

Thesis, COLLÉGIALITÉ, FRANZEN Rachelle

Auteur : Bomboire, Pauline

Promoteur(s) : MEUWIS, Marie-Alice

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/23180>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Caractérisation de la protéine NKCC1 dans la réponse aux traitements du cancer colorectal

Pauline Bomboire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Master en Sciences Biomédicales à finalité approfondie
en Recherche Multidisciplinaire

Année académique 2024-2025

Promoteur:

Marie-Alice Meuwis

Encadrant :

Pierre Adam



Table des matières

Remerciements.....	4
Résumé.....	5
Abstract.....	7
Abréviations.....	9
Introduction	11
1.1 Anatomie et histologie du colon	1
1.1.1 Histologie générale au niveau colorectal.....	1
1.1.2 Composition des cryptes coliques	1
1.2 Le cancer colorectal	2
1.2.1 Épidémiologie	2
1.2.2 Étiologie et classification des CCR	3
1.3 Séquence de transformation adénome-carcinome	4
1.3.1 Formation de l'adénome.....	4
1.3.1.1 Apparition et progression de la dysplasie.....	5
1.3.1.1.1 Évènements génétiques précoces : mutation du gène APC	5
1.3.2 Adénocarcinome.....	6
1.3.2.1 Stratification des adénocarcinomes colorectaux : Approche clinique et moléculaire	6
1.4 Dépistage et méthode diagnostique du CCR.....	7
1.5 Les traitements associés au CCR.....	7
1.5.1 Chimiothérapie.....	8
1.5.1.1 5-Fluorouracil	8
1.5.1.2 Oxaliplatine	9
1.5.1.3 Thérapie combinées (FOLFOX)	10
1.5.2 Radiothérapie.....	10
1.6 Mise en évidence de la protéine « NKCC1 » dans le CCR	12
1.6.1 Caractéristiques de la protéine NKCC1.....	12
1.6.2 Fonctions physiologiques de NKCC1	13
1.6.3 Localisation et rôle de NKCC1 dans le transport ionique colorectal.....	13
1.6.4 Inhibition de la protéine NKCC1	14
1.6.4.1 Bumétanide	14
1.6.5 Implication de la protéine NKCC1 dans les cancers	15
1.6.6 NKCC1 et les cellules souches tumorales.....	16
Contexte et objectifs du mémoire	17
Matériel et méthodes	17
3.1 Culture cellulaire	18
3.2 Knockdown de l'expression de NKCC1 via shRNA (ou siRNA)	18
3.2.1 Transduction des 3 lignées en réalisant un knockdown avec des shRNAs	19
3.3 Détection par Immuno blotting	20
3.3.1 Dosage protéique	20
3.3.2 Western Blot	20
3.4 RTqPCR.....	21
3.5 Mise au point condition de cultures : ensemencement	22

3.5.1	Modèle de culture monocouche (2D)	22
3.5.2	Génération des sphéroïdes	23
3.6	Test de viabilité suite à une chimiothérapie (5-FU).....	23
3.6.1	Condition de culture – tests préliminaires	23
3.6.2	Condition de traitements au 5-FU et véhicule (condition contrôle) avec et sans knockdown de <i>SLC12A2</i> ou inhibition catalytique.....	23
3.6.3	Mesure de la confluence cellulaire sur l'IncuCyte	24
3.6.4	Mesure de la viabilité avec le kit CellTiter-Glo.....	25
3.7	Mesure de la viabilité suite à une irradiation en culture 2D et en 3D.....	25
3.7.1	Mesure de la viabilité cellulaire avec le clonogenic assay réalisé sur cultures 2D	25
3.7.2	Mesure de la viabilité cellulaire à l'IncuCyte pour les cultures 3D	26
3.7.3	Mesure de la viabilité cellulaire avec le kit CellTiter-Glo pour les cultures 3D.....	26
3.8	Statistiques	26
	Résultats	27
4.1	Validation de l'inhibition de l'expression de <i>SLC12A2</i> par shRNAs sur trois lignées.....	27
4.2	Viabilité des différents modèles de culture 2D-3D des 3 lignées en condition basale, après knockdown de NKCC1.....	27
4.2.1	Knockdown de NKCC1 avec un shRNA	27
4.2.2	Viabilité observée sur le modèle de culture en monocouche en 2D	28
4.2.3	Viabilités observées sur le modèle de culture 3D sphéroïde	28
4.3	Effet de la diminution d'expression de NKCC1 sur des marqueurs de prolifération cellulaire.....	30
4.4	Comparaison de l'effet du knockdown de NKCC1 en modèle de culture 2D et 3D sur la prolifération cellulaire	31
4.5	Résultats de l'effet de l'inhibition de NKCC1 dans son activité d'échangeuse d'ions par le bumétanide sur la viabilité cellulaire des HT-29.....	32
4.5.1	Viabilité des cellules cultivées en modèle monocouche (2D).....	32
4.5.2	Viabilité des cellules cultivées en sphéroïdes (modèle 3D)	33
4.6	Effet d'un traitement au 5-FU sur la viabilité cellulaire de cultures 2D et 3D réalisée avec les 3 lignées cellulaires commerciales cancéreuses avec et sans effet sur l'expression ou l'activité échangeuse d'ion de NKCC1	34
4.6.1	Effet de la modulation de NKCC1 par knockdown.....	34
4.6.1.1	Viabilité des cellules cultivées en modèle monocouche (2D)	34
4.6.1.2	Viabilité des cellules cultivées en sphéroïde (modèle 3D)	35
4.7	Effet du traitement 5-Fu sur la viabilité des cellules cancéreuses sous inhibition de la fonction transporteur d'ions de NKCC1 par traitement au bumétanide	36
4.7.1	Viabilité des cellules (HT-29) cultivées en modèle monocouche 2D	36
4.7.2	Viabilité des cellules (HT-29) cultivées en sphéroïde (modèle 3D)	36
4.8	Effet de l'irradiation sur la viabilité cellulaire des 3 lignées en cultures 2D et des HT-29 en modèle sphéroïde (3D).....	37
4.8.1	Viabilité des cellules cultivées en modèle monocouche (2D).....	37
4.8.2	Viabilité des cellules (HT-29) cultivées en modèle sphéroïde (3D)	37
	Discussion/Conclusion.....	28
	Bibliographie	44
	Annexes	40

Remerciements

Avant de débiter ce mémoire comme il se doit, je tenais à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de celui-ci.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Edouard Louis pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de gastroentérologie translationnelle.

Je remercie sincèrement ma promotrice, le Docteur Marie-Alice Meuwis, pour son accueil chaleureux, sa bienveillance constante, ses précieux conseils et son accompagnement attentif tout au long de ce travail.

Je remercie tout particulièrement Pierre Adam, pour sa grande disponibilité, la qualité de son accompagnement lors des manipulations, ses conseils toujours pertinents et sa patience infailible, même face à mes questions les plus simples. Merci également pour sa bonne humeur communicative, les instants « potins » et les fous rires partagés qui ont permis de décompresser de temps en temps.

Je remercie Catherine Salée pour son soutien au laboratoire, sa générosité et sa capacité à rendre les manipulations presque faciles, du moins en apparence.

Je remercie également Charlotte Massot et Marty Stepniak pour leurs conseils et leur bienveillance tout au long de ce mémoire.

Je remercie aussi Juliette Beuriot, Caroline Shadouh ainsi que toute l'équipe de rhumatologie pour leur accueil chaleureux, leur convivialité et leur bonne humeur, particulièrement lors des pauses de midi qui ont égayé mes six mois de stage.

Je souhaite également remercier de tout cœur mes parents et mon frère, pour leur soutien tout au long de mes études. Leur présence rassurante, leur motivation constante et leur confiance m'ont portée dans les moments de doutes.

À mes camarades de Sciences Biomédicales, je suis reconnaissante pour cette solidarité sans failles, les crises de nerfs collectives, les sessions de panique à J-1. Cette dernière année aurait été bien rude sans leur entraide, leur humour, leurs encouragements et leur énergie positive.

Enfin, je remercie mes fidèles amies, qui me suivent depuis la première année à l'université, qui partagent mes joies comme mes peines, et avec qui j'ai pu relâcher la pression, penser à autre chose ... et faire la fête quand il le fallait.

Résumé

La protéine NKCC1, un cotransporteur membranaire sodium-potassium-chlore, est impliquée dans la régulation du volume cellulaire, la prolifération et a été retrouvée comme biomarqueur tissulaire du cancer colorectal, avec une expression accrue observée dès les stades précoces de la carcinogenèse colique, notamment dans les dysplasies et les adénocarcinomes ainsi que dans d'autres pathologies tumorales ou inflammatoires. Ce mémoire s'inscrit dans un projet plus vaste dédié à l'étude de son rôle dans le cancer colorectal. L'objectif principal de ce mémoire est d'évaluer l'effet d'une modification d'expression de NKCC1 ou l'inhibition de sa fonction sur la viabilité cellulaire de cellules tumorales différentes (lignées commerciales HT-29, HCT116 et Caco-2) et ainsi, leur potentielle résistance suite à un traitement chimiothérapeutique de type 5-Fluorouracile (5-FU) ou suite à une irradiation simulant la radiothérapie.

Deux approches d'inhibition de NKCC1 ont été utilisées pour évaluer son impact comparativement à son expression normale ou activité basale et avec et sans traitement 5-FU ou après irradiation. Deux knockdowns spécifiques de *SLC12A2* obtenus par shRNA (shNKCC1 #1 et #2) ont été utilisés, ainsi qu'une inhibition pharmacologique par le bumétanide. L'évaluation de la modulation de NKCC1 sur la viabilité cellulaire, a été réalisée par plusieurs techniques permettant de mesurer l'ATP intracellulaire, de doser le cristal violet assimilé par les cellules viables, par comptage de celle-ci ou encore de mesurer la taille de sphéroïdes obtenus après transduction ou traité par le bumétanide, avec et sans traitement au 5-FU ou suite à une irradiation.

Malgré une certaine hétérogénéité dans les résultats obtenus entre les différentes lignées commerciales utilisées, leur configuration en culture et les méthodes utilisées pour mesurer la viabilité cellulaire, les résultats montrent qu'une inhibition de l'activité échangeuse d'ions de NKCC1 ainsi que son knockdown est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire des sphéroïdes HT-29. À l'inverse, une réduction de la viabilité est observée lorsque les HT-29, sont cultivées en modèle monocouche 2D. En réponse au traitement 5-FU, seule la condition shNKCC1 #2 sur les cellules HT-29, semble présenter une sensibilité accrue. Le traitement radiothérapeutique (irradiation cellulaire), montre que les sphéroïdes HT-29 knockdowns pour NKCC1 ont de manière statistiquement significative une viabilité qui reste stable plus la dose d'irradiation augmente comparée à la condition sh contrôle (SCR) qui montre une viabilité qui diminue à de fortes doses d'irradiation (à partir de 2 Gray).

En conclusion, ce travail met en évidence le rôle complexe de NKCC1 et de sa perte d'expression dans la prolifération tumorale. Au niveau méthodologique, le type de modèle cellulaire utilisé (ligné modèle ou type de culture 2D ou 3D) est important et impact les résultats obtenus de façon parfois contradictoire. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches sur des modèles plus proches de tumeurs afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans les processus impactant la viabilité tumorale en réponse à deux stratégies de traitement utilisées dans le CCR.

Abstract

NKCC1, a sodium-potassium-chloride membrane cotransporter, is involved in the regulation of cell volume and proliferation. It has been identified as a tissue biomarker of colorectal cancer (CRC), with increased expression observed from the early stages of colorectal carcinogenesis, particularly in dysplastic lesions and adenocarcinomas, as well as in other tumor or inflammatory pathologies. This thesis is part of a broader research project dedicated to investigating the role of NKCC1 in colorectal cancer.

The main objective of this work is to evaluate the effect of a modification in NKCC1 expression or the inhibition of its function on the viability of different tumor cell lines (HT-29, HCT116, and Caco-2), and thus their potential resistance to chemotherapeutic treatment with 5-Fluorouracil (5-FU) or following irradiation simulating radiotherapy.

Two approaches were used to inhibit NKCC1 and assess its impact in comparison to its normal expression or basal activity, both with and without 5-FU treatment or irradiation. Specific knockdowns of *SLC12A2* were achieved using shRNA (shNKCC1 #1 and #2), as well as pharmacological inhibition via bumetanide. The impact of NKCC1 modulation on cell viability was assessed through various techniques: measurement of intracellular ATP, crystal violet uptake by viable cells, cell counting, and measurement of the size of spheroids obtained after transduction or bumetanide treatment, with or without 5-FU or irradiation.

Despite some heterogeneity in the results obtained across different commercial cell lines, culture configurations, and viability assessment methods, the findings suggest that inhibition of NKCC1 ion transport activity or its knockdown is associated with increased proliferation of HT-29 spheroids. Conversely, a reduction in viability is observed when HT-29 cells are cultured in 2D monolayers. In response to 5-FU treatment, only the shNKCC1 #2 condition in HT-29 cells seems to present increased sensitivity. Regarding radiotherapy, knockdown HT-29 spheroids maintained significantly stable viability as irradiation dose increased, compared to the scrambled control condition, which showed reduced viability at higher doses (from 2 Gray onwards).

In conclusion, this study highlights the complex role of NKCC1 and its downregulation in tumor cell proliferation. From a methodological perspective, the type of cell model used (cell line or type of 2D or 3D culture) is important and may impact results in sometimes contradictory ways. Further investigations using models more representative of real tumors are needed to better understand the

role of this protein in processes affecting tumor viability in response to the two therapeutic strategies commonly used in CRC.

Abréviations

5-FU	5-fluorouracile
APC	Adenomatous polyposis coli
BK	Big Potassium
CA-19-9	Antigène carbohydrates
CAC	Colitis associated cancer
CEA	Antigène carcinoembryonnaire
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator
CMS	Consensus des sous-types moléculaires
CCR	Cancer colorectal
CSC	Cancer stem cells
DSS	Deleted in colorectal carcinoma
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
EMT-like	Epithelial to mesenchymal transition-like
FdUMP	Fluoro-deoxyuridine monophosphate
FLOFOX	5-FU, Ox, leucovorine
HGD	Dysplasie de haut grade
KRAS	Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog
LGD	Dysplasie de bas grade
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MMR	Mismatch repair
MSI	Instabilité des microsatellites
Ox	Oxaliplatine
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Reactive oxygen species
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SLC12A2	Solute Carrier Family 12 Member 2
TLS	Séquences lentivirales terminales répétées

TIMP-1	Tissue inhibition of metalloprotease de type 1
TNM	Tumor, Nœuds lymphatiques, Métastases
TP53	Protein tumor suppressor p53
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
rLV	Vecteurs lentiviraux recombinants



Introduction

1.1 Anatomie et histologie du colon

1.1.1 Histologie générale au niveau colorectal

Le colon est composé de 4 grandes couches : une muqueuse, une sous-muqueuse, une musculieuse (interne et externe) et la séreuse. La muqueuse est la couche la plus interne et est tapissée d'un épithélium simple cylindrique organisé en cryptes de Lieberkühn qui s'enfoncent dans le tissu conjonctif sous-jacent. Ces cryptes assurent la sécrétion du mucus, l'absorption d'eau, de certains électrolytes et le renouvellement cellulaire (1) (**Figure 1**).

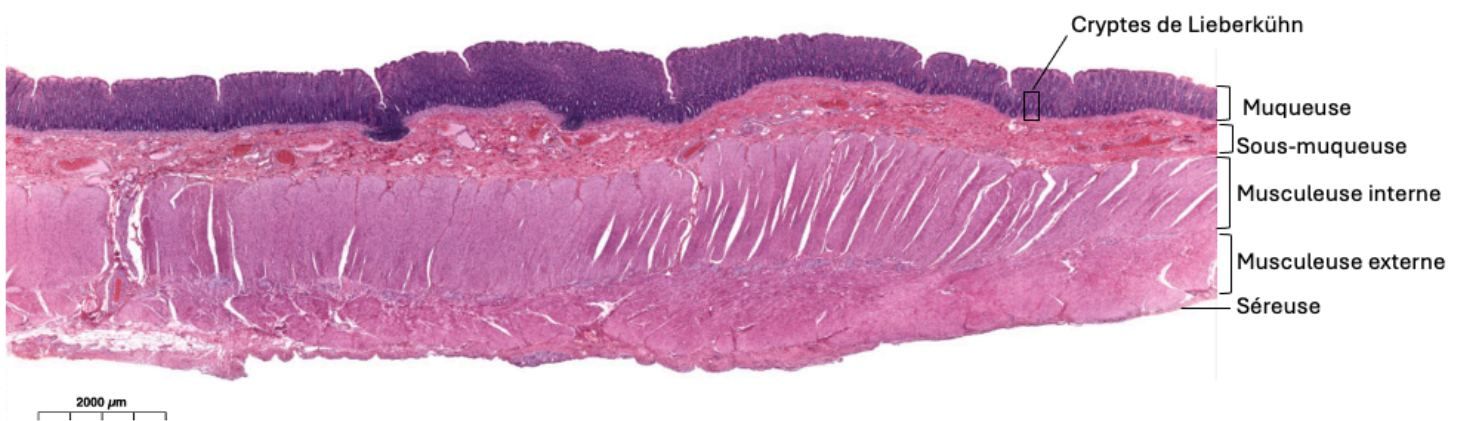


Figure 1: Coupe histologique longitudinale du colon (Robert.L, 2014) (1).

1.1.2 Composition des cryptes coliques

Au niveau colorectal, l'épithélium est composé de nombreuses cryptes avec une organisation cellulaire dynamique. À la base des cryptes se trouvent les cellules souches intestinales exprimant le marqueur Lgr5 ainsi que les cellules +4 localisées quatre positions au-dessus. Ces dernières, quiescentes en condition normale, peuvent se réactiver en cas de lésion pour participer à la régénération de l'épithélium (**Figure 2**). Ces cellules jouent un rôle dans l'autorenouvellement de l'épithélium colique grâce à leur capacité de prolifération et de différenciation élevée. En plus de leur rôle dans l'homéostasie, les cellules souches interviennent dans la réparation tissulaire en réponse aux dommages de l'épithélium. Ces cellules donnent naissance aux cellules d'amplification transitoire (TA) situées en amont, qui subissent plusieurs cycles de division rapide avant de se différencier en cellules spécialisées. Les cellules TA migrent progressivement vers le sommet des cryptes et se différencient. Les cellules différenciées assurent diverses fonctions spécifiques, participent au renouvellement constant de l'épithélium (environ tous les 4 à 5 jours) et sont éliminées par apoptose dans la lumière intestinale (2)(3)(**Figure 3**). Les cellules différenciées comprennent des entérocytes spécialisés dans l'absorption de l'eau, des électrolytes et des acides gras à chaîne courte. Elles comprennent également des cellules caliciformes, très nombreuses, responsables de la sécrétion de mucus qui forme une

barrière protectrice entre les cellules épithéliales et le contenu intestinal tout en facilitant la progression du contenu luminal. Parmi les cellules différenciées, on retrouve des cellules entéroendocrines sécrétant diverses hormones intestinales et, enfin, des cellules M, spécialisées dans le transport des antigènes de la lumière intestinale vers les cellules immunitaires qui se situent dans les plaques de Peyer (4)(5)(6) (**Figure 2**).

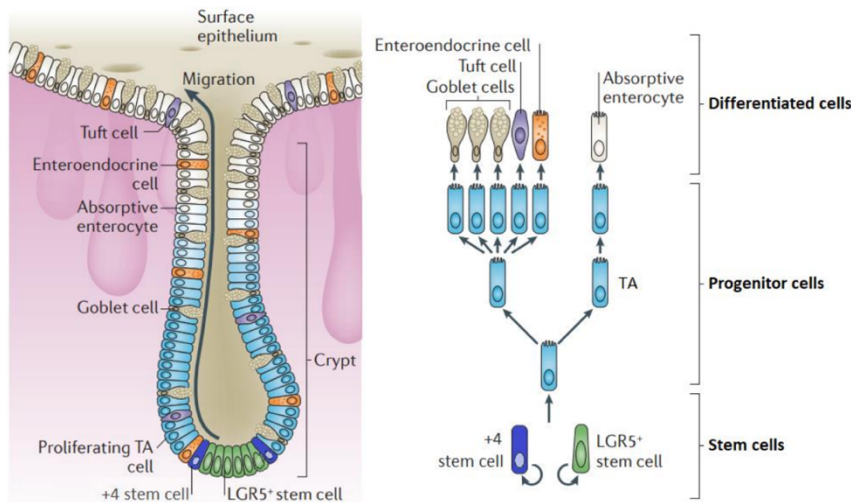


Figure 2: Cryptes de Lieberkühn, les différentes composantes cellulaires (3)

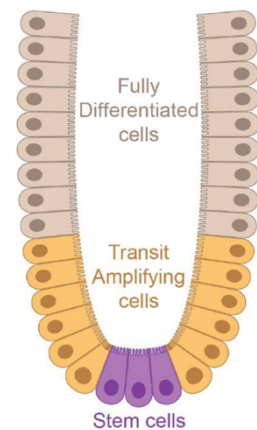


Figure 3: Cryptes de Lieberkühn. Transformation des cellules souches (2)

1.2 Le cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est un type de cancer qui touche les cellules du colon et du rectum qui font partie du gros intestin. Le CCR se développe souvent à partir de polypes adénomateux qui sont des excroissances bénignes. Les cellules à l'origine de ces excroissances acquièrent un phénotype cancéreux conduisant au développement d'une tumeur maligne (CCR). Les adénocarcinomes représentent 90% des cancers colorectaux et naissent à partir des cellules glandulaires de la muqueuse qui tapissent l'intérieur de l'intestin (7)(8).

1.2.1 Épidémiologie

Le cancer colorectal représente un problème majeur de santé publique, affectant des millions de personnes chaque année, il constitue une cause importante de la mortalité et de la morbidité. En 2020, le CCR a été identifié comme le troisième cancer le plus diagnostiqué dans le monde après le cancer du sein et du poumon, avec près de 2 millions de nouveaux cas recensés. Il constitue la deuxième cause de cancer chez les femmes (après le sein) et le troisième chez les hommes (après la prostate et le poumon), tant dans les pays développés que dans les pays en développement. Le CCR présente une incidence et une mortalité 25% moins importante chez la femme que chez l'homme. En Belgique, le CCR représente environ 10% des cancers diagnostiqués chaque année, avec environ 2 600 personnes

qui décèdent suite à ce cancer (7)(9)(10). La survie moyenne au CCR, à 5 ans, en Belgique est estimée 69% chez les hommes et de 71% chez les femmes. Environ 90% des CCR surviennent chez des personnes de plus de 50 ans, dont le mode de vie est plutôt sédentaire (7)(11). L'alimentation, l'obésité, le tabagisme ainsi que certaines maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) peuvent être impliquées dans le développement du cancer colorectal et sont des facteurs de risque du CCR (10)(12).

1.2.2 Étiologie et classification des CCR

En fonction des différentes mutations présente dans les tumeurs, le CCR peut être classé en deux familles distinctes : 1 - le CCR de type sporadique, qui représente 70 à 80% des cas, est causé par des facteurs environnementaux, liés au mode de vie ; 2 - le CCR héréditaire, qui représente 20-35% des CCR et sont liés à des mutations génétiques connues, dont celles du syndrome de Lynch et de la polypose adénomateuse familiale (12)(13)(14). Un autre sous-type de CCR est le « Colitis Associated Cancer (CAC) », qui concerne les CCR associés à des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et qui représente 1-2% des cas de CCR (12)(15).

Il a été démontré que les CCR peuvent survenir selon différents processus carcinogéniques distincts. La première voie de transformation implique l'instabilité chromosomique et représente 85% des CCR sporadiques. Elle s'explique par des altérations au niveau des structures des chromosomes (délétions, additions, amplifications, ...). Cette voie peut entraîner la perte d'un gène suppresseur de tumeur « Adenomatous polyposis Coli », *APC* ainsi que des mutations au niveau d'un gène oncogène « Kristen Rat Sarcoma Viral oncogene Homolog », *KRAS* ou d'un gène suppresseur de tumeur « Tumor Protein p53 », *TP53* (13)(16). La seconde voie est celle impliquant l'instabilité des microsatellites (MSI), qui représente plus ou moins 15% des cancers colorectaux sporadiques. Cette voie est souvent impliquée suite à un défaut du système de réparation des mésappariements de l'ADN (mismatch Repair, MMR) ce qui entraîne des mutations au niveau des séquences répétitives appelées microsatellites. Les CCR, MSI positifs montrent très souvent un phénotype avec des îlots CpG méthylés caractérisé par une hyperméthylation anormale des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui entraîne leur silençage épigénétique, comme pour le gène *MLH1*. Les MSI sont associés aux cancers héréditaires du syndrome de Lynch ainsi qu'à des cancers sporadiques. Dans les MSI, ce sont les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* qui sont fréquemment inactivés (13)(16).

Au sein de ces deux familles, il existe beaucoup d'hétérogénéité, chaque tumeur peut se comporter différemment. Pour harmoniser cette classification, un consensus des sous-types moléculaires du cancer colorectal a été proposé et comporte 4 sous-types différents :

- CMS1 (immunitaire) : Ce sous-type est caractérisé par une MSI, une hypermutation et une forte activation immunitaire (14% des CCR).
- CMS2 (canonique) : Ce sous-type défini comme épithélial avec une activation marquée des voies de signalisation WNT et MYC (37% de CCR).
- CMS3 (métabolique) : Ce sous-type montre une dérégulation métabolique tout en étant épithélial (13% de CCR).
- CMS4 (mésenchymateux) : Ce sous-type est marqué par une activation prononcée du TGF- β , une invasion stromale et de l'angiogenèse (23% des CCR) (17)(16).

1.3 Séquence de transformation adénome-carcinome

La séquence de transformation adénome-carcinome représente environ 85 à 90 % des cas de CCR sporadiques. Il existe également deux autres voies de carcinogenèse moins fréquentes et qui ne seront pas développées dans ce mémoire : la voie des polypes dentelés (serrated pathway) responsable de 10-15% des CCR et la voie inflammatoire associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin représentant moins de 2% des cas (18).

1.3.1 Formation de l'adénome

La transformation tumorale débute à partir d'un tissu colique sain caractérisé par une muqueuse normale du côlon sans altérations morphologiques cellulaires ni anomalies génétiques. Avant d'atteindre le stade cancéreux, des lésions précancéreuses apparaissent, l'épithélium colorectal initialement sain subit des altérations progressives de son architecture et de sa morphologie cellulaire, souvent en réponse à des événements, tels que des mutations génétiques, provoquées par une exposition à des agents mutagènes environnementaux ou une inflammation chronique. Ces transformations peuvent conduire à la formation de polypes adénomateux dans la muqueuse colique (ne dépassant pas la membrane basale) qui représentent des lésions bénignes, mais à potentiel évolutif. Les polypes adénomateux sont des excroissances de la muqueuse colique qui résultent d'une prolifération anormale des cellules glandulaires (18)(19)(20)(21) **(Figure 4)**.

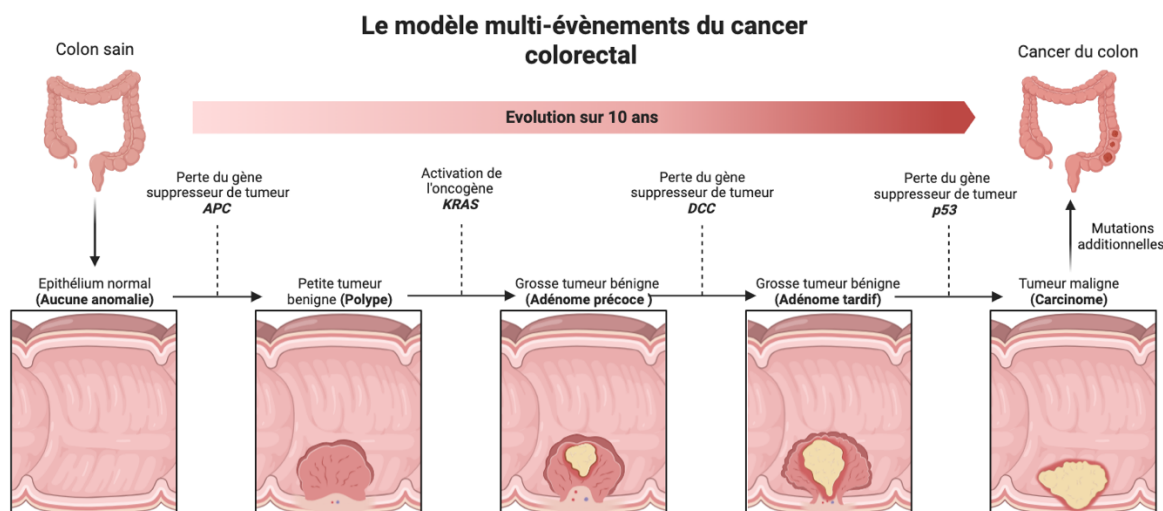


Figure 4: Carcinogénèse colorectale. Figure générée à partir de Biorender d'après (21). Les différents stades de la carcinogénèse d'un colon sain à un cancer colorectal suite à différentes mutations génétiques.

KRAS: Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog, proto oncogène. *DCC* : Deleted in colorectal carcinoma, gène suppresseur de tumeur. *p53*: Protein tumor suppressor p53, gène suppresseur de tumeurs.

1.3.1.1 Apparition et progression de la dysplasie

Les polypes adénomateux se caractérisent par la présence de dysplasie épithéliale qui constitue un critère clé pour les distinguer des polypes hyperplasiques ou bénins sans potentiel malin des autres à haut potentiel malin. La dysplasie colorectale est définie comme une néoplasie de l'épithélium intestinal se caractérisant par des altérations cellulaires telles que des atypies nucléaires avec un rapport noyau/cytoplasme augmenté, des anomalies cytoplasmiques (notamment des altérations de la mucine des cellules caliciformes), ainsi qu'une capacité proliférative cellulaire accrue et montrant des figures mitotiques anormales (10)(22)(23). La dysplasie est classée en deux grades : dysplasie de bas grade (LGD) et dysplasie de haut grade (HGD) suivant le degré d'anomalies nucléaires et de désorganisation architecturale observées. En HGD, les noyaux sont plus irréguliers avec une polarité cellulaire perdue traduisant un risque accru de progression vers un stade cancer (22)(23).

1.3.1.1.1 Événements génétiques précoces : mutation du gène APC

La dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine constitue un élément initiateur clé dans le développement de la dysplasie colorectale et nécessaire au développement cancéreux. Cette dérégulation est souvent liée à une mutation du gène APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), un gène suppresseur de tumeurs jouant un rôle central dans cette voie de signalisation (24). En condition normale, le complexe de dégradation impliquant APC contrôle les niveaux de β -caténine empêchant son accumulation nucléaire. La voie Wnt est essentielle pour le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, notamment en favorisant la prolifération et la différenciation des cellules souches intestinales. En cas

de mutation d'APC, la β -caténine n'est plus dégradée, s'accumule dans le noyau et active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire qui n'est alors plus contrôlée et favorise la formation de la dysplasie des cellules coliques (25)(26)(Figure 5).

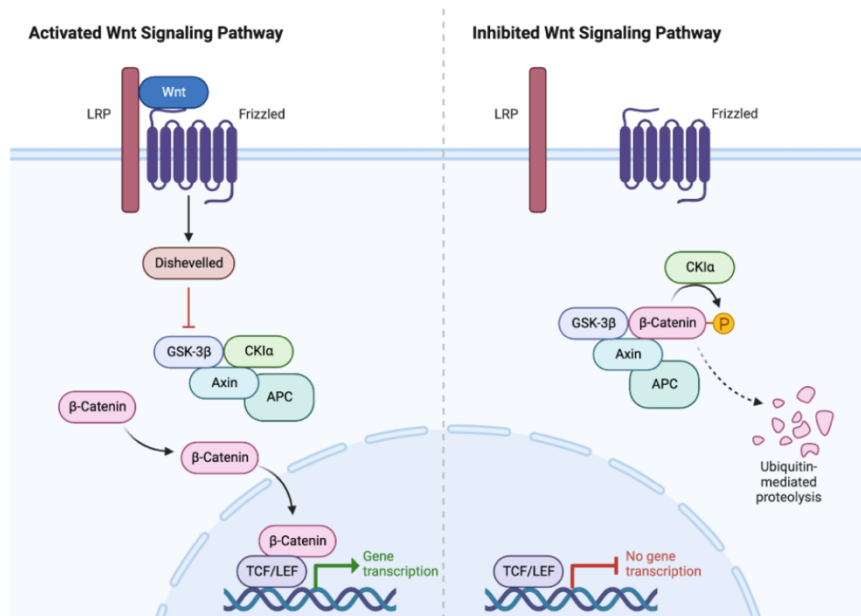


Figure 5: Voie de signalisation Wnt active ou inactive. Généré à partir de Biorender d'après (26).

1.3.2 Adénocarcinome

L'adénocarcinome représente le stade cancéreux où la tumeur issue de l'adénome devient maligne. À ce stade, les cellules tumorales produisent des cytokines et des chimiokines contribuant à stimuler son micro-environnement inflammatoire, favorisant la progression tumorale. Le carcinome peut rester *in situ* c'est-à-dire non invasif et confiné à la couche épithéliale, ou devenir invasif, avec une prolifération qui dépasse l'épithélium et s'infiltre dans les tissus avoisinants (*lamina propria*, sous-muqueuse, musculaires et peut dépasser la séreuse). Les cellules tumorales peuvent atteindre les ganglions lymphatiques à proximité et former des métastases via le système vasculaire ou lymphatique (19)(27) (Figure 4).

1.3.2.1 Stratification des adénocarcinomes colorectaux : Approche clinique et moléculaire

La stadification selon le système TNM (Tumeurs, Nœuds lymphatiques, Métastases) est utilisée pour évaluer la progression du cancer et orienter la stratégie thérapeutique (28)(29). En parallèle, le Consensus Moléculaire des Sous-types (CSM) comme décrit (cf. 1.2.2) permet de classer les tumeurs en quatre profils biologiques distincts, chacun ayant des implications pronostiques (16)(17)(30).

1.4 Dépistage et méthode diagnostique du CCR

Il existe diverses méthodes de dépistage du CCR. En Belgique, le test de recherche de sang occulte dans les selles (FOBT) est proposé dans le cadre du dépistage organisé. Ce test peut cependant conduire à de faux positifs, et sa faisabilité dépend du délai entre deux contrôles. En cas de test positif, une colonoscopie est ensuite réalisée afin de réséquer la lésion en tout ou en partie afin de confirmer le diagnostic par un examen anatomopathologique. En Belgique, la colonoscopie constitue l'examen de référence qui permet d'explorer le colon à l'aide d'un endoscope afin de localiser et décrire les lésions (polype malin, polype dentelé (SSL), tumeur maligne, lésions non polypoïdes), d'effectuer des résections ou des biopsies, et de confirmer le type et le grade de la tumeur par un examen histologique. En l'absence de tumeurs, un contrôle est recommandé tous les 5 ans. En revanche, en cas de détection d'un polype malin, dentelé ou d'une tumeur maligne, une surveillance rapprochée est instaurée, avec une colonoscopie de suivi tous les 3 ans après résection (12)(31). En parallèle, un CT scanner abdominal fait par imagerie scanner (tomodensitométrie) permet de visualiser de façon non invasive la présence de masses anormales au niveau du colon et l'atteinte éventuelle au niveau d'autres organes dans le cas d'un cancer de stade avancé et métastatique. Cette méthode ne permet cependant pas de réaliser des biopsies si une anomalie est détectée, il faudra dans ce cas réaliser une colonoscopie par la suite (32).

Certains marqueurs sanguins pronostiques sont utilisés dans la phase de surveillance post-traitement médical et souvent opératoire. C'est le cas de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA), dont le taux augmente avec la progression tumorale, il est essentiellement utilisé après une chirurgie pour surveiller une éventuelle récurrence. D'autres marqueurs, comme le carbohydrate antigen (CA 19-9), moins informatif que le CEA ou encore le Tissue Inhibitor of Metalloproteinase de Type 1 (TIMP-1), dont le taux est augmenté dans les stades avancés du CCR et qui présente un intérêt pronostique peuvent également être utilisés (33).

1.5 Les traitements associés au CCR

Lorsque le CRC est détecté à un stade précoce, sa prise en charge est associée à un meilleur taux de survie et de rémission. À un stade plus avancé, en revanche, le CCR est plus agressif et difficile à traiter (9). En cas de cancer colorectal localisé, une intervention chirurgicale est nécessaire et est parfois complétée par une chimiothérapie adjuvante (administrée après la chirurgie). Pour les cancers localisés au rectum, une radiothérapie souvent associée à une chimiothérapie peut également être envisagée avant la chirurgie afin de réduire la taille de la tumeur et d'améliorer la résection. Enfin aux stades métastatiques, la chimiothérapie constitue le traitement principal et est accompagnée par une chirurgie lorsque cela est nécessaire (34)(35). Ainsi, la chimiothérapie néoadjuvante permet d'éliminer

les métastases et de faire régresser le stade des/ de la tumeur(s) primaire(s) avant la chirurgie, qui a pour but, alors d'enlever la/les tumeur(s) résiduelle(s) et tissus infiltrés dont les ganglions.

De nombreuses chimiothérapies sont utilisées en clinique, telles que la 5-Fluorouracile (5-FU), l'Oxaliplatine (Ox) ou les chimiothérapies combinées, comme le FOLFOX (5-FU, Ox et Leucovorine) (10)(32).

Plus récemment, des immunothérapies ont été développées visant à mobiliser le système immunitaire du patient à reconnaître et détruire les cellules cancéreuses. C'est le cas des immunothérapies anti-PD1 ou anti-CTLA4 qui peuvent être administrées de manière néoadjuvante (administrées avant le traitement chirurgical) (36)(37). Ces immunothérapies sont particulièrement efficaces chez les patients atteints de CCR présentant une instabilité des microsatellites comme le syndrome de Lynch (8).

Enfin, des thérapies ciblées, telles que les anti-EGFR et anti-VEGF, ont été développées. Inhiber EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique) permet de limiter la migration, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses, tandis que cibler VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) permet de réduire l'angiogenèse tumorale et la progression métastatique (38)(39).

1.5.1 Chimiothérapie

Le principe de la chimiothérapie repose sur l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules en division rapide, perturbant le cycle cellulaire tumoral et pouvant conduire à la mort cellulaire programmée de celles-ci par apoptose. Ce processus nécessite l'activation de protéines de stress telles que p53 ou des enzymes, comme les caspases (40). La chimiothérapie est particulièrement efficace sur les cellules tumorales, puisqu'elles présentent une prolifération exacerbée par rapport aux cellules normales. Cependant, elle n'est pas ciblée sur une zone précise : elle agit de manière systémique et peut donc endommager des cellules saines et particulièrement les cellules dont la prolifération est rapide contrairement à la radiothérapie (**cf.1.5.2**), ce qui explique une partie de ces effets secondaires.

1.5.1.1 5-Fluorouracil

La chimiothérapie à base de 5-Fluorouracile (5-FU) est l'une des plus utilisées dans le traitement des cancers solides, tels que le cancer du sein, de la prostate, du foie ou colorectal (41)(42). Le 5-FU est un analogue fluoré de la base pyrimidique Uracile (U) qui empêche l'incorporation normale des nucléotides dans l'ADN et l'ARN. En interférence avec la synthèse de l'ADN et de l'ARN, le 5-FU est classé parmi les antimétabolites (43)(44). Il agit également comme inhibiteur de la thymidylate synthase, une enzyme clé de la biosynthèse des nucléotides pyrimidiques (45). Le 5-FU est utilisé pour sa capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses, en ciblant différentes voies de signalisation en bloquant leur métabolisme, et également en y induisant des mutations au niveau de l'ADN (43). Le

5-FU pénètre dans la cellule par transport transmembranaire facilité via des transporteurs de nucléosides, des protéines membranaires qui assurent le passage des bases nucléiques (ADN et ARN) et de leurs analogues, comme le 5-FU. Une fois dans la cellule, le 5-FU est converti par des enzymes en fluoro-deoxyuridine monophosphate (FdUMP), son métabolite actif (46).

Les effets du 5-FU au niveau cellulaire dépendent de la durée d'exposition. Il a été démontré en laboratoire qu'un traitement de courte durée (24h) induit un stress métabolique caractérisé par une production accrue de ROS (« reactive oxygen species »), ce qui altère les fonctions mitochondriales, entraînant une diminution de la production d'ATP. Ce déficit énergétique s'accompagne d'une accumulation de métabolites toxiques qui perturbent la biosynthèse des protéines et modifient la glycolyse, accentuant ainsi le stress cellulaire. Cependant, lorsque la chimiothérapie est administrée sur une période plus longue (72h), des effets cytotoxiques avec l'activation des voies de signalisation pro-apoptotiques, telles que la voie intrinsèque mitochondriale, la voie extrinsèque via les récepteurs de mort appartenant à la famille des TNF-R « Tumor Necrosis Factor Receptors », ainsi que les voies MAPK, JNK et ERK. Ces voies conduisent à l'apoptose suite à l'accumulation de dommages à l'ADN, de la libération de facteurs pro-apoptotiques et de l'activation des caspases (47). Le 5-FU perturbe également le cycle cellulaire en bloquant les cellules en phase S, ce qui entraîne une inhibition de leur prolifération (48)(42). Cependant, comme pour la plupart des chimiothérapies, le 5-FU peut également affecter les cellules saines à division rapide, ce qui est à l'origine d'effets secondaires indésirables, tels que la perte des cheveux, la fatigue ou encore des atteintes hépatiques (49).

1.5.1.2 Oxaliplatine

L'oxaliplatine est un complexe moléculaire consistant d'un ion Pt^{2+} (neutre) complexé à un dianion oxalate et à une molécule de 1, 2-diaminocyclohexane. L'oxaliplatine, un agent intercalant, qui exerce un effet cytotoxique en endommageant l'ADN agit également comme agent intercalant au niveau de l'ARN ribosomal (50)(51). Cette chimiothérapie entraîne une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN suite à la formation d'adduits créant des pontages intra ou interbrins d'ADN, ce qui induit des erreurs de transcription et entrave l'action de la polymérase. L'oxaliplatine inhibe la thymidylate synthase, tout comme le fait le 5-FU (45)(51). Les adduits formés, appelés adduits Pt-ADN, sont des liaisons du platine à deux bases guanines consécutives. Ces adduits peuvent déclencher deux voies : la première est la voie de réparation de l'ADN et la seconde activée en cas d'échec de la réparation, est la voie d'induction de l'apoptose. Cette dernière entraîne une accumulation des dommages à l'ADN et l'activation de protéines de stress, telles que la protéine p53 entraînant une apoptose via l'activation des caspases (52)(44).

Lorsqu'elle est utilisée seule, la chimiothérapie montre souvent une efficacité moindre par rapport à son utilisation en association avec d'autres chimiothérapies, telles que la thérapie combinée FOLFOX (cf. 1.5.1.3) (52).

1.5.1.3 Thérapie combinées (FOLFOX)

La thérapie combinée FOLFOX est la chimiothérapie de traitement de première ligne des CCR (52). Ce traitement combine l'acide folinique appelé aussi leucovorine (FOL), le 5-fluorouracile (F), l'oxaliplatine (OX). Le premier agit comme cofacteur en promouvant l'effet cytotoxique du 5-FU. L'acide folinique va ralentir la croissance des cellules cancéreuses en entrant en compétition avec les substrats naturels de la thymidylate synthase, ce qui accroît l'effet toxique général de cette chimiothérapie combinée (45).

1.5.2 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement anticancéreux également utilisé pour réduire la croissance tumorale et limiter les métastases en traitant de façon ciblée les cellules cancéreuses à l'aide de rayonnements ionisants (rayons X, gamma, UV, ...). Elle est actuellement utilisée de manière localisée afin d'irradier une zone précise et éviter les effets secondaires impliquant un effet également sur les cellules normales, ce qui constitue un avantage par rapport à la chimiothérapie dont les effets sont systémiques (40)(53). Les effets de la radiothérapie peuvent être directs ou indirects. Les effets directs incluent des dommages à l'ADN, l'apparition de mutations, des aberrations chromosomiques, des perturbations du cycle cellulaire, une inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (54)(55). Indirectement, l'irradiation induit un stress oxydatif par la génération de Reactive Oxygen Species (ROS), que l'on retrouve également dans le cas des chimiothérapies (56)(57).

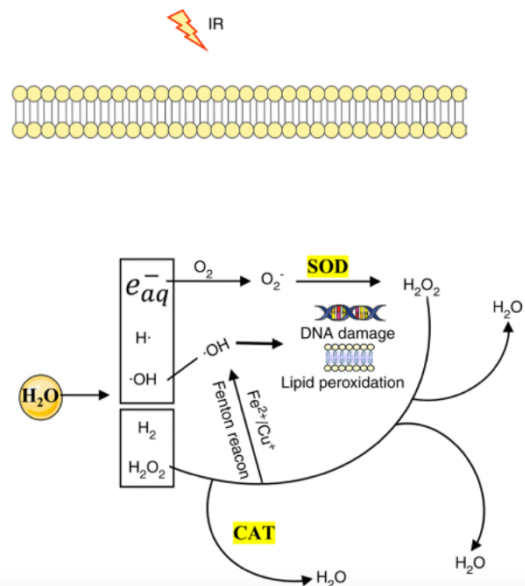


Figure 6: Formation des ROS suite à une irradiation (55).

Les ROS sont fortement présents au niveau des cellules cancéreuses, souvent en raison de modifications génétiques, métaboliques, de l'environnement tumoral, mais aussi des altérations oncogéniques, c'est-à-dire des mutations qui activent des oncogènes ou inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs, favorisant ainsi la transformation maligne. Le terme ROS désigne des molécules contenant de l'oxygène sous forme radicalaire (hydroxyle, $\text{OH}\cdot$ et superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$)¹ et non radicalaire (comme le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2)², des régulateurs importants des processus tumoraux (58)(59) (**Figure 6**). Ils jouent un rôle bivalent dans la progression tumorale. À de fortes doses, ils causent des mutations de l'ADN, de l'ARN et favorisent la mort ou la sénescence cellulaire. En revanche, à de plus faibles doses, ils activent les voies de signalisation, comme MAPK, JNK, PI3K-AKT, ERK, stimulant ainsi la prolifération cellulaire (58)(**Figure 7**).

Bien que la radiothérapie soit conçue pour cibler la zone tumorale, elle affecte également les cellules saines avoisinantes, entraînant des effets secondaires tels que des mutations, une inflammation locale ou une mort cellulaire (53). Enfin, tout comme pour certaines chimiothérapies, l'exposition prolongée aux ROS peut conduire à une sélection de clones cellulaires résistants au stress oxydatif, capable de moduler l'équilibre rédox et la réponse antioxydante, d'améliorer les mécanismes de réparation de l'ADN et de favoriser les mécanismes protumoraux comme l'angiogenèse et les métastases (60)(61).

¹ $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2\cdot^-$ (superoxyde)

² $2\text{O}_2\cdot^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

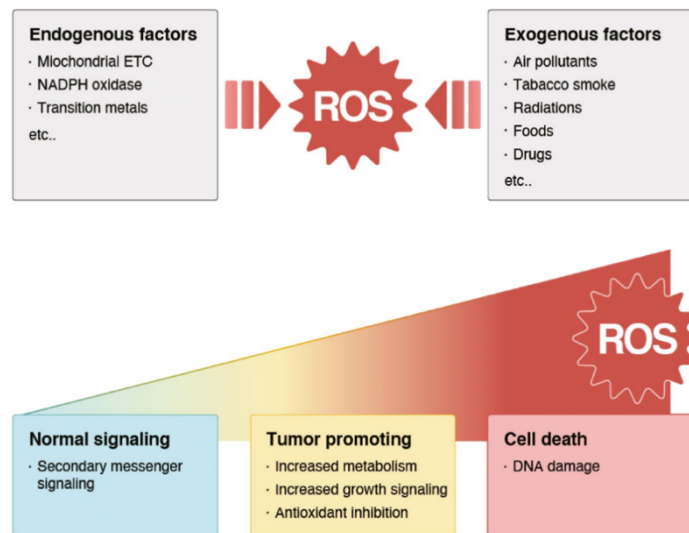


Figure 7: Sources et effets des ROS. Les ROS peuvent être générés par des facteurs exogènes et endogènes. En fonction du niveau de ROS produits, les conséquences biologiques sont diverses (61).

1.6 Mise en évidence de la protéine « NKCC1 » dans le CCR

Au laboratoire, une étude protéomique a permis l'identification de la protéine NKCC1 comme biomarqueur tissulaire surexprimé dans l'entière des lésions dysplasies lié à l'inflammation associée aux maladies inflammatoires chroniques des intestins (rectocolite ulcéro-hémorragique), ainsi que des cancers colorectaux de type colitis associated cancer (CAC) et sporadiques (62).

1.6.1 Caractéristiques de la protéine NKCC1

NKCC1 est une protéine de la famille des cotransporteurs NKCC qui comprend NKCC1 et NKCC2. Ce dernier est principalement exprimé au niveau rénal, contrairement à NKCC1 qui est ubiquitaire (63)(64). NKCC1 est codée par le gène *SLC12A2* « Solute Carrier Family 12 Member 2 » localisé sur le chromosome 5q23 (65). Cette protéine composée de 1205 acides aminés et de 12 domaines transmembranaires possède des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques (**Figure 8**). NKCC1 fonctionne comme un cotransporteur électro-neutre permettant l'entrée de différents ions sodium (Na^+), potassium (K^+) et deux ions chlore (Cl^-). Ce cotransporteur permet un transport actif secondaire non pas basé sur l'ATP, mais sur un gradient d'ions sodium (66). Bien que NKCC1 soit retrouvée au niveau colorectal, sa présence est également marquée dans plusieurs tissus : le cerveau, les poumons, les reins, le pancréas, dans l'oreille interne, les muscles squelettiques et au niveau gastrique. NKCC1 est particulièrement abondant dans les cellules sécrétrices, telles dans les glandes salivaires, les glandes sudoripares, le poumon et l'intestin (66).

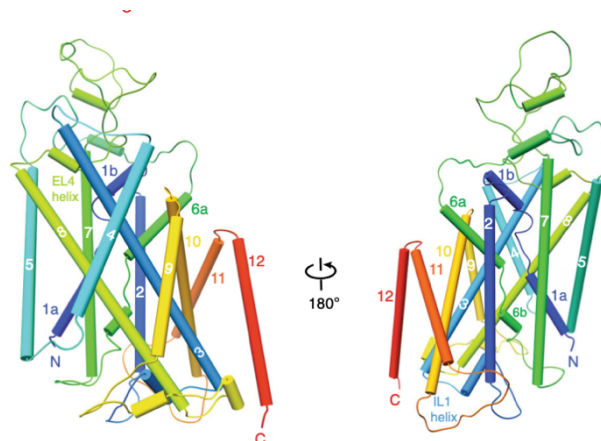


Figure 8: NKCC1 ici représentée sous sa forme monomérique en image miroir. Elle compte 12 domaines dont la localisation est transmembranaire et plusieurs boucles moins structurées : une intracytoplasmique et une extracellulaire (69).

1.6.2 Fonctions physiologiques de NKCC1

Selon sa localisation, NKCC1 exerce différentes fonctions plus ou moins spécifiques, liées à la concentration des ions dont elle facilite les échanges : dans les muscles squelettiques, elle participe à la prévention de la fatigue musculaire lors d'un exercice intense (en facilitant la réabsorption du K^+). Au niveau cérébral, elle intervient dans la régulation de la concentration intracellulaire de Cl^- essentielle au maintien de l'équilibre ionique et à la neurotransmission. Dans les glandes exocrines, NKCC1 permet la sécrétion de fluides en assurant le transport du Cl^- , essentiel à l'homéostasie et à la digestion (66)(67). Au niveau intestinal, et plus particulièrement colorectal, NKCC1 contribue à la régulation du volume cellulaire et de l'équilibre osmotique en modulant les flux ioniques transépithéliaux. Elle est également impliquée dans la sécrétion de mucus et le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (68)(69). Enfin, NKCC1 est exprimée dans les cellules impliquées dans le péristaltisme, dans un processus de contraction et de relaxation des muscles lisses qui permet la progression du bol alimentaire le long du tractus gastro-intestinal (63).

Certains patients présentent une mutation de NKCC1 entraînant une perte de la fonction de cette protéine, pouvant entraîner et au niveau phénotypique des cas de surdités congénitales de constipations sévères, des troubles respiratoires similaires à ceux observés chez les patients atteints de mucoviscidose (obstruction muqueuse des poumons et de l'intestin), une altération de la perception de la douleur, une hypotonie, ainsi que des retards moteurs et cognitifs importants (66).

1.6.3 Localisation et rôle de NKCC1 dans le transport ionique colorectal

NKCC1 est située au niveau basolatéral des entérocytes (62)(68). Les entrées d'ions sont gérées au niveau basolatéral par NKCC1 qui absorbe les ions Na^+ , K^+ , Cl^- qui sont ensuite sécrétés au niveau apical via le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) activé par l'ATP (69). Le

potassium, quant à lui, est excrété au niveau apical par la pompe BK (Big Potassium), plus exprimée dans le colon proximal que dans le colon distal. Ainsi, dans le colon proximal, le potassium est majoritairement excrété, tandis qu'il est plutôt réabsorbé dans le colon distal. Ceci permet de moduler le flux de potassium en fonction des besoins physiologiques, participant ainsi à l'homéostasie potassique et à la régulation de l'osmolarité du contenu colique.

Enfin, la pompe Na/K-ATPase située au pôle basolatéral permet la sortie active du sodium hors de la cellule en échange de potassium, maintenant ainsi un gradient électrochimique à de nombreux transporteurs ioniques. Ce gradient permet notamment le fonctionnement du cotransporteur NKCC1, mais contribue plus largement à la régulation du volume cellulaire, l'équilibre hydrosodé et à la polarisation membranaire (70)(Figure 9).

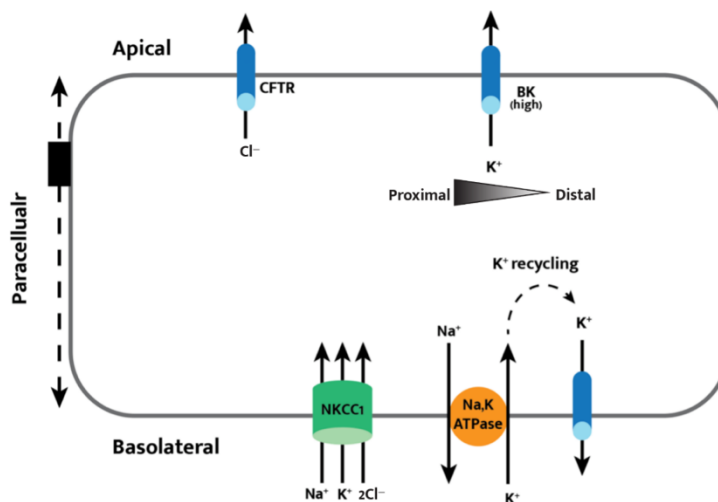


Figure 9: Entérocytes avec les différents (co)transporteurs d'ions dont NKCC1 (70)

1.6.4 Inhibition de la protéine NKCC1

1.6.4.1 Bumétanide

Le bumétanide, un puissant diurétique de l'anse (Burinex®) est approuvé par la FDA et utilisé en clinique. Il inhibe le symport $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ empêchant ainsi le transport des ions de la lumière intestinale vers la cellule en se fixant dans la cavité transmembranaire formée à l'interface de deux monomères du transporteur, celui-ci est conformé dans la membrane (71). Cette inhibition cible spécifiquement les transporteurs NKCC1 actifs sous forme de dimères et correctement insérés dans la membrane. L'inhibiteur bloque ces cotransporteurs en les maintenant dans un état ouvert vers l'extérieur, entrant en compétition avec un ion chlore. Cette compétition empêche la liaison du chlore au transporteur, ce qui suggère que l'inhibition par le bumétanide est spécifique. Ce diurétique a un effet transitoire sur l'activité de NKCC1, se traduisant par une diminution du gradient osmotique impactant l'équilibre hydrique et ionique de la cellule (72).

1.6.5 Implication de la protéine NKCC1 dans les cancers

La protéine NKCC1 est surexprimée dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer gastrique, pancréatique, le glioblastome et le CCR. Dans le glioblastome, une surexpression de la protéine NKCC1 a été démontrée et associée au caractère malin du glioblastome se traduisant par une invasion tumorale impliquant un processus EMT-like (Epithelial-to-Mesenchymal Transition-like). Une inhibition par le bumétanide cause une diminution de la prolifération cancéreuse dans ce contexte (73). Il a également été rapporté que NKCC1 était surexprimée dans le cancer gastrique. L'inhibition de NKCC1 cause également une diminution de la croissance, de la prolifération et de la migration de ce type de cellules cancéreuses, notamment sur les métastases et les lignées cellulaires dérivant de gliomes malins (74).

Il a été démontré au laboratoire que NKCC1 était fortement exprimée au niveau du fond des cryptes correspondant aux cellules souches intestinales. Il est donc fort probable que cette protéine soit un marqueur potentiel des cellules souches (62)(**Figure 10**).

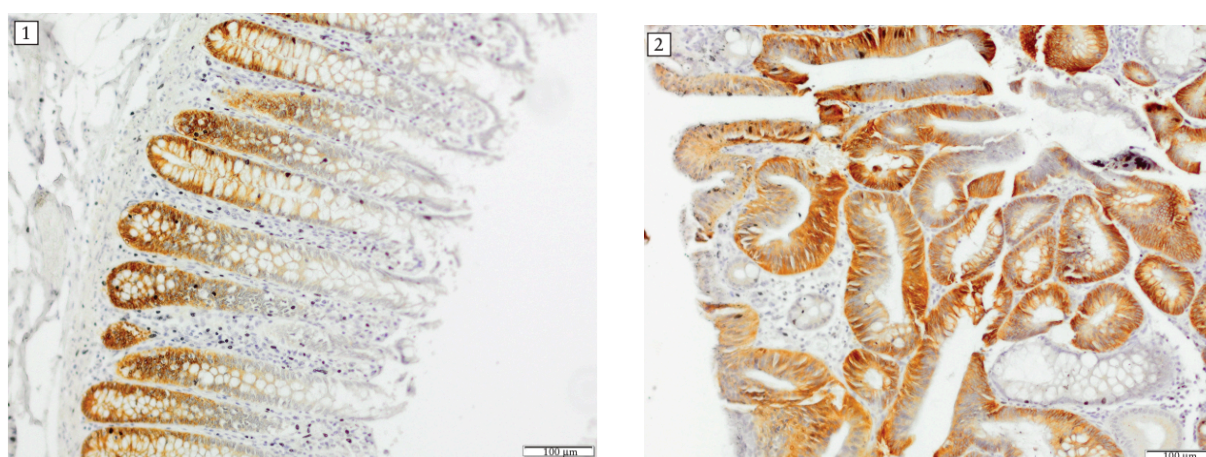


Figure 10: Immunohistochimie spécifique de NKCC1 sur une coupe de colon de patient sain (1) et sur une dysplasie du colon de patient atteint d'une colite ulcéraire (2) (62).

L'expression de NKCC1 est augmentée dans les lésions précancéreuses et cancéreuses dans les cancers colorectaux associés à l'inflammation et des cancers sporadiques. Aux vues de ces résultats, il a été postulé que NKCC1 pourrait jouer un rôle important au niveau des étapes précoces de la carcinogenèse colique. À l'heure actuelle, très peu d'études ont caractérisé NKCC1 dans la carcinogenèse colorectale. Cependant, les patients porteurs de tumeurs colorectales avec un niveau d'expression de *SLC12A2* élevé montrent une meilleure survie que ceux présentant des tumeurs avec un profil d'expression bas (**Figure 11A**). De plus, le niveau d'expression du gène *SLC12A2* varie en fonction du stade du cancer colorectal, avec une expression plus élevée aux stades précoces du CCR (**Figure 11B**), suggérant si prise dans leur ensemble, un rôle potentiel de NKCC1 dans le développement du CCR (75).

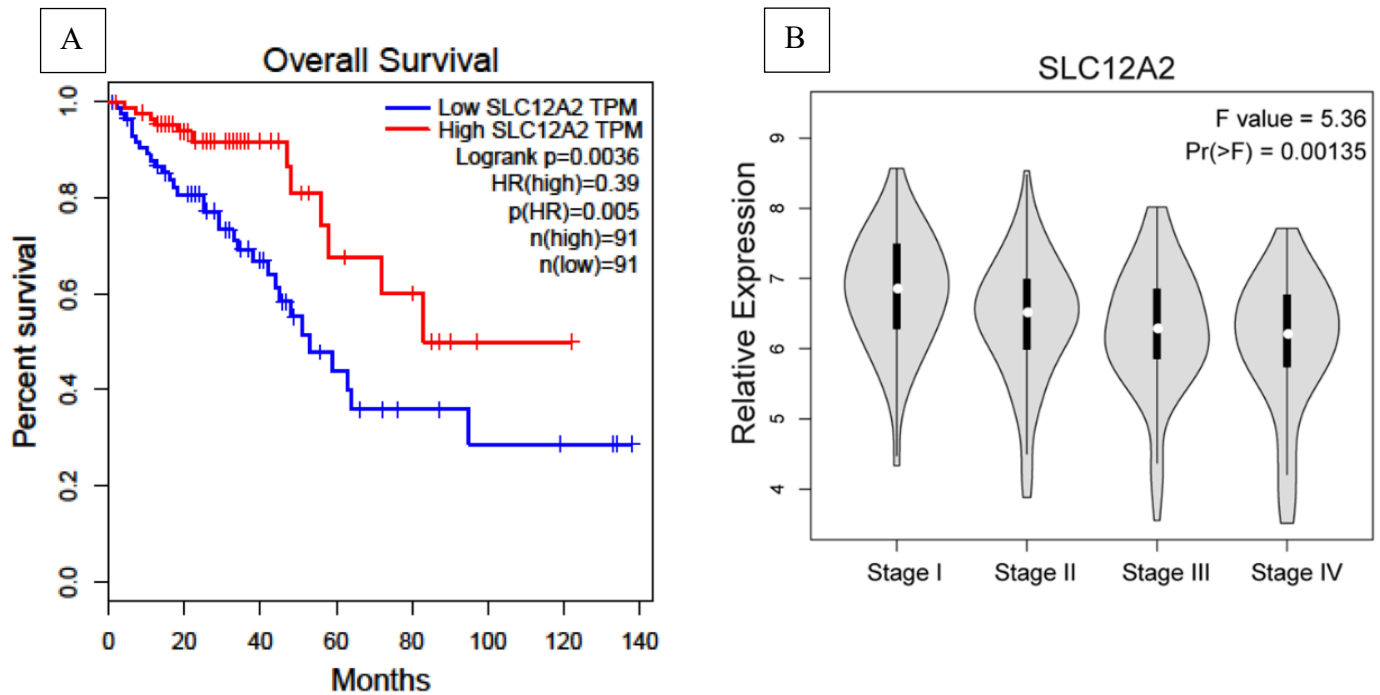


Figure 11: A) Courbe de survie des patients atteint d'un cancer colorectal en fonction de la surexpression ou de la sous-expression du gène SLC12A2. B) Niveau d'expression de SLC12A2 aux différents stades tumoraux. (<https://academic.oup.com/nar/article/45/W1/W98/>)

1.6.6 NKCC1 et les cellules souches tumorales

Il a récemment été démontré que NKCC1 était associée aux cellules souches cancéreuses (CSCs = Cancer Stem Cells) (76). Celles-ci sont caractérisées par deux propriétés majeures : l'autorenouvellement et la pluripotence avec une capacité de prolifération accrue. Contrairement aux cellules souches normales, les CSCs conservent ses comportements pathologiques (résistance aux traitements, promotion de l'invasion). Cette plasticité et cette capacité à se différencier en plusieurs sous-types cellulaires expliquent l'hétérogénéité intratumorale observée dans de nombreux cancers solides. Par exemple, les cellules souches des cryptes intestinales Lgr5⁺ après l'acquisition de mutations oncogéniques peuvent être à l'origine de cancers intestinaux (77). De plus, les CSCs sont souvent impliquées dans la résistance aux traitements anticancéreux par neutralisation des ROS et une capacité à échapper à l'apoptose induite par la chimiothérapie ou la radiothérapie, favorisant la persistance tumorale et les récives (77). Ainsi, l'identification de marqueurs spécifiques des CSCs est essentielle pour le développement de thérapies ciblées (75).



Contexte et objectifs du mémoire

Au laboratoire, il a été démontré que la protéine NKCC1 est surexprimée dans les lésions pré tumorales et tumorales colorectales sporadiques, mais également survenant dans un contexte inflammatoire chronique chez des patients souffrant d'une rectocolite ulcéro-hémorragique (62). Il a également été démontré que l'expression de la protéine NKCC1 influence la survie des patients atteints de CRC (75). Dans ce contexte, l'objectif de ce mémoire est de contribuer à la caractérisation du rôle de NKCC1 dans la, et ce, en évaluant l'effet de sa modulation en réponse à deux traitements utilisés dans le cancer colorectal.

Sur un plan plus pragmatique, nous allons évaluer son implication dans la viabilité cellulaire ainsi qu'en condition basale et dans un contexte où les cellules où cette activité ou expression de NKCC1 est modulée sont traitées par chimiothérapie 5-FU et par irradiation pour évaluer en laboratoire l'effet dans le contexte de la réponse à ces deux types de traitements.

Étant donné que les modèles 3D des lignées colorectales ainsi que les modèles de traitements chimiothérapie/irradiation ne sont pas encore utilisés au laboratoire, le développement de ces modèles sera l'un des objectifs principaux de ce mémoire.



Matériel et méthodes

Afin d'aborder cette question, nous utiliserons une stratégie expérimentale utilisant 3 lignées cellulaires de cancer colorectal : les lignées HT-29, HCT116 et Caco-2, cultivées soit en culture monocouche (culture en deux dimensions (2D)), soit en générant des sphéroïdes (culture en 3D). Ensuite, nous allons inhiber l'activité transporteur d'ions de NKCC1 (via le bumétanide) ou son expression (via shRNA) et mesurer la viabilité des différentes lignées CCR. Enfin, les lignées seront traitées par chimiothérapie au 5-FU et par irradiation afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de NKCC1 sur la survie cellulaire par différentes méthodes. Le workflow illustré (**Figure 12**) résume la stratégie expérimentale utilisée dans ce travail.

3.1 Culture cellulaire

Trois lignées cellulaires humaines adhérentes proviennent de tumeurs primaires d'adénocarcinome colorectal ont été sélectionnées pour ce travail. Il s'agit des lignées HT-29 (HTB-38, ATCC), HCT116 (CCL-247EMT, ATCC) et Caco-2 (HTB-37, ATCC). Elles sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM High Glucose, L0106-500, Biowest) contenant 10% de sérum fœtal bovin (FBS, A5256701, Gibco), 1% de pénicilline/streptomycine (P4458, Sigma) et 2% de GlutaMAX 100X (35050-038, Gibco) à 37°C sous 5% de CO₂ et 21% d'O₂. Lorsque la confluence atteint 70-80%, les cellules sont détachées avec de la trypsine 0,25% EDTA dans du HBSS (L0931-100, Biowest). Les sphéroïdes sont ensemencés dans des plaques 96 puits round bottom Ultra-Low Attachement (ULA, 650970, Greiner). Deux modes de cultures cellulaires sont réalisées, une culture en monocouche (2D) et un modèle de sphéroïde (3D). Ce dernier est très utile afin de représenter l'architecture 3D des tumeurs *in vivo* de manière plus fidèle en tenant compte du gradient d'oxygène, des interactions intercellulaires, entre autres.

3.2 Knockdown de l'expression de NKCC1 via shRNA (ou siRNA)

Il est possible de réduire l'expression de la protéine NKCC1 en ciblant directement son ARNm et en bloquant sa traduction par knockdown. Cette technique ne supprime pas totalement l'expression du gène, mais en diminue significativement le niveau permettant un silençage partiel. Le siRNA (small interfering RNA) et le shRNA (short hairpin RNA) partagent un même objectif : inhiber l'expression génique, cependant, ils présentent quelques différences (**Figure 13**). Le shRNA permet une atténuation (« silencing ») de l'expression à long terme et de manière stable, voire permanente. Le shRNA est généralement introduit dans la cellule à l'aide de vecteurs viraux ou plasmidiques, ce qui fait que cette stratégie est privilégiée pour des études à long terme (78).

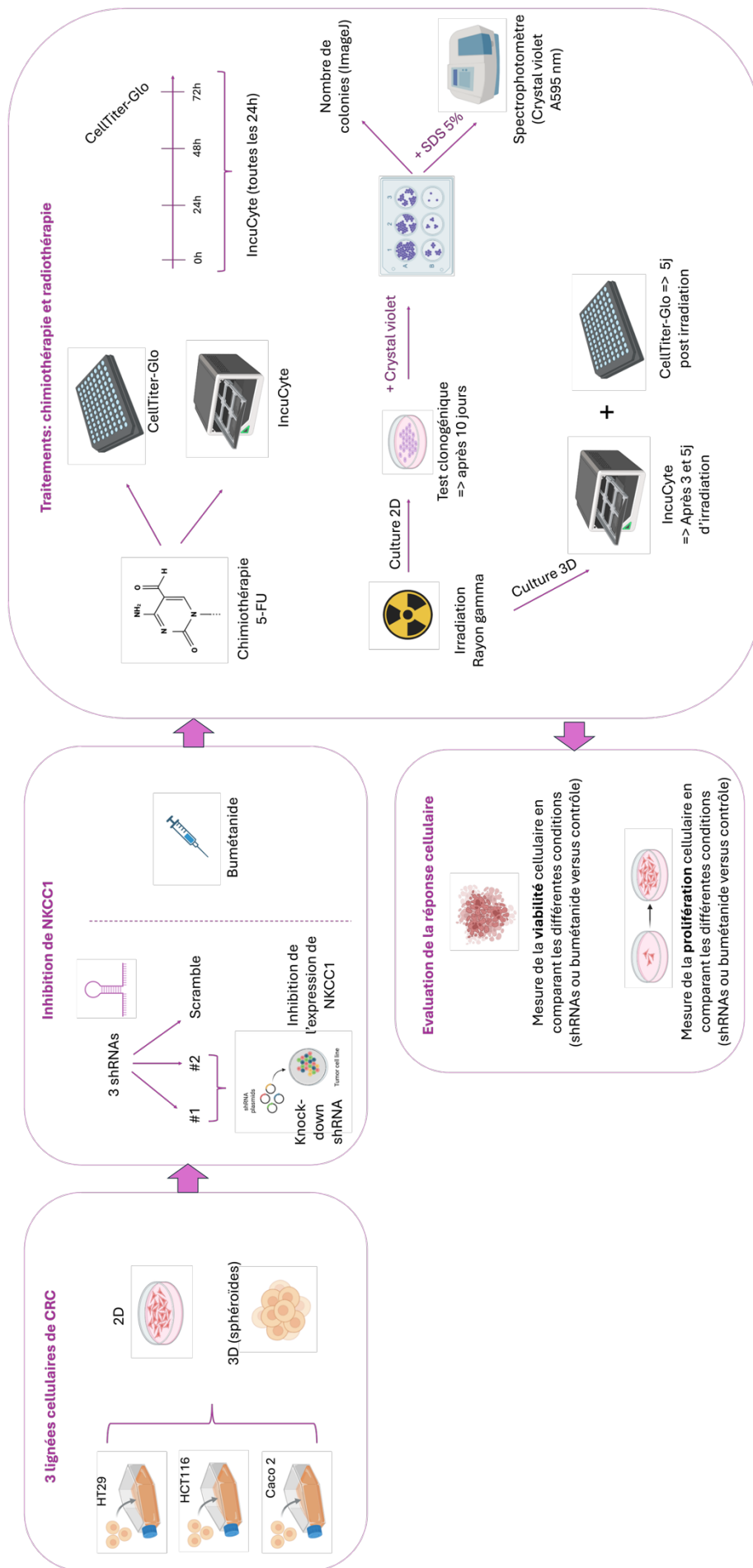


Figure 12: Workflow de la stratégie expérimentale.

siRNA	shRNA-lentivirus
Short-term target KD (< 1 week)	Long-term target KD
Minimal library maintenance	Significant library maintenance
Some cell types are not transfected efficiently	Infection is generally more effective than transfection, thus larger repertoire of cells can be used
Dosing to control cellular concentration	Difficult to control cellular concentration, though inducible system possible
Chemical modifications possible	Stable target KD cell line can be generated.
More consistent quality of reagent	Titer of shRNA-lentiviral particles can be more variable

Figure 13: Tableau comparatif des avantages et inconvénients liés aux deux stratégies de silençage de l'expression génique par siRNA et shRNA (78).

3.2.1 Transduction des 3 lignées en réalisant un knockdown avec des shRNAs

Pour évaluer l'impact de l'inhibition de l'expression de NKCC1 sur la réponse aux traitements, nous utilisons des lignées CCR transduites via shRNA dirigés contre NKCC1 (VectorBuilder). Les shRNAs sont insérés dans un vecteur viral, tels qu'un lentivirus ou un adénovirus, puis transduits dans la cellule. Le vecteur viral permet l'entrée du shRNA au sein de la cellule et plus spécifiquement dans le noyau. Un lentivirus est utilisé pour permettre l'entrée du vecteur dans la cellule hôte via un mécanisme viral, sans provoquer d'effets toxiques. Le vecteur s'intègre dans le génome de la cellule hôte permettant une expression stable du shRNA. Une fois dans le noyau, le transgène codant pour le shRNA est transcrit en un ARN double brin en épingle à cheveux. Cet ARN est exporté du noyau et pris en charge par le complexe DICER, une nucléase de la famille RNase III, qui clive l'ARN double brin en petits ARN interférents (siRNA) mesurant entre 21 et 23 nucléotides. Ces siRNA sont ensuite intégrés dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complexe) qui reconnaît la séquence d'ARNm complémentaire et qui induit sa dégradation, empêchant ainsi la traduction de la protéine cible (79)(80) (**Figure 14**).

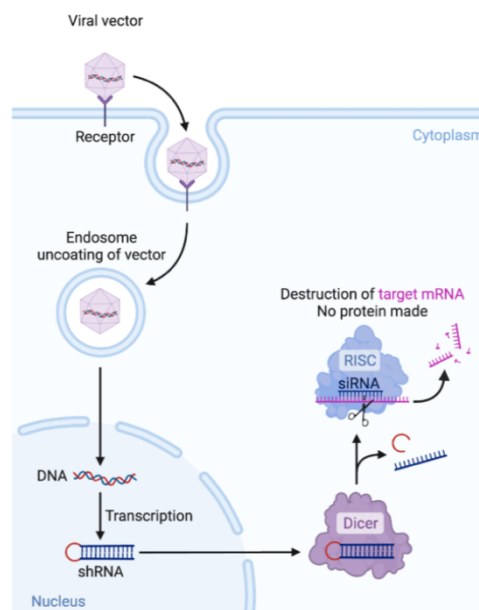


Figure 14: Schéma généré à partir de Biorender illustrant la production et l'intégration des shRNAs à l'aide de vecteurs viraux, adapté de (79).

Trois conditions expérimentales différentes ont été appliquées à chaque lignée. Les 2 conditions comportent un shRNA ciblant le transcrit de *SLC12A2* (shNKCC1 #1 et shNKCC1 #2), chacun reconnaissant une séquence différente du transcrit, le but étant de valider que les effets observés sont spécifiques de l'inhibition de l'expression de NKCC1. La troisième condition, appelée Scrambled (SCR), est un contrôle négatif où *SLC12A2* n'est pas ciblée et où les shRNA générés ne sont pas spécifiques. L'utilisation d'une condition SCR permet de vérifier un éventuel effet hors cible ou un effet lié à la transduction.

Pratiquement, nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux recombinants (rLV) contenant les séquences transgéniques recombinantes (chaque shRNA) ainsi que des séquences virales d'emballage (glycoprotéines d'enveloppe, ...) et de régulation (flanquées de séquences terminales répétées lentivirales, TLR) sont utilisées. Un gène de résistance à un antibiotique (puromycine) est également inséré dans le plasmide viral afin de sélectionner uniquement les cellules ayant intégré le virus de manière stable suite à l'administration de l'antibiotique.

3.3 Détection par Immuno blotting

3.3.1 Dosage protéique

Le dosage protéique permet d'établir la quantité totale de protéines extraites dans le tampon Ripa d'échantillons et est utilisée afin de déterminer la quantité de chaque échantillon à charger sur le gel avant SDS-PAGE. L'extraction des protéines est réalisée sur un culot cellulaire obtenu par centrifugation de chaque réplicat de culture (à 4°C, 200g pendant 5 min), suivi de deux lavages au PBS (avec une centrifugation entre chaque lavage). Ensuite, les échantillons sont resuspendus dans 150 µL de tampon RIPA, vortexé et le lysat obtenu est centrifugés pendant 10 min à 16000 RFC, 4°C. Le surnageant est récupéré et dosé. Une courbe standard de Bovin Serum Albumine (BSA 2000µg/mL (23209, Thermo Scientific) est réalisée pour chaque série de dosage et sert de référence. Les échantillons sont d'abord dilués avec de l'eau déminéralisée, comme la courbe standard. La plaque 96 puits (655180, Greiner Bio-one) est chargée avec 25 µL/puits de standards et d'échantillons en duplicat, puis 200 µL de BCA working reagent (23227, Thermo Scientific) sont ajoutés avant d'agiter la plaque pendant 30 secondes et ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C avant lecture à 560nm (SpectraMax plus, Molecular Devices).

3.3.2 Western Blot

Les extraits protéiques dosés sont dilués afin de déposer une quantité connue et constante entre conditions à comparer, ils sont dénaturés dans une solution tampon Laemmli concentrée 5x (Tris 1M pH 6.8, bleu de bromophénol (1,865 mM), SDS (347 mM), glycérol (3,42 M ou 25% V/V, β-

mercaptoéthanol (1,77 M ou 1,25% V/V) et de l'eau déminéralisée si nécessaire), puis vortexés et chauffés pendant 5 minutes à 99°C. Les extraits protéiques sont centrifugés puis chargés sur un gel de polyacrylamide à 10%. Un marqueur de poids moléculaire (PM) est également utilisé (Page Ruler Plus Prestained protein Ladder, Thermo Scientific) comme marqueur de PM apparent. Le gel de polyacrylamide à 4% (gel de concentration) et puis à 10% (gel de séparation) est utilisé dans ce travail. Ensuite, les protéines migrent sous l'effet d'un courant de 10 mA/gel dans une cuve contenant un tampon de migration TGS (1610772, Bio-rad dilué 10X).

Le transfert des protéines est quant à lui réalisé overnight à 40 mA sur une membrane de PVDF (88518, Thermo Scientific) et dans un tampon de transfert (**Annexe 1**). La membrane est d'abord pré-activée avec du méthanol, rincée avec de l'eau déminéralisée puis transférée dans le tampon de transfert. Durant celui-ci, la membrane est en contact direct avec le gel, ce qui permet aux protéines d'être adsorbées sur celle-ci et sa détection par un système exploitant une interaction antigènes-anticorps. Après le transfert, la membrane est bloquée durant 1h à température ambiante (RT) dans une solution de TBS-T (**Annexe 2**) + GE 4% (17703416, Cytiva) sous agitation. La membrane est lavée pendant 5 minutes avec du TBS-T puis incubée avec l'anticorps primaire dilué (1/1000) (**Annexe 3**) dans du TBS-T + 4% GE durant 2 heures ou overnight à 4°C sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3X5 minutes avec du TBS-T. L'anticorps secondaire dilué (1/1000) (**Annexe 3**) dans du TBS-T + 2% GE est ajouté sur la membrane et est incubé pendant 1 heure à RT. La membrane est finalement lavée 3X10 minutes avec du TBS-T.

La révélation par chimiluminescence utilise le kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (32106, Thermo Scientific) qui est un mélange de luminol et de peroxyde d'hydrogène réagissant avec l'enzyme HRP (« Horse Radish Peroxidase ») couplée à l'anticorps secondaire, ce qui permet la détection du signal émis (chimiluminescence) sur un film photographique (47410 19289, Fujifilm).

3.4 RTqPCR

La RT-qPCR est une technique permettant de quantifier l'expression d'un gène de façon indirecte en deux étapes : la transcription inverse de l'ARN messager en ADN complémentaire, suivie de son amplification en temps réel par PCR à l'aide d'un marqueur fluorescent. L'intensité du signal obtenu permet d'estimer de façon relative à l'amplicon d'un autre gène de référence la quantité initiale d'ARN messager.

L'extraction des ARN est réalisée avec le kit ARN Macherey-Nagel-NucleoSpin® RNA mini (réf: 740955.10). Ensuite, une reverse transcription (RT) à l'aide du kit FastGene cDNA synthesis Kit LS63 est réalisée grâce à l'ajout d'un mélange contenant des hexamers aléatoires, des OligoDT, des dNTP, DTT, le FastGene Scriptase II Buffer concentré 5x, l'inhibiteur de RNase, la FastGene Scriptase II (LS63, NIPPON Genetics Europe) afin de synthétiser l'ADN complémentaire. Sur un thermocycleur (Veriti 96

Well, Applied biosystems), la transcription inverse est réalisée en un seul cycle, composé de deux étapes : une incubation de 50 minutes à 42°C pour la synthèse de l'ADNc, suivie d'une inactivation enzymatique de 15 minutes à 70°C.

Enfin, la qPCR est réalisée avec le produit de la RT dispensé à raison de 100 ng/conditions, avec le kit FastGene® IC Green 2X qPCR Universal Mix, ce qui permet l'amplification des séquences d'ADN spécifiques des amorces utilisées (**Annexe 4**). Pratiquement, l'ADNc est dilué dans de l'eau UltraPure (740955.250, Marcherey-Nagel) pour obtenir une concentration finale de 1,5625 ng/μL. Le mix de PCR est préparé avec les primers forward et reverse avec une concentration finale de 400nM (volume total par puit = 20 μL) (**Annexe 4**), de l'eau UltraPure et le Fastgene IC Green concentré 2x (LS4005, NIPPON Genetics Europe). Les plaques PCR sont chargées avec un volume total de 20 μL par puits comprenant 16 μL de mix PCR et 4 μL de l'échantillon dilué (ADNc). La PCR (LightCycler 480 Roche) comporte une phase initiale d'activation de la polymérase à 95°C pendant 2 minutes, suivie de 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 5 secondes ainsi qu'une hybridation et une amplification à 60°C pendant 20-30 secondes. L'acquisition du signal fluorescent est effectuée à chaque cycle.

Les résultats sont ensuite analysés par la méthode des ΔCT qui permet d'évaluer l'expression relative des gènes cibles entre eux (gènes d'intérêts sur gènes rapporteurs). Pour chaque échantillon, un CT (cycle threshold) est déterminé, ce qui correspond au cycle à partir duquel la fluorescence dépasse le seuil de détection. Le ΔCT est donc obtenu en soustrayant le CT du gène de référence (*RNA18s*) au CT du gène d'intérêt (ici *SLC12A2*). Ceci permet de compenser les variations liées à la quantité d'ARN initial ou à l'efficacité de la transcription inverse. Une valeur élevée indique une surexpression du gène cible par rapport au contrôle, tandis qu'une valeur faible indique une sous-expression.

3.5 Mise au point condition de cultures : ensemencement

3.5.1 Modèle de culture monocouche (2D)

Dans des plaques 96 puits, une suspension cellulaire transduite avec le shRNA contrôle (SCR) est ensemencée avec un nombre croissant de cellules (1250, 2500, 5000 et 10000 cellules par puits). Le but est de déterminer quelle est la suspension cellulaire permettant d'atteindre une confluence inférieure à 80% après 72h de culture, soit la fin du traitement au 5-FU. Les plaques sont incubées au total pendant 96h démarrant par 24h de prolifération des cellules suivie de 72h de traitement au 5-FU. Une lecture permettant d'évaluer la confluence cellulaire de chacun des puits est réalisée toutes les 24h à l'IncuCyte, les images et les données sont traitées à l'aide d'un logiciel (« IncuCyte® standard and spheroid software module ») afin de suivre l'évolution de la confluence des cellules toutes les 24

heures. Celui-ci permet d'acquérir des images en contraste de phase avec un objectif à grossissement X4 (**Figure 15A**).

3.5.2 Génération des sphéroïdes

Dans les plaques 96 puits à fond incurvé (ref 650970, CellStar®, Greiner), les cellules contrôles transduits (SCR) sontensemencées en nombre croissant de cellules par puits (1250, 2500, 5000 et 10000 cellules par puits en triplicat). Le but est de déterminer quelle est la suspension cellulaire permettant d'obtenir un seul sphéroïde/puits d'une taille supérieure à 300µm et qui n'est pas en souffrance après 144h, soit la fin du traitement (81). Ces plaques au fond incurvées empêchent l'adhérence des cellules aux parois et favorisent la formation des sphéroïdes. Les plaques sont incubées pendant 144h avec, dans un premier temps la phase de formation du sphéroïde qui dure 72 heures et la phase de stimulation qui dure 72h également. Un scan de chacun des puits est réalisé toutes les 24 heures pour suivre l'évolution des sphéroïdes (**Figure 15B**).

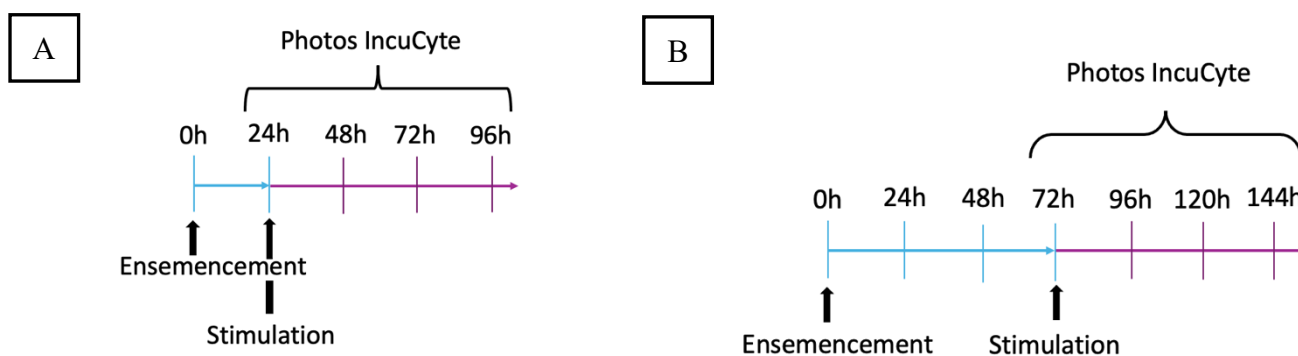


Figure 15: Schéma temporelle de l'expérience du suivi cellulaire par l'IncuCyte (A) en 2D et (B) en 3D

3.6 Test de viabilité suite à une chimiothérapie (5-FU)

3.6.1 Condition de culture – tests préliminaires

Suite à la mise au point de l'ensemencement, des conditions optimales ont été définies :

- Les cultures 2D : Ensemencement de 2500 cellules par puit pour les lignées HCT116, Caco-2 et 5000 cellules par puit pour les HT-29.
- La culture de sphéroïdes : Ensemencement de 1250 cellules par puit pour les 3 lignées.

3.6.2 Condition de traitements au 5-FU et véhicule (condition contrôle) avec et sans knockdown de *SLC12A2* ou inhibition catalytique

Les plaques sont incubées pendant 24h pour les cultures 2D et 72h pour les cultures sphéroïdes. Les cellules sont ensuite stimulées avec la chimiothérapie (5-FU, 102757917, F6627-1G, Sigma) en définissant une gamme de concentration adéquate et similaire entre les cultures 2D et 3D afin d'observer un effet sur la viabilité cellulaire.

- HCT116 : la gamme de concentration utilisée est : 0, 1, 5, 10, 50, 100 μM finale.
- Caco-2 et HT29 : la gamme de concentration utilisée est : 0, 1, 10, 100, 500, 1000 μM finale.

Le 5-FU est resuspendu dans du DMSO (BCBZ7129, Sigma) (26 mg/mL final) pour obtenir une solution stock de 200 mM 100x concentrée par rapport à la concentration finale dans le milieu de culture lors du traitement.

Pour les cultures 2D et 3D, la concentration finale de 5-FU est de 2 mM. Les cellules contrôles sont traitées avec du DMSO à la même concentration finale (V/V) que celle utilisée pour le traitement au 5-FU.

Les cellules traitées au 5-FU sont soit des cellules knockdowns à l'aide d'un shRNA, soit elles sont traitées avec du bumétanide (P16D056, Thermo Scientific) en poudre qui est lui aussi resuspendu dans du DMSO (BCBZ7129, Sigma) pour obtenir une solution stock avec une concentration finale de 800 μM . Les cellules sont stimulées avec du bumétanide (ou du DMSO pour les cellules contrôles) durant 30 minutes. Ensuite, le milieu avec le bumétanide est remplacé par un milieu avec du bumétanide et du 5-FU (ou un milieu avec du DMSO et du 5-FU pour les cellules contrôles) (**Figure 16**).

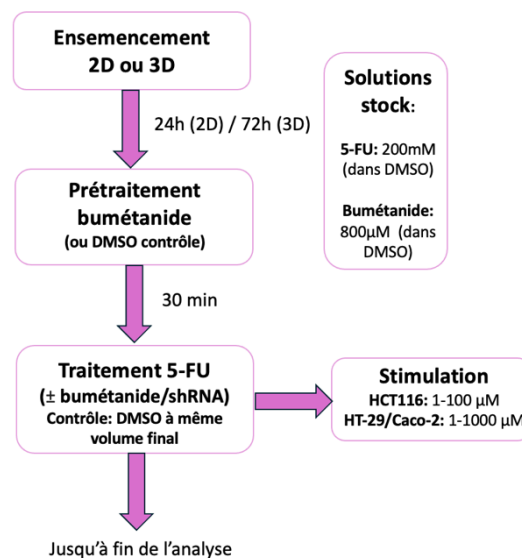


Figure 16: Workflow de la stimulation à la chimiothérapie (5-FU) pour les cellules traitées au bumétanide ou avec des shRNAs

3.6.3 Mesure de la confluence cellulaire sur l'Incucyte

Les images des cultures cellulaires sont acquises à l'aide du système IncuCyte et sont ensuite analysées par le logiciel intégré à la machine. Ce logiciel permet de mesurer la confluence des cultures 2D (μm) ou l'aire du sphéroïde (μm^2). Pour cela, un scan de chaque puits est réalisé toutes les 24 heures jusqu'à la fin du traitement (72h).

3.6.4 Mesure de la viabilité avec le kit CellTiter-Glo

Ce réactif est utilisé après 72h de traitement pour mesurer la viabilité cellulaire via une quantification de l'ATP cellulaire. Dans un premier temps, le réactif permet la lyse des cellules afin de libérer l'ATP intracellulaire dans le milieu réactionnel. Dans un second temps, le réactif du kit mélangé à raison de 50% final avec le milieu de lyse cellulaire, permet la réaction enzymatique entre la luciférase qui, en présence d'ATP oxyde la luciférine, de façon quantitative et qui dès lors émet un rayonnement lumineux mesuré au luminomètre (réglages : orbital, vitesse normale, temps de comptage = 0,25) après 2 minutes d'agitation pour lyser les cellules 2D et 5 minutes d'agitation pour les sphéroïdes 3D. Enfin, 10 minutes de réaction à RT sont nécessaires pour les cultures 2D et 25 minutes pour les 3D juste avant la lecture au luminomètre. Deux versions du kit ont été utilisées: une pour les cultures 2D (ref 0000633237, Promega) et une pour les cultures en sphéroïde (3D) (ref 0000634441, Promega).

3.7 Mesure de la viabilité suite à une irradiation en culture 2D et en 3D

En culture 2D, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits, à raison de 1000 cellules par puits dans 2mL de milieu. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont irradiées au Gamma cell à des doses de 0, 2, 4 et 6 Grays respectivement. Les cellules sont ensuite maintenues en culture pendant 10 jours afin d'évaluer la formation de colonies. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours.

En culture de sphéroïdes, les cellules sontensemencées dans les mêmes conditions, puis incubées pendant 3 jours afin de permettre la formation des sphéroïdes. Une fois formés, ceux-ci sont irradiés aux mêmes doses que les cultures 2D (0, 2, 4 et 6 Grays). Après irradiation, les sphéroïdes sont maintenus en culture pendant 6 jours avec un renouvellement du milieu tous les deux jours.

3.7.1 Mesure de la viabilité cellulaire avec le clonogenic assay réalisé sur cultures 2D

Le test clonogénique permet d'évaluer la capacité des cellules à former des colonies après un traitement. Les colonies formées dans chaque puits sont fixées et colorées au cristal violet. Cette coloration permet à la fois de dénombrer visuellement les colonies et de mesurer l'absorbance du colorant restant en solution, tous deux étant proportionnels à la quantité de cellules viables présentes dans chaque puits.

Les plaques mises sur glace sont lavées deux fois avec du PBS froid (L0615-500, Biowest) (2 mL/puit). Les colonies sont fixées pendant 10 minutes avec du méthanol (24B074022, VWR chemicals) refroidi préalablement à -20°C (2mL/puit). Les plaques sont retirées de la glace et le méthanol est éliminé. Les colonies sont colorées avec une solution de cristal violet (Sigma, C0775) (2mL/puit) pendant 5 minutes. La solution de cristal violet est éliminée et les puits sont rincés deux fois avec de l'eau déminéralisée

(2 mL/puits). Les plaques 6 puits sont scannées afin d'être numérisées grâce au scanner (Epson perfection V700 photo). Le comptage ainsi que l'aire totale des colonies sont mesurés par la suite avec le logiciel « ImageJ ». Le cristal violet est ensuite dissout avec du SDS 5% dans de l'eau déminéralisée (102593029, Sigma) (1mL/puit) overnight. Enfin, 100 µL de mélange SDS 5% + cristal violet en solution en concentration variable de chaque conditions sont prélevés et placés en triplicat dans une plaque 96 puits pour mesurer l'absorbance au spectrophotomètre (SpectraMax plus, Molecular Devices) à 595 nm. Chaque test est effectué en triplicat expérimental réalisé à l'étape de la mise en culture et chaque resolubilisation du cristal violet intégré par les colonies viables est réalisé en triplicat de lecture.

3.7.2 Mesure de la viabilité cellulaire à l'IncuCyte pour les cultures 3D

La viabilité des sphéroïdes est établie à l'aide du logiciel de l'IncuCyte qui réalise une image scannée de chaque puits, ceci avant l'irradiation, trois et cinq jours après irradiation et permet de mesurer l'aire du sphéroïde.

3.7.3 Mesure de la viabilité cellulaire avec le kit CellTiter-Glo pour les cultures 3D

Au 5^{ème} jour après irradiation, le réactif du CellTiter-Glo est chargé en volume égal à celui présent dans les différents puits et la viabilité cellulaire est mesurée via une quantification d'ATP intracellulaire dont la concentration après lyse cellulaire est proportionnelle aux cellules viables.

3.8 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Une régression non linéaire a été réalisée pour modéliser l'effet de l'inhibiteur (bumétanide) en fonction de la réponse normalisée, avec une pente variable. Lorsque deux conditions étaient comparées, un test *t* de Student a été utilisé. En cas de comparaison entre plus de deux groupes, une ANOVA à un facteur a été utilisée suivi d'un test post hoc adapté. Enfin, un test du Dunnett's, un post hoc test, a été utilisé pour les comparaisons multiples contre un groupe témoin. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.



Résultats

4.1 Validation de l'inhibition de l'expression de *SLC12A2* par shRNAs sur trois lignées

Les lignées Caco-2, HCT116 et HT29 ont été transduites avec des shRNA ciblant NKCC1 (shNKCC1 #1 et #2). L'analyse par RT-qPCR, dans la lignée HT-29 montre que la condition shNKCC1 #1 entraîne une diminution de l'expression de NKCC1 de l'ordre de 80% (fold change = 0,2) tandis que la condition shNKCC1 #2 induit une réduction d'environ 55% (fold change = 0,45) par rapport à la condition contrôle (shRNA SCR). Ces résultats confirment ce qui a déjà été établi au laboratoire. Ceci est observable au Western blot après normalisation au signal de la β -actine. On remarque que c'est en effet la condition shNKCC1 #1 qui exprime le moins NKCC1 dans les trois lignées comparées à la condition shSCR. Dans nos conditions expérimentales, la lignée HT-29 apparaît comme celle qui exprime le plus NKCC1 en condition contrôle comparée aux signaux WB deux autres lignées. On remarque que les niveaux d'inhibition de l'expression de NKCC1 ne sont pas les mêmes entre les différentes lignées (**Figure 17**).

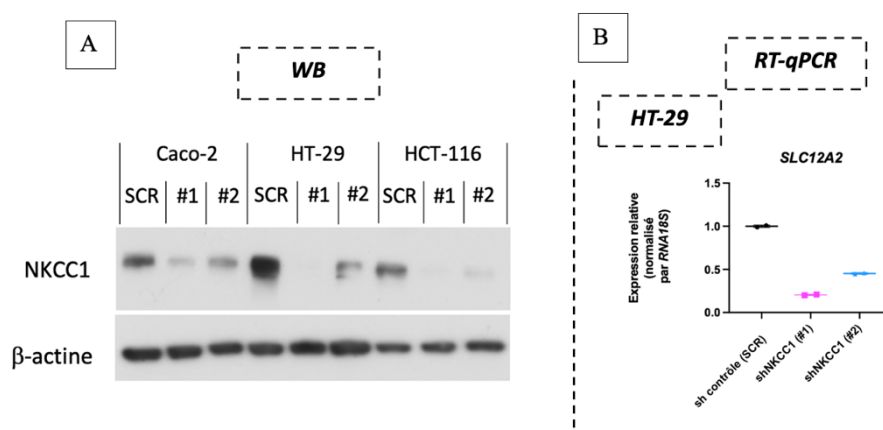


Figure 17: (A) Signal Western blot de NKCC1 et de la protéine ubiquitaire β -actine pour les 3 lignées cellulaires transduites avec les trois conditions de shRNA (SCR, #1 et #2). La quantité de protéines totales déposées par puits est de 20 μ g. (B) RT-qPCR montrant le pourcentage d'inhibition des shNKCC1 #1 et #2 dans la lignée d'HT-29. Les points représentent des réplicats techniques d'une même condition.

4.2 Viabilité des différents modèles de culture 2D-3D des 3 lignées en condition basale, après knockdown de NKCC1

4.2.1 Knockdown de NKCC1 avec un shRNA

La viabilité des cellules transduites cultivées en 2D et en 3D a été évaluée à l'aide de deux méthodes : CellTiter-glo et IncuCyte.

4.2.2 Viabilité observée sur le modèle de culture en monocouche en 2D

Dans la lignée HT-29, les résultats des tests de viabilité obtenus sur base d'une mesure de la confluence estimée toutes les 24h montrent que la condition contrôle (SCR) présente une confluence supérieure aux deux conditions shNKCC1 #1 et #2 et cette différence est statistiquement significative après 96 heures de cultures. Le fait d'inhiber spécifiquement l'expression de NKCC1 diminuerait la capacité de prolifération des cellules HT-29 de manière significative, par rapport à la condition contrôle (**Figure 18A**).

Les résultats de viabilité obtenus pour la lignée HCT-116 par mesure de la confluence via l'IncuCyte montre une confluence progressivement plus faible dans la condition contrôle shRNA (SCR) par rapport aux deux conditions shNKCC1 (#1 et #2). De plus, la condition shNKCC1 #1 présente une confluence légèrement inférieure à celle observée dans la condition shNKCC1 #2. Cependant, ce résultat n'a pas été reproductible (**Figure 18B**).

A l'inverse de ce qui a été observé avec la lignée HCT116, la lignée Caco-2 montre que la condition contrôle shSCR présente une confluence légèrement plus élevée que les conditions shNKCC1 #1 et #2, et ce, à tous les temps mesurés. Cependant, ce résultat n'a pas été reproductible (**Figure 18C**).

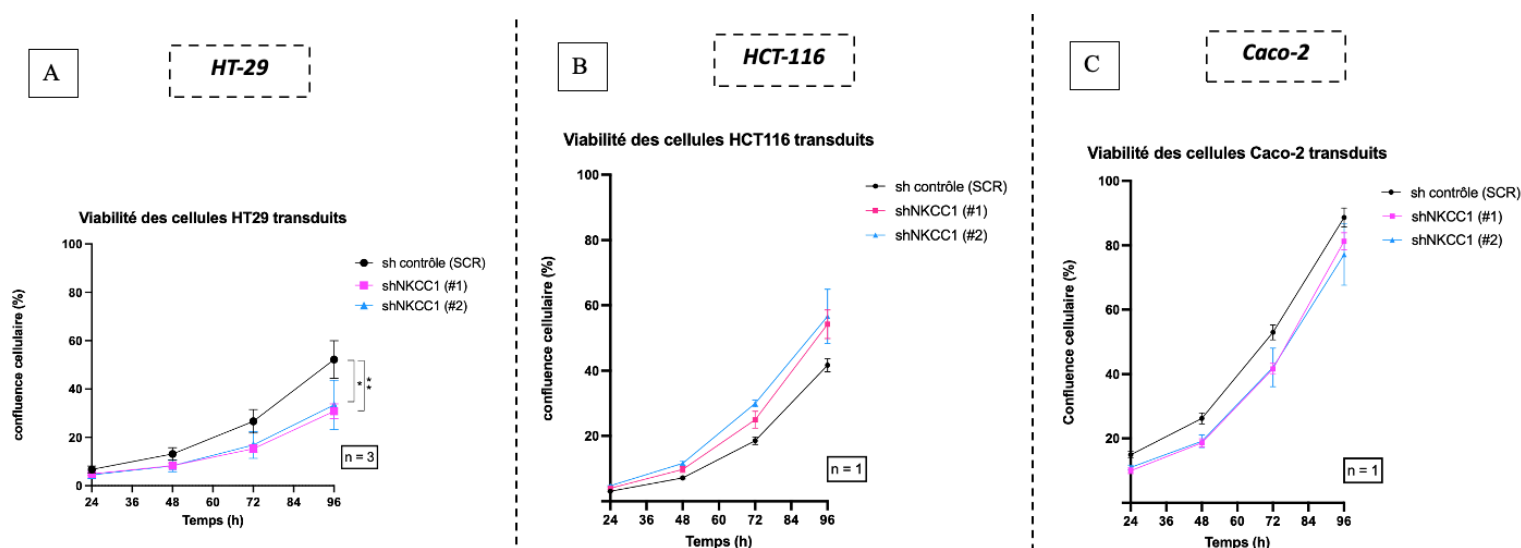


Figure 18: Mesure de la confluence cellulaire de la lignée HT-29 (A), HCT-116 (B) et Caco-2 (C) en condition basale, cultivée en monocouche (2D), transduites avec les différents shRNA et établie toutes les 24h via l'IncuCyte. Chaque point représente la moyenne d'une expérience indépendante (A) et la moyenne d'un triplicat (B et C).

4.2.3 Viabilités observées sur le modèle de culture 3D sphéroïde

La viabilité des sphéroïdes HT-29 générés après transduction révèle une augmentation progressive de la surface totale des sphéroïdes transduits avec shNKCC1 #1 et #2 par comparaison à ceux générés après transduction par le shRNA SCR dès 24h (soit 3 jours après l'ensemencement) et perdurant jusqu'à 72h. Cette différence de prolifération entre la condition contrôle et les conditions transduites par le shRNA spécifique de NKCC1 est statistiquement significative. Par ailleurs, la condition shNKCC1

#1 présente une surface sphéroïdale légèrement plus élevée que celle de shNKCC1 #2 durant les premières 48h. Cet écart tend à se réduire après 72h indiquant potentiellement une dynamique de croissance différenciée entre les deux conditions shNKCC1 spécifiques testées (**Figure 19A**). Ces observations sont complétées par des images acquises avec le logiciel de l'IncuCyte où les conditions shNKCC1 #1 et #2 illustrent les différences de tailles observées et supérieures à celles de la condition contrôle (**Figure 19C**). Enfin, les données issues du test CellTiter-Glo soutiennent les tendances observées à l'IncuCyte puisqu'elles vont dans le même sens et sont statistiquement significatives (**Figure 19B**).

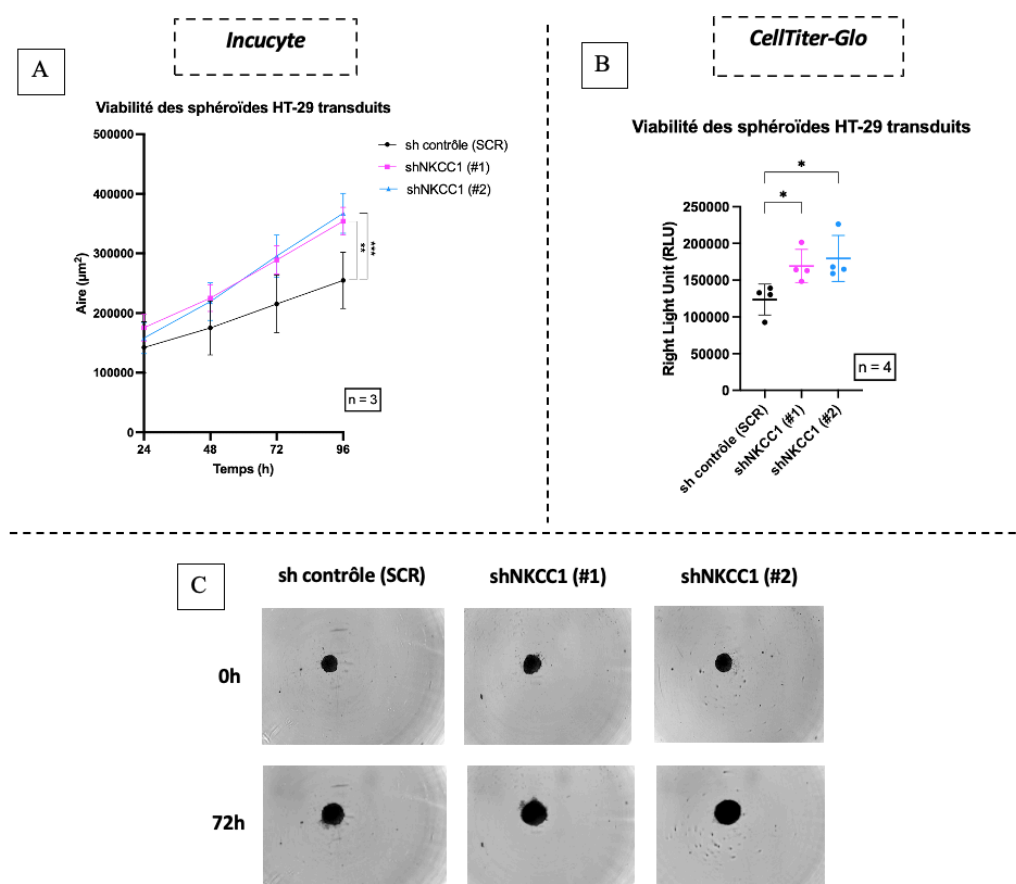


Figure 19: Mesure de la viabilité des sphéroïdes HT-29 en condition basal transduits par les différents shRNAs, et obtenus (A) à l'IncuCyte où chaque point représente la moyenne d'une expérience indépendante (B) par mesure de l'ATP métabolique intracellulaire (kit CellTiter-Glo). Chaque point représente la moyenne d'un triplicat (C) Images de sphéroïdes HT-29 en conditions basales générés après transduction par les différents shRNAs, et acquises à la baseline après 72h post ensemencement avec l'IncuCyte.

Les résultats obtenus pour la lignée HCT-116 sur base sur la mesure établie via l'IncuCyte et montre une tendance similaire avec une augmentation de la taille des sphéroïdes plus marquée dans la condition shNKCC1 #2 que dans la condition shNKCC1 #1. Toutefois, l'évolution de l'aire du sphéroïde au cours du temps, bien que suivant une cinétique comparable, reste moins marquée dans ces deux

conditions que dans la lignée HT-29 (**Figure 20A**). En revanche, les résultats issus du test CellTiter-Glo ne confirment pas ces observations : la viabilité mesurée dans les trois conditions shRNA montre des différences, mais pas significatives (**Figure 20B**).

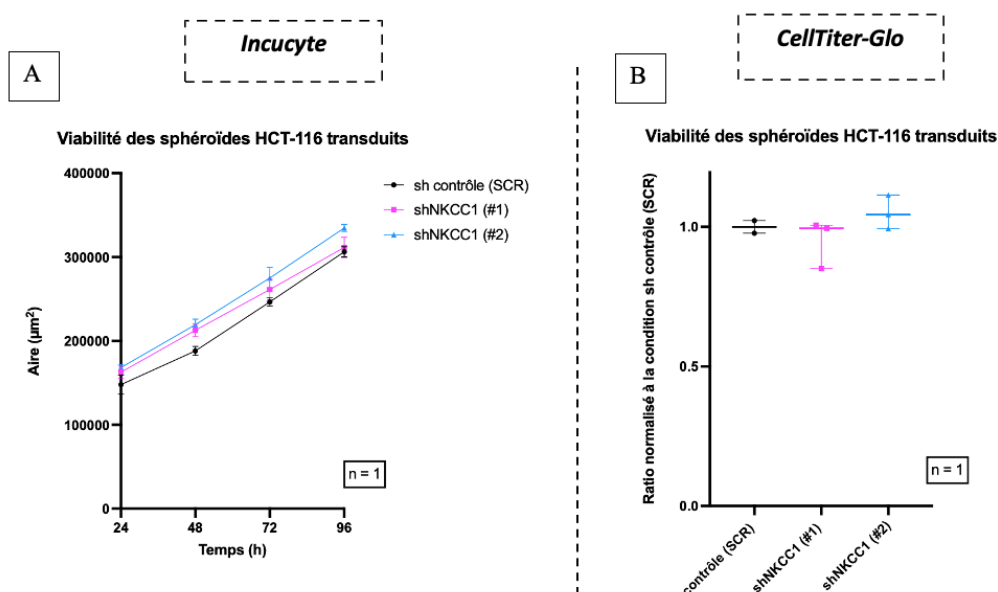


Figure 20: Mesure de la viabilité des sphéroïdes HCT-116 non traités transduits par les différents shRNA, et obtenus (A) à l'Incucyte où chaque point représente la moyenne d'un triplicat et (B) par mesure de l'ATP métabolique intracellulaire (kit CellTiter-Glo) où chaque point représente un réplicat.

Enfin, pour la lignée Caco-2, il a été impossible de mettre au point les conditions de culture permettant la formation de sphéroïdes de tailles optimales. En effet, la suspension cellulaire testée conduisait à la formation de multiples agrégats cellulaires plutôt qu'à un sphéroïde unique bien défini rendant la méthodologie de mesure de la taille de sphéroïdes impossible à mesurer de façon fiable.

4.3 Effet de la diminution d'expression de NKCC1 sur des marqueurs de prolifération cellulaire

Au vu des différences de prolifération entre les cultures 2D et 3D spécifiquement dans la lignée HT-29, nous avons investigué des voies de signalisation spécifiques en testant des gènes et des protéines marqueurs de ces voies régulant le processus de prolifération cellulaire. Ainsi p70 et sa forme phosphorylée P-p70 impliquée dans la voie de signalisation mTOR, ainsi que la protéine d'intérêt NKCC1 ont été analysés par WB (**Figure 21**).

NKCC1, en culture 2D, montre que la condition shNKCC1 #2 présente un niveau d'expression similaire à celui du contrôle, ce qui est en contradiction avec les résultats communiqués (**Figure 17**). En culture 3D, le signal WB de NKCC1 est le plus fort dans la condition shSCR, est non détecté dans la condition

shNKCC1 #1 et intermédiaire dans la condition shNKCC1 #2. Par ailleurs, le signal de NKCC1 est nettement plus élevé en modèle 3D qu'en culture 2D pour la même quantité en protéines totales chargée sur gel et à la même exposition. Le rapport P-p70/p70 est moins élevé en 2D pour les conditions shNKCC1 comparé à la condition sh contrôle. Ces données suggèrent que l'inhibition de NKCC1 pourrait être associée à une diminution de l'activation de la voie mTOR en culture 2D (**Figure 21**).

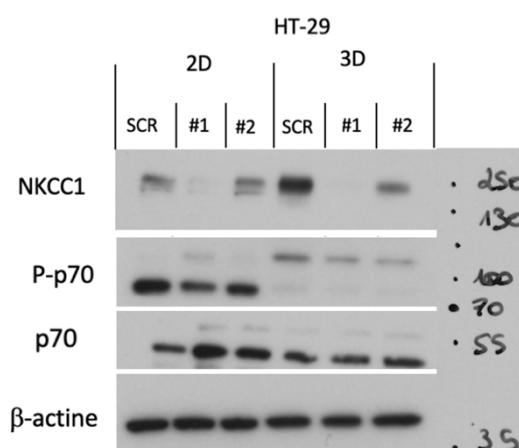


Figure 21: Western blot d'extraits cellulaires de cultures 2D et de sphéroïdes générés avec des cellules HT-29 transduites avec les 3 shRNAs #1 et #2 et SCR. La quantité de protéines totales déposées par puits est de 20 µg.

4.4 Comparaison de l'effet du knockdown de NKCC1 en modèle de culture 2D et 3D sur la prolifération cellulaire

Une RT-qPCR a été réalisée à partir d'extraits d'ARNm issus des cultures 2D et 3D des cellules HT-29 après une phase de prolifération en condition non traitée. L'objectif est d'évaluer l'expression des gènes liés à la viabilité et à la prolifération des sphéroïdes. Dans les deux types de culture, le gène NKCC1 est fortement exprimé dans la condition contrôle (shSCR). En revanche, son expression est réduite dans les conditions shNKCC1 #1 et #2 confirmant l'efficacité de l'inhibition. Cette inhibition apparaît plus marquée en culture 3D qu'en 2D pour les deux shNKCC1 #1 et #2. Concernant les marqueurs de prolifération cellulaire Ki67 et CCND1 (qui codent pour la cycline D1, régulatrice du passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire), leur expression est significativement diminuée dans les conditions shNKCC1 #1 et #2 par rapport à la condition shSCR, en 2D comme en 3D.

Ces résultats suggèrent qu'une inhibition plus forte de NKCC1 est associée à une prolifération cellulaire réduite. L'expression des marqueurs de prolifération est légèrement plus élevée dans la condition #2, par rapport à la condition #1 principalement en culture 2D (**Figure 22**).

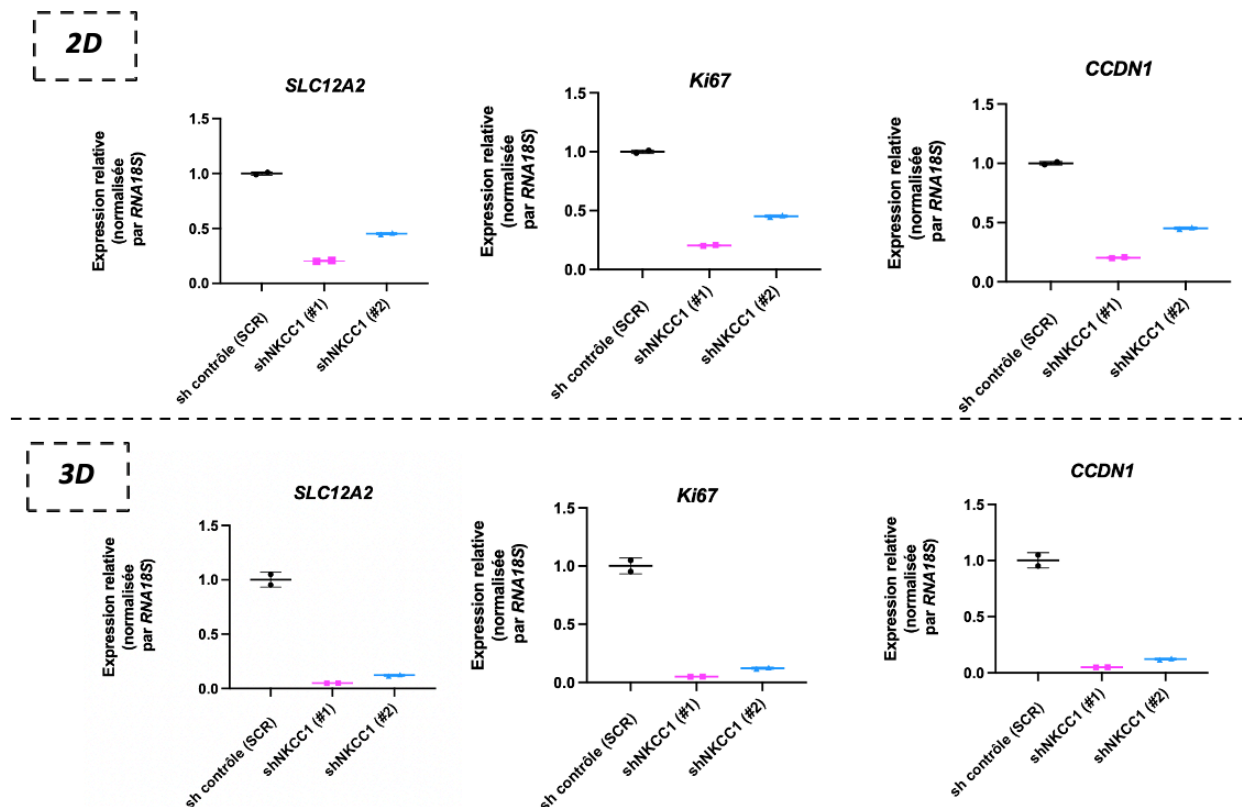


Figure 22: RT-qPCR de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire sur base d'extraits d'ARNm de cellules HT-29 en culture 2D et 3D. Chaque point représente un réplicat technique d'une même condition.

4.5 Résultats de l'effet de l'inhibition de NKCC1 dans son activité d'échangeuse d'ions par le bumétanide sur la viabilité cellulaire des HT-29

4.5.1 Viabilité des cellules cultivées en modèle monocouche (2D)

Bien que l'expérience n'ait pas été réalisée en triplicat, les résultats évaluent la confluence des cellules HT-29 avec et sans inhibition de NKCC1 au bumétanide et montrent une prolifération accrue à partir de 48h, indiquant une meilleure viabilité par rapport à la condition contrôle. Ceci reste cependant discutable au vu des barres d'erreurs obtenues à 72 comme à 96h de culture (**Figure 23**).

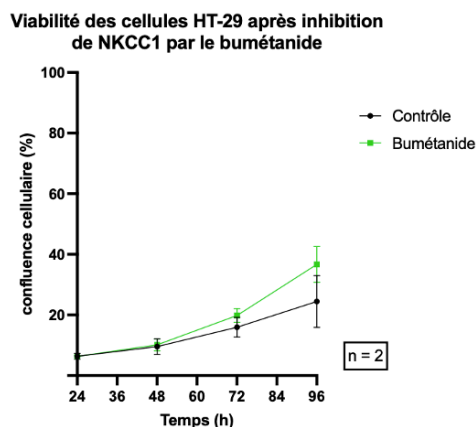


Figure 23: Mesure de la confluence cellulaire de la lignée HT-29 évaluée toutes les 24h à l'IncuCyte où chaque point représente la moyenne de deux triplicats.

4.5.2 Viabilité des cellules cultivées en sphéroïdes (modèle 3D)

La surface des sphéroïdes HT-29 traités au bumétanide augmente progressivement avec le temps et reste supérieure à celle des sphéroïdes de la condition contrôle. Ceci a été réalisé en triplicat mais n'est pas significatif (**Figure 24A**). De plus, les résultats du test du kit CellTiter-Glo révèlent une viabilité accrue des sphéroïdes traités par rapport à ceux de la condition contrôle et cette différence de viabilité est statistiquement significative (**Figure 24B**).

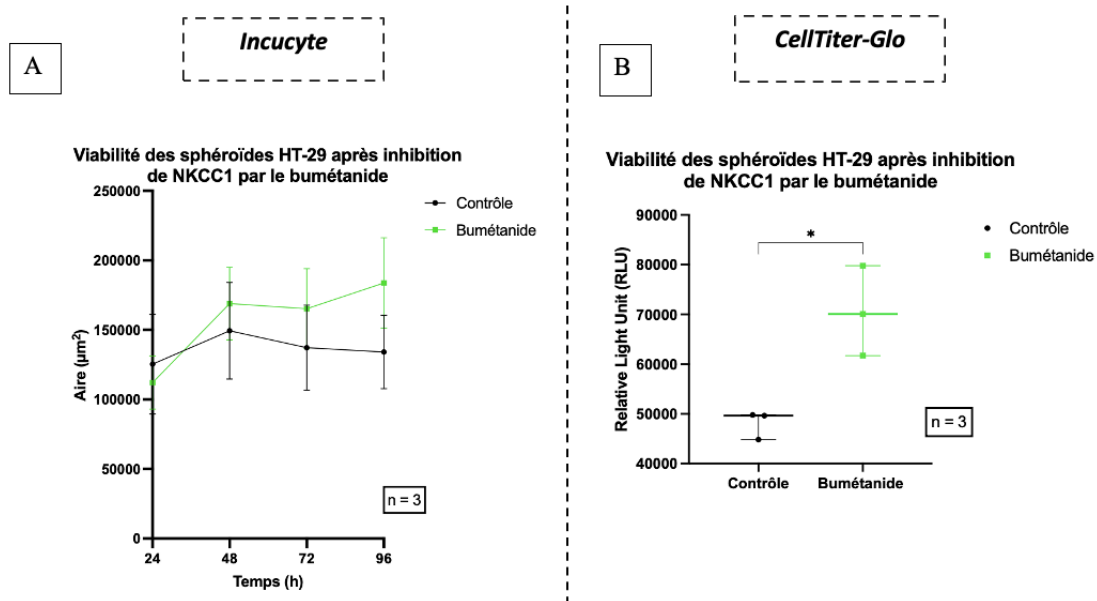


Figure 24: Mesure de la viabilité des sphéroïdes HT-29 avec et sans traitement par le bumétanide déterminé (A) à l'IncuCyte toutes les 24h où chaque point représente la moyenne d'une expérience indépendante et (B) au test CellTiter-Glo où chaque point représente la moyenne d'un triplicat.

Dans l'ensemble, sur la viabilité en condition basale, l'inhibition de NKCC1 modifie la dynamique de la prolifération cellulaire de manière lignée-dépendante. Le knockdown dans la lignée HT-29 diminue la viabilité en 2D, mais augmente la croissance des sphéroïdes en 3D. À l'inverse, l'inhibition par le bumétanide de l'activité échangeuse d'ion de NKCC1 tend à favoriser la prolifération des cellules HT-29 dans les deux modèles.

4.6 Effet d'un traitement au 5-FU sur la viabilité cellulaire de cultures 2D et 3D réalisée avec les 3 lignées cellulaires commerciales cancéreuses avec et sans effet sur l'expression ou l'activité échangeuse d'ion de NKCC1

4.6.1 Effet de la modulation de NKCC1 par knockdown

4.6.1.1 Viabilité des cellules cultivées en modèle monocouche (2D)

La viabilité établie par la mesure de la confluence ou l'ATP métabolique après 72h de traitements ne met en évidence aucune tendance claire permettant de différencier les trois conditions de shRNA en modèle HT-29, HCT-116 et Caco-2 (**Figure 25A, B et C respectivement**). Le seul effet observable concerne l'impact de la dose de 5-FU utilisée, car la viabilité cellulaire diminue progressivement dans les trois conditions de shRNA, et ce, de manière comparable. Pour les HCT-116, la gamme de concentration de 5-FU utilisée est plus faible que pour les lignées HT-29 et Caco-2 en raison d'une sensibilité accrue de ces cellules à cet agent.

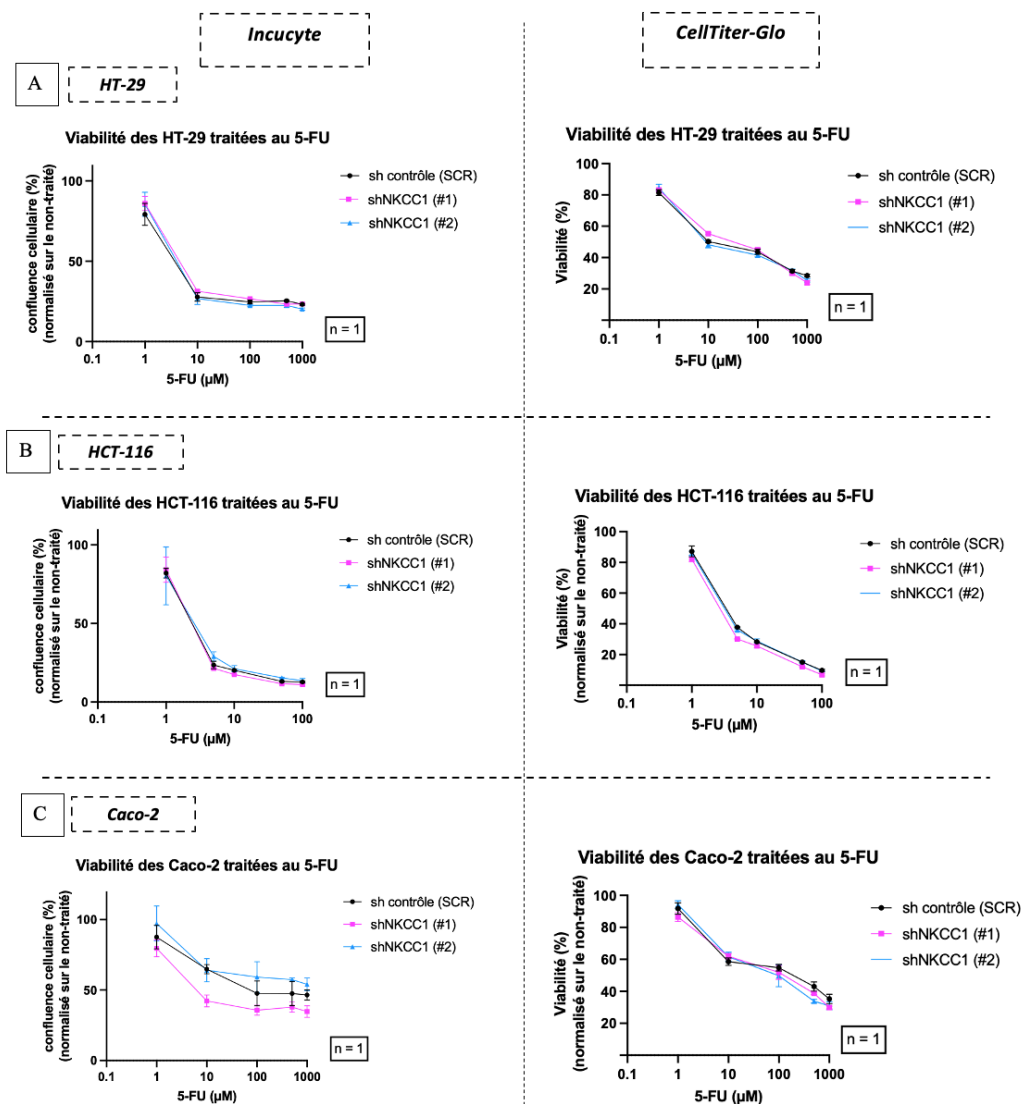


Figure 25: Viabilité des 3 lignées cellulaires mesurée grâce à l'Incucyte et au test CellTiter-Glo après 72h de traitement au 5-FU. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat.

4.6.1.2 Viabilité des cellules cultivées en sphéroïde (modèle 3D)

La viabilité des sphéroïdes HT-29 a été évaluée avec la méthode CellTiter-Glo qui révèle une sensibilité croissante au 5-FU selon les conditions de shRNA et avec une réponse plus marquée dans la condition shNKCC1 #2 que la condition shNKCC1#1, par rapport à la condition contrôle shSCR (**Figure 26A**). L'augmentation de la concentration en 5-FU entraîne une diminution progressive de la viabilité des sphéroïdes dans les trois conditions. En comparaison aux sphéroïdes générés après transduction par le shRNA SCR, ceux des conditions shNKCC1 #1 et #2 semblent les plus sensibles au traitement. La mesure de l'aire des sphéroïdes à l'Incucyte, n'a pas pu générer de résultat fiable suite à une limitation technique du logiciel. Ce dernier ne permet pas de distinguer précisément la surface du sphéroïde, car les cellules mortes ou détachées présentes autour du sphéroïde entraînent des mesures d'aire non exacte et donc non interprétable. Ceux-ci sont montrés à titre indicatif dans ce travail (**Annexe 5**). Aucun résultat interprétable n'a été acquis avec les HCT-116 qui montrent le même souci que les HT29 (**Annexe 5**). Les résultats des tests de viabilité obtenus avec la méthode CellTiter-Glo ne permettent pas de conclure à une différence significative de sensibilité entre les différentes conditions testées et transduites (**Figure 26B**).

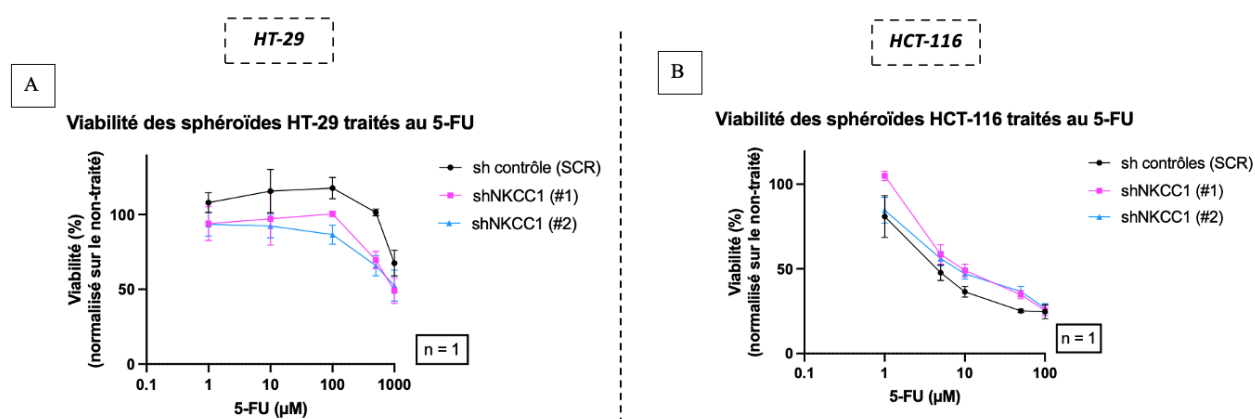


Figure 26: Viabilité des sphéroïdes (A) HT-29 et (B) HCT-116 mesurée après 72h de traitement à différentes doses de 5-FU, établies sur base de l'ATP cellulaire mesurée par le kit CellTiter-Glo. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat.

4.7 Effet du traitement 5-Fu sur la viabilité des cellules cancéreuses sous inhibition de la fonction transporteur d'ions de NKCC1 par traitement au bumétanide

4.7.1 Viabilité des cellules (HT-29) cultivées en modèle monocouche 2D

Lors de l'analyse de la viabilité sans traitement 5-FU, les cellules exposées au bumétanide montrent une prolifération plus importante que les cellules de la condition contrôle. Cependant, après 72h de traitement au 5-FU, la confluence des cellules, mesurée à l'IncuCyte révèle une diminution de la viabilité des cellules traitées au bumétanide dans deux expériences indépendantes (n=2) (**Figure 27**).

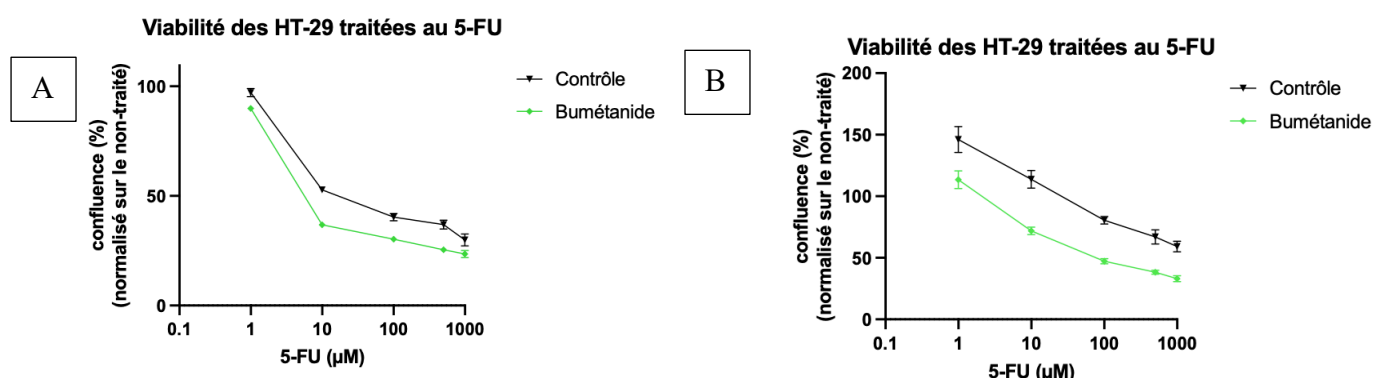


Figure 27: Viabilité des cellules HT-29 traitées au 5-FU après 72h de traitement au bumétanide, mesuré à l'IncuCyte. (A) expérience 1, (B) expérience 2. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat.

4.7.2 Viabilité des cellules (HT-29) cultivées en sphéroïde (modèle 3D)

En condition de culture 3D, des tendances similaires à celles observées en 2D sont retrouvées. Cependant, l'analyse via l'IncuCyte ne met pas en évidence une diminution de la viabilité associée à l'effet dose-dépendance du 5-FU (**Figure 28A**). Le test CellTiter-Glo montre la même tendance qu'observée en 2D, avec une diminution de la viabilité des sphéroïdes traités au bumétanide. Cet effet est particulièrement marqué pour les concentrations 5-FU comprises entre 10 à 100 µM (**Figure 28B**).

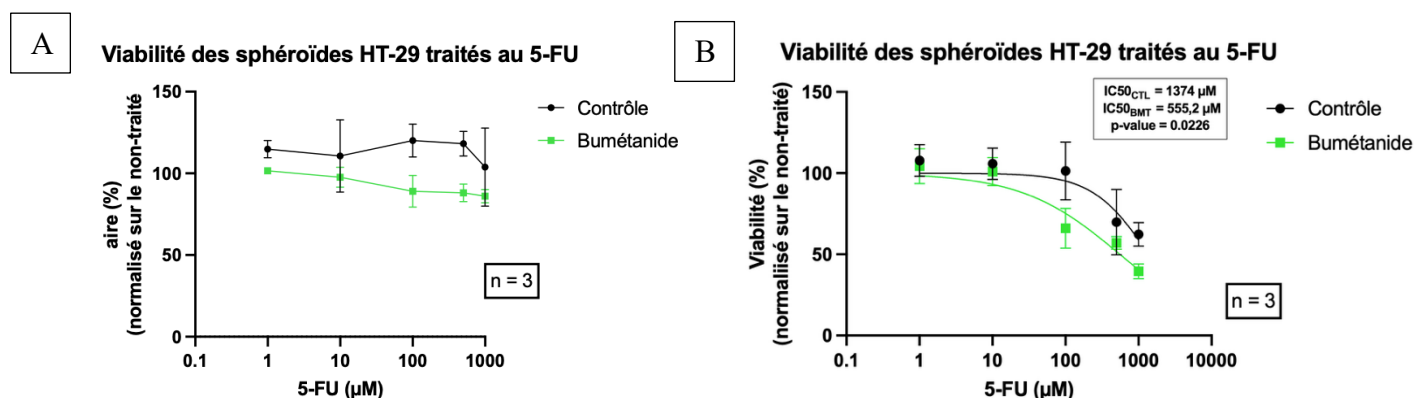


Figure 28: Viabilité des sphéroïdes HT-29 traités au 5-FU après 72h de traitement au bumétanide, mesuré à (A) l'IncuCyte et (B) grâce au kit CellTiter-Glo où chaque point représentait la moyenne d'une expérience indépendante.

Pour conclure sur l'impact de la viabilité sous traitement selon la modulation de NKCC1 traitée en 5-FU, l'effet cytotoxique du 5-FU est dose-dépendant, quel que soit la lignée ou le mode de culture. Le knockdown de NKCC1 ne modifie pas significativement la réponse en 2D cependant, en 3D, une sensibilité accrue au traitement 5-FU est observée. L'inhibition fonctionnelle par le bumétanide semble également potentialiser l'effet du 5-FU.

4.8 Effet de l'irradiation sur la viabilité cellulaire des 3 lignées en cultures 2D et des HT-29 en modèle sphéroïde (3D)

4.8.1 Viabilité des cellules cultivées en modèle monocouche (2D)

Les résultats des trois méthodes utilisées pour évaluer la viabilité cellulaire (le comptage des cellules viables, mesure de l'aire cellulaire et absorbance du cristal violet) montrent une diminution progressive de la viabilité cellulaire en fonction des doses d'irradiation, mais aucun impact du knockdown de NKCC1 n'est observé. Cette manipulation a été réalisée trois fois. Une seule expérience est communiquée dans ce travail à titre indicatif (**Figure 29**).

4.8.2 Viabilité des cellules (HT-29) cultivées en modèle sphéroïde (3D)

La viabilité établie sur base des scans réalisés via l'Incucyte révèle une diminution en fonction de l'augmentation des doses d'irradiation. Aucune différence entre les trois conditions shRNA n'est observée, car les résultats sont non interprétables pour la même raison que celle évoquée précédemment. En revanche, les résultats du kit CellTiter-Glo, révèlent que les cellules transduites avec le shRNA contrôle (SCR) présentent une viabilité décroissante en fonction des doses d'irradiation, 120 heures après traitement. De manière intéressante, les conditions shNKCC1 #1 et #2 ne montrent pas de diminution de viabilité aux mêmes doses d'irradiation (**Figure 30**).

En conclusion, l'effet de l'irradiation sur la viabilité va induire une diminution dose-dépendante de celle-ci dans les 2 modèles indépendamment du knockdown de NKCC1 considéré. En 3D, les sphéroïdes knockdowns pour NKCC1 semblent moins sensibles à l'irradiation, comparés à la condition contrôle SCR qui, elle, montre une sensibilité accrue. En 2D, aucune tendance claire n'est observable, aucun effet ne peut être conclu.

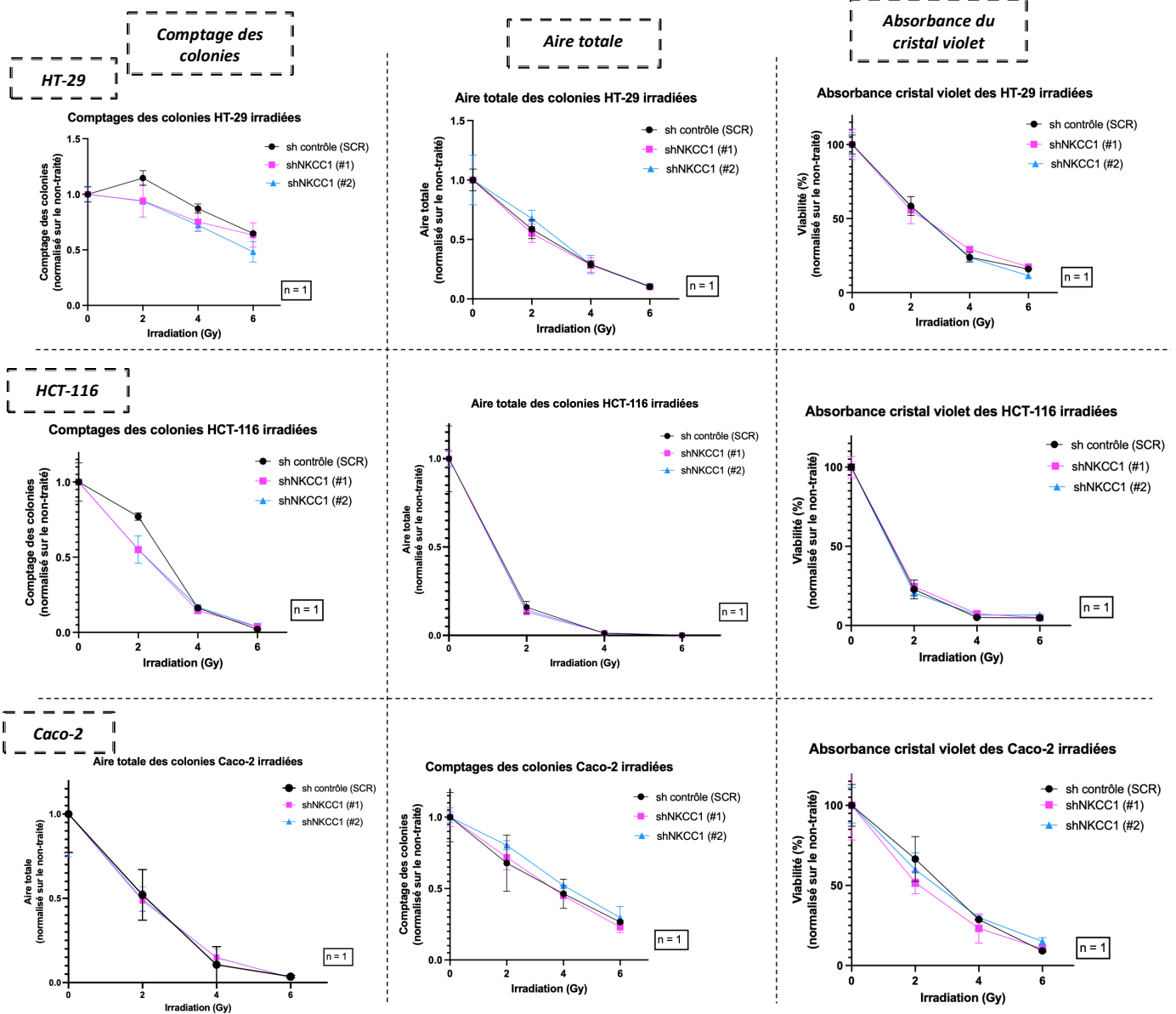


Figure 29: Mesure de la viabilité après irradiations de trois lignées cellulaires (HT-29, HCT-116 et Caco-2) avec et sans transduction des shRNA NKCC1 #1 et #2 et le shRNA SCR. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat.

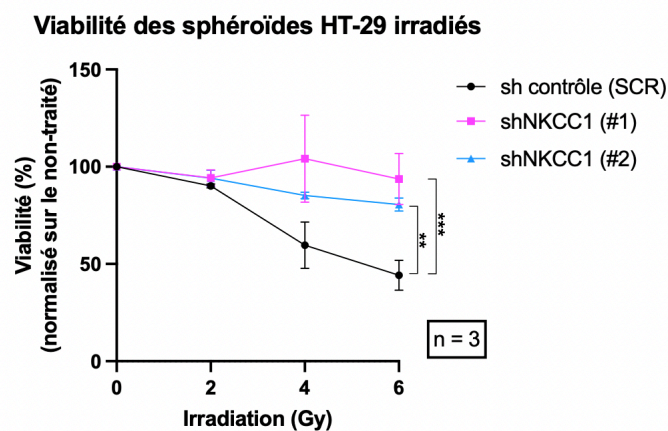



Figure 30: Viabilité des sphéroïdes HT-29 transduits et irradiés, mesurée par le kit CellTiter-Glo 5 jours après l'irradiation. Chaque point représente la moyenne d'une expérience indépendante



Discussion/Conclusion

Les effets du knockdown de NKCC1 diffèrent selon les lignées cellulaires, soulignant une hétérogénéité de réponse à la perte de l'expression de ce cotransporteur. Alors qu'un ralentissement de la prolifération est observé dans les conditions knockdowns par shRNA, l'inhibition de l'activité échangeuse d'ions via le bumétanide semble au contraire stimuler la croissance cellulaire dans les cellules HT-29. Cette divergence suggère que les mécanismes cellulaires diffèrent selon le mode d'inhibition. Ceci pose question sur le rôle contextuel de NKCC1 dans la régulation de la prolifération tumorale.

La variabilité observée entre les différentes lignées au travers des expériences de viabilité en cas de knockdown de NKCC1 ou des tests réalisés au bumétanide pourrait s'expliquer par les caractéristiques génétiques et épigénétiques différentes de chaque lignée. Des éléments tels que le statut MSI, la présence de mutations dans des gènes clés ainsi que l'instabilité chromosomique peuvent influencer la sensibilité cellulaire à une inhibition de NKCC1 via une modulation de son expression ou via une inhibition de son activité échangeuse d'ions restreinte à sa localisation membranaire.

La lignée HT-29 présente un phénotype non hypermutée et microsatellite stable (MSS) avec plusieurs mutations fréquentes dans les CRC sporadiques, notamment sur les gènes APC, BRAF, SMAD4, TP53 et PIK3CA. Cette lignée est caractérisée par la voie des instabilités chromosomiques, majoritaires dans les CCR (82)(83). À l'inverse, la lignée HCT116 présente une instabilité des microsatellites (MSI), une mutation de KRAS et est considérée comme une lignée hypermutée. Cette lignée permet d'explorer la voie moléculaire distincte de l'instabilité du microsatellite moins fréquente dans les CCR sporadiques (environ 15%) (82)(83)(84). Enfin, la lignée Caco-2, également non hypermutée, et MSS, est mutée sur le gène P53 (82)(83).

Par ailleurs, les trois lignées utilisées ne sont pas classées dans les mêmes sous-types CMS : la lignée HT-29 est associée au sous-type CMS3 (métabolique), HCT116 correspond au CMS1 (immunitaire) tandis que Caco-2 présente un profil proche du CMS2 (canonique). Ces sous-types présentent des réalités biologiques complètement différentes, que ce soit au niveau du métabolisme, de la réponse immunitaire et de la signalisation et du comportement cellulaire en culture (82). Cette hétérogénéité moléculaire pourrait expliquer la variabilité des réponses à l'inhibition de NKCC1 ainsi que le niveau d'expression de NKCC1 en condition basale.

Les résultats obtenus en condition basale en cultures 3D HT-29 knockdown pour NKCC1, montrent qu'une diminution de l'expression de NKCC1 stimule la prolifération cellulaire. L'inhibition la plus efficace de NKCC1 (80% d'inhibition) induit une croissance plus rapide des sphéroïdes durant les trois premiers jours d'incubation alors qu'aucune variation de comportement n'est observée lors de l'inhibition de NKCC1 pour le modèle 3D HCT-116. Il serait donc particulièrement intéressant de

poursuivre les expériences avec la lignée HT-29 (sous irradiation avec inhibition par le bumétanide en modèle sphéroïde) puisque cette lignée semble être plus impactée par l'inhibition de NKCC1, notamment en 3D.

Une inhibition de la fonction transporteur d'ion de NKCC1 sur la lignée HT-29 par le bumétanide montre aussi une augmentation de la prolifération cellulaire. Ces résultats indiquent qu'en culture 3D, une diminution de l'activité échangeuse d'ions ou un knockdown de NKCC1 induisent une prolifération accrue de la lignée HT-29. Or, il a été expliqué dans l'article de Chen. D *et al.* que SLC12A2 était associé à un effet protecteur dans le CCR, ce qui est cohérent avec le fait que la diminution de l'expression de *SLC12A2* entraîne une augmentation de la prolifération dans les résultats des modèles 3D (75).

Au vu des différences de prolifération entre les cultures 2D et 3D des cellules HT-29, l'effet du knockdown de NKCC1 sur la voie de signalisation mTOR et la prolifération cellulaire a été explorée et des différences marquées sont observées quant à l'expression NKCC1 avec une surexpression nette dans les sphéroïdes 3D par rapport aux cultures 2D. Ceci pourrait s'expliquer par l'induction d'un phénotype « cellules souches » plus marqué en culture 3D. Il a d'ailleurs été démontré par Gheytauchi *et al.*, que le caractère des cellules souches tumorales était davantage exprimé dans les cultures 3D de cellules HT-29 que dans les cultures 2D (85).

De plus, l'inhibition de NKCC1 en 2D entraîne une diminution spécifique relative du niveau de P-p70/p70 total qui témoigne d'une réduction de l'activation de la voie mTOR. Cet effet est beaucoup moins marqué en culture 3D, où l'activation de p70 est déjà visible (même si elle est faible). La RT-qPCR indique qu'une inhibition de NKCC1 (shNKCC1 #1 et #2) que ce soit en 2D ou en 3D est associée à une diminution de la prolifération cellulaire. Ce résultat est cohérent avec les observations faites en 3D, mais est partiellement contradictoire avec les données obtenues en 2D, où une diminution de la prolifération avait été précédemment observée dans les conditions knockdowns de NKCC1 par rapport à la condition contrôle. Il pourrait être intéressant de recommencer l'expérience qui a été réalisée une seule fois afin de voir si l'effet est réel.

Après 72h de traitement au 5-FU, les cultures 2D ne permettant pas de conclure à une éventuelle différence entre les conditions de shRNAs. Cependant, une dose plus faible suffit à induire une réduction significative de la viabilité cellulaire des HCT-116 par comparaison à ce qui a été obtenu avec les lignées HT-29 et Caco-2. Ces observations concordent avec les résultats de Druzhkova *et al.*, qui ont mis en évidence une sensibilité plus importante des HCT-116 à différents agents chimiothérapeutiques (FOLFOX, oxaliplatine, irinotecan) en les comparant aux HT-29 (86). Comme expliqué précédemment, les HCT116 sont p53 Wild type (WT), ce qui les rend potentiellement plus sensibles aux traitements.

Les sphéroïdes HT-29 ont été étudiés uniquement via l'analyse par CellTiter-Glo afin de mettre en évidence une viabilité supérieure des cellules contrôles (shSCR) par rapport à la condition shNKCC1 #1 et #2 sous 5-FU. Ceci suggère que le knockdown de NKCC1 accroît la sensibilité des cellules à ce traitement chimiothérapeutique. Ce phénomène est concordant avec les observations de Luo *et al.*, qui rapporte que la diminution d'expression de NKCC1 dans des allogreffes de gliomes chez la souris potentialise les effets de la chimiothérapie en induisant une diminution de la prolifération et augmentant l'apoptose des cellules tumorales. La combinaison d'un agent chimiothérapeutique avec une diminution d'expression de NKCC1 pourrait constituer une stratégie permettant de sensibiliser des tumeurs colorectales au 5-FU (87). Tout ceci est également observable lors de l'inhibition de la fonction échangeuse d'ions de NKCC1 par le bumétanide, tant en modèle 2D que 3D. Les cellules les plus sensibles au traitement 5-FU ont une viabilité qui diminue. Comme le rapporte Luo *et al.* et Algharabil *et al.*, l'inhibition de NKCC1 par le bumétanide ou un knockdown par les shRNAs dans les gliomes renforce l'efficacité des agents chimiothérapeutiques comme le témozolomide en augmentant l'apoptose, en réduisant la prolifération et la migration des cellules tumorales et donc en améliorant l'efficacité du traitement (73)(87)(88). Ceci suggère que NKCC1 aurait un rôle dans la survie des cellules tumorales. Les deux mécanismes d'inhibition testés dans ce travail sur les cellules HT29 convergent avec cette observation faite dans la littérature dans un autre contexte tumoral.

L'irradiation dans les cultures 2D au sein des trois lignées ne provoque aucune différence entre les trois conditions shRNA, peu importe la dose utilisée. Les sphéroïdes HT29 montrent des effets sur la viabilité avec l'analyse CellTiter-Glo. On observe dans la condition contrôle une sensibilité de cellules aux radiations : après 5 jours, la viabilité diminue, et ce, de manière dose dépendante. Cette diminution de viabilité est plus marquée dans la condition contrôle que dans les conditions shNKCC1. Les sphéroïdes knockdowns pour NKCC1 ne montrent pratiquement aucune sensibilité à l'irradiation, la viabilité restant stable, quelle que soit la dose utilisée. Ces observations suggèrent que la perte de NKCC1 confère une résistance aux rayonnements ionisants proportionnels au knockdown de NKCC1.

Nos résultats montrent que l'irradiation et la chimiothérapie n'induisent pas les mêmes effets sur les cellules tumorales, lorsque NKCC1 est modulé (inhibition ou knockdown). Ces thérapies génèrent des stress communs, comme le stress oxydant via la production de ROS, mais sont aussi complètement différentes dans leurs mécanismes régulateurs. Ce comportement divergeant, suggèrent un rôle complexe d'NKCC1 dans ces processus et interactions entre la régulation ionique, la prolifération et la sensibilité des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. Il a été démontré selon Garzon-Muvdi *et al.*, que la plasticité fonctionnelle de NKCC1 est également observée dans le glioblastome où son rôle dans la migration et l'invasion tumorale varie en fonction de l'environnement tumoral (89).

Comme évoqué dans l'introduction (**cf. 1.6.6**), NKCC1 a été récemment associé aux cellules souches cancéreuses. Nous hypothétisons que la sensibilisation aux traitements observée suite à l'inhibition de NKCC1 résulterait d'une modulation de ce caractère «cellules souches» habituellement associé à une résistance thérapeutique (77).

Au niveau clinique Chen.D *et al.*, ont montré que l'expression de NKCC1 diminue davantage avec les stades croissants (III et IV) de classification des CCR correspondant aux stades les plus agressifs et de moins bons pronostics via un modèle de régression de Cox univarié, les auteurs ont conclu que *SLC12A2* constituait un facteur protecteur dans le cancer colorectal. Toutefois, ils soulignent une contradiction avec leurs résultats expérimentaux, qui montrent que *SLC12A2* favorise la prolifération et le caractère «cellules souches» des cellules tumorales *in vitro*. Cette divergence pourrait s'expliquer par des effets contextuels du micro-environnement tumoral, des types de traitement ou des caractéristiques non contrôlées des cohortes analysées (stades tumoraux, statut métastatique ou thérapeutique)(75). Nos résultats expérimentaux révèlent que le knockdown de NKCC1 entraîne une résistance à l'irradiation ainsi qu'une augmentation de la prolifération des sphéroïdes HT-29, ce qui renforcerait l'hypothèse d'un effet protecteur d'une expression plus forte de NKCC1 dans les cancers colorectaux.

Pour conclure, ce travail a permis de mettre en évidence que l'inhibition de NKCC1 dans le CCR induit des effets variables selon le modèle cellulaire utilisé (choix de la lignée), l'organisation des cellules (modèle 2D ou 3D) et le type de traitement appliqué (5-FU ou radiothérapie). Alors qu'une inhibition de NKCC1 favorise la prolifération en condition basale, elle semble accroître la sensibilité à la chimiothérapie tout en conférant une résistance à la radiothérapie. Ces effets contrastés soulignent le rôle complexe et contextuel de NKCC1 dans la réponse tumorale face aux traitements par irradiation ou par chimiothérapie 5-FU. L'hétérogénéité génétique et moléculaire des CCR (notamment les différences de statut MSI, de mutations oncogéniques ou de sous-types CMS) pourrait également être un facteur déterminant expliquant la variabilité des effets de l'inhibition de ce transporteur en condition basale comme sous les deux traitements testés (soit 5-FU ou par irradiation).

Nos résultats suggèrent une sensibilisation des cellules tumorales aux traitements cytotoxiques (chimiothérapie et radiothérapie) lorsque NKCC1 est inhibé ou knockdown, en particulier dans certaines lignées. On peut ainsi émettre l'hypothèse d'un effet synergique potentiel, dans lequel une inhibition de NKCC1 (via bumétanide ou un knockdown) pourrait être envisagée comme traitement adjuvant aux approches thérapeutiques conventionnelles. Une exploration de l'expression de NKCC1 au sein de cohortes de patients bien caractérisées sur le plan des sous-types CMS pourrait permettre

d'identifier les profils tumoraux les plus susceptibles de bénéficier d'une co-inhibition ciblée de ce transporteur.

Afin de répondre aux questions soulevées dans ce travail, des perspectives multiples existent. Tout d'abord, l'utilisation de modèles plus représentatifs de la variabilité des tumeurs rencontrées dans le CCR, tels que les organoïdes dérivés de tumeurs primaires, permettrait d'investiguer le rôle de NKCC1 dans des modèles 3D, plus proches de la réalité clinique. De plus, l'utilisation des modèles murins (xénogreffes sous-cutanées de cellules HT-29 shNKCC1), ou des PDX (« Patient-Derived Xenograft ») permettrait d'évaluer l'influence du micro-environnement tumoral, absent dans les modèles *in vitro*. Il serait également pertinent d'étudier l'expression de NKCC1 dans des cohortes de patients bien caractérisés en lien avec les sous-types CMS afin d'identifier la distribution de la protéine en lien avec ces différents profils tumoraux et d'identifier où la modulation de NKCC1 via le bumétanide aurait le plus d'impact comme traitement adjuvant de la radiothérapie ou du 5-FU voire d'autres chimiothérapies qui restent à évaluer. Enfin, il serait intéressant de comparer la sensibilité à l'inhibition de NKCC1 entre les tumeurs primaires et leurs métastases afin de déterminer si des différences de réponses existent selon le site tumoral et l'évolution de la maladie.



Bibliographie

1. Robert L. Sorenson T. Clark Brelje. Atlas of Human Histology A Guide to Microscopic Structure of Cells, Tissues and Organs. 2014.
2. Mamis K, Zhang R, Bozic I. Stochastic model for cell population dynamics quantifies homeostasis in colonic crypts and its disruption in early tumorigenesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2023 Oct 18;290(2009).
3. Barker N. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014. p. 19–33.
4. Stange DE. Intestinal Stem Cells. In: *Digestive Diseases*. 2013. p. 293–8.
5. Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. Vol. 49, *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group; 2017.
6. Choi J, Augenlicht LH. Intestinal stem cells: guardians of homeostasis in health and aging amid environmental challenges. Vol. 56, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2024. p. 495–500.
7. <https://cancer.be/cancer/cancer-colorectal/>. 2025.
8. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer [Internet]. www.thelancet.com. 2019 Oct. Available from: www.thelancet.com
9. Eng C, Yoshino T, Ruíz-García E, Mostafa N, Cann CG, O'Brian B, et al. Colorectal cancer. Vol. 404, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2024. p. 294–310.
10. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
11. <https://kankerregister.org/fr>. 2025.
12. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Herrera Enríquez M, Uriarte-Ruiz K, et al. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci*. 2017 Oct 27;5(11):4667.
13. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. Vol. 469, *Virchows Archiv*. Springer Verlag; 2016. p. 125–34.
14. Eng C, Jácome AA, Agarwal R, Hayat MH, Byndloss MX, Holowatyj AN, et al. A comprehensive framework for early-onset colorectal cancer research. Vol. 23, *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd; 2022. p. e116–28.

15. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. Vol. 14, *Cancers*. MDPI; 2022.
16. Dunne PD, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer—an update. Vol. 484, *Virchows Archiv*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2024. p. 273–85.
17. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov 1;21(11):1350–6.
18. Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Vol. 16, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Research; 2019. p. 713–32.
19. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. Vol. 21, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2021. p. 653–67.
20. Vacante M, Ciuni R, Basile F, Biondi A. Gut microbiota and colorectal cancer development: A closer look to the adenoma-carcinoma sequence. Vol. 8, *Biomedicines*. MDPI AG; 2020. p. 1–19.
21. Neil A. Campbell LAUMLCSAWPVM and JBR. *Biology: A Global Approach*, 11th Global Edition. Campbell . 2018;
22. Kim J, Tomita N, Suriawinata AA, Hassanpour S. Detection of Colorectal Adenocarcinoma and Grading Dysplasia on Histopathologic Slides Using Deep Learning. *American Journal of Pathology*. 2023 Mar 1;193(3):332–40.
23. Harpaz N, Polydorides AD. Colorectal Dysplasia in Chronic Inflammatory Bowel Disease Pathology, Clinical Implications, and Pathogenesis.
24. Mezzapesa M, Losurdo G, Celiberto F, Rizzi S, D’amati A, Piscitelli D, et al. Serrated Colorectal Lesions: An Up-to-Date Review from Histological Pattern to Molecular Pathogenesis. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
25. Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review. Vol. 46, *Cell Biology International*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 863–77.
26. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. Vol. 7, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2022.
27. Faris C, Cuaranta A, Abdelmasseh M, Finley R, Payne B, Gorka A, et al. Incidence and Dynamics of CRC Stage Migration: A Regional vs. a National Analysis. *Cancers (Basel)*. 2024 Oct 1;16(19).

28. Chen K, Collins G, Wang H, Toh JWT. Pathological features and prognostication in colorectal cancer. *Current Oncology*. 2021 Dec 1;28(6):5356–83.
29. Piñeros M, Parkin M, Ward K, Chokunonga E, Ervik M, Farrugia H, et al. Review Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information [Internet]. www.thelancet.com/oncology. 2019. Available from: www.thelancet.com/oncology
30. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. Vol. 17, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2017. p. 79–92.
31. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer [Internet]. www.thelancet.com. Available from: www.thelancet.com
32. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Nov 5;1.
33. Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T, Ishigamori R. Biomarkers for colorectal cancer. Vol. 11, *International Journal of Molecular Sciences*. 2010. p. 3209–25.
34. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2020 Oct 1;31(10):1291–305.
35. Mishra J, Drummond J, Quazi SH, Karanki SS, Shaw JJ, Chen B, et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. Vol. 86, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2013. p. 232–50.
36. Fidelle M, Chen J, Roberti MP, Kroemer G, Zitvogel L. Impact of the intestinal microbiota in colorectal cancer. Vol. 207, *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*. Elsevier Masson s.r.l.; 2023. p. 1234–41.
37. Johdi NA, Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
38. Riccardi C, Napolitano E, Platella C, Musumeci D, Melone MAB, Montesarchio D. Anti-VEGF DNA-based aptamers in cancer therapeutics and diagnostics. Vol. 41, *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 464–506.
39. Kasi PM, Afable MG, Herting C, Lukanowski M, Jin Z. Anti-EGFR Antibodies in the Management of Advanced Colorectal Cancer. Vol. 28, *Oncologist*. Oxford University Press; 2023. p. 1034–48.
40. Hennequin C, Guillermin S, Quero L. Combination of chemotherapy and radiotherapy: A thirty years evolution. Vol. 23, *Cancer/Radiotherapie*. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 662–5.

41. Keramati Z, Motalleb G, Rahdar A, Kerachian MA. Anticancer Effect of Fluorouracil and Gum-Based Cerium Oxide Nanoparticles on Human Malignant Colon Carcinoma Cell Line (Caco2). *Cell J.* 2023 Mar 1;25(3):194–202.
42. Alzahrani SM, Al Doghaither HA, Al-Ghafari AB, Pushparaj PN. 5-Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer (Review). Vol. 50, *Oncology Reports*. Spandidos Publications; 2023.
43. Hudiță A, Radu IC, Zaharia C, Ion AC, Ginghină O, Gălățeanu B, et al. Bio-and hemo-compatible silk fibroin pegylated nanocarriers for 5-fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer: In vitro studies. *Pharmaceutics*. 2021;13(5).
44. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 14;20(30):10316–30.
45. Ramzy GM, Boschung L, Koessler T, Delucinge-Vivier C, Docquier M, McKee TA, et al. FOLFOXIRI Resistance Induction and Characterization in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2022 Oct 1;14(19).
46. Suetsugu T, Mori R, Futamura M, Fukada M, Tanaka H, Yasufuku I, et al. Mechanism of acquired 5FU resistance and strategy for overcoming 5FU resistance focusing on 5FU metabolism in colon cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2021 Apr 1;45(4).
47. Akpınar B, Bracht E V, Reijnders D, Safarikova B, Jelinkova I, Grandien A, et al. 5-Fluorouracil-induced RNA stress engages a TRAIL-DISC-dependent apoptosis axis facilitated by p53 [Internet]. Vol. 6. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
48. Ghafouri-Fard S, Abak A, Tondro Anamag F, Shoorei H, Fattahi F, Javadinia SA, et al. 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent. Vol. 11, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
49. Smith T, Affram K, Bulumko E, Agyare E, Author Edward Agyare C, Martin Luther S. Evaluation of in-vitro cytotoxic effect of 5-FU loaded-chitosan nanoparticles against spheroid models HHS Public Access. Vol. 4, *J Nat Sci*. 2018.
50. Alcindor md T, Beauger phd mba N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. Vol. 18. 2011.
51. O'Dowd PD, Sutcliffe DF, Griffith DM. Oxaliplatin and its derivatives – An overview. Vol. 497, *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V.; 2023.
52. Alian OM, Azmi AS, Mohammad RM. Network insights on oxaliplatin anti-cancer mechanisms. *Clin Transl Med*. 2012 Dec;1(1).

53. Cao W, Gu Y, Meineck M, Xu H. The combination of chemotherapy and radiotherapy towards more efficient drug delivery. Vol. 9, Chemistry - An Asian Journal. 2014. p. 48–57.
54. Liu R, Bian Y, Liu L, Liu L, Liu X, Ma S. Molecular pathways associated with oxidative stress and their potential applications in radiotherapy (Review). Vol. 49, International Journal of Molecular Medicine. Spandidos Publications; 2022.
55. Wang J song, Wang H juan, Qian H li. Biological effects of radiation on cancer cells. Vol. 5, Military Medical Research. BioMed Central Ltd.; 2018.
56. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh KW. Biological response of cancer cells to radiation treatment. Vol. 1, Frontiers in Molecular Biosciences. Frontiers Media S.A.; 2014.
57. Sun M, Moquet J, Barnard S, Mancey H, Burling D, Baldwin-Cleland R, et al. In vitro study of radiosensitivity in colorectal cancer cell lines associated with Lynch syndrome. Front Public Health. 2024;12.
58. Sorolla MA, Hidalgo I, Sorolla A, Montal R, Pallisé O, Salud A, et al. Microenvironmental reactive oxygen species in colorectal cancer: Involved processes and therapeutic opportunities. Vol. 13, Cancers. MDPI; 2021.
59. Wang Z, Li S, Cao Y, Tian X, Zeng R, Liao DF, et al. Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. Vol. 2016, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Publishing Corporation; 2016.
60. Basak D, Uddin MN, Hancock J. The role of oxidative stress and its counteractive utility in colorectal cancer (CRC). Vol. 12, Cancers. MDPI AG; 2020. p. 1–31.
61. Nakamura H, Takada K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. Vol. 112, Cancer Science. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 3945–52.
62. Merli AM, Vieujean S, Massot C, Blétard N, Quesada Calvo F, Baiwir D, et al. Solute Carrier Family 12 Member 2 as a Proteomic and Histological Biomarker of Dysplasia and Neoplasia in Ulcerative Colitis. J Crohns Colitis. 2021 Feb 1;15(2):287–98.
63. Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. Vol. 466, Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2014. p. 91–105.
64. Delpire E, Koumangoye R. NKCC1 in human diseases: Is the SLC12A2 gene haploinsufficient? Am J Physiol Cell Physiol. 2023 Aug 1;325(2):C385–90.
65. Haas M, Iii BF. THE Na-K-Cl COTRANSPORTER OF SECRETORY EPITHELIA [Internet]. Vol. 22, Annu. Rev. Physiol. 2025. Available from: www.annualreviews.org.
66. Koumangoye R, Bastarache L, Delpire E. NKCC1: Newly Found as a Human Disease-Causing Ion Transporter. Vol. 2, Function. Oxford University Press; 2021.

67. Delpire E, Gagnon KB. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC) physiological function in nonpolarized cells and transporting epithelia. *Compr Physiol*. 2018 Apr 1;8(2):871–901.
68. Demian WL, Persaud A, Jiang C, Coyaud É, Liu S, Kapus A, et al. The Ion Transporter NKCC1 Links Cell Volume to Cell Mass Regulation by Suppressing mTORC1. *Cell Rep*. 2019 May 7;27(6):1886-1896.e6.
69. Yang X, Wang Q, Cao E. Structure of the human cation–chloride cotransporter NKCC1 determined by single-particle electron cryo-microscopy. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
70. Negussie AB, Dell AC, Davis BA, Geibel JP. Colonic Fluid and Electrolyte Transport 2022: An Update. Vol. 11, *Cells*. MDPI; 2022.
71. Löscher W, Kaila K. CNS pharmacology of NKCC1 inhibitors. Vol. 205, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2022.
72. Zhao Y, Roy K, Vidossich P, Cancedda L, De Vivo M, Forbush B, et al. Structural basis for inhibition of the Cation-chloride cotransporter NKCC1 by the diuretic drug bumetanide. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
73. Ma H, Li T, Tao Z, Hai L, Tong L, Yi L, et al. NKCC1 promotes EMT-like process in GBM via RhoA and Rac1 signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2019 Feb 1;234(2):1630–42.
74. Wang JF, Zhao K, Chen YY, Qiu Y, Zhu JH, Li BP, et al. NKCC1 promotes proliferation, invasion and migration in human gastric cancer cells via activation of the MAPK-JNK/EMT signaling pathway. *J Cancer*. 2021 Jan 1;12(1):253–63.
75. Chen DY, Zhang YY, Nie HH, Wang HZ, Qiu PS, Wang F, et al. Comprehensive analyses of solute carrier family members identify SLC12A2 as a novel therapy target for colorectal cancer. *Sci Rep*. 2024 Dec 1;14(1).
76. Lin K, Chowdhury S, Zeineddine MA, Zeineddine FA, Hornstein NJ, Villarreal OE, et al. Identification of Colorectal Cancer Cell Stemness from Single-Cell RNA Sequencing. *Molecular Cancer Research*. 2024 Apr 2;22(4):337–46.
77. Chu X, Tian W, Ning J, Xiao G, Zhou Y, Wang Z, et al. Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy. Vol. 9, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2024.
78. Martin S, Buehler G, Ang KL, Feroze F, Ganji G, Li Y. Cell-Based RNAi Assay Development for HTS [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
79. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*. 2002 Apr 15;16(8):948–58.

80. Chu L, Gu J, Sun L, Qian Q, Qian C, Liu X. Oncolytic adenovirus-mediated shRNA against Apollon inhibits tumor cell growth and enhances antitumor effect of 5-fluorouracil. *Gene Ther.* 2008 Apr;15(7):484–94.
81. Pinto B, Henriques AC, Silva PMA, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. Vol. 12, *Pharmaceutics*. MDPI AG; 2020. p. 1–38.
82. Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW, et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res.* 2014 Jun 15;74(12):3238–47.
83. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2.
84. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer.* 2017 Jul 6;16(1).
85. Gheytauchi E, Naseri M, Karimi-Busheri F, Atyabi F, Mirsharif ES, Bozorgmehr M, et al. Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 2021 Dec 1;21(1).
86. Druzhkova I, Potapov A, Ignatova N, Bugrova M, Shchechkin I, Lukina M, et al. Cell hiding in colorectal cancer: correlation with response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2024 Dec 1;14(1).
87. Luo L, Guan X, Begum G, Ding D, Gayden J, Hasan MN, et al. Blockade of cell volume regulatory protein NKCC1 increases TMZ-induced glioma apoptosis and reduces astrogliosis. *Mol Cancer Ther.* 2020 Jul 1;19(7):1550–61.
88. Algharabil J, Kintner DB, Wang Q, Begum G, Clark PA, Yang S Sen, et al. Inhibition of Na-K + -2Cl⁻ cotransporter isoform 1 accelerates temozolomide-mediated apoptosis in glioblastoma cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2012;30(1):33–48.
89. Garzon-Muvdi T, Schiapparelli P, ap Rhys C, Guerrero-Cazares H, Smith C, Kim DH, et al. Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. *PLoS Biol.* 2012 May;10(5).



Annexes

Annexe 1: Composition du tampon de transfert

Réactifs	Quantité	Référence	Firme
Tris	12,1 g	103156X	VWR Chemicals
Glycine	57,6 g	1.04169.1000	Sigma-Aldrich
Eau déminéralisée	3,2 L	/	/
Méthanol	800 mL	20903.368	VWR Chemicals

(Volume final = 4L)

Annexe 2: Composition du TBS-T

Réactifs	Quantité	Référence	Firme
Tris	12,1 g	103156X	VWR Chemicals
NaCl	40 g	27810.295	VWR Chemicals
Tween 20	10 mL	8.22184.1000	Sigma-Aldrich
Eau déminéralisée	5L	/	/

(Volume final = 5L)

Annexe 3: Anticorps primaires et secondaires utilisés dans le western blot

Anticorps primaire	Référence	Firme	Espèce hôte
NKCC1	83515	Cell signaling	Rabbit
P70	92025	Cell signaling	Rabbit
p-P70	92055	Cell signaling	Rabbit
AKR1B10	HPA020280	Sigma	Rabbit
β-actine	0000120499	Sigma	Mouse

Anticorps secondaire	Référence	Firme
Anti-Mouse	70765	Cell signaling
Anti-Rabbit	70745	Cell signaling

Annexe 4: Gènes utilisés pour la RT-qPCR

Gènes	Amorces Forward	Amorces Reverse	Firme
SQSTM1	TGTGTAGCGTCTGCGAGGGAAA	AGTGTCCGTGTTTCACCTCCG	IDT
CD44	CCAGAAGGAACAGTGGTTTGGC	ACTGTCCTCTGGGCTTGGTGTT	IDT
CCND1	TCTACACCGACAACCTCCATCCG	TCTGGCATTGTTGGAGAGGAAGTG	IDT
HO-1	CCAGGCAGAGAATGCTGAGTTC	AAGACTGGGCTCTCCTTGTTGC	IDT
C-myc	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG	IDT

NRF2	CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG	IDT
P53	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC	IDT
OLFM4 W.REES	ACCTTTCCCGTGGACAGAGT	TGGACATATTCCTCACTTTGGA	IDT
RNA 18s	ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA	GCCTCACTAAACCATCCAATCGG	IDT
SLC12A2	CCTCTACACAAGCCCTGACTTAC	CGTGAGTTTGGAGCACCTGTCA	IDT
Ki67	GAAAGAGTGGCAACCTGCCTTC	GCACCAAGTTTTACTACATCTGCC	IDT
LGR5	CCTGCTTGACTTTGAGGAAGACC	CCAGCCATCAAGCAGGTGTTCA	IDT

Annexe 5: Image représentative des scans des sphéroïdes (A) HT-29 et (B) HCT-116 dans les trois conditions après 72h de traitements au 5-FU montrant les défauts de mesure due à l'IncuCyte. Les concentrations de 5-FU varient de 50 à 1000 μ M. Les flèches représentent les défauts.

