16*, 588–599.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol. *36*, 59–74.

Gross, I., Lhermitte, B., Domon-Dell, C., Duluc, I., Martin, E., Gaiddon, C., Kedinger, M., and Freund, J.N. (2005). Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. Oncogene *24*, 7955–7963.

Gross, I., Duluc, I., Benameur, T., Calon, A., Martin, E., Brabletz, T., Kedinger, M., Domon-Dell, C., and Freund, J.-N. (2008). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. Oncogene *27*, 107–115.

Guo, R.-J., Funakoshi, S., Lee, H.H., Kong, J., and Lynch, J.P. (2010). The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. Carcinogenesis *31*, 159–166.

Hryniuk, A., Grainger, S., Savory, J.G.A., and Lohnes, D. (2014). Cdx1 and Cdx2 function as tumor suppressors. J. Biol. Chem. *289*, 33343–33354.

Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., and Stamm, S. (2013). Function of alternative splicing. Gene *514*, 1–30.

Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. Gene *299*, 1–34.

Lefebvre, O., Sorokin, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1999). Developmental expression and cellular origin of the laminin alpha2, alpha4, and alpha5 chains in the intestine. Dev Biol *210*, 135–150.

Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., III, McCoy, C.E., Mazur, K.C., and Mabry, N.D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. Cancer Res *36*, 4562–4569.

Li, H., and Jasper, H. (2016). Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. Dis. Model. Mech. *9*, 487–499.

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.

Murakami, H., and Masui, H. (1980). Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *77*, 3464–3468.

Mutoh, H., Hakamata, Y., Sato, K., Eda, A., Yanaka, I., Honda, S., Osawa, H., Kaneko, Y., and Sugano, K. (2002). Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. Biochem.Biophys.Res.Commun. *294*, 470–479.

Nilsen, T.W., and Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature *463*, 457–463.

Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., and Wright, C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. Development *122*, 983–995.

Paradis, C., Cloutier, P., Shkreta, L., Toutant, J., Klarskov, K., and Chabot, B. (2007). hnRNP I/PTB can antagonize the splicing repressor activity of SRp30c. RNA N. Y. N *13*, 1287–1300.

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.

Renouf, B., Soret, C., Saandi, T., Delalande, F., Martin, E., Vanier, M., Duluc, I., Gross, I., Freund, J.N., and Domon-Dell, C. (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. Nucleic Acids Res *40*, 3456–3469.

Rings, E.H., Boudreau, F., Taylor, J.K., Moffett, J., Suh, E.R., and Traber, P.G. (2001). Phosphorylation of the serine 60 residue within the cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. Gastroenterology *121*, 1437–1450.

Rodolosse, A., Chantret, I., Lacasa, M., Chevalier, G., Zweibaum, A., Swallow, D., and Rousset, M. (1996). A limited upstream region of the human sucrase-isomaltase gene confers glucose-regulated expression on a heterologous gene. Biochem.J. *315*, 301–306.

Saandi, T., Baraille, F., Derbal-Wolfrom, L., Cattin, A.L., Benahmed, F., Martin, E., Cardot, P., Duclos, B., Ribeiro, A., Freund, J.N., et al. (2013). Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4alpha in intestinal cancer. Oncogene *32*, 3782–3788.

San Roman, A.K., Tovaglieri, A., Breault, D.T., and Shivdasani, R.A. (2015). Distinct Processes and Transcriptional Targets Underlie CDX2 Requirements in Intestinal Stem Cells and Differentiated Villus Cells. Stem Cell Rep. *5*, 673–681.

Scholl, C., Bansal, D., Dohner, K., Eiwen, K., Huntly, B.J., Lee, B.H., Rucker, F.G., Schlenk, R.F., Bullinger, L., Dohner, H., et al. (2007). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. J.Clin.Invest. *117*, 1037–1048.

Silberg, D.G., Sullivan, J., Kang, E., Swain, G.P., Moffett, J., Sund, N.J., Sackett, S.D., and Kaestner, K.H. (2002). Cdx2 Ectopic Expression Induces Gastric Intestinal Metaplasia in Transgenic Mice. Gastroenterology *122*, 689–696.

Simmini, S., Bialecka, M., Huch, M., Kester, L., van de Wetering, M., Sato, T., Beck, F., van Oudenaarden, A., Clevers, H., and Deschamps, J. (2014). Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. Nat. Commun. *5*, 5728.

Stoneley, M., Spencer, J.P., and Wright, S.C. (2001). An internal ribosome entry segment in the 5’ untranslated region of the mnt gene. Oncogene *20*, 893–897.

Stringer, E.J., Duluc, I., Saandi, T., Davidson, I., Bialecka, M., Sato, T., Barker, N., Clevers, H., Pritchard, C.A., Winton, D.J., et al. (2012a). Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. Dev. Camb. Engl. *139*, 465–474.

Stringer, E.J., Duluc, I., Saandi, T., Davidson, I., Bialecka, M., Sato, T., Barker, N., Clevers, H., Pritchard, C.A., Winton, D.J., et al. (2012b). Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. Development. *139*, 465–474.

Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature *398*, 422–426.

Thoene, S., Rawat, V.P., Heilmeier, B., Hoster, E., Metzeler, K.H., Herold, T., Hiddemann, W., Gokbuget, N., Hoelzer, D., Bohlander, S.K., et al. (2009). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia *23*, 649–655.

Verzi, M.P., Shin, H., Ho, L.-L., Liu, X.S., and Shivdasani, R.A. (2011). Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. Mol. Cell. Biol. *31*, 2026–2039.

van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. Cell *88*, 789–799.

Wethmar, K., Smink, J.J., and Leutz, A. (2010). Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *32*, 885–893.

Witek, M.E., Snook, A.E., Lin, J.E., Blomain, E.S., Xiang, B., Magee, M.S., Magee, M., and Waldman, S.A. (2014). A novel CDX2 isoform regulates alternative splicing. PloS One *9*, e104293.

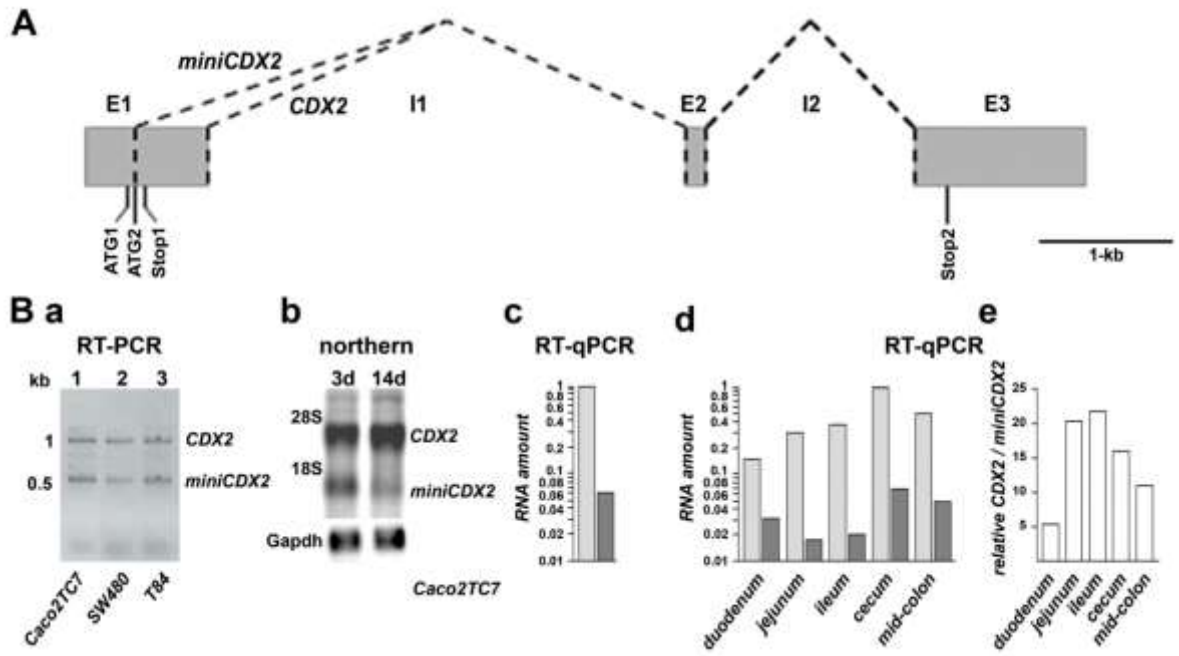

Figure 1. Alternative splicing at the *CDX2* locus

A. *CDX2* gene map. E1-3: Exon-1 to -3; I1-2; Intron-1 and -2; dotted lines represent the spliced regions to produce respectively the *CDX2* and *miniCDX2* mRNAs. The translation start codons ATG_1 and ATG_2, and the stop codons $Stop_1$ and $Stop_2$ are indicated. **B.** Expression of the *miniCDX2* transcript. **a.** RT-PCR on the indicated intestinal cell lines with the primers CDX21F / CCR hybridizing respectively upstream of ATG_1 in the Exon-1 and downstream of $Stop_2$ in the Exon-3. The 2 bands correspond to the *CDX2* and *miniCDX2* transcripts. **b.** Northern blot of polyA RNA (10 µg per lane) from Caco2TC7 cells cultured for 3 days and 14 days revealing the *CDX2* and *miniCDX2* mRNA. **c.** RT-qPCR quantification of *CDX2* (light grey) and *miniCDX2* mRNA (dark grey) in 3 days Caco2TC7 cells (semi-logarithmic scale). **d.** RT-qPCR of *CDX2* (light grey) and *miniCDX2* mRNA (dark grey) (semi-logarithmic scale) along the murine gut; *CDX2* was arbitrary set at 1 in the cecum. **e.** *CDX2* / *miniCDX2* mRNA ratio along the mouse intestine.

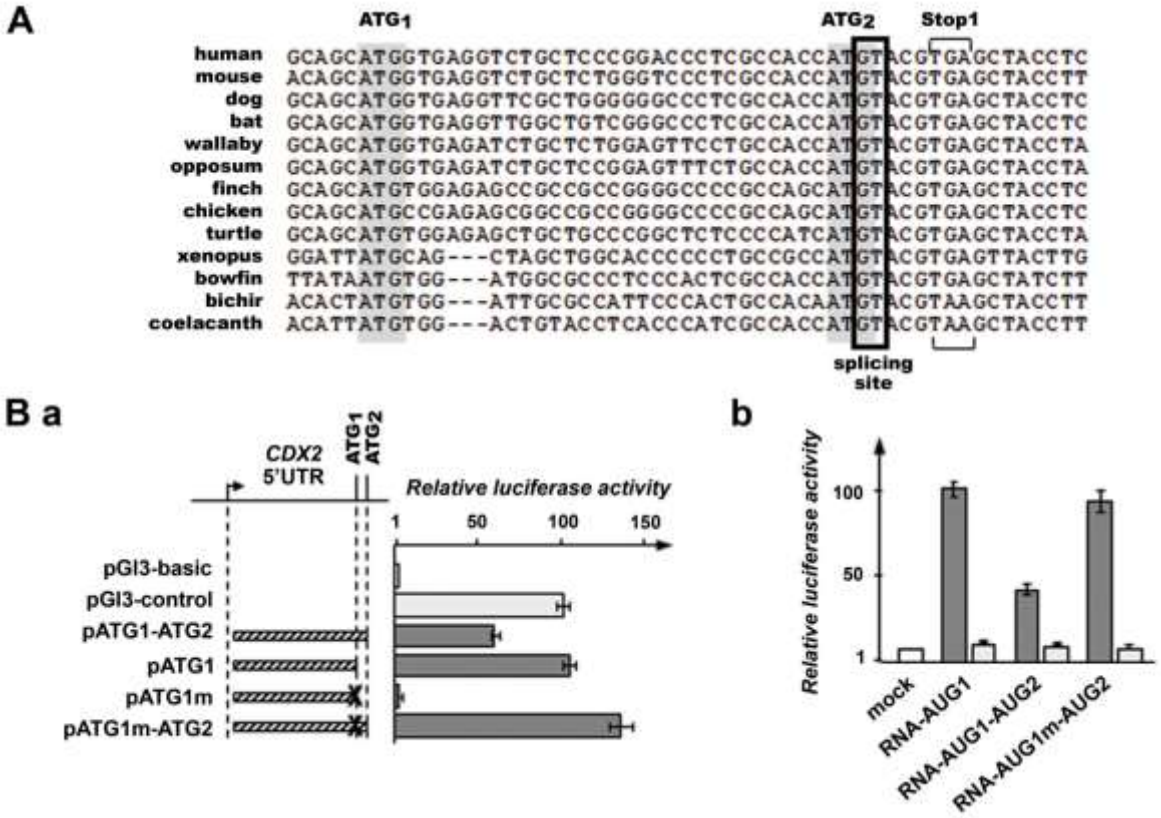

Figure 2. Functionality of the conserved alternative splicing / translation motif of the *CDX2* locus

A. The conserved motif found in *CDX2*-type genes (see also Figure 2 – figure supplement 2). **B. a.** Luciferase activity in human colon cancer HCT116 cells transfected with the indicated reporter plasmids; X designates the mutation of ATG_1 into TAG in pATG1m and in pATG1m-ATG2; pGl3-control was set to 100 and pGl3-basic gave background activity. **b.** Luciferase activity in HCT116 cells transfected with *in vitro*-transcribed polyadenylated RNA without (light grey) or with m7G cap (dark grey). Data are given as mean ±SD for triplicates.

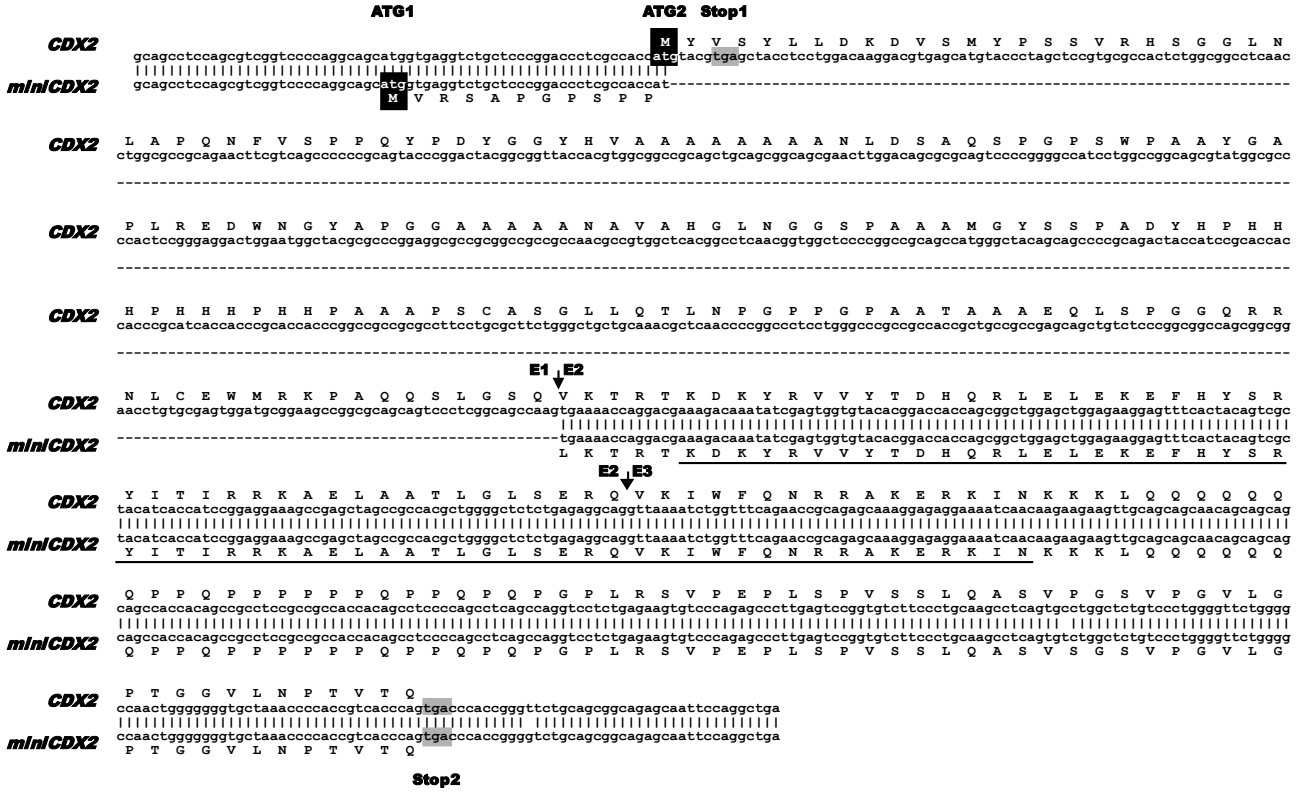

Figure 2 – supplement figure 1

DNA sequence of the two RT-PCR fragments amplified from Caco2TC7 cells RNA using the primers CDX2-1F / CCR: they correspond to the original *CDX2* mRNA and to the splicing variant *miniCDX2*, respectively. Dots indicate the segment spliced out in *miniCDX2*. E1/E2 and E2/E3 mark the boundaries between Exon-1 and -2 and between Exon-2 and -3 in the *CDX2* mRNA. Sequences of the CDX2 and miniCDX2 proteins are given in capital letters. The translation start site used for the CDX2 protein is ATG_2 and the one used for miniCDX2 is ATG_1. The DNA-binding homeodomain is underlined. The translation stop codon Stop1 is in frame with ATG_1 in the *CDX2* transcript but out of frame with ATG_2; it is lost in the *miniCDX2* variant. The stop codon Stop2 is used for both CDX2 and miniCDX2 proteins. The Genbank accession number of the miniCDX2 sequence is KJ531444.

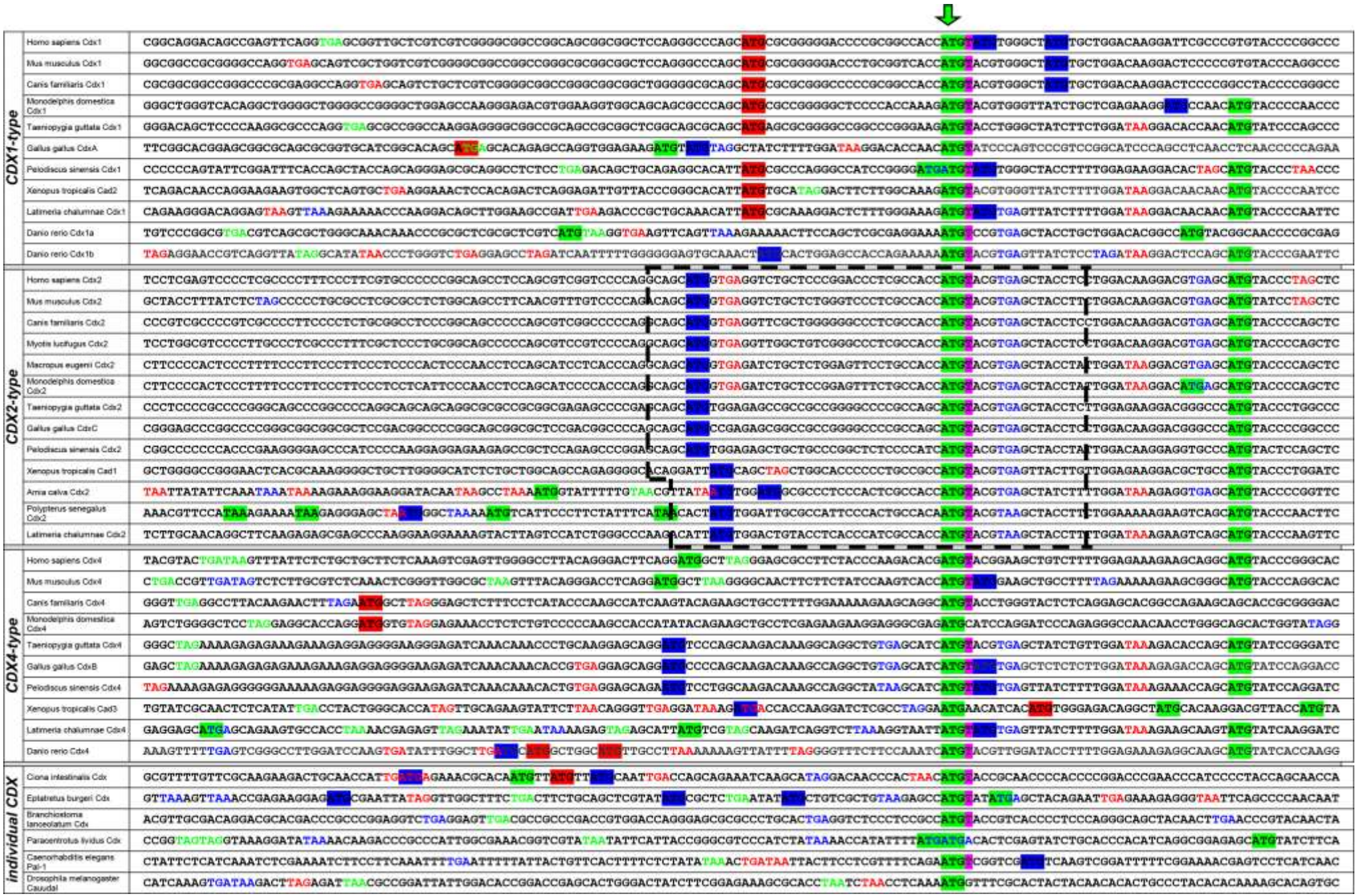
CDX1-type
Homo sapiens Cdx1
Mus musculus Cdx1
Canis familiaris Cdx1
Monodelphis domestica Cdx1
Taeniopygia guttata Cdx1
Gallus gallus CdxA
Pelodiscus sinensis Cdx1
Xenopus tropicalis Cad2
Latimeria chalumnae Cdx1
Danio rerio Cdx1a
Danio rerio Cdx1b
CDX2-type
Homo sapiens Cdx2
Mus musculus Cdx2
Canis familiaris Cdx2
Myotis lucifugus Cdx2
Macropus eugenii Cdx2
Monodelphis domestica Cdx2
Taeniopygia guttata Cdx2
Gallus gallus CdxC
Pelodiscus sinensis Cdx2
Xenopus tropicalis Cad1
Anas calva Cdx2
Polypterus senegalus Cdx2
Latimeria chalumnae Cdx2
CDX4-type
Homo sapiens Cdx4
Mus musculus Cdx4
Canis familiaris Cdx4
Monodelphis domestica Cdx4
Taeniopygia guttata Cdx4
Gallus gallus CdxB
Pelodiscus sinensis Cdx4
Xenopus tropicalis Cad3
Latimeria chalumnae Cdx4
Danio rerio Cdx4
individual CDX
Ciona intestinalis Cdx
Eptatretus burgeri Cdx
Branchiostoma lanceolatum Cdx
Paracentrotus lividus Cdx
Caenorhabditis elegans Pal-1
Drosophila melanogaster Caudal

Figure 2 – supplement figure 2

Alignment of 40 *CDX* gene sequences in the region surrounding the canonical ATG codon used as translation start site for the CDX proteins (highlighted in green, arrow). This canonical ATG corresponds to ATG_2 in the Figures 1A and 2A. Other ATGs present in these 150-bp sequences are highlighted in green if they are in the same frame as the CDX protein translation start codon, or in red or blue for the two other frames. Stop codons in these frames are in the corresponding colors. The conserved T following the CDX protein start site is in purple. The region boxed for the *CDX2*-type genes is shown in the Figure 2A.

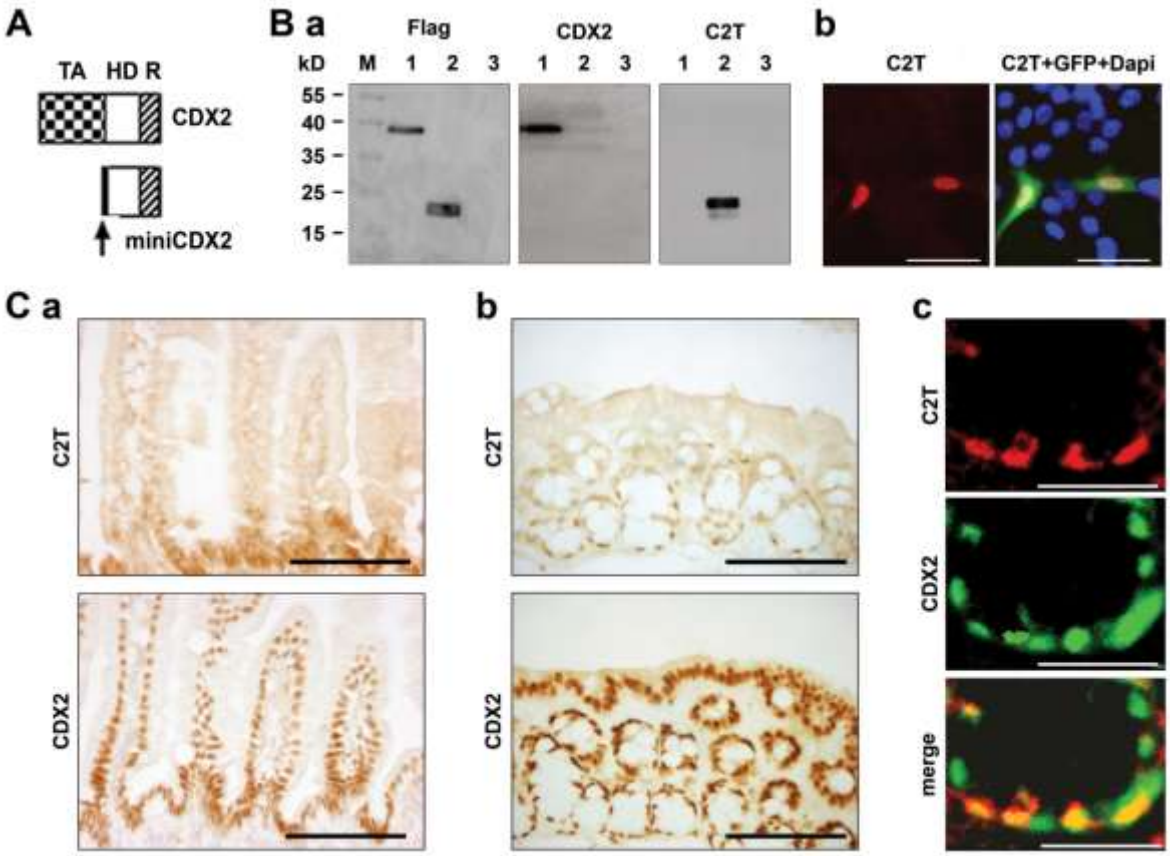

Figure 3. Protein expression of the miniCDX2 variant

A. Structure of the CDX2 and miniCDX2 proteins: TA, transactivation domain; HD, DNA-binding homeodomain; R, regulatory domain. The arrow points to the 12-aa Nter peptide of miniCDX2. **B.** The C2T antibody raised against the 12-aa Nter peptide of miniCDX2. **a.** HCT116 cells transfected with the plasmid pFlag-CDX2 (lane 1), pFlag-miniCDX2 (lane 2) or the empty vector pFlag-CMV2 (lane 3) were analyzed by western blot with Flag, CDX2 or C2T antibodies. The Flag antibody reveals both Flag-CDX2 and Flag-miniCDX2 proteins, whereas the CDX2 and C2T antibodies respectively detect Flag-CDX2 and Flag-miniCDX2. **b.** HCT116 cells co-transfected with pFlag-miniCDX2 and pEGFP showed nuclear localization of Flag-miniCDX2 (Flag antibody, red). Bars: 10 µm. **C.a.** Immunodetection of the miniCDX2 (C2T antibody) and CDX2 proteins in the small intestine of 2-day-old mouse neonates. **b.** same in the proximal colon of adult mice. Bars: 100 µm. **c.** Co-immunofluorescence detection of the miniCDX2 (C2T) and CDX2 proteins in the proximal colon of adult mice. Bars: 20 µm.

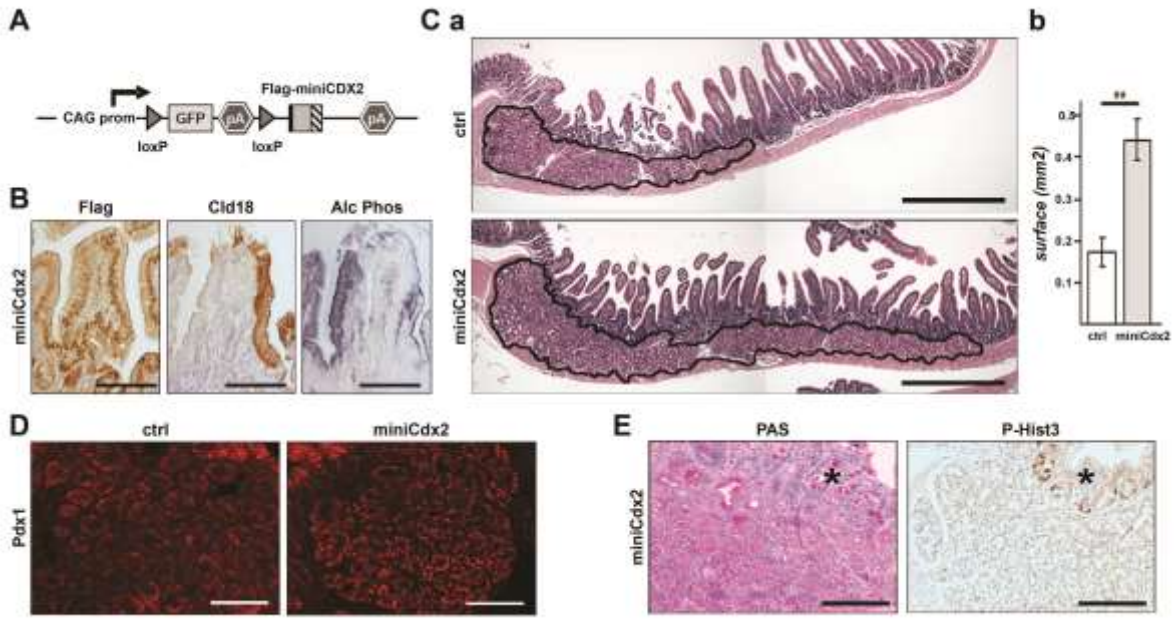

Figure 4. Overexpression of miniCDX2 in transgenic mice

A. Map of the *jojo-Flag-miniCDX2* transgene with the CAG promoter, the loxP/Cre-excisable cassette containing the GFP coding sequence followed by a transcriptional stop (pA), and the Flag-miniCDX2 coding sequence. **B.** Serial sections of rare small intestinal villi of *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice showing Flag-miniCDX2 expression accompanied by the loss of Alkaline Phosphatase and the ectopic expression of Claudin-18. Bars: 50 µm. **C. a.** Histology of the Brunner's glands of *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice (miniCdx2) compared to control *jojo-Flag-miniCDX2* animals (ctrl); bars: 500 µm. **b**. Quantification of the surface of the Brunner's glands in 3-4 month-old control *jojo-Flag-miniCDX2* (ctrl, n=12) and *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice (miniCdx2, n=9); **p<0.01. **D.** Pdx1 immunofluorescence staining in control *jojo-Flag-miniCDX2* (ctrl) and *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* (miniCdx2) mice; bars: 100 µm. **E.** The Brunner's glands of the *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice show no major change in cell differentiation (PAS staining) and no obvious activation of the cell proliferation (P-Hist3). Bars: 100 µm. The asterisks label the duodenal crypts overlaying the Brunner's glands.

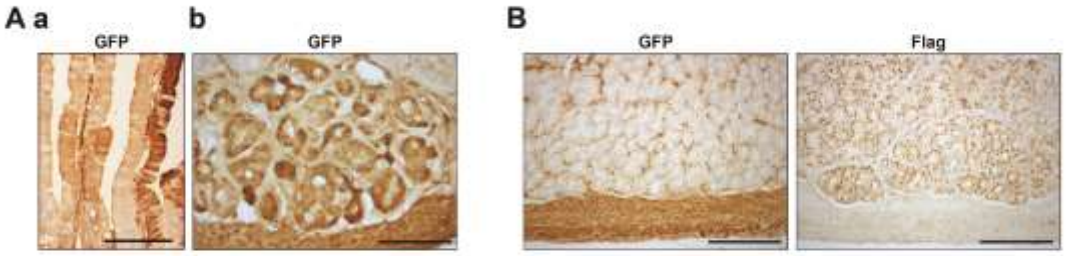

Figure 4 – supplement figure 1

A. GFP immunostaining in *jojo-Flag-miniCDX2* mice reveals only rare small intestinal villi in which ribbons of epithelial cells express the transgene (**a**); on the contrary, the transgene is highly expressed in the Brunner's glands (**b**); note the expression of GFP in the underlying muscle layers. Bars: 100 µm. **B.** In *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice, GFP was lost while Flag immunostaining appeared in the nuclei of the Brunner's glands, demonstrating the elimination of the Stop cassette and the onset of expression of Flag-miniCDX2. On the contrary, the underlying muscle layers in which the Villin promoter is not active continued to express GFP. Bars: 100 µm.

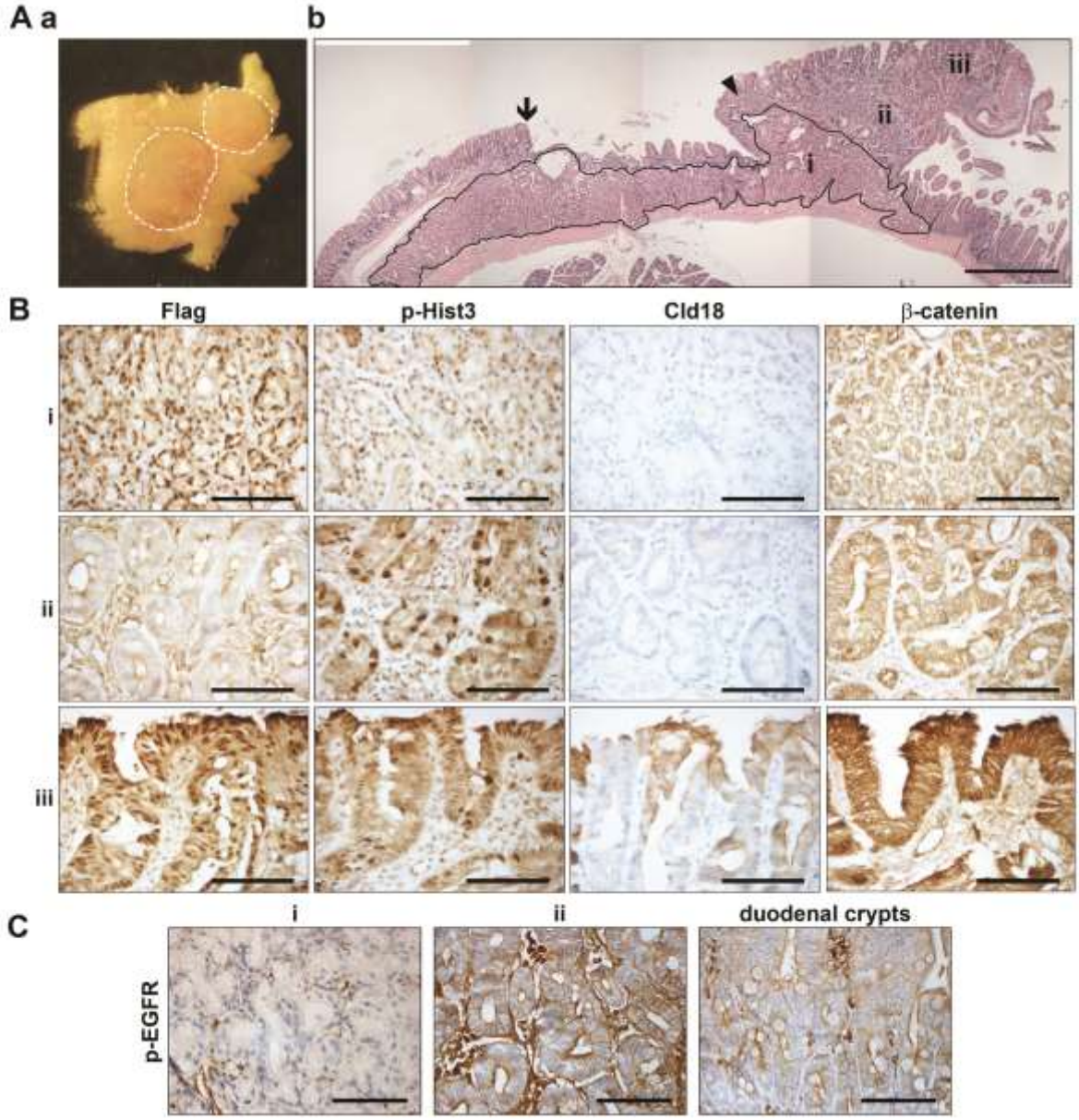

Figure 5. Duodenal lesions in aged *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mice

A.a. Macroscopic view of 2 adjacent polyps grown in the duodenal region of a 18 month-old *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre* mouse. **b.** Histology of a polyp near the gastric-intestinal boundary (arrow); (i), (ii) and (iii) respectively designate the expanded territory of Brunner's glands (encircled), the hyper-proliferating crypts and the surface area. The arrowhead locates squamous stratified epithelium. Bar: 500 µm. **B.** Immunostaining of Flag-miniCDX2, phospho-Histone-3, Claudin-18 and β-catenin in the regions (i), (ii) and (iii) of the duodenal polyp. Bars: 50 µm. **C.** Phospho-EGFR immunodetection in the regions (i) and (ii) of the polyps, and in normal adjacent duodenal crypts. Bars: 50 µm.

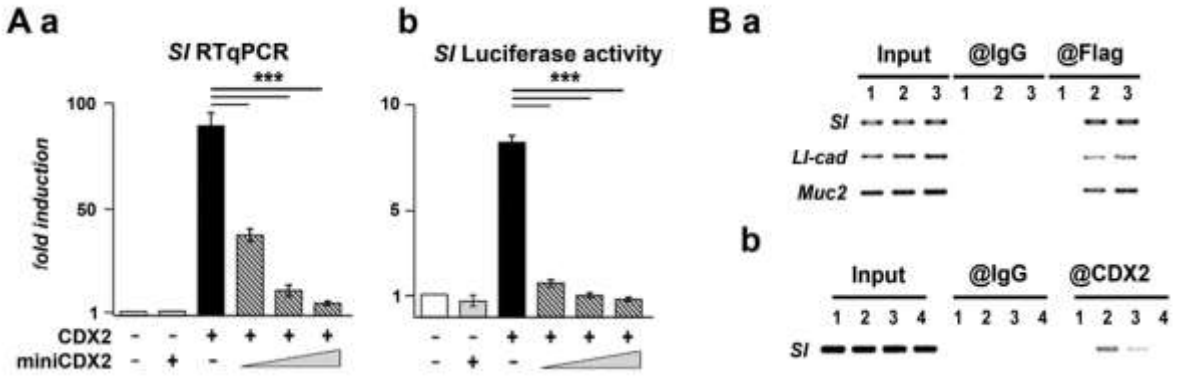

Figure 6. Effect of miniCDX2 on the transcriptional activity of the CDX2 protein

A. RT-qPCR quantification of the *SI* RNA (**a**) and pSI-luc luciferase activity (**b**) in HCT116 cells transfected with pFlag-miniCDX2 or with pFlag-CDX2 or with pFlag-CDX2 together with increasing amounts of pFlag-miniCDX2; data are given as mean ±SD for triplicates (***p<0.001). **B.a.** HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 1), pFlag-CDX2 (lane 2) or pFlag-miniCDX2 (lane 3) were processed for ChIP with anti-Flag or IgG. DNA was PCR-amplified with primers of the *SI*, *LI-cadherin* and *Muc2* promoters. **b.** HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 1), with pFlag-CDX2 (lane 2), with pFlag-CDX2 with a 3-fold molar excess of pFlag-miniCDX2 (lane 3), or with pFlag-miniCDX2 (lane 4) were processed for ChIP with anti-CDX2 or IgG; *SI* promoter DNA was amplified by PCR.

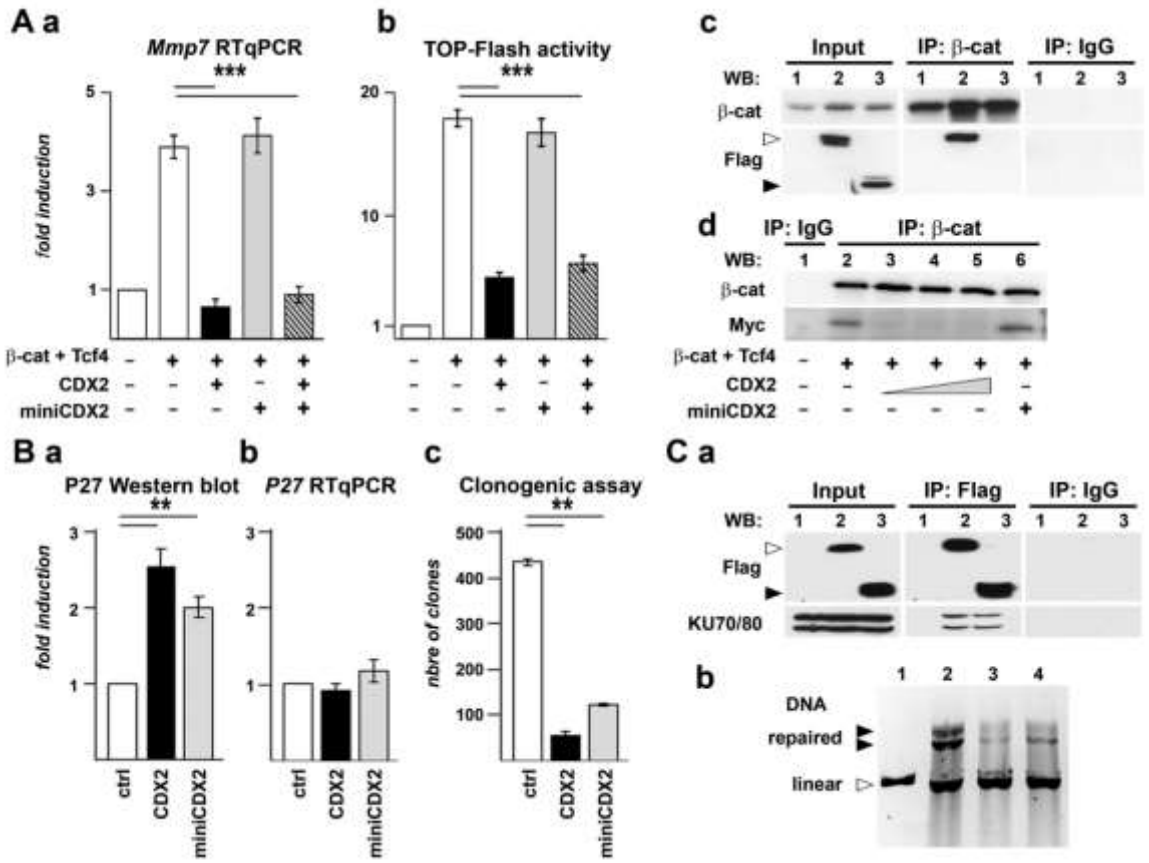

Figure 7. Effect of miniCDX2 on transcription-independent activities of CDX2

A. RT-qPCR quantification of the *Mmp7* RNA (**a**) and TOP-Flash luciferase activity (**b**) in HEK293 cells transfected with pS33A-β-catenin, pMyc-Tcf4, pFlag-CDX2 and/or pFlag-miniCDX2; data are given as mean ±SD for triplicates (***p<0.001). **c.** Proteins from cells transfected with pS33A-βcatenin alone (lane 1), with pS33A-βcatenin together with pFlag-CDX2 (lane 2), or with pS33A-βcatenin together with pFlag-miniCDX2 (lane 3) were immunoprecipitated with anti-β-catenin or IgG and analyzed by western blot with anti-β-catenin and with anti-Flag to reveal Flag-CDX2 (▷) and Flag-miniCDX2 (▶). **d.** Proteins from cells transfected with pS33A-βcatenin and pMyc-Tcf4 together with increasing amounts of pFlag-CDX2 or with pFlag-miniCDX2 were immunoprecipitated with anti-β-catenin and analyzed by western blot with anti-β-catenin and anti-Myc to check the β-catenin/Tcf4 interaction. **B**. Western blot (**a**) and RT-qPCR (**b**) quantification of $P27^{KIP1}$ protein and RNA in HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (ctrl), pFlag-CDX2 or pFlag-miniCDX2. **c**. Clonogenic assays on HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (ctrl), pFlag-CDX2 or pFlag-miniCDX2. Data are means ±SD for triplicates (**p<0.01). **C. a.** Proteins from cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 1), pFlag-CDX2 (lane 2) or pFlag-miniCDX2 (lane 3)

were immunoprecipitated with anti-Flag or IgG and analyzed by western blot with anti-Flag and anti-KU70/80 to check for KU70/80 interaction with Flag-CDX2 (▷) and Flag-miniCDX2 (▶). **b** For DNA repair assays, linearized plasmid pcDNA3 (lane 1) was incubated with nuclear extracts of SW480 cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 2), pFlag-CDX2 (lane 3) or pFlag-miniCDX2 (lane 4), and then separated by electrophoresis on an agarose gel. The linear and repaired (circular and/or concatemers) plasmid forms are indicated.

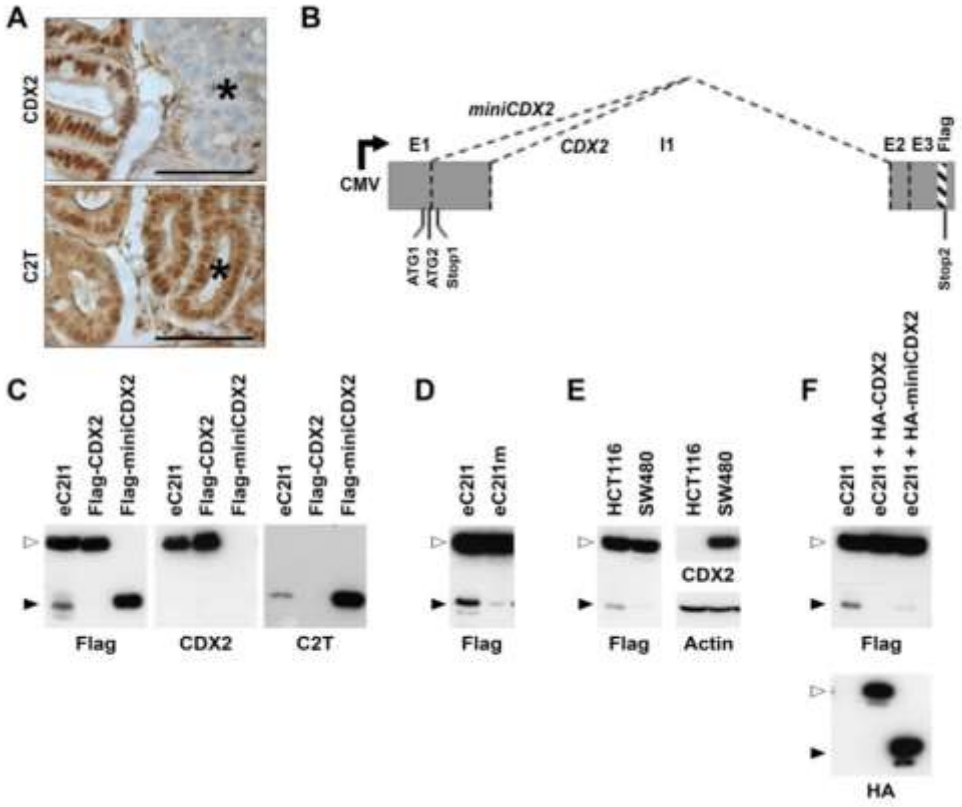

Figure 8. Auto-regulation of the *CDX2* pre-mRNA splicing

A. Immunodetection of the CDX2 and miniCDX2 (C2T antibody) proteins at the border between normal caecal epithelium and heteroplasia (asterisk) in *Cdx2*$^{+/-}$ mice. Bars: 50 µm. **B.** Map of the eC2I1 reporter plasmid. **C**. Production of the two protein variants CDX2 (▷) and miniCDX2 (▶) from the reporter plasmid eC2I1. HCT116 cells were transfected either with the plasmids eC2I1, pFlag-CDX2 or pFlag-miniCDX2, and the proteins were revealed using anti-Flag, anti-CDX2 and anti-miniCDX2 (C2T) antibodies, respectively. **D**. HCT116 cells transfected with the plasmid eC2I1 or with the mutant form eC2I1m. **E**. Inverse correlation between the production of miniCDX2-Flag and the endogenous level of CDX2 in human colon cancer cell lines. Left panel: HCT116 and SW480 transfected with eC2I1. Right panel: endogenous level of expression of CDX2 protein in HCT116 and SW480 cells related to Actin. **F**. HCT116 cells transfected with eC2I1 and either the control empty plasmid, or the plasmids encoding pHA-CDX2 or pHA-miniCDX2. The lower panel confirms the expression of HA-CDX2 and HA-miniCDX2 in these cells, using anti-HA antibody.

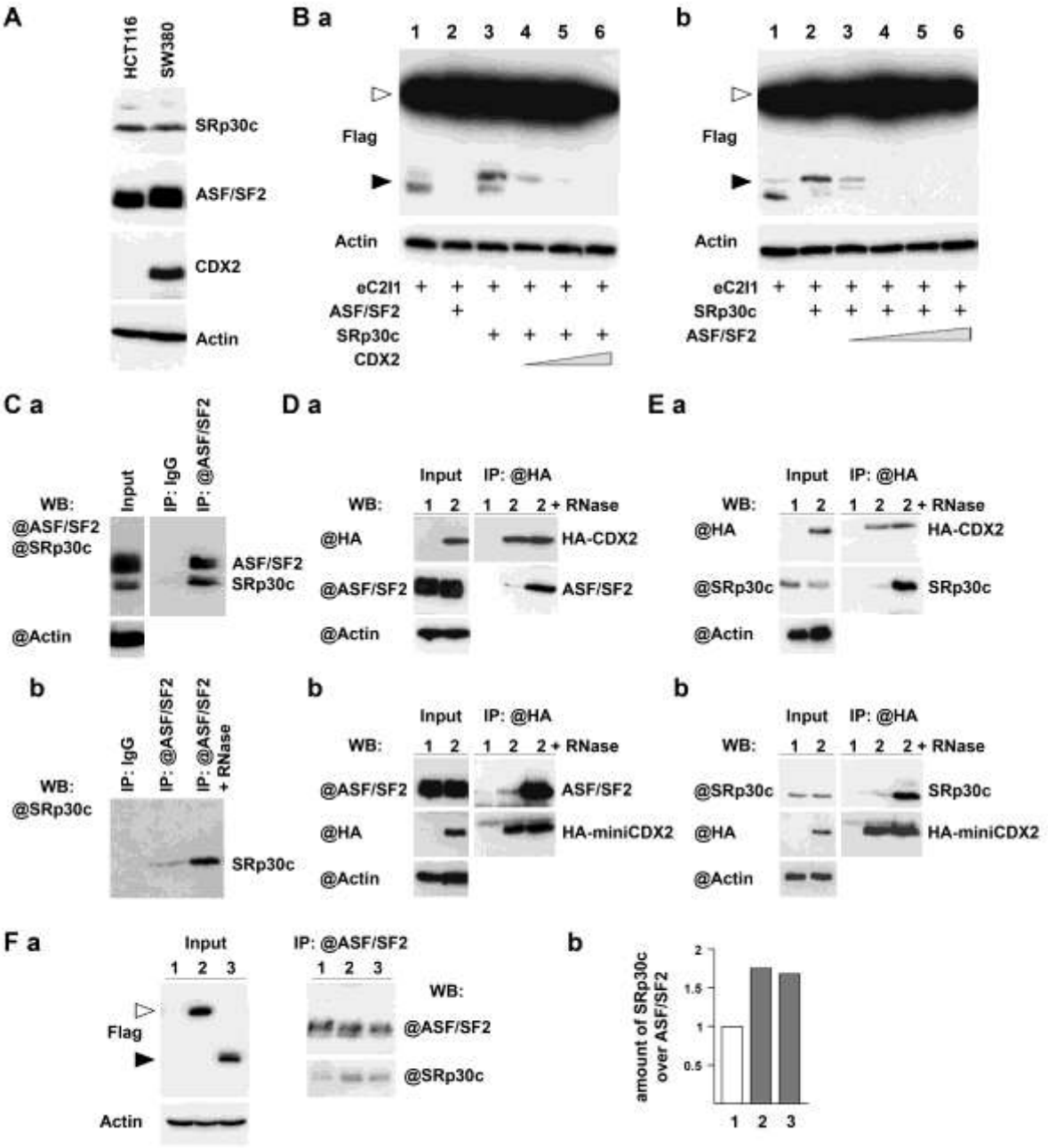

Figure 9. Mechanism of regulation of the *CDX2* pre-mRNA splicing

A. Expression of the splicing factors ASF/SF2 and SRp30c in HCT116 and SW480 colon cancer cells. **B**. Impact of ASF/SF2, SRp30c and CDX2 on the reporter plasmid eC2I1. HCT116 cells were transfected with eC2I1 and the expression plasmids for the indicated proteins, and the two splicing variants CDX2 (▷) and miniCDX2 (▶) were detected with anti-Flag antibody. **C**. Interaction between ASF/SF2 and SRp30c. **a**. HCT116 cells were transfected with the plasmids encoding His-ASF/SF2 and His-SRp30c. After immunoprecipitation with anti-ASF/SF2 antibody or with IgG, the proteins were revealed with anti-ASF/SF2 and anti-SRp30c antibodies. **b**. Endogenous proteins of HCT116 cells

were immunoprecipitated with IgG or with anti-ASF/SF2 antibody, or with anti-ASF/SF2 antibody after RNase treatment, and revealed with anti-SRp30c antibody. **D**. Interaction between ASF/SF2 and CDX2 or miniCX2. **a**. HCT116 cells were transfected with the control plasmids pCMV2-Flag (lane 1) or pHA-CDX2 (lane 2). Protein extracts immunoprecipitated with anti-HA beads and revealed with anti-HA and anti-ASF/SF2 antibodies. **b**. Same as (a) with pHA-miniCDX2 instead of pHA-CDX2. **E**. Interaction between SRp30c and CDX2 or miniCDX2. Same as (D) except that protein detection used anti-SRp30c instead of anti-ASF2/SF2 antibody. **F**. Effect of CDX2 and miniCDX2 on the interaction between ASF/SF2 and SRp30c. **a**. HCT116 cells were transfected with the control plasmid pCMV2-Flag (lane 1), with pHA-CDX2 (lane 2) or pHA-miniCDX2 (lane 3). Cell extracts were immunoprecipitated with anti-ASF/SF2 antibody and revealed with anti-ASF/SF2 and anti-SRp30c antibodies. **b**. Quantification of immunoprecipitated SRp30c relative to ASF/SF2.

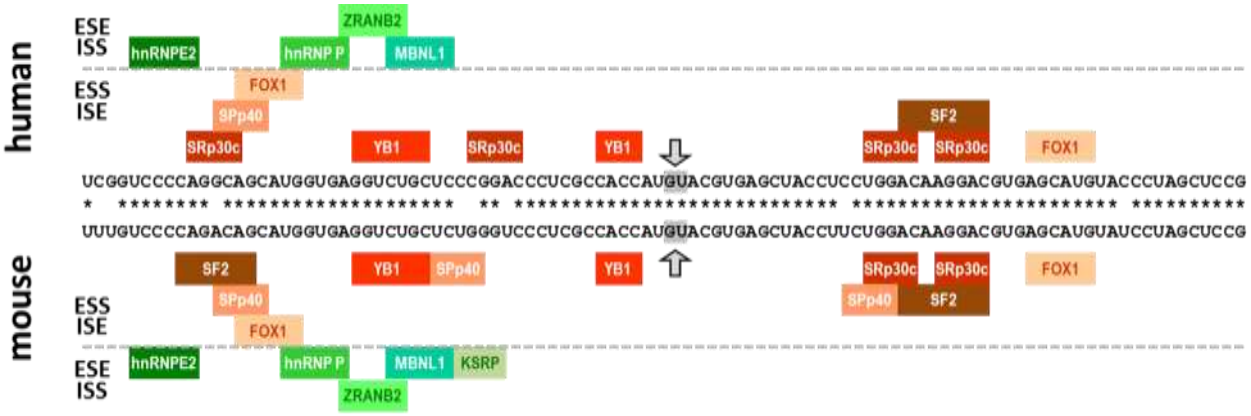

Figure 9 – supplement figure 1

Binding site prediction for splicing factors in the human and murine *CDX2* pre-mRNA sequence surrounding the alternative donor site used to produce the *miniCDX2* mRNA. The prediction used SpliceAid2 (http://193.206.120.249/splicing_tissue.html). The GU splicing site is labeled by the grey arrow. ESE, ISS, ESS and ISE respectively correspond to putative Exon Splicing Enhancer, Intron Splicing Silencer, Exon Splicing Silencer and Intron Splicing Enhancer sequences.

Supplementary Table 1

Detection of novel exonic sequences in caecal RNA

Sheet 1: Quality of reads generated from wild type Cecum tissue (Q: Phred score; PF: reads passing the Illumina chastity filter).

Sheet 2: List of novel potential exon-exon junctions detected in the wild type cecum. The chromosomic coordinates of the potential junction is indicated, as well as the distance to the closest gene transcriptional start site (TSS), ensembl gene identifier, gene name, and the location of the novel jonction in respect to the known gene (promoter region, intronic region, distal intergenic region). The list of gene potentially expressed in intestinal stem cells, as described from Munoz et al. (2012), is also indicated.

Sheet 3: Localization of the novel exon-exon junctions with respect to reference gene model, and their frequency.

V. Résultats complémentaires

A. Etude du ratio miniCdx2/Cdx2 dans les tumeurs intestinales de souris $Apc^{+/\Delta 14}$

J'ai analysé par RT-qPCR l'expression relative des transcrits Cdx2 et miniCdx2 dans 3 tumeurs intestinales de souris $Apc^{+/\Delta 14}$ et dans la muqueuse adjacente saine. Globalement, nos résultats indiquent que le ratio Cdx2/miniCdx2 change en faveur de miniCdx2 dans les tumeurs des souris $Apc^{+/\Delta 14}$ en comparaison à la muqueuse saine **(Figure 30)**.

B. Etude du ratio miniCdx2/Cdx2 dans les tumeurs coliques humaines

J'ai également étudié par RT-qPCR l'expression relative des transcrits Cdx2 et miniCdx2 dans une petite collection de 8 CCR humains et dans la muqueuse adjacente saine. Dans la muqueuse saine, l'expression de miniCdx2 est 10 à 30 fois plus faible que celle de Cdx2. Dans les tumeurs, l'expression de Cdx2 diminue alors que celle de miniCdx2 augmente dans la majorité des cas, de sorte que le ratio entre Cdx2 et miniCdx2 est modifié en faveur de miniCdx2 dans les tumeurs en comparaison à la muqueuse saine associée **(Figure 31)**.

L'ensemble de nos résultats montre que Cdx2 inhibe l'épissage conduisant à la synthèse de miniCdx2 tandis que dans les CCR, la réduction de l'expression de Cdx2 s'accompagne d'une augmentation du taux de miniCdx2. Puisque ce variant exerce un effet dominant-négatif sur l'activité transcriptionnelle de Cdx2 et que Cdx2 exerce une fonction de suppresseur de tumeurs dans l'intestin, nous émettons l'hypothèse que l'augmentation du rapport miniCdx2/Cdx2 dans les CCR participe à la progression tumorale.

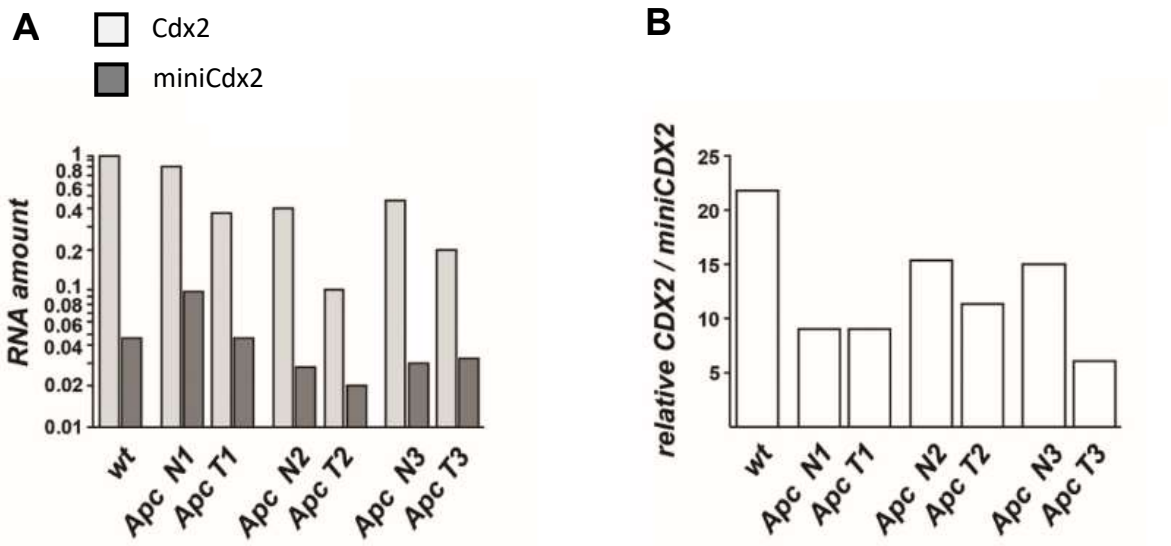

Figure 30: Altération de l'expression des transcrits Cdx2 et miniCdx2 dans les tumeurs intestinales de souris.

(A) Les ARNm Cdx2 et miniCdx2 ont été quantifiés par RT-qPCR dans l'iléon sain (wt), dans 3 tumeurs iléales de souris $Apc^{+/\Delta 14}$ (Apc T1-3) et dans la muqueuse adjacente normale associée aux tumeurs (Apc N1-3). L'expression du variant miniCdx2 a été normalisée par rapport à l'expression du variant Cdx2, arbitrairement fixée à 1 dans l'iléon. **(B)** Ratio d'expression entre Cdx2 et miniCdx2.

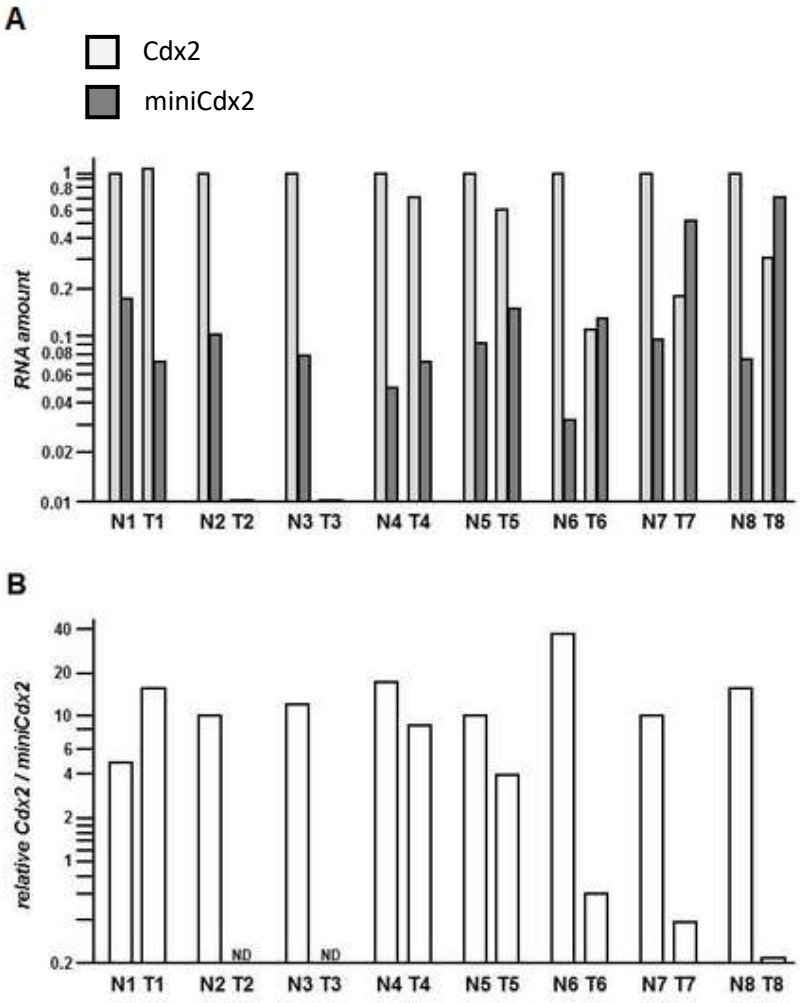

Figure 31: Altération de l'expression des transcrits Cdx2 et miniCdx2 dans les CCR humains.

(A) Les ARNm Cdx2 et miniCdx2 ont été quantifiées par RT-qPCR dans 8 tumeurs coliques humaines (T1-8) et dans la muqueuse normale adjacente associée aux tumeurs (N1-8). L'expression du variant miniCdx2 a été normalisée par rapport à l'expression du variant Cdx2, fixée à 1 dans les échantillons de muqueuses normales. **(B)** Ratio d'expression entre Cdx2 et miniCdx2.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- A -

Abate-Shen, C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? Nat. Rev. Cancer *2*, 777–785.

Akcora, D., Huynh, D., Lightowler, S., Germann, M., Robine, S., de May, J., Pollard, J., Stanley, E., Malaterre, J., and RG, R. (2013). The CSF-1 receptor fashions the intestinal stem cell niche. Stem Cell Res. *10*, 203–212.

Akiyama, J., Okamoto, R., Iwasaki, M., Zheng, X., Yui, S., Tsuchiya, K., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2010). Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *393*, 662–667.

van den Akker, E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Beck, F., Meyer, B.I., and Deschamps, J. (2002). Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. Development *129*, 2181–2193.

Al-Tassan, N., Chmiel, N.H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A.L., Williams, G.T., Hodges, A.K., Davies, D.R., David, S.S., Sampson, J.R., et al. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. Nat. Genet. *30*, 227–232.

Amsen, D., Antov, A., and Flavell, R.A. (2009). The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. Nat. Rev. Immunol. *9*, 116–124.

Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., et al. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. Development *132*, 1443–1451.

Angers, S., and Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 468–477.

Angus-Hill, M.L., Elbert, K.M., Hidalgo, J., and Capecchi, M.R. (2011). T-cell factor 4 functions as a tumor suppressor whose disruption modulates colon cell proliferation and tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 4914–4919.

Ankathatti Munegowda, M., Deng, Y., Mulligan, S.J., and Xiang, J. (2011). Th17 and Th17-stimulated $CD8^+$ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. Cancer Immunol. Immunother. CII *60*, 1473–1484.

Anna, C.H., Iida, M., Sills, R.C., and Devereux, T.R. (2003). Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. *190*, 135–145.

Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2003). Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc+/Delta716 Cdx2+/- compound mutant mice. Nat. Genet. *35*, 323–330.

Aoki, K., Kakizaki, F., Sakashita, H., Manabe, T., Aoki, M., and Taketo, M.M. (2011). Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. Cancer Res. *71*, 593–602.

Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2016). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut *0*, 1–9.

Auclair, B.A., Benoit, Y.D., Rivard, N., Mishina, Y., and Perreault, N. (2007). Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. Gastroenterology *133*, 887–896.

Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat. Immunol. *1*, 113–118.

- B -

Baba, Y., Nosho, K., Shima, K., Freed, E., Irahara, N., Philips, J., Meyerhardt, J.A., Hornick, J.L., Shivdasani,

R.A., Fuchs, C.S., et al. (2009). Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. Clin. Cancer Res. *15*, 4665–4673.

Bae, J.M., Lee, T.H., Cho, N.-Y., Kim, T.-Y., and Kang, G.H. (2015). Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. World J. Gastroenterol. *21*, 1457–1467.

Bai, Y.Q., Yamamoto, H., Akiyama, Y., Tanaka, H., Takizawa, T., Koike, M., Kenji Yagi, O., Saitoh, K., Takeshita, K., Iwai, T., et al. (2002). Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. Cancer Lett. *176*, 47–55.

Bai, Y.-Q., Miyake, S., Iwai, T., and Yuasa, Y. (2003). CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. Oncogene *22*, 7942–7949.

Bakaris, S., Cetinkaya, A., Ezberci, F., and Ekerbicer, H. (2008). Expression of homeodomain protein CDX2 in colorectal adenoma and adenocarcinoma. Histol. Histopathol. *23*, 1043–1047.

Baker, S., Plug, A., Prolla, T., Bronner, C., Harris, A., Yao, X., Christie, D., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., et al. (1996). Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. Nat. Genet. *13*, 336–342.

Baker, S.M., Bronner, C.E., Zhang, L., Plug, A.W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E.A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., et al. (1995). Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. Cell *82*, 309–319.

Balaguer, F., Castellví-Bel, S., Castells, A., Andreu, M., Muñoz, J., Gisbert, J.P., Llor, X., Jover, R., de Cid, R., Gonzalo, V., et al. (2007). Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study. Clin. Gastroenterol. Hepatol. *5*, 379–387.

Balish, E., and Warner, T. (2002). Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. Am. J. Pathol. *160*, 2253–2257.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet (London, England) *357*, 539–545.

Barker, N. (2014). 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.

Barros, R., Mendes, N., Howe, J.R., Reis, C.A., de Bolos, C., Carneiro, F., David, L., and Almeida, R. (2009). Juvenile polyps have gastric differentiation with MUC5AC expression and downregulation of CDX2 and SMAD4. Histochem. Cell Biol. *131*, 765–772.

Barry, E.R., Morikawa, T., Butler, B.L., Shrestha, K., De la Rosa, R., Yan, K.S., Fuchs, C.S., Magness, S.T., Smits, R., Ogino, S., et al. (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. Nature *493*, 106–110.

Batlle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., Van den Born, M.M.W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., Van de Wetering, M., Pawson, T., et al. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. Cell *111*, 251–263.

Batts, L.E., Polk, D., Dubois, R.N., and Kulessa, H. (2006). Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis. Dev. Dyn. *235*, 1563–1570.

Becht, E., De Reyniès, A., Giraldo, N.A., Pilati, C., Buttard, B., Lacroix, L., Selves, J., Sautès-Fridman, C., Laurent-Puig, P., and Fridman, W.H. (2016). Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. Clin. Cancer Res. an Off. J.

Am. Assoc. Cancer Res. *22*, 4057–4066.

Beck, F., Erler, T., Russell, A., and James, R. (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. Dev. Dyn. *204*, 219–227.

Beck, F., Chawengsaksophak, K., Waring, P., Playford, R.J., and Furness, J.B. (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 7318–7323.

Beck, S., Jung, B., Del Rosario, E., Gomez, J., and Carethers, J. (2007). BMP-induced growth suppression in colon cancer cells is mediated by p21WAF1 stabilization and modulated by RAS/ERK. Cell. Signal. *19*, 1465–1472.

Bedeir, A., and Krasinskas, A.M. (2011). Molecular diagnostics of colorectal cancer. Arch. Pathol. Lab. Med. *135*, 578–587.

Bellcross, C., Bedrosian, S., Daniels, E., Duquette, D., Hampel, H., Jasperson, K., Joseph, D., Kaye, C., Lubin, I., Meyer, L., et al. (2012). Implementing screening for Lynch syndrome among patients with newly diagnosed colorectal cancer: summary of a public health/clinical collaborative meeting. Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet. *14*, 152–162.

Bellis, J., Duluc, I., Romagnolo, B., Perret, C., Faux, M.C., Dujardin, D., Formstone, C., Lightowler, S., Ramsay, R.G., Freund, J.-N., et al. (2012). The tumor suppressor Apc controls planar cell polarities central to gut homeostasis. J. Cell Biol. *198*, 331–341.

Benahmed, F., Gross, I., Guenot, D., Jehan, F., Martin, E., Domon-Dell, C., Brabletz, T., Kedinger, M., Freund, J.-N., and Duluc, I. (2007). The microenvironment controls CDX2 homeobox gene expression in colorectal cancer cells. Am. J. Pathol. *170*, 733–744.

Benahmed, F., Gross, I., Gaunt, S.J., Beck, F., Jehan, F., Domon-Dell, C., Martin, E., Kedinger, M., Freund, J.N., and Duluc, I. (2008). Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. Gastroenterology *135*, 1238–1247.

Bernstein, C., Blanchard, J., Kliewer, E., and Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. Cancer *91*, 854–862.

Bissahoyo, A., Pearsall, R.S., Hanlon, K., Amann, V., Hicks, D., Godfrey, V.L., and Threadgill, D.W. (2005). Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet. Toxicol. Sci. an Off. J. Soc. Toxicol. *88*, 340–345.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. Am. J. Anat. *160*, 51–63.

Blache, P., Van De Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.N., Clevers, H., and Jay, P. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. J. Cell Biol. *166*, 37–47.

Boland, R.C., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology *138*, 2073–2087.

Bonhomme, C., Duluc, I., Martin, E., Chawengsaksophak, K., Chenard, M.-P., Kedinger, M., Beck, F., Freund, J.-N., and Domon-Dell, C. (2003). The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. Gut *52*, 1465–1471.

Bonnet, D., and Dick, J. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat. Med. *3*, 730–737.

Booth, C., and Potten, C.S. (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J. Clin. Invest. *105*, 1493–1499.

Boulanger, J., Vézina, A., Mongrain, S., Boudreau, F., Perreault, N., Auclair, B.A., Lainé, J., Asselin, C., and Rivard, N. (2005). Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. J. Biol. Chem.

280, 18095–18107.

Boyd, M., Bressendorff, S., Møller, J., Olsen, J., and Troelsen, J.T. (2009). Mapping of HNF4alpha target genes in intestinal epithelial cells. BMC Gastroenterol. *9*, 68.

Boyd, M., Hansen, M., Jensen, T.G.K., Perearnau, A., Olsen, A.K., Bram, L.L., Bak, M., Tommerup, N., Olsen, J., and Troelsen, J.T. (2010). Genome-wide analysis of CDX2 binding in intestinal epithelial cells (Caco-2). J. Biol. Chem. *285*, 25115–25125.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2002). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. Am. J. Pathol. *161*, 1135–1141.

Brabletz, T., Spaderna, S., Kolb, J., Hlubek, F., Faller, G., Bruns, C.J., Jung, A., Nentwich, J., Duluc, I., Domon-dell, C., et al. (2004). Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. Cancer Res. *64*, 6973–6977.

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., and Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell. Signal. *23*, 609–620.

Van Den Brink, G.R. (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. Physiol. Rev. *87*, 1343–1375.

Brosens, L.A.A., van Hattem, A., Hylind, L.M., Iacobuzio-Donahue, C., Romans, K.E., Axilbund, J., Cruz-Correa, M., Tersmette, A.C., Offerhaus, G.J.A., and Giardiello, F.M. (2007). Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. Gut 56, 965–967.

Bruce, W., and Van der Gaag, H. (1963). A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. Nature *199*, 79–80.

Buchet-Poyau, K., Courchet, J., Le Hir, H., Séraphin, B., Scoazec, J.Y., Duret, L., Domon-Dell, C., Freund, J.N., and Billaud, M. (2007). Identification and characterization of human Mex-3 proteins, a novel family of evolutionarily conserved RNA-binding proteins differentially localized to processing bodies. Nucleic Acids Res. *35*, 1289–1300.

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.

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

Butterworth, A.S., Higgins, J.P., and Pharoah, P. (2006). Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. Eur. J. Cancer (Oxford, Engl. 1990) *42*, 216–227.

- C -

Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R., Maitra, A., and Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. Genes Dev. *24*, 2383–2388.

Cairnie, A.., Lamerton, L.., and Steel, G.. (1965). Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. Exp. Cell Res. *39*, 528–538.

Calon, A., Gross, I., Lhermitte, B., Martin, E., Beck, F., Duclos, B., Kedinger, M., Duluc, I., Domon-Dell, C., and Freund, J.-N. (2007). Different effects of the Cdx1 and Cdx2 homeobox genes in a murine model of intestinal inflammation. Gut *56*, 1688–1695.

Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2007). YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. Curr. Biol. CB *17*, 2054–2060.

Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., and Butel, M. (2007). [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. Gastroenterol. Clin. Biol. *31*, 533–542.

Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 11452–11457.

Charité, J., de Graaff, W., Consten, D., Reijnen, M.J., Korving, J., and Deschamps, J. (1998). Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. Development *125*, 4349–4358.

Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V., Köntgen, F., and Beck, F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. Nature *386*, 84–87.

Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J., and Beck, F. (2004). Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 7641–7645.

Chen, Y., and Jiang, J. (2013). Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. Cell Res. *23*, 186–200.

Chen, G.Y., Shaw, M.H., Redondo, G., and Núñez, G. (2008). The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. Cancer Res. *68*, 10060–10067.

Chen, P.C., Dudley, S., Hagen, W., Dizon, D., Paxton, L., Reichow, D., Yoon, S.R., Yang, K., Arnheim, N., Liskay, R.M., et al. (2005). Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. Cancer Res. *65*, 8662–8670.

Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. Am. J. Anat. *141*, 537–561.

Chu, F., Esworthy, R., Chu, P., Longmate, J., Huycke, M., Wilczynski, S., and Doroshow, J. (2004). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. Cancer Res. *64*, 962–968.

Clarke, A.R., Cummings, M., and Harrison, D. (1995). Interaction between murine germline mutations in p53 and APC predisposes to pancreatic neoplasia but not to increased intestinal malignancy. Oncogene *11*, 1913–1920.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res. *66*, 9339–9344.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell *127*, 469–480.

Clevers, H.C., and Bevins, C.L. (2013). Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. Annu. Rev. Physiol. *75*, 289–311.

Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M., Vallejo, C., Martos, J., and Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. Cancer 79, 2320–2328.

Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. Lab. Invest. *84*, 1619–1630.

Conlon, M., and Bird, A.R. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. Nutrients *7*, 17–44.

Corradini, E., Babitt, J.L., and Lin, H.Y. (2009). The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. Cytokine Growth Factor Rev. *20*, 389–398.

da Costa, L.T., He, T., Yu, J., Sparks, A.B., Morin, P.J., Polyak, K., Laken, S., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1999). CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/beta-catenin signaling. Oncogene *18*, 5010–5014.

Crissey, M.A., Guo, R., Funakoshi, S., Kong, J., Liu, J., and Lynch, J.P. (2011). Cdx2 levels modulate intestinal epithelium maturity and Paneth cell development. Gastroenterology *140*, 517–528.

Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, a015081.

- D -

Dalerba, P., Sahoo, D., Paik, S., Guo, X., Yothers, G., Song, N., Wilcox-Fogel, N., Forgó, E., Rajendran, P.S., Miranda, S.P., et al. (2016). CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. N. Engl. J. Med. *374*, 211–222.

Dang, D., Mahatan, C., Dang, L., Agboola, I., and Yang, V. (2001). Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. Oncogene *20*, 4884–4890.

Dave, M., Higgins, P.D., Middha, S., and Rioux, K.P. (2012). The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. Transl Res *160*, 246–257.

Davis, H., Irshad, S., Bansal, M., Rafferty, H., Boitsova, T., Bardella, C., Jaeger, E., Lewis, A., Freeman-Mills, L., Giner, F., et al. (2015). Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. Nat. Med. *21*, 62–70.

Dawson, H., Galván, J.A., Helbling, M., Muller, D.E., Karamitopoulou, E., Koelzer, V.H., Economou, M., Hammer, C., Lugli, A., and Zlobec, I. (2014). Possible role of Cdx2 in the serrated pathway of colorectal cancer characterized by BRAF mutation, high-level CpG Island methylator phenotype and mismatch repair-deficiency. Int. J. Cancer *134*, 2342–2351.

De, A. (2011). Wnt/Ca2+ signaling pathway: a brief overview. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). *43*, 745–756.

Delker, D.A., McGettigan, B.M., Kanth, P., Pop, S., Neklason, D.W., Bronner, M.P., Burt, R.W., and Hagedorn, C.H. (2014). RNA sequencing of sessile serrated colon polyps identifies differentially expressed genes and immunohistochemical markers. PLoS One *9*, e88367.

Derbal-Wolfrom, L., Pencreach, E., Saandi, T., Aprahamian, M., Martin, E., Greferath, R., Tufa, E., Choquet, P., Lehn, J.-M., Nicolau, C., et al. (2013). Increasing the oxygen load by treatment with myo-inositol trispyrophosphate reduces growth of colon cancer and modulates the intestine homeobox gene Cdx2. Oncogene *32*, 4313–4318.

Derwinger, K., Kodeda, K., Bexe-Lindskog, E., and Taflin, H. (2010). Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. Acta Oncol. *49*, 57–62.

DiDonato, J.A., Mercurio, F., and Karin, M. (2012). NF-κB and the link between inflammation and cancer. Immunol. Rev. *246*, 379–400.

Domon-Dell, C., Wang, Q., Kim, S., Kedinger, M., Evers, B.M., and Freund, J.-N. (2002). Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells. Gut *50*, 525–529.

Donehower, L., Harvey, M., Slagle, B., McArthur, M., Montgomery, C.J., Butel, J., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature *356*, 215–221.

van Dop, W.A., Uhmann, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G.J., van den Bergh Weerman, M.A., Boeckxstaens, G.E., Hommes, D.W., Hardwick, J.C., et al. (2009). Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. Gastroenterology *136*, 2195–2203.

Dunn, G., Old, L., and Schreiber, R. (2004). The three Es of cancer immunoediting. Annu. Rev. Immunol. *22*, 329–360.

Durand, A., Donahue, B., Peignon, G., Letourneur, F., Cagnard, N., Slomianny, C., Perret, C., Shroyer, N.F., and Romagnolo, B. (2012). Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 8965–8970.

- E -

Edelmann, W., Yang, K., Umar, A., Heyer, J., Lau, K., Fan, K., Liedtke, W., Cohen, P., Kane, M., Lipford, J., et al. (1997). Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. Cell *91*, 467–477.

Edelmann, W., Yang, K., Kuraguchi, M., Heyer, J., Lia, M., Kneitz, B., Fan, K., Brown, A.M.C., Lipkin, M., and Kucherlapati, R. (1999). Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. Cancer Res. *59*, 1301–1307.

Edelmann, W., Umar, A., Yang, K., Heyer, J., Kucherlapati, M., Lia, M., Kneitz, B., Avdievich, E., Fan, K., Wong, E., et al. (2000). The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. Cancer Res. *60*, 803–807.

Engle, S., Ormsby, I., Pawlowski, S., Boivin, G., Croft, J., Balish, E., and Doetschman, T. (2002). Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice. Cancer Res. *62*, 6362–6366.

Erdman, S., Sohn, J., Rao, V., Nambiar, P., Ge, Z., Fox, J., and Schauer, D. (2005). CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. Cancer Res. *65*, 3998–4004.

van Es, J.H, Sato, T., van de Wetering, M Lyubimova, A., Nee, A., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., Martens, A., et al. (2012a). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. Nat. Cell Biol. *14*, 1099–1104.

van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., et al. (2005a). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. Nat. Cell Biol. *7*, 381–386.

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. (2005b). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature *435*, 959–963.

van Es, J.H., Haegebarth, 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.

Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., M, S.-C., Capella, G., Peinado, M.A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S.J., et al. (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. Cancer Res. *60*, 4366–4371.

Esumi, H., Ohgaki, H., Kohzen, E., Takayama, S., and Sugimura, T. (1989). Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Japanese J. Cancer Res. Gann *80*, 1176–1178.

- F -

Faber, K., Bullinger, L., Ragu, C., Garding, A., Mertens, D., Miller, C., Martin, D., Walcher, D., Döhner, K., Döhner, H., et al. (2013). CDX2-driven leukemogenesis involves KLF4 repression and deregulated PPAR?? signaling. J. Clin. Invest. *123*, 299–314.

Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. Gastroenterology *143*, 1518–1529.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. Annu. Rev. Pathol. *6*, 479–507.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell *61*, 759–767.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int. J. Cancer *136*, E359–E386.

Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. Mol. Cell. Biol. *27*, 7551–7559.

van der Flier, L.G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M.E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G., et al. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. Gastroenterology *132*, 628–632.

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

Fodde, R., Edelmannt, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlsont, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., Khan, P.M., et al. (1994). A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 8969–8973.

Franchi, A., Massi, D., Palomba, A., Biancalani, M., and Santucci, M. (2004). CDX-2, cytokeratin 7 and cytokeratin 20 immunohistochemical expression in the differential diagnosis of primary adenocarcinomas of the sinonasal tract. Virchows Arch. an Int. J. Pathol. *445*, 63–67.

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. Nature *435*, 964–968.

Fre, S., Pallavi, S.K., Huyghe, M., Laé, M., Janssen, K.-P., Robine, S., Artavanis-Tsakonas, S., and Louvard, D. (2009). Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 6309–6314.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat. Rev. Cancer. *12*, 298–306.

- G -

Gagné-Sansfaçon, J., Allaire, J.M., Jones, C., Boudreau, F., and Perreault, N. (2014). Loss of Sonic hedgehog leads to alterations in intestinal secretory cell maturation and autophagy. PLoS One *9*, e98751.

Gagnière, J., Raisch, J., Veziant, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.A., Pezet, D., and Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. World J. Gastroenterol. *22*, 501–518.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science *313*, 1960–1964.

Gao, N., and Kaestner, K.H. (2010). Cdx2 regulates endo-lysosomal function and epithelial cell polarity. Genes Dev. *24*, 1295–1305.

Gao, N., White, P., and Kaestner, K.H. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. Dev. Cell *16*, 588–599.

Garcia-Fernàndez, J. (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. Nat. Rev. Genet. *6*, 881–892.

Geiersbach, K.B., and Samowitz, W.S. (2011). Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch. Pathol. Lab. Med. *135*, 1269–1277.

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. C. *69*, 2907–2917.

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. Nature *529*, 226–230.

Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T., and De Vos, W.M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. Genes Nutr. *6*, 209–240.

Goodwin, A.C., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Huso, D.L., Wu, X., Murray-Stewart, T.R., Hacker-Prietz, A., Rabizadeh, S., Woster, P.M., Sears, C.L., et al. (2011). Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic Bacteroides fragilis-induced colon tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 15354–15359.

Gradl, D., Kühl, M., and Wedlich, D. (1999). The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. Mol. Cell. Biol. *19*, 5576–5587.

Grainger, S., Savory, J.G. a, and Lohnes, D. (2010). Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium. Dev. Biol. *339*, 155–165.

Grainger, S., Lam, J., Savory, J.G.A., Mears, A.J., Rijli, F.M., and Lohnes, D. (2012). Cdx regulates Dll1 in multiple lineages. Dev. Biol. *361*, 1–11.

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.

Grivennikov, S., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G., Osterreicher, C., Hung, K., et al. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. Nature 491, 254–258.

Gross, I., Lhermitte, B., Domon-Dell, C., Duluc, I., Martin, E., Gaiddon, C., Kedinger, M., and Freund, J.-N. (2005). Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. Oncogene *24*, 7955–7963.

Gross, I., Duluc, I., Benameur, T., Calon, a, Martin, E., Brabletz, T., Kedinger, M., Domon-Dell, C., and Freund, J.-N. (2008). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. Oncogene *27*, 107–115.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. Cancer Cell *4*, 111–120.

Guerra, L., Guidi, R., and Frisan, T. (2011). Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression? FEBS J. *278*, 4577–4588.

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat. Med. *21*, 1350–1356.

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

Guo, L., and Teng, L. (2015). YAP/TAZ for cancer therapy: opportunities and challenges (review). Int. J. Oncol. *46*, 1444–1452.

Guo, R.J., Funakoshi, S., Lee, H.H., Kong, J., and Lynch, J.P. (2010). The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. Carcinogenesis *31*, 159–166.

- H -

Haggar, F.A., and Boushey, R.P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin. Colon Rectal Surg. *22*, 191–197.

Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. Orphanet J. Rare Dis. *4*.

Hammond, W.A., Swaika, A., and Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. Ther. Adv. Med. Oncol. *8*, 57–84.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57–70.

Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T.O., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. EMBO J. *18*, 5931–5942.

Haramis, A.-P.G., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J., 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.

Harvey, M., McArthur, M., Montgomery, C.J., Butel, J., Bradley, A., and Donehower, L. (1993). Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. Nat. Genet. *5*, 225–229.

Hatzis, P., van der Flier, L.G., van Driel, M.A., Guryev, V., Nielsen, F., Denissov, S., Nijman, I.J., Koster, J., Santo, E.E., Welboren, W., et al. (2008). Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. Mol. Cell. Biol. *28*, 2732–2744.

Hauck, A.L., Swanson, K.S., Kenis, P.J.A., Leckband, D.E., Gaskins, H.R., and Schook, L.B. (2005). Twists and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. Birth Defects Res. Part C , Embryo Today Rev. *75*, 58–71.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science *281*, 1509–1512.

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.

Heath, J.P. (1996). Epithelial cell migration in the intestine. Cell Biol. Int. *20*, 139–146.

Hienonen, T., Laiho, P., Salovaara, R., Mecklin, J.P., Järvinen, H., Sistonen, P., Peltomäki, P., Lehtonen, R., Nupponen, N.N., Launonen, V., et al. (2003). Little evidence for involvement of MLH3 in colorectal cancer predisposition. Int. J. Cancer *106*, 292–296.

Hinkel, I., Duluc, I., Martin, E., Guenot, D., Freund, J.N., and Gross, I. (2012). Cdx2 controls expression of the protocadherin Mucdhl, an inhibitor of growth and β-catenin activity in colon cancer cells. Gastroenterology *142*, 875–885.

Hinoi, T., Lucas, P.C., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (2002). CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. Gastroenterology *123*, 1565–1577.

Hinoi, T., Gesina, G., Akyol, A., Kuick, R., Hanash, S., Giordano, T.J., Gruber, S.B., and Fearon, E.R. (2005). CDX2-regulated expression of iron transport protein hephaestin in intestinal and colonic epithelium. Gastroenterology *128*, 946–961.

Hobert, J. A, and Eng, C. (2009). PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview. Genet. Med. *11*, 687–694.

Hoesel, B., and Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Mol. Cancer *12*.

Hollande, F., Pannequin, J., and Joubert, D. (2010). The long road to colorectal cancer therapy: searching for the right signals. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. *13*, 44–56.

Hopkins, B.D., Fine, B., Steinbach, N., Dendy, M., Shaw, J., Pappas, K., Yu, J.S., Hodakoski, C., Klein, J., Pegno, S., et al. (2013). A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. Science *341*, 399–402.

Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C., and Rivard, N. (2001). Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. J. Biol. Chem. *276*, 21885–21894.

Howe, J.R., Roth, S., Ringold, J.C., Summers, R.W., Järvinen, H.J., Sistonen, P., Tomlinson, I.P., Houlston, R.S., Bevan, S., Mitros, F.A., et al. (1998). Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. Science *280*, 1086–1088.

Howe, J.R., Bair, J.L., Sayed, M.G., Anderson, M.E., Mitros, F. a, Petersen, G.M., Velculescu, V.E., Traverso, G., and Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. Nat. Genet. *28*, 184–187.

Howe, L.R., Watanabe, O., Leonard, J., and Brown, A.M.C. (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. Cancer Res. *63*, 1906–1913.

Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S. V, Weinstock, J., Gallini, C., Redding, K., Margolskee, R., Osborne, L.C., et al. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. Science (80-.). *351*, 1329–1333.

Hryniuk, A., Grainger, S., Savory, J.G. a, and Lohnes, D. (2012). Cdx function is required for maintenance of intestinal identity in the adult. Dev. Biol. *363*, 426–437.

Hu, Y., and Fu, L. (2012). Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. Am. J. Cancer Res. *2*, 340–356.

Hussain, M.M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. Curr. Opin. Lipidol. *25*, 200–206.

Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L., and Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. Int. J. Cancer *125*, 171–180.

Huynh, D., Dai, X., Nandi, S., Lightowler, S., Trivett, M., Chan, C., Bertoncello, I., Ramsay, R., and Stanley, E. (2009). Colony stimulating factor-1 dependence of paneth cell development in the mouse small intestine. Gastroenterology *137*, 136–144.

- I -

Imajo, M., Miyatake, K., Iimura, A., Miyamoto, A., and Nishida, E. (2012). A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/β-catenin signalling. EMBO J. *31*, 1109–1122.

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.

Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., and Winton, D.J. (2005). Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. Dev. Dyn. *233*, 1332–1336.

- J -

Jagmohan-Changur, S., Poikonen, T., Vilkki, S., Launonen, V., Wikman, F., Orntoft, T., Møller, P., Vasen, H., Tops, C., Kolodner, R.D., et al. (2003). EXO1 variants occur commonly in normal population: evidence against a role in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer Res. *63*, 154–158.

James, R., Erler, T., and Kazenwadel, J. (1994). Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. J. Biol. Chem. *269*, 15229–15237.

Janakiram, N., and Rao, C. (2014). The role of inflammation in colon cancer. Adv. Exp. Med. Biol. *816*.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. World J. Gastroenterol. *21*, 8787–8803.

Janssen, K., El-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., and Robine, S. (2002). Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. Gastroenterology *123*, 492–504.

Janssen, K., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El Marjou, F., Smits, R., et al. (2006). APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. Gastroenterology *131*, 1096–1109.

Javelaud, D., and Mauviel, A. (2005). Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase

pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. carcinogenesis. Oncogene *24*, 5742–5750.

Jenne, D., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. Nat. Genet. *18*, 38–43.

Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. Nat. Genet. *24*, 36–44.

Johnson, R.L., and Fleet, J.C. (2013). Animal models of colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev. *32*, 39–61.

Jonckheere, N., Vincent, A., Perrais, M., Ducourouble, M.P., Male, A.K. Van, Aubert, J.P., Pigny, P., Carraway, K.L., Freund, J.N., Renes, I.B., et al. (2007). The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells. J. Biol. Chem. *282*, 22638–22650.

Jones, S., Emmerson, P., Maynard, J., Best, J.M., Jordan, S., Williams, G.T., Sampson, J.R., and Cheadle, J.P. (2002). Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. Hum. Mol. Genet. *11*, 2961–2967.

Jung, B., Beck, S., Cabral, J., Chau, E., Cabrera, B., Fiorino, A., Smith, E., Bocanegra, M., and Carethers, J. (2007). Activin type 2 receptor restoration in MSI-H colon cancer suppresses growth and enhances migration with activin. Gastroenterology *132*, 633–644.

- K -

Kado, S., Uchida, K., Funabashi, H., Iwata, S., Nagata, Y., Ando, M., Onoue, M., Matsuoka, Y., Ohwaki, M., and Morotomi, M. (2001). Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice. Cancer Res. *61*, 2395–2398.

Kaiko, G., and Stappenbeck, T. (2014). Host-microbe interactions shaping the gastrointestinal environment. Trends Immunol. *35*, 538–548.

Kaltschmidt, J.A., Davidson, C.M., Brown, N.H., and Brand, A.H. (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. Nat. Cell Biol. *2*, 7–12.

Kamada, N., and Núñez, G. (2014). Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. Gastroenterology *146*, 1477–1488.

Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J., and Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Res. *57*, 808–811.

Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., and Kaestner, K.H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. Development *129*, 2619–2628.

Kazanjian, A., Noah, T., Brown, D., Burkart, J., and Shroyer, N. (2010). Atonal homolog 1 is required for growth and differentiation effects of notch/gamma-secretase inhibitors on normal and cancerous intestinal epithelial cells. Gastroenterology *139*, 918–928.

Keller, M.S., Ezaki, T., Guo, R., and Lynch, J.P. (2004). Cdx1 or Cdx2 expression activates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and compaction in human COLO 205 cells. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *287*, 104–114.

Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. Curr. Gastroenterol. Rep. *12*, 319–330.

Kim, B.G., Li, C., Qiao, W., Mamura, M., Kasprzak, B., Anver, M., Wolfraim, L., Hong, S., Mushinski, E., Potter, M., et al. (2006a). Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. Nature *441*, 1015–1019.

Kim, H.S., Lee, J.-S., Freund, J.N., Min, K.W., Lee, J.S., Kim, W., Juhng, S.W., and Park, C.S. (2006b). CDX-2 homeobox gene expression in human gastric carcinoma and precursor lesions. J. Gastroenterol. Hepatol. *21*, 438–442.

Kim, J.H., Kim, K.J., Rhee, Y.Y., Bae, J.M., Cho, N.Y., Lee, H.S., and Kang, G.H. (2015). Gastric-type expression signature in serrated pathway-associated colorectal tumors. Hum. Pathol. *46*, 643–656.

Kim, J.M., Lee, J.Y., Yoon, Y.M., Oh, Y.-K., Kang, J.S., Kim, Y.-J., and Kim, K.-H. (2006c). Bacteroides fragilis enterotoxin induces cyclooxygenase-2 and fluid secretion in intestinal epithelial cells through NF-kappaB activation. Eur. J. Immunol. *36*, 2446–2456.

Kim, S., Domon-Dell, C., Wang, Q., Chung, D.H., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., Freund, J.N., and Evers, B.M. (2002). PTEN and TNF-alpha regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-kappaB-dependent pathway. Gastroenterology 123, 1163–1178.

Kim, S.P., Park, J.W., Lee, S.H., Lim, J.H., Jang, B.C., Lee, S.H., Jang, I.H., Freund, J.-N., Suh, S.-I., Mun, K.C., et al. (2004). Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. *315*, 93–99.

Kim, T.H., Escudero, S., and Shivdasani, R.A. (2012). Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 3932–3937.

Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Review Colorectal Cancer. Cell *87*, 159–170.

Klimesova, K., Kverka, M., Zakostelska, Z., Hudcovic, T., Hrncir, T., Stepankova, R., Rossmann, P., RidlKostovcik, M., Mrazek, J., Kopecny, J., et al. (2013). Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M-deficient mice. Inflamm. Bowel Dis. *19*, 1266–1277.

Kohn, A., and Moon, R. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. Cell Calcium *38*, 439–446.

Kong, J., Crissey, M.A., Funakoshi, S., Kreindler, J.L., and Lynch, J.P. (2011). Ectopic Cdx2 expression in murine esophagus models an intermediate stage in the emergence of Barrett's esophagus. PLoS One *6*, e18280.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. Nat. Genet. *19*, 379–383.

Kosinski, C., Li, V.S.W., Chan, A.S.Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., 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. U. S. A. *104*, 15418–15423.

Kosinski, C., Stange, D.E., Xu, C., Chan, A.S.Y., Ho, C., Yuen, S., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Clevers, H., Leung, S.Y., et al. (2010). Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. Gastroenterology *139*, 893–903.

Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., et al. (2013). Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. Cell Host Microbe. *14*, 207–215.

Kostourou, V., Cartwright, J.E., Johnstone, A.P., Boult, J.K.R., Cullis, E.R., Whitley, G., and Robinson, S.P. (2011). The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. Br. J. Cancer *104*, 83–90.

Krueger, F., Madeja, Z., Hemberger, M., McMahon, M., Cook, S., and Gaunt, S. (2009). Down-regulation of Cdx2 in colorectal carcinoma cells by the Raf-MEK-ERK 1/2 pathway. Cell. Signal. *21*, 1846–1856.

Kucharzik, T., Lügering, N., Rautenberg, K., and Lügering, A. (2000). Role of M Cells in Intestinal Barrier Function. Ann. N. Y. Acad. Sci. *915*, 171–183.

Kucherlapati, M.H., Lee, K., Nguyen, A.A., Clark, A.B., Hou, H.J., Rosulek, A., Li, H., Yang, K., Fan, K., Lipkin, M., et al. (2010). An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. Gastroenterology *138*, 993–1002.

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. U. S. A. *101*, 266–271.

Kullander, K., and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *3*, 475–486.

Kuraishy, A., Karin, M., and Grivennikov, S. (2011). Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. Immunity *35*, 467–477.

- L -

Lander, A.D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A.L., Trumpp, A., and Oskarsson, T. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? BMC Biol. *10*.

Lao, V., and Grady, W. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. *8*, 686–700.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M., and Dick, J. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature *367*, 645–648.

Laqueur, G., and Matsumoto, H, Y.R. (1981). Comparison of the carcinogenicity of methylazoxymethanol-beta-D-glucosiduronic acid in conventional and germfree Sprague-Dawley rats. J. Natl. Cancer Inst. *67*, 1053–1055.

Lee, J.-H., Kim, T.-S., Yang, T.-H., Koo, B.-K., Oh, S.-P., Lee, K.-P., Oh, H.-J., Lee, S.-H., Kong, Y.-Y., Kim, J.-M., et al. (2008). A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. EMBO J. *27*, 1231–1242.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. Nature *396*, 643–649.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophilia. Nature *276*, 565–570.

Li, N., Nakauka-Ddamba, A., Tobias, J., Jensen, S.T., and Lengner, C.J. (2016). Mouse Label-Retaining Cells Are Molecularly and Functionally Distinct From Reserve Intestinal Stem Cells. Gastroenterology *151*, 298–310.e7.

Li, Y., Kundu, P., Seow, S.W., de Matos, C.T., Aronsson, L., Chin, K.C., Kärre, K., Pettersson, S., and Greicius, G. (2012). Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice. Carcinogenesis *33*, 1231–1238.

van Lier, M.G.F., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E.M.H., Kuipers, E.J., Steyerberg, E.W., and van Leerdam, M.E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. Am. J. Gastroenterol. *105*, 1258–1264.

Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielianl, P.S., Parker, M.G., and Evan, G. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. Nucleic Acids Res. *23*, 1686–1690.

Liu, J., Duan, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, W., Long, H., Lin, Z., and Zhu, B. (2011). IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. *407*, 348–354.

Lopez-Garcia, C., Klein, A.M., Simons, B.D., and Winton, D.J. (2010). Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. Science *330*, 822–825.

Lord, R.V.N., Brabender, J., Wickramasinghe, K., DeMeester, S.R., Holscher, A., Schneider, P.M., Danenberg, P. V., and DeMeester, T.R. (2005). Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. Surgery *138*, 924–931.

Lorentz, O., Duluc, I., Arcangelis, A. De, Simon-assmann, P., Kedinger, M., and Freund, J.-N. (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. J. Cell Biol. *139*, 1553–1565.

Lorentz, O., Cadoret, a, Duluc, I., Capeau, J., Gespach, C., Cherqui, G., and Freund, J.N. (1999). Downregulation of the colon tumour-suppressor homeobox gene Cdx-2 by oncogenic ras. Oncogene *18*, 87–92.

Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D.F., Bolden, J.E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J.A., Krizhanovsky, V., et al. (2013). Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. Cell *153*, 449–460.

Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. N. Engl. J. Med. *348*, 919–932.

- M -

Ma, L., Juttner, M., Kullak-Ublick, G. a., and Eloranta, J.J. (2012). Regulation of the gene encoding the intestinal bile acid transporter ASBT by the caudal-type homeobox proteins CDX1 and CDX2. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *302*, G123–G133.

MacDonald, B., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev. Cell *17*, 9–26.

Mack, D., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. Gut *52*, 827–834.

Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. Am. J. Physiol. *276*, G941–G950.

Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. Science *303*, 1662–1665.

Madara, J. (1982). Cup cells: structure and distribution of a unique class of epithelial cells in guinea pig, rabbit, and monkey small intestine. Gastroenterology *83*, 981–994.

Madara, J., and Carlson, S. (1985). Cup cells: further structural characterization of the brush border and the suggestion that they may serve as an attachment site for an unidentified bacillus in guinea pig ileum. Gastroenterology *89*, 1374–1386.

Madison, B.B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X.T., and Gumucio, D.L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. Development *132*, 279–289.

Mallo, G. V, Rechreche, H., Frigerio, J.M., Rocha, D., Zweibaum, A., Lacasa, M., Jordan, B.R., Dusetti, N.J., Dagorn, J.C., and Iovanna, J.L. (1997). Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. Int. J. Cancer *74*, 35–44.

Mantovani, A. (2009). Cancer: Inflaming metastasis. Nature *457*, 36–37.

Margalit, Y., Yarus, S., Shapira, E., Gruenbaum, Y., and Fainsod, A. (1993). Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homeobox gene. Nucleic Acids Res. *21*, 4915–4922.

Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., et al. (2013). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. PLoS Med. *10*, e1001453.

Markowitz, S.D., and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N. Engl. J. Med. *361*, 2449–2460.

Markowitz, S.D., Dawson, D.M., Willis, J., and Willson, J.K. V (2002). Focus on colon cancer. Cancer Cell *1*, 233–236.

Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. Bioessays *24*, 91–98.

Martin, E., Vanier, M., Tavian, M., Guerin, E., C, D.-D., Duluc, I., Gross, I., Rowland, J., Kim, S., and Freund, J. (2010). CDX2 in congenital gut gastric-type heteroplasia and intestinal-type Meckel diverticula. Pediatrics *126*, e723–e727.

Martínez-Climent, J., Andreu, E., and Prosper, F. (2006). Somatic stem cells and the origin of cancer. Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Spanish Oncol. Soc. Natl. Inst. Mex. *8*, 647–663.

Marusyk, A., Tabassum, D., Altrock, P., Almendro, V., Michor, F., and Polyak, K. (2014). Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. Nature *514*, 54–58.

Matsuda, M., Sentani, K., Noguchi, T., Hinoi, T., Okajima, M., Matsusaki, K., Sakamoto, N., Anami, K., Naito, Y., Oue, N., et al. (2010). Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. Pathol. Int. *60*, 673–680.

Merchant, J.L., and Saqui-Salces, M. (2014). Inhibition of Hedgehog signaling in the gastrointestinal tract: targeting the cancer microenvironment. Cancer Treat. Rev. *40*, 12–21.

Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadient, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., and Ciaccio, P.J. (2004). Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. Toxicol. Sci. an Off. J. Soc. Toxicol. *82*, 341–358.

Miller, R.K., and McCrea, P.D. (2010). Wnt to build a tube: Contributions of Wnt signaling to epithelial tubulogenesis. Dev. Dyn. *239*, 77–93.

Miller, H., Zhang, J., Kuolee, R., Patel, G., and Chen, W. (2007). Intestinal M cells: the fallible sentinels? World J. Gastroenterol. *13*, 1477–1486.

Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rev. *16*, 251–263.

Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., and Nakamura, Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. Hum. Mol. Genet. *1*, 229–233.

Mizoshita, T., Tsukamoto, T., Nakanishi, H., Inada, K.I., Ogasawara, N., Joh, T., Itoh, M., Yamamura, Y., and Tatematsu, M. (2003). Expression of Cdx2 and the phenotype of advanced gastric cancers: relationship with prognosis. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *129*, 727–734.

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., Pagès, F., et al. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *29*, 610–618.

Modica, S., Morgano, A., Salvatore, L., Petruzzelli, M., Vanier, M.-T., Valanzano, R., Esposito, D.L., Palasciano, G., Duluc, I., Freund, J.-N., et al. (2009). Expression and localisation of insulin receptor substrate 2 in normal intestine and colorectal tumours. Regulation by intestine-specific transcription factor CDX2. Gut *58*, 1250–1259.

Modica, S., Cariello, M., Morgano, A., Gross, I., Vegliante, M.C., Murzilli, S., Salvatore, L., Freund, J.N., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2014). Transcriptional regulation of the intestinal nuclear bile acid farnesoid X receptor (FXR) by the caudal-related homeobox 2 (CDX2). J. Biol. Chem. *289*, 28421–28432.

Moltke, J. Von, Ji, M., Liang, H., and Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. Nature *529*, 221–225.

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

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. Science *247*, 322–324.

Moskaluk, C., Zhang, H., Powell, S., Cerilli, L., Hampton, G., and Frierson, H.J. (2003). Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. Mod. Pathol. *16*, 913–919.

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.

Mutoh, H., Hakamata, Y., Sato, K., Eda, A., Yanaka, I., Honda, S., Osawa, H., Kaneko, Y., and Sugano, K. (2002). Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. *294*, 470–479.

Mutoh, H., Sakamoto, H., Hayakawa, H., Arao, Y., Satoh, K., Nokubi, M., and Sugano, K. (2006). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 induces expression of the basic helix – loop – helix transcription factor Math1. Differentiation. *74*, 313–321.

Mutoh, H., Hayakawa, H., Sakamoto, H., and Sugano, K. (2007). Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor-kappaB. J. Gastroenterol. *42*, 719–729.

- N -

Narisawa, T., Magadia, N., Weisburger, J., and Wynder, E. (1974). Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. J. Natl. Cancer Inst. *53*, 1093–1097.

Narita, T., Saitoh, K., Kameda, T., Kuroiwa, a, Mizutani, M., Koike, C., Iba, H., and Yasugi, S. (2000). BMPs are necessary for stomach gland formation in the chicken embryo: a study using virally induced BMP-2 and Noggin expression. Development *127*, 981–988.

Naydenov, N.G., Hopkins, A.M., and Ivanov, A.I. (2009). c-Jun N-terminal kinase mediates disassembly of apical junctions in model intestinal epithelia. Cell Cycle *8*, 2110–2121.

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. Nat. Protoc. *2*, 1998–2004.

Neumüller, R.A., and Knoblich, J.A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. Genes Dev. *23*, 2675–2699.

Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. Science 336, 1262–1267.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 767–779.

Nieuwenhuis, M.H., and Vasen, H.F.A. (2007). Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *61*, 153–161.

Nik, A.M., Reyahi, A., Pontén, F., and Carlsson, P. (2013). Foxf2 in intestinal fibroblasts reduces numbers of Lgr5(+) stem cells and adenoma formation by inhibiting Wnt signaling. Gastroenterology *144*, 1001–1011.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat. Genet. *24*, 372–376.

Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. Cell *123*, 917–929.

Noah, T., Donahue, B., and Shroyer, N. (2011). Intestinal development and differentiation. Exp. Cell Res. *317*, 2702–2710.

- O -

O'Brien, C., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature *445*, 106–110.

Okayasu, I., Yamada, M., Mikami, T., Yoshida, T., Kanno, J., and Ohkusa, T. (2002). Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. J. Gastroenterol. Hepatol. *17*, 1078–1083.

Olsen, A.K., Coskun, M., Bzorek, M., Kristensen, M.H., Danielsen, E.T., Jørgensen, S., Olsen, J., Engel, U., Holck, S., and Troelsen, T. (2013). Regulation of APC and AXIN2 expression by intestinal tumor suppressor CDX2 in colon cancer cells. Carcinogenesis *34*, 1361–1369.

Olsen, J., Eiholm, S., Kirkeby, L.T., Espersen, M.L.M., Jess, P., Gögenür, I., Olsen, J., and Troelsen, J.T. (2016). CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer. Exp. Mol. Pathol. *100*, 59–66.

Ordóñez-Morán, P., Dafflon, C., Imajo, M., Nishida, E., and Huelsken, J. (2015). HOXA5 Counteracts Stem Cell Traits by Inhibiting Wnt Signaling in Colorectal Cancer. Cancer Cell *28*, 815–829.

Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C., and Taketo, M. (1995). Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 4482–4486.

Owusu, B.Y., Vaid, M., Kaler, P., and Klampfer, L. (2015). Prognostic and Predictive Significance of Stromal Fibroblasts and Macrophages in Colon Cancer. Biomark. Cancer *7*, 29–37.

- P -

Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., et al. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N. Engl. J. Med. *353*, 2654–2666.

Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *27*, 5944–5951.

Palomaki, G.E., McClain, M.R., Melillo, S., Hampel, H.L., and Thibodeau, S.N. (2009). EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet. *11*, 42–65.

Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. Dev. Cell *19*, 491–505.

Pardoll, D. (2002). T cells take aim at cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 15840–15842.

Park, D.Y., Srivastava, A., Kim, G.H., Mino-Kenudson, M., Deshpande, V., Zukerberg, L.R., Song, G.A., and Lauwers, G.Y. (2010). CDX2 expression in the intestinal-type gastric epithelial neoplasia: frequency and significance. Mod. Pathol. *23*, 54–61.

Pereira, B., Sousa, S., Barros, R., Carreto, L., Oliveira, P., Oliveira, C., Chartier, N.T., Plateroti, M., Rouault, J.P., Freund, J.N., et al. (2013). CDX2 regulation by the RNA-binding protein MEX3A: impact on intestinal differentiation and stemness. Nucleic Acids Res. *41*, 3986–3999.

Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. Physiol. Rev. *94*, 1287–1312.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. Genes Dev. *17*, 1709–1713.

Potten, C.S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. Nature *269*, 518–521.

Potten, C.S., Kovacs, L., and Hamilton, E. (1974). Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. Cell Tissue Kinet. *7*, 271–283.

Potten, C.S., Owen, G., and Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. J. Cell Sci. *115*, 2381–2388.

Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Washington, M., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S., 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.

Preston, S.L., Wong, W.M., Chan, A.O.O., Poulsom, R., Jeffery, R., Goodlad, R.A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W.F., et al. (2003). Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. Cancer Res. *63*, 3819–3825.

Prolla, T., Baker, S., Harris, A., Tsao, J., Yao, X., Bronner, C., Zheng, B., Gordon, M., Reneker, J., Arnheim, N., et al. (1998). Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. Nat. Genet. *18*, 276–279.

Putz, U., Howitt, J., Doan, A., Goh, C.-P., Low, L.-H., Silke, J., and Tan, S.-S. (2012). The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. Sci. Signal. *5*, ra70.

- Q -

Qian, Y., Billeter, M., Otting, G., Müller, M., Gehring, W., and Wüthrich, K. (1989). The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution : comparison with prokaryotic repressors. Cell *59*, 573–580.

Quyn, A.J., Appleton, P.L., Carey, F.A., Steele, R.J.C., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R.A., Sansom, O.J., and Näthke, I.S. (2010). Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. Cell Stem Cell *6*, 175–181.

- R -

Ralston, A., and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. Dev. Biol. *313*, 614–629.

Rawat, V.P.S., Cusan, M., Deshpande, A., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Humphries, R.K., Bohlander, S.K., Feuring-Buske, M., and Buske, C. (2004). Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 817–822.

Reddy, B., and Rivenson, A. (1993). Inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. Cancer Res. *53*, 3914–3918.

Reddy, B.S., and Ohmori, T. (1981). Effect of intestinal microflora and dietary fat on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Cancer Res. *41*, 1363–1367.

Reddy, B.S., Narisawa, T., Wright, P., Vukusich, D., Weisburger, J., and Wynder, E. (1975a). Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. Cancer Res. *35*, 287–290.

Reddy, B.S., Narisawa, T., Maronpot, R., Weisburger, J.H., and Wynder, E.L. (1975b). Animal models for the study of dietary factors and cancer of the large bowel. Cancer Res. *35*, 3421–3426.

Reitmair, A.H., Redston, M., Cai, J.C., Chuang, T.C.Y., Bjerknes, M., Cheng, H., Hay, K., Gallinger, S., Bapat, B., and Mak, T.W. (1996). Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. Cancer Res. *56*, 3842–3849.

Renouf, B., Soret, C., Saandi, T., Delalande, F., Martin, E., Vanier, M., Duluc, I., Gross, I., Freund, J.-N., and Domon-Dell, C. (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. Nucleic Acids Res. *40*, 3456–3469.

Riccio, O., van Gijn, M.E., Bezdek, A.C., Pellegrinet, L., van Es, J.H., Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., Honjo, T., Clevers, H., and Radtke, F. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. EMBO Rep. *9*, 377–383.

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.

Rings, E.H., Boudreau, F., Taylor, J.K., Moffett, J., Suh, E.R., and Traber, P.G. (2001). Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. Gastroenterology *121*, 1437–1450.

Robanus-Maandag, E.C., Koelink, P.J., Breukel, C., Salvatori, D.C.F., Jagmohan-Changur, S.C., Bosch, C.A.J., Verspaget, H.W., Devilee, P., Fodde, R., and Smits, R. (2010). A new conditional Apc-mutant mouse model for colorectal cancer. Carcinogenesis *31*, 946–952.

De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. J. Carcinog. *10*.

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

Rosenberg, D.W., Giardina, C., and Tanaka, T. (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. Carcinogenesis *30*, 183–196.

Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A.G., Li, X., Neal, J.T., Schafer, E.J., Zack, T.I., Wang, X., Tsherniak, A., Schinzel, A.C., et al. (2013). β-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. Cell *151*, 1457–1473.

Roszko, I., Sawada, A., and Solnica-Krezel, L. (2009). Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. Semin. Cell Dev. Biol. *20*, 986–997.

Roth, S., Franken, P., Sacchetti, A., Kremer, A., Anderson, K., Sansom, O., and Fodde, R. (2012). Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury. PLoS One *7*, e38965.

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(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. Gastroenterology *142*, 1195–1205.

Rubinstein, M., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y. (2013). Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. Cell Host Microbe. *14*, 195–206.

- S -

Saad, R.S., Ghorab, Z., Khalifa, M. a, and Xu, M. (2011). CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. World J. Gastrointest. Surg. *3*, 159–166.

Saandi, T., Baraille, F., Derbal-Wolfrom, L., Cattin, A.-L., Benahmed, F., Martin, E., Cardot, P., Duclos, B., Ribeiro, A., Freund, J.-N., et al. (2013). Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4α in intestinal cancer. Oncogene *32*, 3782–3788.

Sacksteder, M. (1976). Occurrence of spontaneous tumors in the germfree F344 rat. J. Natl. Cancer Inst. *57*, 1371–1373.

Sadanandam, A., Lyssiotis, C. a, Homicsko, K., Collisson, E.A., Gibb, W., Wullschleger, S., Ostos, L., Lannon, W., Grotzinger, C., Del Rio, M., et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. Nat. Med. *19*, 619–625.

Sakaguchi, T., Gu, X., Golden, H.M., Suh, E., Rhoads, D.B., and Reinecker, H.C. (2002). Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. J. Biol. Chem. *277*, 21361–21370.

Salzman, N.H., Underwood, M.A., and Bevins, C.L. (2007). Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. Semin. Immunol. *19*, 70–83.

San Roman, A.K., Tovaglieri, A., Breault, D.T., and Shivdasani, R.A. (2015). Distinct Processes and Transcriptional Targets Underlie CDX2 Requirements in Intestinal Stem Cells and Differentiated Villus Cells. Stem Cell Reports *5*, 673–681.

Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Valls, E., Darling, D.S., Castells, A., and Postigo, A. (2015). ZEB1 and TCF4

reciprocally modulate their transcriptional activities to regulate Wnt target gene expression. Oncogene *34*, 5760–5770.

Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *20*, 695–723.

Sancho, R., Nateri, A.S., de Vinuesa, A.G., Aguilera, C., Nye, E., Spencer-Dene, B., and Behrens, A. (2009). JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumourigenesis in mice. EMBO J. *28*, 1843–1854.

Sangiorgi, E., and Capechhi, M. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. Nat. Genet. *40*, 915–920.

Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., et al. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. Genes Dev. *18*, 1385–1390.

Sansom, O.J., Meniel, V., Wilkins, J.A., Cole, A.M., Marsh, V., Jamieson, T.J., Guerra, C., Ashton, G.H., Barbacid, M., and Clarke, A.R. (2006). Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 14122–14127.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature *459*, 262–265.

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. Nature *469*, 415–418.

Savage, D. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu. Rev. Microbiol. *31*, 107–133.

Savkovic, S., Koutsouris, A., and Hecht, G. (1997). Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic Escherichia coli. Am. J. Physiol. *273*, C1160–C1167.

Savory, J.G.A, Bouchard, N., Pierre, V., Rijli, F.M., De Repentigny, Y., Kothary, R., and Lohnes, D. (2009). Cdx2 regulation of posterior development through non-Hox targets. Development *136*, 4099–4110.

Schlicker, A., Beran, G., Chresta, C.M., McWalter, G., Pritchard, A., Weston, S., Runswick, S., Davenport, S., Heathcote, K., Castro, D.A., et al. (2012). Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. BMC Med. Genomics *5*.

Schneider, M.R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trülzsch, K., Müller-Höcker, J., Vogelmann, R., Allgäuer, M., Gerhard, M., Steininger, S., et al. (2010). A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. PLoS One *5*, e14325.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells *4*, 7–25.

Scholl, C., Bansal, D., Döhner, K., Eiwen, K., Huntly, B.J.P., Lee, B.H., Rücker, F.G., Schlenk, R.F., Bullinger, L., Döhner, H., et al. (2007). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. J. Clin. Invest. *117*, 1037–1048.

Schreiber, R., Old, L., and Smyth, M. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science *331*, 1565–1570.

Schreibman, I.R., Baker, M., Amos, C., and McGarrity, T.J. (2005). The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. Am. J. Gastroenterol. *100*, 476–490.

Schröder, N., and Gossler, A. (2002). Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. Gene Expr. Patterns *2*, 247–250.

Schuijers, J., and Clevers, H. (2012). Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. EMBO J. *31*, 2685–2696.

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.

Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. Gastroenterology *134*, 849–864.

Sears, C.L. (2009). Enterotoxigenic Bacteroides fragilis: a rogue among symbiotes. Clin. Microbiol. Rev. *22*, **349–369.**

Semenov, M.V., Habas, R., MacDonald, B.T., and He, X. (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. Cell *131*, 1378.

Senter, L., Clendenning, M., Sotamaa, K., Hampel, H., Green, J., Potter, D., Lindblom, A., Lagerstedt, K., Thibodeau, S.N., Lindor, N., et al. (2008). The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline PMS2 mutations. October *135*, 419–428.

Shaked, H., Hofseth, L.J., Chumanevich, A., Chumanevich, A.A., Wang, J., Wang, Y., Taniguchi, K., Guma, M., Shenouda, S., Clevers, H., et al. (2012). Chronic epithelial NF-κB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 14007–14012.

Shang, B., Liu, Y., Jiang, S., and Liu, Y. (2015). Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. Sci. Rep. *5*, 15179.

Shih, I.M., Wang, T.L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S.R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 2640–2645.

Silberg, D.G., Swain, G.P., Suh, E.R., and Traber, P.G. (2000). Cdx1 and Cdx2 expression during intestinal development. Gastroenterology *119*, 961–971.

Silberg, D.G., Sullivan, J., Kang, E., Swain, G.P., Moffett, J., Sund, N.J., Sackett, S.D., and Kaestner, K.H. (2002). Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. Gastroenterology *122*, 689–696.

Simmini, S., Bialecka, M., Huch, M., Kester, L., van de Wetering, M., Sato, T., Beck, F., van Oudenaarden, A., Clevers, H., and Deschamps, J. (2014). Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. Nat. Commun. *5*, 5728.

Simons, B.D., and Clevers, H. (2011). Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. Cell *145*, 851–862.

Singh, B.N., Koyano-Nakagawa, N., Donaldson, A., Weaver, C. V., Garry, M.G., and Garry, D.J. (2015). Hedgehog Signaling during Appendage Development and Regeneration. Genes (Basel). *6*, 417–435.

Sivagnanasundaram, S., Islam, I., Talbot, I., Drummond, F., Walters, J., and Edwards, Y. (2001). The homeobox gene CDX2 in colorectal carcinoma: a genetic analysis. Br. J. Cancer *84*, 218–225.

Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es, J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., et al. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. Cell *143*, 134–144.

Solanas, G., and Batlle, E. (2011). Control of cell adhesion and compartmentalization in the intestinal epithelium. Exp. Cell Res. *317*, 2695–2701.

Soret, C., Martin, E., Duluc, I., Dantzer, F., Vanier, M., Gross, I., Freund, J.-N., and Domon-Dell, C. (2016). Distinct mechanisms for opposite functions of homeoproteins Cdx2 and HoxB7 in double-strand break DNA repair in colon cancer cells. Cancer Lett. *374*, 208–215.

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

Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. Cancer Res. *58*, 1130–1134.

Specian, R., and Oliver, M. (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. Am. J. Physiol. *260*, C183–C193.

Stanger, B.Z., Datar, R., Murtaugh, L.C., and Melton, D.A. (2005). Direct regulation of intestinal fate by Notch. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 12443–12448.

Stein, S., Fritsch, R., Lemaire, L., and Kessel, M. (1996). Checklist : vertebrate homeobox genes. Mech. Dev. *55*, 91–108.

Stringer, E., Duluc, I., Saandi, T., Davidson, I., Bialecka, M., Sato, T., Barker, N., Clevers, H., Pritchard, C., Winton, D., et al. (2012). Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. Development *139*, 465–474.

Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. Development *132*, 2093–2102.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. Science *256*, 668–670.

Subramanian, V., Meyer, B.I., and Gruss, P. (1995). Disruption of the murine homeobox gene Cdx1 affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. Cell *83*, 641–653.

Subtil, C., Guérin, E., Schneider, A., Chenard, M.-P., Martin, E., Domon-Dell, C., Duluc, I., Brabletz, T., Kedinger, M., Duclos, B., et al. (2007). Frequent rearrangements and amplification of the CDX2 homeobox gene in human sporadic colorectal cancers with chromosomal instability. Cancer Lett. *247*, 197–203.

Suh, E., and Traber, P.G. (1996). An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. Mol. Cell. Biol. *16*, 619–625.

Suh, E., Chen, L., Taylor, J., and Traber, P.G. (1994). A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. Mol. Cell. Biol. *14*, 7340–7351.

Sun, Q., Burton, R.L., and Lucas, K.G. (2013). Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. Blood *99*, 3302–3309.

- T -

Tabariès, S., Lapointe, J., Besch, T., Woollard, J., Tuggle, C.K., and Jeannotte, L. (2005). Cdx protein interaction with Hoxa5 regulatory sequences contributes to Hoxa5 regional expression along the axial skeleton. Mol. Cell. Biol. *25*, 1389–1401.

Tabassum, D.P., and Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. Nat. Rev. Cancer *15*, 473–483.

Tagawa, T., Haraguchi, T., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Inada, K., and Iba, H. (2012). Multiple microRNAs induced by Cdx1 suppress Cdx2 in human colorectal tumour cells. Biochem. J. *447*, 449–455.

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., et al. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel β-catenin-interacting protein. Genes Dev. *14*, 1741–1749.

Takahashi, M., and Wakabayashi, K. (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. Cancer Sci. *95*, 475–480.

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.

Taketo, M.M., and Edelmann, W. (2009). Mouse models of colon cancer. Gastroenterology *136*, 780–798.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci. *94*, 965–973.

Taylor, J., Boll, W., Levy, T., Suh, E., Siang, S., Mantei, N., and Traber, P. (1997). Comparison of intestinal phospholipase A/lysophospholipase and sucrase-isomaltase genes suggest a common structure for enterocyte-specific promoters. DNA Cell Biol. *16*, 1419–1428.

Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature *398*, 422–426.

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

Thoene, S., Rawat, V.P.S., Heilmeier, B., Hoster, E., Metzeler, K.H., Herold, T., Hiddemann, W., Gökbuget, N., Hoelzer, D., Bohlander, S.K., et al. (2009). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia *23*, 649–655.

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

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W., Pagès, F., et al. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res. *71*, 1263–1271.

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

T**roelsen, J.T.**, Mitchelmore, C., Spodsberg, N., Jensen, A.M., Norén, O., and Sjöström, H. (1997). Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homoeodomain protein Cdx-2. Biochem. J. *322*, 833–838.

Tsai, J.-H., Lin, Y.-L., Cheng, Y.-C., Chen, C.-C., Lin, L.-I., Tseng, L.-H., Cheng, M.-L., Liau, J.-Y., and Jeng, Y.-M. (2015). Aberrant expression of annexin A10 is closely related to gastric phenotype in serrated pathway to colorectal carcinoma. Mod. Pathol. *28*, 268–278.

Tutlewska, K., Lubinski, J., and Kurzawski, G. (2013). Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. Hered. Cancer Clin. Pract. *11*, 9.

- U -

Uesaka, T., Kageyama, N., and Watanabe, H. (2004). Identifying target genes regulated downstream of Cdx2 by microarray analysis. J. Mol. Biol. *337*, 647–660.

Uronis, J.M., Mühlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., and Jobin, C. (2009). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. PLoS One *4*, e6026.

- V -

Vang, R., Gown, A.M., Wu, L.-S.-F., Barry, T.S., Wheeler, D.T., Yemelyanova, A., Seidman, J.D., and Ronnett, B.M. (2006). Immunohistochemical expression of CDX2 in primary ovarian mucinous tumors and metastatic mucinous carcinomas involving the ovary: comparison with CK20 and correlation with coordinate expression of CK7. Mod. Pathol. *19*, 1421–1428.

Vannucci, L., Stepankova, R., Kozakova, H., Fiserova, A., Rossmann, P., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Colorectal carcinogenesis in germ-free and conventionally reared rats: different intestinal environments affect the systemic immunity. Int. J. Oncol. *32*, 609–617.

Varelas, X., Miller, B.W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F.A., Sakuma, R., Pawson, T.,

Hunziker, W., McNeill, H., et al. (2010). The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. Dev. Cell *18*, 579–591.

Vasen, H., Watson, P., Mecklin, J., and Lynch, H. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology *116*, 1453–1456.

Vauhkonen, M., Vauhkonen, H., and Sipponen, P. (2008). Helicobacter pylori infection induces a reversible expression of the CDX2 transcription factor protein in human gastric epithelium. Scand. J. Gastroenterol. *43*, 915–921.

Verzi, M.P., Shin, H., He, H.H., Sulahian, R., Meyer, C., Montgomery, R.K., Fleet, J.C., Brown, M., Liu, X.S., and Shivdasani, R.A. (2010). Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. Dev. Cell *19*, 713–726.

Verzi, M.P., Shin, H., Ho, L.-L., Liu, X.S., and Shivdasani, R. a (2011). Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. Mol. Cell. Biol. *31*, 2026–2039.

Vooijs, M., Liu, Z., and Kopan, R. (2011). Notch: Architect, Landscaper, and Guardian of the Intestine. Gastroenterology *141*, 448–459.

- W -

Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat. Rev. Cancer. *9*, 537–549.

Waldner, M.J., Foersch, S., and Neurath, M.F. (2012). Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. Int. J. Biol. Sci. *8*, 1248–1253.

Wang, R., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., et al. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. Genes Dis. *1*, 87–105.

Wang, S., Liu, Z., Wang, L., and Zhang, X. (2009). NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. Cell. Mol. Immunol. *6*, 327–334.

Wang, X., Wei, W., Kong, F., Lian, C., Luo, W., Xiao, Q., and Xie, Y. (2012). Prognostic significance of Cdx2 immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis of published literatures. J. Exp. Clin. Cancer Res. *31*, 9473–9484.

Wei, K., Clark, A.B., Wong, E., Kane, M.F., Mazur, D., Parris, T., Kolas, N., Russell, R., Jr, H.H., Kneitz, B., et al. (2003). Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. Genes Dev. *17*, 603–614.

Werling, R., Yaziji, H., Bacchi, C., and Gown, A. (2003). CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. Am. J. Surg. Pathol. *27*, 303–310.

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.

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., De Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., Van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., et al. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. Cell *111*, 241–250.

Wicking, C., Simms, L., Evans, T., Walsh, M., Chawengsaksophak, K., Beck, F., Chenevix-Trench, G., Young, J., Jass, J., Leggett, B., et al. (1998). CDX2, a human homologue of Drosophila caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. Oncogene *17*, 657–659.

Wijnen, J., de Leeuw, W., Vasen, H., van der Klift, H., Møller, P., Stormorken, A., Meijers-Heijboer, H., Lindhout, D., Menko, F., Vossen, S., et al. (1999). Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6

germline mutations. Nat. Genet. *23*, 142–144.

de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te Riele, H. (1995). Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. Cell *82*, 321–330.

de Wind, N., Dekker, M., Claij, N., Jansen, L., van Klink, Y., Radman, M., Riggins, G., van der Valk, M., van't Wout, K., and te Riele, H. (1999). HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions. Nat. Genet. *23*, 359–362.

Witek, M.E., Snook, A.E., Lin, J.E., Blomain, E.S., Xiang, B., Magee, M., and Waldman, S. a. (2014). A Novel CDX2 Isoform Regulates Alternative Splicing. PLoS One *9*, e104293.

Wojciechowicz, K., Cantelli, E., Van Gerwen, B., Plug, M., Van Der Wal, A., Delzenne-Goette, E., Song, J., De Vries, S., Dekker, M., and Te Riele, H. (2014). Temozolomide increases the number of mismatch repair-deficient intestinal crypts and accelerates tumorigenesis in a mouse model of Lynch syndrome. Gastroenterology *147*, 1064–1072.

Wu, L.H., and Lengyel, J.A. (1998). Role of caudal in hindgut specification and gastrulation suggests homology between Drosophila amnioproctodeal invagination and vertebrate blastopore. Development *125*, 2433–2442.

Wu, B., Crampton, S., and Hughes, C. (2007). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. Immunity *26*, 227–239.

Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. Nat. Med. *15*, 1016–1022.

Wu, Y., Berends, M.J., Sijmons, R.H., Mensink, R.G., Verlind, E., Kooi, K. a, van der Sluis, T., Kempinga, C., van dDer Zee, A.G., Hollema, H., et al. (2001). A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Nat. Genet. *29*, 137–138.

- X -

Xin, S., Huixin, C., Benchang, S., Aiping, B., Jinhui, W., Xiaoyan, L., Yu, W.B.C., and Minhu, C. (2008). Expression of Cdx2 and claudin-2 in the multistage tissue of gastric carcinogenesis. Oncology *73*, 357–365.

Xu, F., Li, H., and Jin, T. (1999). Cell type-specific autoregulation of the Caudal-related homeobox gene Cdx-2/3. J. Biol. Chem. *274*, 34310–34316.

Xu, L., Corcoran, R.B., Welsh, J.W., Pennica, D., and Levine, A.J. (2000). WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. Genes Dev. *14*, 585–595.

- Y -

Yagi, O.K., Akiyama, Y., and Yuasa, Y. (1999). Genomic structure and alterations of homeobox gene CDX2 in colorectal carcinomas. Br. J. Cancer *79*, 440–444.

Yamamoto, H., Bai, Y.Q., and Yuasa, Y. (2003). Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. *300*, 813–818.

Yang, V.W., and Bialkowska, A.B. (2015). Intestinal tumorigenesis: Mechanisms of development and progression.

Yang, Q., Bermingham, N. a, Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. Science *294*, 2155–2158.

Yao, X., Buermeyer, A., Narayanan, L., Tran, D., Baker, S., Prolla, T., Glazer, P., Liskay, R., and Arnheim, N. (1999). Different mutator phenotypes in Mlh1- versus Pms2-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 6850–6855.

Young, T., and Deschamps, J. (2009). Hox, Cdx, and anteroposterior patterning in the mouse embryo. Curr.

Top. Dev. Biol. *88*, 235–255.

Young, T., Rowland, J.E., van de Ven, C., Bialecka, M., Novoa, A., Carapuco, M., van Nes, J., de Graaff, W., Duluc, I., Freund, J.N., et al. (2009). Cdx and Hox genes differentially regulate posterior axial growth in mammalian embryos. Dev. Cell *17*, 516–526.

- Z -

Zacharias, W.J., Madison, B.B., Kretovich, K.E., Walton, K.D., Richards, N., Udager, A.M., Li, X., and Gumucio, D.L. (2012). Hedgehog signaling controls homeostasis of adult intestinal smooth muscle. Dev. Biol. *355*, 152–162.

Zamai, L., Ponti, C., Mirandola, P., Gobbi, G., Papa, S., Galeotti, L., Cocco, L., and Vitale, M. (2007). NK cells and cancer. J. Immunol. (Baltimore, Md.1950) *178*, 4011–4016.

Zhang, G., and Rudney, J. (2011). Streptococcus cristatus attenuates Fusobacterium nucleatum-induced cytokine expression by influencing pathways converging on nuclear factor-κB. Mol. Oral Microbiol. *26*, 150–163.

Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Gao, Z., Ehrlich, S.M., Fields, J.Z., and Boman, B.M. (2001). Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. Cancer Res. *61*, 8664–8667.

Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., Dawson, D., Willis, J.E., Markowitz, S.D., Camargo, F.D., et al. (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, E1312–E1320.

Zhou, X.-P., Waite, K.A., Pilarski, R., Hampel, H., Fernandez, M.J., Bos, C., Dasouki, M., Feldman, G.L., Greenberg, L.A., Ivanovich, J., et al. (2003). Germline PTEN promoter mutations and deletions in Cowden/Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome result in aberrant PTEN protein and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway. Am. J. Hum. Genet. *73*, 404–411.

Zhu, L., Gibson, P., Currle, D., Tong, Y., Richardson, R., Bayazitov, I., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D., and Gilbertson, R. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. Nature *457*, 603–607.

Ziv, E., and Bendayan, M. (2000). Intestinal Absorption of Peptides Through the Enterocytes. Microsc. Res. Tech. *49*, 346–352.

Z**wijsen, A.,** Verschueren, K., and Huylebroeck, D. (2003). New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. FEBS Lett. *546*, 133–139.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Article 1:

Balbinot C, Armant A, Elarouci N, Marisa L, Martin E, De Clara E, Deschamps J, Beck F, Freund JN, Duluc I. Non-Cell-Autonomous Tumor Suppressor Activity of the Homeobox Gene Cdx2 in the Gut. *Manuscrit soumis*

Article 2:

Balbinot C, Vanier M, Nair A, Armant O, Soret C, Martin E, Pénichon J, Saandi Thoueiba, Reimund JM, Deschamps J, Beck F, Domon-Dell C, Gross I, Duluc I, Freund JN. Fine-tuning and autoregulation of an intestinal homeobox gene, Cdx2, by alternative splicing. *Manuscrit soumis*

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales:

"Non-cell-autonomous tumor suppressor activity of the Cdx2 homeobox gene in the gut through the microenvironment".
Balbinot C, Armant O, Martin E, Freund J-N, Duluc I
1st Immunology Meeting of Strasbourg, Strasbourg, 4 octobre 2016.

"*Non-cell-autonomous tumor suppressor activity of the intestinal homeobox gene Cdx2*"
Balbinot C, Martin E, Freund J-N, Duluc I
Digestive Disease Week (DDW), San Diego, 23 mai 2016. **Certificat de reconnaissance pour mon activité scientifique.**

"The homeobox gene CDX2 has non-cell-autonomous tumor suppressor activity in the gut"
Balbinot C, Armant O, Martin E, Marisa L, De Reynies A, Freund J-N, Duluc I
23rd Annual Meeting of the European Cancer Center (EuCC), Strasbourg, 13 mai 2016. **Prix de la meilleure communication.**

"Epissage alternatif du gène homéotique Cdx2 : fonction et autorégulation"
Balbinot C, Nair A, Vanier M, Duluc I, Freund J-N
XXXIV^{ième} congrès du Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Lille, 10 mars 2016. **Prix de la meilleure communication.**

"Conséquences physiopathologiques de l'invalidation de Cdx2 dans l'intestin adulte"
Balbinot C, DeClara E, Armant O, Beck F, Deschamps J, Martin E, Freund J-N, Duluc I
2èmes Journées Scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, 1er Juillet 2014

"Etude des lésions polypoïdes du caecum apparaissant suite à l'invalidation conditionnelle de Cdx2 dans l'intestin adulte"

DeClara E, Balbinot C, Saandi T, Armant O, Stringer EJ, Beck F, Deschamps J, Martin E, Freund J-N, Duluc I

XXXI^{ième} congrès du Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Montpellier, 4 avril 2013

Poster:

"A novel intercellular mode of action for the tumour suppressor function of the homeotic transcription factor Cdx2 in the adult gut"

Balbinot C, Martin E, Freund J-N, Duluc I

4èmes Journées Scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, 28 Avril 2016**.**

ENSEIGNEMENT

Au cours de mes deux premières années de thèse, j'ai exercé la fonction de monitrice d'enseignement à l'Université de Strasbourg. Dans le cadre de Travaux Pratiques et Dirigés de biostatistiques, biologie cellulaire et biologie du développement, j'ai encadré des étudiants en Licence Science de la Vie (L1-L3) et en Première Année Commune des Etudes de Santé (PACES).

Camille BALBINOT

Fonction et mode d'action du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers de l'intestin

Résumé :

Chez l'adulte, le facteur de transcription homéotique Cdx2 est spécifiquement exprimé dans l'intestin dont il maintient l'identité et contrôle l'homéostasie. Des études récentes menées chez l'homme ont identifié des formes de cancer colorectal de mauvais pronostic dans lesquelles l'expression de Cdx2 est très fortement réduite.

Ce travail de thèse visait à étudier les conséquences physiopathologiques de la perte de fonction de Cdx2 dans l'intestin adulte. A partir d'un modèle murin d'invalidation conditionnelle et mosaïque de Cdx2, nos résultats montrent que la perte de Cdx2 conduit au développement de lésions caecales de type gastrique qui n'évoluent pas spontanément en cancer. Ces lésions créent cependant un microenvironnement inflammatoire qui favorise la transformation maligne de cellules épithéliales voisines intactes pour Cdx2 et prédisposées à la tumorigénèse.

Globalement, ces résultats montrent que Cdx2 exerce une fonction suppresseur de tumeurs « cellule non-autonome » dans l'intestin.

Mots clés : Cdx2, cancer colorectal, intestin, micoenvironnement

Abstract:

The intestine-specific transcription factor Cdx2 is required throughout life for intestinal homeostasis and for the maintenance of intestinal identity. Several recent studies showed that Cdx2 expression is dramatically reduced in some human colon cancers of poor prognosis.

This work aimed to investigate the pathophysiological consequences of the loss of Cdx2 in the adult gut. Conditional mosaic ablation of Cdx2 in mice causes gastric-type metaplasia in the cecum which do not spontaneously evolve to cancer. However, these lesions strongly modify the inflammatory microenvironment which facilitates the malignant transformation of adjacent Cdx2-intact and cancer-prone epithelial cells.

Collectively, these results unravel a novel and original function of Cdx2, namely its non-cell autonomous tumor suppressor activity in the gut.

Key words: Cdx2, colorectal cancer, intestine, microenvironment