

SOMMAIRE

1. RÉSUMÉ	1
2. MOTS CLÉS.....	2
3. LISTE DES ABREVIATIONS.....	2
4. INTRODUCTION.....	3
4.1 Les chiffres importants du cancer du côlon.....	3
4.2 Les métastases ou comment la cellule décide de « <i>changer de place</i> » ...	3
4.3 La transition épithelio-mésenchymateuse.....	4
4.4. Cellules épithéliales et TEM.....	5
4.5. Signalisation moléculaire et TEM.....	6
4.6. Le processus de formation de métastases.....	7
4.7. A la recherche d'un modèle d'étude plus « physiologique ».	8
5. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	10
5.1. Culture cellulaire.....	10
5.2. Induction de la TEM.....	10
5.3 Immunofluorescence.....	10
5.4 Western Blotting.....	11
5.5 Extraction d'ARN.....	12
5.6. Analyse des données d'expression génique des cellules HT29 traitées...	12
5.7. Analyse des données d'expression génique de cohortes de données publiques.....	14
5.8. Analyses statistiques.....	15

6.	RESULTATS.....	17
6.1	Le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement induit l'individualisation des cellules d'un microtissus.....	17
6.2	L'analyse du profil transcriptomique confirme la transition épithélio - mésenchymateuse des microtissus traités avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement.....	18
6.3	Les sphéroïdes traités avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement se déplacent vers les sous-types moléculaires consensus de type mésenchymateux, CMS4.....	20
6.4	Les voies du métabolisme des acides biliaires et l'homéostasie du cholestérol sont altérées en parallèle du processus de la TEM.....	21
6.5	Les métagènes dérivés <i>in vitro</i> montrent des valeurs pronostiques cohérentes dans un grand jeu de données publiques de CCR.....	24
6.6	La fusion des métagènes <i>Epithelial Mesenchymal Transition and Cholesterol Homeostasis</i> a montré une amélioration de la valeur pronostique à 5 ans.	28
6.7	La fusion des métagènes <i>Epithelial Mesenchymal transition</i> et <i>Cholesterol Homeostasis</i> est un facteur pronostique indépendant pour la RFS.....	30
7	DISCUSSION.....	32
8	CONCLUSION.....	40
9	RÉFÉRENCES.....	41
10	DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES.....	48
10.1	Figures supplémentaires.....	48
10.2	Tableaux supplémentaires.....	51

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Caractéristiques générales de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).
- Figure 2. Phénotype des cellules traitées avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement.
- Figure 3. Le clustering hiérarchique non supervisé révéla trois clusters de gènes.
- Figure 4. Évaluation du traitement sur les sous-types moléculaires consensus CMS.
- Figure 5. Construction de trois robustes métagènes corrélés avec l'induction de la TEM. Analyses supervisées effectuées avec l'algorithme Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).
- Figure 6. Métagènes et transcriptome.
- Figure 7. RFS après corrélations de la base de données public COAD sur l'expression des métagènes.
- Figure 8. Modèle de survie à partir des métagènes *Epithelial Mesenchymal Transition* et *Cholesterol Homeostasis* fusionnées (« *Epithelial Mesenchymal Transition+Cholesterol Homeostasis métagènes model* »).
- Figure 9. Voie de synthèse du mévalonate.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1. Anticorps utilisés dans l'étude.
- Tableau 2. Description de la population COAD globale.
- Tableau 3. Description des 3 groupes de métagènes, (2239) COAD.
- Tableau 4. Analyses univariées et multivariées dans le « jeu de données d'entraînement ».
- Tableau 5. Analyses univariées et multivariées dans le « jeu de données de validation ».

LISTE DES DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

Figures supplémentaires

- Figure supplémentaire 1. Tests de confirmation du StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement en tant qu'inducteur d'EMT sur les cellules adhérentes de la lignée cellulaire du cancer du côlon HT29.
- Figure supplémentaire 2. Observation et quantification, en Immunofluorescence, d'un phénomène connu en littérature (V. Comailss et al. ,2016) comme conséquence de l'induction de la transition épithéliale-mésenchymateuse : l'apparition d'erreurs de cytokinèse avec formation conséquente de cellules bi/polynucléées (ligné cellulaire HT 29 cultivée en 2D).
- Figure supplémentaire 3. Graphiques d'enrichissement de GSEA comparant les profils d'expression génique des sphéroïdes T aux sphéroïdes NT (panel du haut) et des sphéroïdes TR aux sphéroïdes T (panel du bas) pour les 3 listes de gènes *HALLMARK* significatives d'intérêt i.e. '*Epithelial mesenchymal transition*' (A.), '*Bile acide métabolisme*' (B.) et '*Cholesterol homeostasis*' (C.).

Tableaux supplémentaires

- Tableau supplémentaire 1. Description des 11 jeux de données publics de colon inclus.
- Tableau supplémentaire 2. Métagènes et core gènes.

1. RÉSUMÉ

Le cancer du côlon est une tumeur avec une propension métastatique élevée responsable d'un pronostic défavorable. Les métastases, du grec « je me déplace », sont issues des cellules de la tumeur primaire qui subissent un processus de transition épithelio-mésenchymateuse (TEM), dont l'étendue des effets dans les cellules cancéreuses reste à découvrir.

Pour identifier de nouvelles voies activées lors de ce processus et mieux comprendre l'évolution de la maladie, nous avons mis au point un modèle d'étude *in vitro* de carcinome colorectal à partir duquel nous avons provoqué une TEM et son phénomène inverse, la transition mesenchymo-épithéliale (TME). Ceci nous a permis d'observer les voies moléculaires impliquées.

Nous avons ensuite soumis les candidats à l'algorithme GSEA (Broad Institute) et obtenu 3 métagènes régulés au cours du processus de la TEM/TME. Deux d'entre eux, le *Cholesterol Homeostasis* et l'attendu *Epithelial Mesenchymal Transition*, étaient associés à la survie sans rechute à 5 ans dans une banque de données transcriptomiques de plus de 2000 patients.

Ce deux métagènes, fusionnés, nous ont permis d'obtenir un modèle robuste, qui s'est révélé être un facteur pronostic indépendant de la survie sans progression à 5 ans des cancers colorectaux.

Ce modèle apporte de nouvelles pistes dans la compréhension des mécanismes de survenue des métastases en désignant la reprogrammation métabolique tumorale comme un élément clé de la TEM.

2. MOTS CLÉS

Transition épithélio-mésenchymateuse ; Transition mésenchymo -épithéliale ;
carcinome colorectal ; métastases ; signature transcriptomique ; pronostique de survie ;
Homéostasie du cholestérol ; voie du mévalonate ;

3. LISTE DES ABREVIATIONS

ARN: acide ribonucléique

CCR: cancer colorectal

CMS: consensus molecular subtypes

CTC: cellule tumorale circulante

CBNPC : cancer du poumon non à petites cellules

EGF : Epidermal Growth Factor

FGF : Fibroblast Growth Factor

HGF : Facteur de croissance des hépatocytes

MEC : matrice extra cellulaire

NT: Sphéroïdes/cellules non traitée

pCRC : tumeur primaire de cancer colorectal

RT : sphéroïdes traités et après pas traité par 2 jours (Reverse Treatment)

RFS : relapse-free survival ; survie sans rechute

T: sphéroïdes /cellules traitée

TGF β : transforming growth factor beta

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TME : Transition mésenchymato -épithéliale

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

4. INTRODUCTION

4.1. Les chiffres importants du cancer du côlon.

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent en France et dans le monde, après le cancer du sein et celui du poumon. En 2018, le cancer colorectal a représenté la seconde cause de mortalité par cancer avec plus de 17 000 décès, et plus de 43 000 nouveaux cas enregistrés (1 ; 2). La survie à 5 ans des patients diagnostiqués précocement, donc non métastatiques, dépasse les 90%. Des métastases synchrones, c'est-à-dire présentes lors de la découverte du cancer colorectal, sont cependant trouvées dans 20 à 25% des cas. Environ 15% des cancers colorectaux engendrent des métastases hépatiques métachrones dans les 5 ans qui suivent le traitement de la tumeur colorectale. Le risque de survenue de métastases, qui au total avoisine les 40%, est corrélé au stade du cancer primitif. La survie de ces patients à 5 ans chute alors drastiquement aux environs de 15% (3).

La dissémination métastatique est donc la principale cause de mortalité des cancers colorectaux.

4.2. Les métastases ou comment la cellule décide de « *changer de place* ».

Les métastases proviennent de cellules issues de la tumeur primaire qui ont acquis la capacité de se détacher et de migrer à distance. Ces cellules ont un phénotype invasif et résistant en conditions hostiles (comme dans la circulation par exemple), mais aussi une certaine capacité d'adaptation, ou plasticité cellulaire, qui leur permet de changer à nouveau leurs caractéristiques afin de se nicher, puis de proliférer dans un nouvel environnement.

La première étape qui mène aux métastases est l'acquisition d'un caractère invasif local. Ceci implique des changements importants au niveau des cellules tumorales primaires. Les cellules normales sont organisées en couches de cellules épithéliales incompatibles avec la motilité et le caractère invasif que nous pouvons observer dans les carcinomes malins. Pour acquérir la motilité, les cellules doivent perdre certaines de leurs caractéristiques épithéliales et changer leurs caractéristiques morphologiques et leur schéma d'expression génique pour acquérir les programmes de transcription caractéristiques des cellules mésenchymateuses. On parle alors de *Transition épithélio-mésenchymateuse* (TEM) (4).

4.3. La transition épithélio-mésenchymateuse.

Les premières descriptions *in vitro* de la TEM remontent au début des années 1980, à partir des observations faites par Elizabeth Hay (5). Les premières découvertes la définissent comme fondamentale lors des premiers stades du développement embryonnaire (6 ;7). Des études ultérieures ont montré que la TEM est non seulement importante dans l'embryogenèse et l'organogenèse, mais joue également un rôle clé dans certains événements pathologiques tels que le remodelage des tissus post-lésion (8), dans la cancérogenèse et les métastases (9) et la fibroses (10 ; 11). Le TEM doit être perçue comme un processus finement régulé et dynamique. Ce processus est réversible : le programme inverse, appelé *Transition mésenchymato-épithéliale* (TME), se produit à la fois lors de l'embryogenèse et au cours de divers processus pathologiques (12 ; 13 ;14).

La réversibilité de ce processus souligne l'énorme plasticité de certaines cellules embryonnaires et adultes qui participent aux processus de pathogenèse de la maladie.

4.4. Cellules épithéliales et TEM.

Les cellules épithéliales, organisées en monocouche, sont densément emballées et étroitement liées par des complexes jonctionnels de molécules d'adhésion cellulaire impliquant des membres de la famille des cadhérines, telles que l'E-cadhérine, qui ont une localisation préférentielle sur les surfaces latérales des cellules, et les filaments intermédiaires de cytokératine. Les principales molécules d'adhésion à la matrice extra cellulaire (la MEC) sont situées au pôle basal, et appartiennent à la famille des intégrines. Ces cellules sont capables de proliférer, mais elles se développent en groupes tout en restant en contact les unes avec les autres par les jonctions intercellulaires.

Les cellules mésenchymateuses, en revanche, ne forment pas de couche organisée ; les contacts entre elles sont typiquement et exclusivement focaux et sont établis par de nombreuses expansions cytoplasmiques à l'aide de la N-cadhérine.

Les cellules mésenchymateuses ne reposent pas sur la membrane basale mais sont immergées dans une matrice acellulaire complexe et ne présentant pas de polarisation dans la distribution des marqueurs membranaires ou du cytosquelette.

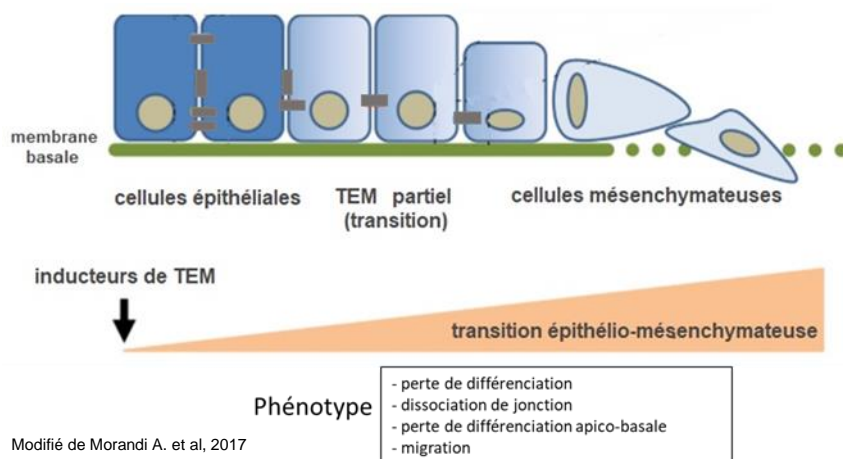


Figure 1. Caractéristiques générales de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

La transition des cellules épithéliales vers un phénotype mésenchymateux, induite par plusieurs facteurs environnementaux ou solubles, est caractérisée par la perte de contact cellule-cellule et de polarité cellulaire. Les cellules devenues mésenchymateuses acquièrent des compétences migratoires et invasives.

Elles ont également des filaments intermédiaires de vimentine et montrent une forme irrégulière, fusionnée ou étoilée, et des mouvements amiboïdes lors de leur migration.

En culture, elles prennent une forme fibroblastoïde et présentent des fibres de stress (15) (Figure1).

4.5. Signalisation moléculaire et TEM.

L'EMT est induite par des signaux extracellulaires provenant des composants de la matrice extracellulaire, le collagène et l'acide hyaluronique, mais également par des facteurs de croissance solubles comme le TGF- β (Transforming Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) ou de l'EGF (Epidermal Growth Factor). Ce sont des facteurs qui lient les récepteurs membranaires avec un domaine intracellulaire et possèdent une activité tyrosine kinase : après la liaison avec le ligand, ce domaine est phosphorylé et active des molécules effectrices intracellulaires qui à leur tour activent le facteur de transcription SNAIL. Celui-ci inhibe alors l'expression de la E-cadhérine en se liant au promoteur du gène et en bloquant son expression (16).

L'activation de SNAIL se traduit donc par la perte rapide des marqueurs épithéliaux et par l'acquisition de marqueurs typiques des cellules mésenchymateuses. La superfamille des facteurs de transcription SNAIL, ZEB et TWIST s'activent pendant le processus de TEM (17 ;18). WNT joue également un rôle important dans l'induction de la TEM en conduisant à une expression réduite de l'E-cadhérine et en favorisant la transition des cellules épithéliales vers le phénotype mésenchymateux (19). SNAIL est également spécifiquement exprimé dans le cancer invasif du côlon, dans les cellules qui ont traversé la membrane basale, ont perdu l'expression de la E-cadhérine et présentent une positivité nucléaire pour la β -caténine (20).

Le TGF β a largement été utilisé pendant les dernières années pour étudier le processus de transition épithélio-mésenchymateuse. Une étude a montré que certaines lignées cellulaires cancéreuses possèdent une continuité de prolifération cellulaire en TEM et ce

fait provoque une certaine instabilité génomique avec formation d'anomalies mitotiques et apparition de cellules poli-nucléées (21).

4.6. Le processus de formation de métastases.

Les étapes liées au processus de migration des cellules sont l'invasion, le transport dans la circulation sanguine, l'extravasation, la formation de micrométastases, et enfin la colonisation avec la croissance de petites colonies en métastases macroscopiques (22 ; 23).

Toutes les cellules qui entrent dans la circulation sanguine ne survivront pas, mais l'état mésenchymateux les aide à résister aux forces des cisaillements et à la perte de contact avec les autres cellules et à la matrice extra cellulaire, en évitant l'anoikis. Si les cellules cancéreuses ont survécu et se sont extravasé, elles s'installent alors dans des sites éloignés, où elles peuvent rester dormantes ou, si elles trouvent les conditions idéales pour se développer, former des colonies secondaires ou métastases. Des études montrent que ces colonies ne conservent pas longtemps le phénotype mésenchymateux normalement attribué aux cellules invasives, mais reviennent à un phénotype plus épithélial (24 ;25). L'induction de la TEM est un mécanisme d'importance centrale dans la progression métastatique des carcinomes et la phase de MET subséquente est cruciale pour induire le processus de colonisation. Cependant, de nombreux aspects de ce processus n'ont toujours pas été entièrement clarifiés.

Des articles contradictoires sont apparus ces dernières années sur la réelle implication de la TEM dans la formation de métastases (26 ; 27). Si pendant longtemps la TEM était considérée comme fondamentale pour la formation des métastases (16 ; 28), des études ont successivement émergé montrant que certaines cellules formant des métastases

conservaient le phénotype épithélial (29), suggérant plus de précaution sur l'interprétation du rôle de la TEM dans le cancer.

L'idée émergente est qu'une TEM partielle, possédant un phénotype épithélio-mésenchymateux intermédiaire, peut représenter la situation idéale pour la formation de métastases (30 ; 31).

De plus, différentes études démontrent aussi que la TEM induit une reprogrammation évidente touchant les voies métaboliques à différents niveaux (32 ; 33 ; 34) : notamment le métabolisme du glucose (35; 36), qui est aussi le plus connu et le plus étudié, mais aussi les métabolismes des acides aminés (37) et des lipides (38 ; 39 ; 40). Le but présumé est un remodelage métabolique total des cellules qui favorise la résistance à un environnement hostile avec la capacité de formation de métastases.

4.7. A la recherche d'un modèle d'étude plus « physiologique ».

La majorité des études se sont focalisées sur les gènes *princeps* de TEM et à leur conséquences évidentes (comme la perte des molécules d'adhésion et de polarité, la réorganisation du cytosquelette...). Or des données récentes suggèrent que ces modifications ne sont que la « partie émergée de l'iceberg ». En effet, la TEM régule des voies extrêmement diverses et complexes, et nous commençons tout juste à comprendre la véritable implication de l'engagement cellulaire dans ce processus.

Parce qu'il est difficile de discerner les gènes spécifiquement activés lors du processus de la TEM dans des échantillons aussi complexes que des tumeurs humaines, les approches *in vitro*, ont été les plus simples à réaliser pour mettre en évidence des signatures pro-TEM. Cependant, la majorité des études conduites à ce jour l'ont été en utilisant une induction de la TEM « peu physiologique » (en utilisant un seul facteur pro-TEM, le plus souvent le TGF β , et dans des modèles peu pertinents comme les cultures

cellulaires en 2 dimensions) et en absence de validation à grande échelle sur des échantillons de patients. Tout ceci a contribué à limiter l'interprétation de la TEM aux constituants de la « pointe de l'iceberg », dont les cibles sont restées « inatteignables » du fait de leur implication dans des processus aussi généraux qu'importants pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Nous avons souhaité développer une approche *in vitro* nous permettant de surmonter chacune des limites mentionnées précédemment en induisant la TEM à partir d'un cocktail complet, composé d'un mélange de facteurs connu pour induire la TEM, dont le TGF β : le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement. Ce supplément a été développé par Weinberg RA et son équipe (41) qui en ont montré les capacités spécifiques d'induction de la TEM. De plus, nous avons utilisé des micro-tissus cellulaires de consistance plus physiologique que les cultures en 2D, et, après une sélection rigoureuse des candidats affecté par la TEM, nous avons validé leur pertinence biologique *in silico*. Notre but était d'identifier, de façon fine, certains processus biologiques induits par la TEM, dans la perspective de mettre en évidence des gènes candidats plus « atteignables », car plus en aval et, peut-être, plus spécifiques de la cellule cancéreuse. Ces candidats pourraient à la fois permettre de mieux catégoriser les patients, jouer un rôle de marqueur pronostic et, pourquoi pas, servir de cible thérapeutique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

5.1. Culture cellulaire.

Les cellules HT29 ont été obtenues du ATCC® Human Cell Lines.

Les cellules HT29 ont été cultivées en utilisant du Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) avec 10% de Fetal Calf Serum (FCS)(Eurobio) inactivé par la chaleur, dans un incubateur humidifié avec une atmosphère de 5% de CO₂ à 37 ° C. Pour la culture en monocouche, les cellules ont étéensemencées en Falcon® 6-well Multiwell. Pour la culture des sphéroïdes, les cellules ont étéensemencées dans des CellCarrier Spheroid ULA 96 puits Microplates™ (PerkinElmer) de manière de permettre la formation des sphéroïdes.

5.2. Induction de la TEM.

Les sphéroïdes ont été traitées avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement (R&D) à une concentration 1X après 2 jours de croissance avec du milieu Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) avec 10% de Fetal Calf Serum (FCS)(Eurobio). Après 3 jours de traitement, le milieu enrichi de StemXVivo® EMT Inducing Media a été remplacé par du nouveau, pendant 2 jours supplémentaires. Après 5 jours de traitement, pour les sphéroïdes subissant la TME, le milieu a été remplacé à nouveau avec du milieu Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) avec 10% de Fetal Calf Serum (FCS)(Eurobio). L'expérience a été effectuée en triplicata.

5.3. Immunofluorescence.

Les cellules ont été plaquées sur des lamelles avant le traitement.

Les cellules ont été fixées avec 4% de formaldéhyde pendant 5 minutes, perméabilisées avec du PBS, 0,2% de Triton-X100 pendant 10 minutes et bloquées dans du PBS, 3% Bovine Serum albumin (BSA) pendant 15 minutes.

Ensuite, les cellules ont été incubées avec l' anticorp primaire dilués dans du PBS, 3% de BSA (**Tableau 1**) pendant une nuit à 4 ° C. Après lavage avec du PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS, 3% de BSA (**Tableau 1**) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été lavées abondamment et montées en utilisant le réactif *ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen by Thermofisher Scientific)*.

Les photos ont été prises en utilisant le microscope confocale LSM-510 (Carl Zeiss) avec un x63 NA1.4 Plan Apochromat. Les coupes optiques Z-series ont été obtenues par pas de 0,2 µm puis projetées avec le logiciel LSM (Zeiss) en tant que projections maximales. Les images ont été traitées à l'aide de Photoshop 8.0.1. Les résultats ont été analysés à l'aide de GraphPad Prism 8.4.1.

5.4. Western Blotting.

Les cellules ont été grattées et lysées dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 1% désoxycholate de sodium) supplémenté avec l'inhibiteur de protéase HALT 1X (Thermo Fisher Scientific), incubé pendant 10 minutes sur glace, et centrifugé à 13 800 g. Les surnageants ont été recueillis et quantifiés avec le kit Bradford Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Le tampon de charge a été ajouté aux échantillons à une concentration finale 1X. Les échantillons ont été bouillis et chargés dans des gels d'acrylamide / bisacrylamide et transférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été bloquées en utilisant du PBS, 0.1% tween, 5% lait pendant au moins 30 minutes et incubées avec des anticorps primaires dilués dans du PSB, 5% de sérum de cheval normal pendant une nuit à 4 ° C (**Tableau 1**). Le jour suivant, les

membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires dilués dans du PSB, 5% de sérum de cheval normal pendant 1 h à température ambiante (**Tableau 1**). Les membranes ont été visualisés avec les anticorps secondaires couplé HRP et ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). Les blots ont été révélées en utilisant le système d'imagerie ChemiDoc MP (BioRad).

Anticorps	Dilution IF	Dilution WB	Fournisseur
anti-Fibronectine mouton		1: 1000	R&D Systems
anti-E-cadhérine lapin		1: 1000	SIGMA
anti-ZEB1 Lapin		1: 1000	Abcam
anti-Pan-cytokératine Lapin	1:500		Abcam
anti-mouton HRP âne		1: 10000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
anti-lapin HRP âne		1: 10000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
anti-lapin Dylight 488 âne	1: 1000		Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

Tableau 1. Anticorps utilisés dans l'étude

5.5. Extraction d'ARN.

Les échantillons ont été extraits en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen) et en suivant les instructions du fabricant. La qualité a été testée à l'aide d'un Agilent Bioanalyzer.

5.6. Analyse des données d'expression génique des cellules HT29 traitées.

Des puces à ADN ont été utilisées pour définir et comparer les profils transcriptomes des sphéroïdes HT29 traités 5 jours avec le *StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement* (R&D) (sphéroïde T) (N = 3), leur contrôle respectif non traité à 5 jours (sphéroïde NT) (N = 3) et des sphéroïdes HT29 traités 5 jours avec *StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement* (R&D) suivi de 2 jours sans traitement (sphéroïde TR) (N = 3). L'ARN total des 9 sphéroïdes HT29 a été extrait à l'aide du mini kit RNeasy (*Qiagen*) et la qualité a été testée par électrophorèse à l'aide d'un bioanalyseur *Agilent*. A partir de l'ARN total, le marquage et l'hybridation des puces à ADN a été fait conformément aux

recommandations du fabricant (*Affymetrix, Thermo Fisher*) à partir de 100 ng d'ARN pour chaque échantillon en utilisant les puces à ADN *Affymetrix GeneChip HuGene 2,0 ST*. Les données d'expression ont été traitées par *Robust Multichip Average* (RMA) (Irizarry et al., Biostatistics 2003) dans le logiciel R à l'aide du sous-programme *bioconductor* et des paquets associés.

Avant analyse, les données log2-transformées ont été filtrées pour en exclure les gènes faiblement exprimés, définis comme des gènes ayant un niveau d'expression médian à travers tous les échantillons inférieurs au premier quartile de la distribution de l'ensemble des valeurs d'expression. Le filtrage des données a abouti à 17421 gènes annotés.

Une analyse non supervisée a été réalisée par classification hiérarchique avec le programme *Cluster* (Eisen et al, 1998) en utilisant la corrélation de Pearson comme distance et le regroupement par moyenne des liaisons comme paramètres. Le résultat a été visualisé à l'aide du programme *TreeView* (Eisen et al, 1998). La robustesse des clusters a été évaluée avec le package R *pvclust* (Suzuki et al., Bioinformatics 2006) avec des paramètres de classification identiques à la classification hiérarchique et en utilisant 100 itérations de re-échantillonnage aléatoire.

Des analyses supervisées pour identifier les voies biologiques impactées par le traitement *StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement* (R&D) dans les sphéroïdes HT29 ont été effectuées avec l'algorithme *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>) comparant les sphéroïdes T aux sphéroïdes NT, et les sphéroïdes RT aux sphéroïdes T. Les *GSEA* ont été réalisées à l'aide de la collection de liste de gènes *HALLMARK* de la base de données *MSigDB* v7.0 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) pour représenter des états ou processus biologiques bien définis à travers 50 signatures géniques. Comme paramètres pour la *GSEA*, nous avons utilisé la métrique de différence de classe pour ordonner les gènes filtrés, la statistique d'enrichissement pondérée pour calculer le score d'enrichissement (ES) de chaque

ensemble de gènes testé et 1000 permutations pour évaluer la signification. Les signatures *HALLMARK* significatives ont été sélectionnées pour avoir une valeur de probabilité corrigée du taux de fausse découverte (FDR) $<0,01$. Pour chacune des signatures *HALLMARK* significatives à travers, des métagènes ont été calculés en utilisant la moyenne d'expression des gènes essentiels obtenus par l'analyse *GSEA*. Le score naturel de 0 a été utilisé comme seuil pour définir un échantillon comme «élevé» (score positif) ou «faible» (score négatif) pour chaque métagène.

5.7. Analyse des données d'expression génique de cohortes de données publiques.

Pour évaluer les signatures d'expression génique obtenues par la *GSEA*, nous avons rassemblé des données clinico-pathologiques et d'expression génique de tissus à partir d'échantillons d'adénocarcinome colorectal primaire provenant de 11 cohortes de données publiques. Les ensembles publics et les données brutes ont été collectés à partir des bases de données *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) / *Genbank* GEO, *ArrayExpress* et *TCGA* (**Tableau supplémentaire 1**). Les échantillons de ces cohortes étaient profilés en utilisant des puces à ADN pangénome (*Affymetrix*) ou par séquençage des ARN (RNAseq, *Illumina*). Dans la présente étude, l'ensemble de données publiques analysé contenait un total de 2401 échantillons, dont 2239 échantillons de pCRC.

L'analyse des données a nécessité une étape de traitement pré-analytique. Nous avons d'abord normalisé les données d'expression de chaque cohorte séparément, en utilisant la méthode *Robust Multichip Average* (RMA) avec l'algorithme quantile non paramétrique pour les données *Affymetrix* brutes. La normalisation a été effectuée dans R à l'aide de *bioconductor* et des paquets associés. Nous avons ensuite mappé les sondes

d'hybridation à travers les différentes puces à ADN représentées comme précédemment décrit (Bertucci F. Cancer Lett. 2014). Lorsque plusieurs sondes étaient mappées sur le même identifiant de gène (GeneID), nous avons conservé celle présentant la variance la plus élevée au sein de chacune des cohortes de données. Nous avons log2-transformé les données RNAseq disponibles du TCGA qui étaient préalablement normalisées. La classification *Consensus Molecular Subtype* (CMS) (Guinney, j Nat med 2015) (42) était basée sur l'outil *CMScaller* conçu par Eide et al. (Rapports scientifiques 2017). Les métagènes des signatures HALLMARK issues de l'analyse sur les sphéroïdes HT29 ont été calculés au sein de chacune des cohortes de données. Le score naturel de 0 a été utilisé comme seuil pour définir un échantillon comme «élevé» (score positif) ou «faible» (score négatif) pour chaque métagène.

5.8. Analyses statistiques.

Les corrélations entre les classes basées sur l'expression des métagènes (faible contre élevé) et les facteurs clinicopathologiques ont été calculées avec le test t de Student pour les variables continues et le test exact de Fisher pour les variables catégorielles. Pour les cohortes de données publiques, le critère de survie était défini comme la survie sans rechute (RFS) calculée à partir de la date du diagnostic jusqu'à la date de la rechute. Le suivi a été mesuré de la date du diagnostic à la date des dernières nouvelles pour les patients sans événement. Des 2239 pCRC, 1837 étaient disponibles pour l'analyse de survie. La survie a été calculée en utilisant la méthode de Kaplan-Meier où les courbes étaient comparées avec le test du log-rank. Des analyses univariées et multivariées ont été effectuées en utilisant la régression de Cox avec le test de Wald pour évaluer la signification. L'analyse multivariée incluait toutes les variables avec une valeur de probabilité inférieure à 5% dans l'analyse univariée. Tous les tests statistiques étaient bilatéraux avec un niveau de signification de 5%. L'analyse statistique a été effectuée à

l'aide du paquet *survival* (version 2.30) dans le logiciel R (version 3.5.2). Le document a été rédigé conformément aux recommandations des rapports concernant les critères des études pronostiques des marqueurs tumoraux (REMARK) (McShane et al., 2005).

6. RÉSULTATS

6.1. Le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement induit

l'individualisation des cellules d'un microtissu.

Le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement a été utilisé comme un puissant inducteur de la TEM dans diverses lignées cellulaires cancéreuses adhérentes cultivées sur des flasques (2 dimensions, 2D). Nous avons confirmé ces données sur les cellules HT29 cultivées dans ces conditions (**Figures supplémentaires 1 et 2**). Étant donné que les cultures cellulaires 2D offrent une cinétique de croissance et une adhésion cellulaire non naturelles, *i.e.* sans la possibilité d'un gradient de diffusion ni d'organisation cellulaire, nous avons émis l'hypothèse que les conditions de culture 2D n'étaient pas appropriées pour étudier de façon physiologique les effets de la TEM. La faible pertinence biologique des modèles de culture en 2D pourrait en effet biaiser et / ou masquer certaines voies biologiques pertinentes. Nous avons donc examiné l'impact du StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement sur la lignée cellulaire HT29 cultivée en microtissu dans des conditions d'adhérence ultra-faibles permettant aux cellules de croître en formant un microtissu.

Les HT29 ensemencées forment un sphéroïde compact après 48 heures de culture (**Figure 2, côté gauche**). En l'absence de traitement spécifique (sphéroïdes NT), ce microtissu continue sa croissance comme un sphéroïde dense pendant les 7 à 10 jours suivants (**Figure 2, partie supérieure**). Lorsque le sphéroïde, âgé de 48 heures, est traité avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement (sphéroïdes T), il devient plus lâche, dès les premières 24 heures, avec un certain nombre de cellules viables et rondes visibles à la périphérie du noyau du sphéroïde. Le nombre de ces cellules augmente avec le temps (**Figure 2, au milieu-bas**). Une fois que le StemXVivo® EMT Inducing Media

Supplement est retiré de la culture (sphéroïdes TR), nous avons observé le phénomène inverse : les cellules détachées réintègrent progressivement le noyau du microtissu pour former un sphéroïde plus homogène et compact (**Figure 2, côté droite- bas**).

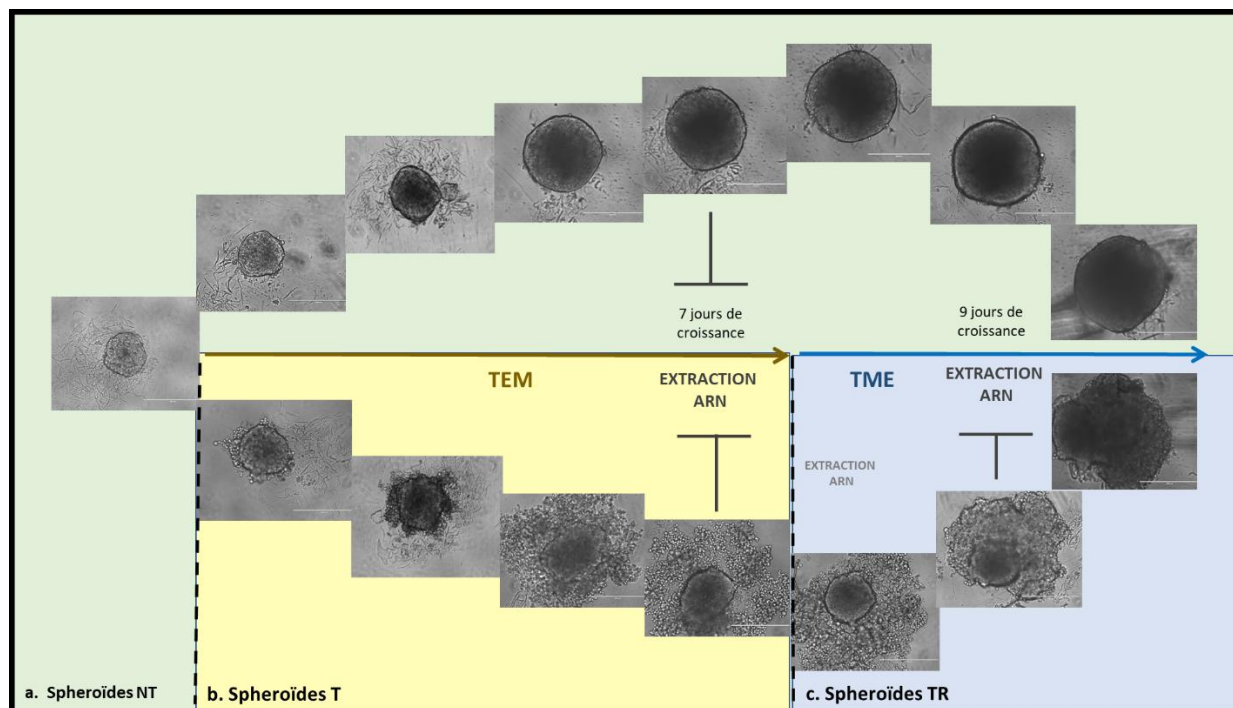


Figure 2. Phénotype des cellules traitées avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement.

a, côté gauche (vert) : sphéroïde compact après 48 heures ; **a, partie supérieure (vert) :** sphéroïde NT, continue la croissance comme une sphéroïde dense ; **b (jaune) :** sphéroïdes T, il devient plus lâche avec des cellules en périphérie du noyau du microtissu ; **c (bleu clair) :** sphéroïdes TR, une fois éliminé le traitement les cellules détachées réintègrent progressivement le noyau du microtissu pour former une sphéroïde.

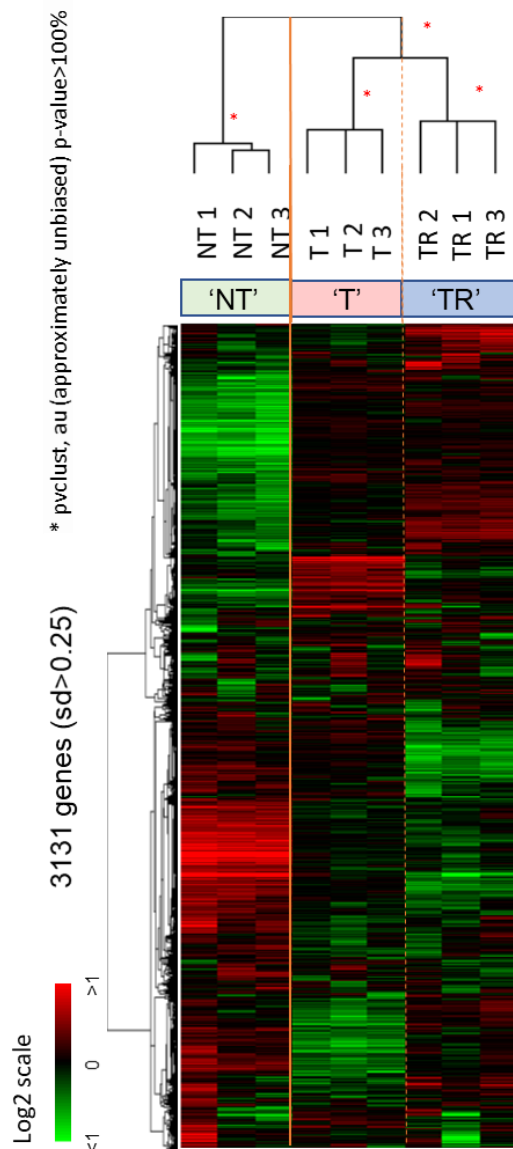
Cette première expérience montre que le supplément StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement induit un relâchement des sphéroïdes qui pourrait être assimilé à un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse en considération du fait que les cellules perdent leur capacité d'adhésion.

6.2. L'analyse du profil transcriptomique confirme la transition épithélio-mésenchymateuse des microtissus traités avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement.

Pour identifier les voies biologiques activées par le traitement StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement sur les sphéroïdes, nous avons effectué une analyse pan-

transcriptomique (Affymetrix™ GeneChip Human Gene 2.0 ST Assay). L'analyse a été effectuée à J7 (NT et T) puis à J9 (RT), lorsque les changements phénotypiques étaient visibles dans la majorité des cellules pour chacune des deux conditions.

Le clustering hiérarchique non supervisé a révélé trois clusters de gènes significativement



distincts et cohérents (la robustesse a été définie par le package pvclust, avec une p value non biaisée approximative >100%) correspondant au triplicata de chacune des conditions de traitement spécifique (NT, T ou TR) (**Figure 3**).

Il est intéressant de noter que les conditions T et TR étaient « plus proches » l'une avec l'autre qu'avec la condition NT. Ceci est parfaitement en accord avec le phénotype observé (**Figure 2**). Le profil transcriptomique des 3 conditions sera donc un bon indicateur des voies activées lors de l'utilisation du StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement.

Figure 3. Le clustering hiérarchique non supervisé révélé trois clusters de gènes.

'NT': sphéroïdes non traitée ; 'T': sphéroïdes traitée ; 'TR' : sphéroïdes traitée par 5 jours et poussée, après, par 2 jours sans traitement

6.3. Les sphéroïdes traités avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement se déplacent vers les sous-types moléculaires consensus de type mésenchymateux, CMS4.

Pour montrer que notre modèle était physiologiquement pertinent, nous avons appliqué la classification moléculaire consensus (CMS) établie par Guinney J et al en 2015, à partir de tumeurs humaines (42). Elle distingue 4 sous-types de CRC, associés à des pronostics différents, en fonction des profils biologiques proéminents dans la tumeur: CMS1 instabilité des microsatellites / immunitaire (hyper-muté, avec instabilité des microsatellites et forte activation immunitaire); CMS2 canonique (épithéliale, avec une activation marquée de la signalisation WNT et MYC); CMS3 métabolique (épithéliale, avec dérégulation métabolique évident) ; CMS4 mésenchymateux (activation proéminente du TGF β , invasion stromale et angiogenèse). En utilisant chaque classe CMS comme métagène, nous avons établi un score d'enrichissement pour le métagène d'intérêt dans chacune de nos 3 conditions (NT, T et TR).

Le score prévalent pour les sphéroïdes NT correspondait au métagène CMS3 (moyenne score CMS3 = 0.332). Lorsque les sphéroïdes ont été traités avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement, une diminution significative du score CMS3 ($p = 1,22E-02$) et une augmentation significative du score CMS4 ($p = 9,58E-03$) ont été observées. Le CMS4 est associé à un phénotype mésenchymateux, concordant avec le phénotype observé. Après l'élimination du StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement (sphéroïdes TR), le score pour CMS4 diminue de manière significative, tandis que le score pour la classe CMS2 a été significativement amélioré par rapport au tissu NT ($p =$

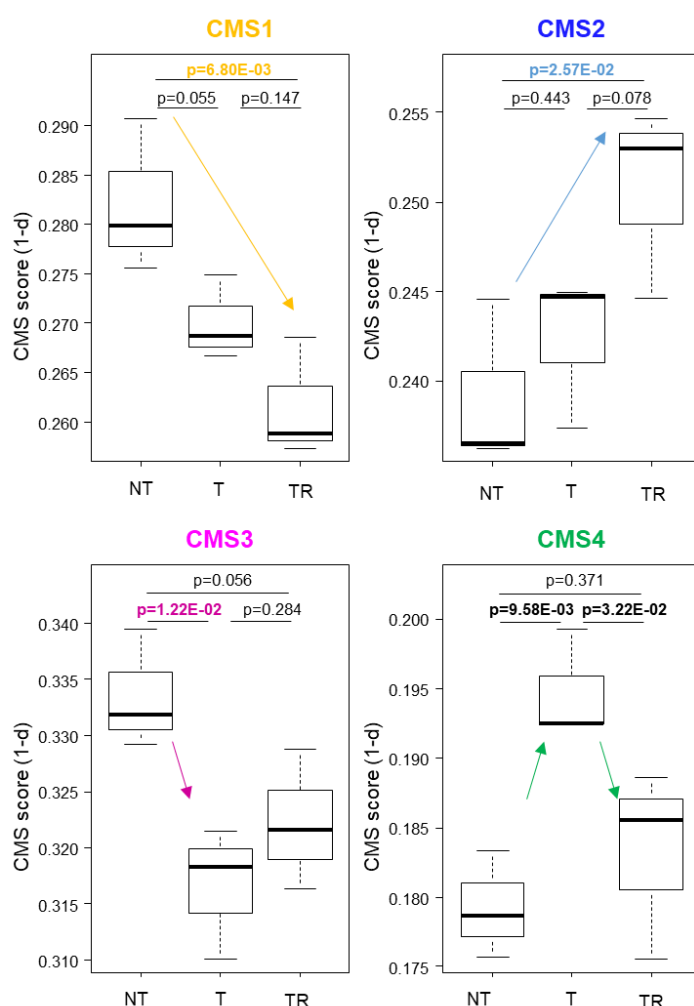


Figure 4. Évaluation du traitement sur les sous-types moléculaires consensus CMS.

Les sphéroïdes traités avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement activent le passage vers la classe mésenchymateuse CMS4. CMS1 : instabilité des microsatellites / immunitaire) ; CMS2 canonique, épithéliale ; CMS3 métabolique, épithéliale ; CMS4 mésenchymateux.

2,57E-02). Cela montre qu'un programme pro-épithélial (classe CMS2) a été spécifiquement réactivé une fois que l'inducteur de la TEM a été retiré du milieu de culture (**Figure 4**).

Dans l'ensemble, nous avons montré que les cellules HT29 cultivées en microtissus et exposées à un inducteur de la TEM activent un programme transcriptomique physiologique vers la classe mésenchymateuse CMS4 et qu'il s'agit d'un processus réversible.

6.4. Les voies du métabolisme des acides biliaires et l'homéostasie du cholestérol sont altérées en parallèle du processus de la TEM.

Souhaitant trouver de nouvelles voies biologiques réversibles associées à l'induction de la TEM sur les microtissus, nous avons soumis nos données à l'algorithme GSEA (Broad Institute, Molecular Signature Database, MSigDB v7.0). Nous avons effectué une analyse supervisée pour dépister les différentes voies enrichies à partir de set de gènes

caractéristiques de 50 voies (GSEA) dans les conditions T contre NT (induction de la TEM) ou TR contre T (induction de la TME).

Seize sets de gènes ont été régulés de manière différentielle dans au moins l'une des conditions suivantes : sphéroïdes T par rapport aux sphéroïdes NT ou sphéroïdes TR par rapport aux sphéroïdes T (tous les sets de gènes avec une q-value<1%). Trois de ces

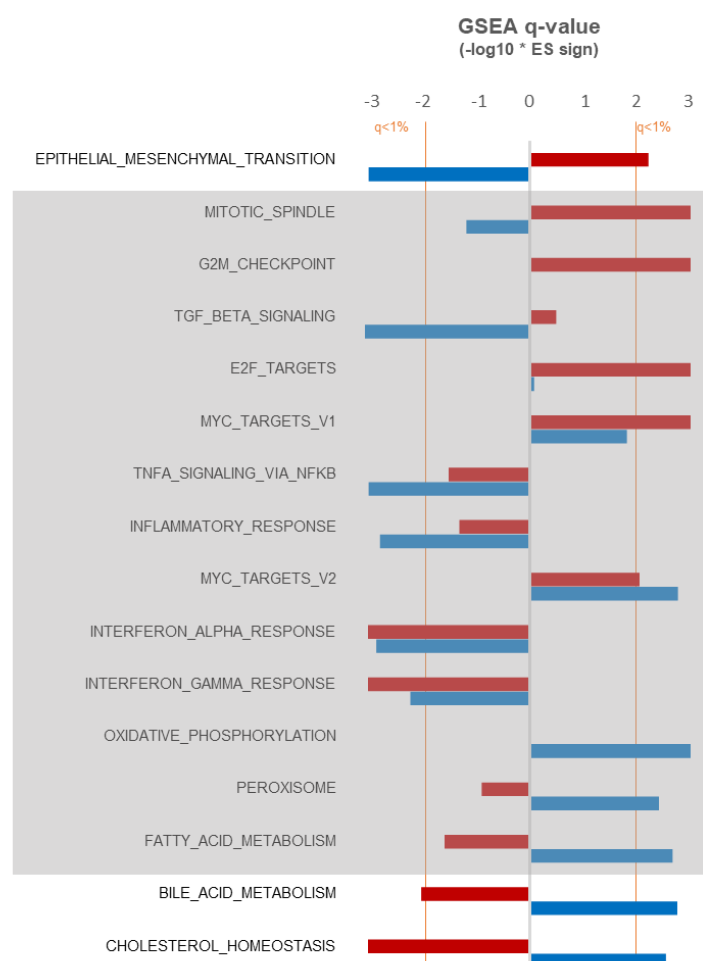


Figure 5. Construction de trois robustes métagenes corrélés avec l'induction de la TEM. Analyses supervisées effectuées avec l'algorithme Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). 16 gènes-set ont été régulés de manière différentielle dans au moins une condition : T vs NT ou TR vs T et suivantes. 3 de ces seize gènes-set sont inversement régulés dans les deux conditions T vs NT et TR vs T : *Epithelial Mesenchymal Transition*; *Bile Acid Metabolism*; *Cholesterol Homeostasis*.

seize gène-set étaient à la fois significativement et inversement régulés dans les deux conditions (c'est-à-dire sur-exprimé dans les sphéroïdes T par rapport aux sphéroïdes NT et sous-exprimé dans les sphéroïdes TR par rapport aux sphéroïdes T ou *vice-versa*) (**Figure 5**).

L'*Epithelial Mesenchymal Transition* gènes-set était l'un de ces trois gènes-sets. Cela confirme la robustesse de la procédure.

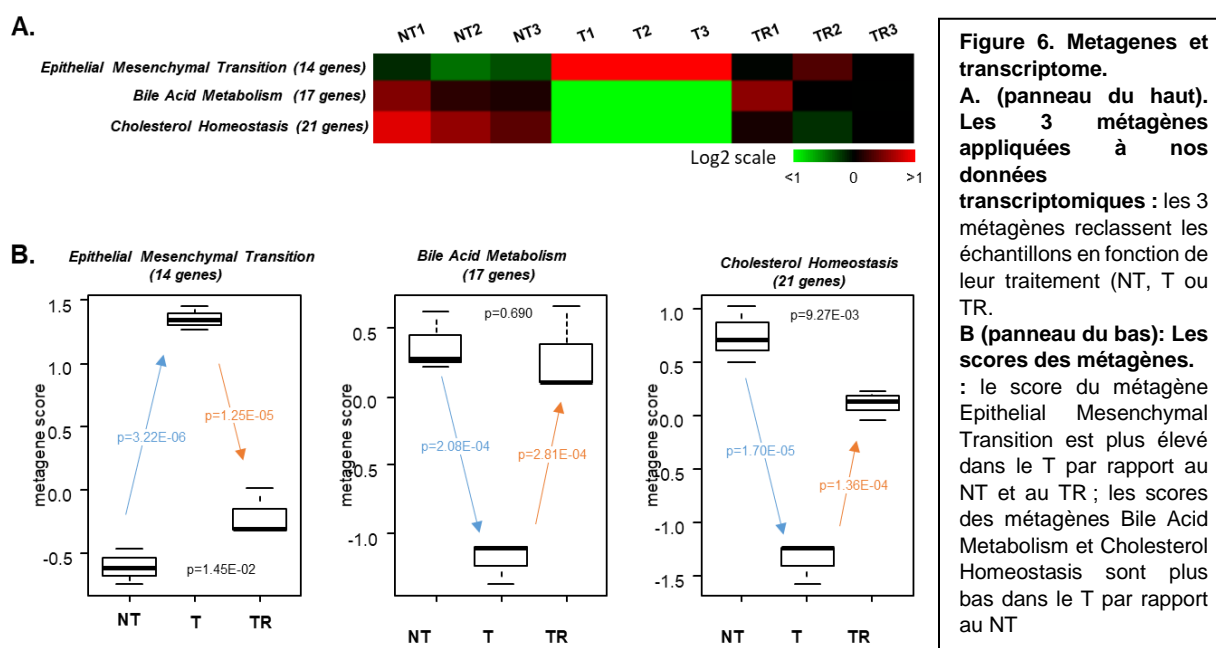
Ce set de gènes était composé de 22 gènes sur-exprimé dans les sphéroïdes T par rapport aux NT (q-value = 5,61E-03) et de 38 gènes

sous-exprimés dans le TR par rapport aux sphéroïdes T (q-value <1,00 E-03) (**Tableau supplémentaire 2 et Figure supplémentaire 3**). Les deux autres sets de gènes étaient le *Bile Acid Metabolism* et le *Cholesterol Homeostasis*. Le set de gènes *Bile Acid Metabolism* était composé de 33 gènes sous-exprimés dans les sphéroïdes T par rapport

aux NT (q-value= 9,16E-03) et de 33 gènes sur-exprimés dans les sphéroïdes TR par rapport aux T (q-value=1,62E-03). Le set de gènes *Cholesterol Homeostasis* était composé de 31 gènes sous-régulés dans les sphéroïdes T par rapport aux NT (q-value<1,00E-03) et 28 gènes sur-régulés dans les sphéroïdes TR par rapport aux T = 2,64E-03) (**Tableau supplémentaire 2 et Figure supplémentaire 3**).

Pour chacun des 3 sets de gènes, nous avons ensuite sélectionné les gènes qui étaient régulés de manière significative et opposée dans les deux conditions (les sphéroïdes T par rapport aux sphéroïdes NT et les sphéroïdes TR par rapport aux sphéroïdes T) (**Tableau supplémentaire 2 et Figure supplémentaire 3**). Notre objectif était de restreindre l'analyse aux gènes dont l'expression était constamment affectée par le traitement et de les utiliser pour construire un métagène correspondant à chacune des 3 voies mises en évidence. Nous avons ainsi identifié 14 gènes pour le set de gènes *Epithelial Mesenchymal Transition*, 17 gènes pour le set de gènes *Bile Acid Metabolism* et 21 gènes pour le set de gènes *Cholesterol Homeostasis* (**Tableau supplémentaire 2**). Appliqués à nos données transcriptomiques, les 3 métagènes étaient suffisamment robustes pour reclasser les échantillons en fonction de leur traitement (NT, T ou TR) (**Figure 6, A**). Les scores d'enrichissement pour chaque métagène étaient cohérents avec l'enrichissement initial de GSEA: le score du métagène *Epithelial Mesenchymal Transition* était le plus élevé dans le T par rapport au NT (p-value = 3,22E-06) et par rapport au TR (p-value = 1,25E-05); les scores des métagènes *Bile Acid Metabolism* et *Cholesterol Homeostasis* étaient les plus bas dans le T par rapport au NT (p-value 2,08E-04 et p-value = 1,70E-05 respectivement) et par rapport au TR (p-value 2,08E-04 et p-value = 1,70E-05, respectivement) (**figure 6,B**).

Au total, cette procédure nous a permis de construire 3 métagènes (total de 14 + 17 + 21 gènes) régulés au cours du processus de TEM.



6.5. Les métagènes dérivés *in vitro* montrent des valeurs pronostiques cohérentes dans un grand jeu de données publiques de CCR.

Puisque la TEM est un facteur de mauvais pronostic, nous voulions appliquer chacun de ces 3 métagènes à une base de données transcriptomique à grande échelle et étudier leurs caractéristiques pronostiques respectives. Nous avons construit la base de données d'expression d'ARNm du génome entier à partir de 11 data-set publics, en utilisant un total de 2239 échantillons de CRC primaires (colorectal adenocarcinoma, COAD) (**Tableau supplémentaire 1**). Nous avons concentré notre analyse sur les 1837 échantillons avec des données de survie sans récurrence.

Comme montré dans le **Tableau 2**, la plupart des patients COAD de la base de données avaient 50 ans ou plus (88%), 47% étaient des femmes, la localisation des tumeurs était distale dans 50% des cas. Les tumeurs pStage 1 représentent le 10%, le pStage 2 le

Characteristic	Global N (%)
Age_Diag50	
<=50	228 (12%)
>50	1702 (88%)
Sex	
female	954 (47%)
male	1069 (53%)
Location	
distal	840 (50%)
proximal	854 (50%)
pStage	
1	167 (10%)
2	667 (41%)
3	548 (34%)
4	237 (15%)
pT	
pT1	15 (2%)
pT2	112 (13%)
pT3	656 (74%)
pT4	100 (11%)
pN	
0	584 (66%)
1	300 (34%)
pM	
0	737 (86%)
1	121 (14%)
Grade	
1	26 (6%)
2	353 (77%)
3	77 (17%)
Taube_EMT_score	-0.04 (-2-3.4)
CMS	
CMS1	389 (20%)
CMS2	640 (32%)
CMS3	343 (17%)
CMS4	604 (31%)
Follow-up median, mon	43 (1-212)
5y-RFS	71% [68-73]

Tableau 2. Description de la population COAD globale.

41%, le pStage 3 le 34% et le pStage 4 le 15%; la classification pathologique de la plupart des tumeurs au niveau d'infiltration était moyenne - élevée (pT3: 74%, pT2 13% et pT4 11%), avec seulement 2% de pT1. La plupart des tumeurs étaient pN-négatives (66%). Les patients étaient majoritairement non métastatiques (86%). Les grades tumoraux étaient répartis comme suit : 6% grade 1, 77% grade 2, 17% grade 3. Tous les sous-types moléculaires CMS étaient représentés avec principalement les classes CMS2, CMS4, CMS1 puis CMS3 (32%, 31%, 20% et 17 %, respectivement). Le suivi médian après le diagnostic était de 43 mois (extrêmes : 1–212). Un total de 1837 patients a présenté un événement RFS, et la RFS à 5 ans était de 71% (intervalle de confiance à 95% (IC à 95%) 68–73).

En utilisant cette base de données, nous avons d'abord utilisé le score naturel de 0 comme seuil pour définir un

échantillon comme «*high*» (score positif) ou «*low*» (score négatif) pour chaque métagène. Ensuite, pour chaque métagène, nous avons comparé les données cliniques, les variables moléculaires et la RFS en fonction de ces 2 catégories «*high*» ou «*low*». Les échantillons tumoraux enrichis pour le métagène *Epithelial Mesenchymal Transition* sont issus de patients plus jeunes ($p = 3.29E-05$), avec un stade tumoral plus élevé ($p = 4.12E-07$), une stadification pathologique plus élevée ($p = 4.12E-07$) et plus de ganglions lymphatiques envahis ($p = 1,44E-04$).

Ces tumeurs étaient enrichies pour la classe moléculaire CMS4 ($p = 5,43E-139$) et avaient une RFS inférieure à 5 ans ($p = 5,98E-04$). Le groupe “high” du metagene *Epithelial Mesenchymal Transition* était composé de tumeurs plus agressives ou avancées (**Tableau 3 ; Figure 7A**).

<i>'Epithelial Mesenchymal Transition'</i>					<i>'Bile Acid Metabolism'</i>					<i>'Cholesterol Homeostasis'</i>				
Characteristic	N	low	high	p-value	Characteristic	N	low	high	p-value	Characteristic	N	low	high	p-value
Age_Diag50				3.29E-05	Age_Diag50				0.95	Age_Diag50				0.424
<=50	228	81 (9%)	147 (15%)		<=50	228	114 (12%)	114 (12%)		<=50	228	107 (11%)	121 (12%)	
>50	1702	858 (91%)	844 (85%)		>50	1702	859 (88%)	843 (88%)		>50	1702	851 (89%)	851 (88%)	
Sex				0.887	Sex				0.0672	Sex				2.90E-02
female	954	461 (47%)	493 (47%)		female	954	503 (49%)	451 (45%)		female	954	498 (50%)	456 (45%)	
male	1069	521 (53%)	548 (53%)		male	1069	519 (51%)	550 (55%)		male	1069	505 (50%)	564 (55%)	
Location				0.142	Location				2.08E-07	Location				0.529
distal	840	392 (48%)	448 (51%)		distal	840	378 (43%)	462 (56%)		distal	840	424 (50%)	416 (49%)	
proximal	854	430 (52%)	424 (49%)		proximal	854	493 (57%)	361 (44%)		proximal	854	417 (50%)	437 (51%)	
pStage				4.12E-07	pStage				3.41E-02	pStage				0.112
1	167	111 (14%)	56 (7%)		1	167	76 (9%)	91 (11%)		1	167	89 (11%)	78 (10%)	
2	667	323 (42%)	344 (40%)		2	667	324 (40%)	343 (43%)		2	667	309 (38%)	358 (44%)	
3	548	231 (30%)	317 (37%)		3	548	303 (37%)	245 (30%)		3	548	289 (36%)	259 (32%)	
4	237	102 (13%)	135 (16%)		4	237	112 (14%)	125 (16%)		4	237	120 (15%)	117 (14%)	
pT				1.09E-02	pT				3.77E-02	pT				0.259
pT1	15	11 (3%)	4 (1%)		pT1	15	10 (2%)	5 (1%)		pT1	15	10 (2%)	5 (1%)	
pT2	112	67 (16%)	45 (10%)		pT2	112	46 (10%)	66 (15%)		pT2	112	54 (13%)	58 (13%)	
pT3	656	304 (71%)	352 (77%)		pT3	656	334 (74%)	322 (74%)		pT3	656	306 (72%)	350 (76%)	
pT4	100	45 (11%)	55 (12%)		pT4	100	59 (13%)	41 (9%)		pT4	100	54 (13%)	46 (10%)	
pN				1.44E-04	pN				3.57E-02	pN				0.544
0	584	310 (72%)	274 (60%)		0	584	282 (63%)	302 (70%)		0	584	276 (65%)	308 (67%)	
1	300	118 (28%)	182 (40%)		1	300	168 (37%)	132 (30%)		1	300	149 (35%)	151 (33%)	
pM				0.072	pM				1	pM				0.860
0	737	367 (88%)	370 (84%)		0	737	371 (86%)	366 (86%)		0	737	351 (86%)	386 (86%)	
1	121	49 (12%)	72 (16%)		1	121	61 (14%)	60 (14%)		1	121	56 (14%)	65 (14%)	
Grade				0.521	Grade				4.63E-03	Grade				0.790
1	26	14 (6%)	12 (5%)		1	26	17 (8%)	9 (4%)		1	26	13 (6%)	13 (5%)	
2	353	173 (79%)	180 (76%)		2	353	149 (71%)	204 (83%)		2	353	170 (78%)	183 (77%)	
3	77	33 (15%)	44 (19%)		3	77	45 (21%)	32 (13%)		3	77	34 (16%)	43 (18%)	
CMS				5.34E-139	CMS				1.61E-42	CMS				1.08E-14
CMS1	389	172 (20%)	217 (20%)		CMS1	389	266 (27%)	123 (12%)		CMS1	389	196 (20%)	193 (19%)	
CMS2	640	430 (49%)	210 (19%)		CMS2	640	180 (19%)	460 (46%)		CMS2	640	244 (25%)	396 (40%)	
CMS3	343	251 (29%)	92 (8%)		CMS3	343	165 (17%)	178 (18%)		CMS3	343	163 (17%)	180 (18%)	
CMS4	604	26 (3%)	578 (53%)		CMS4	604	360 (37%)	244 (24%)		CMS4	604	371 (38%)	233 (23%)	
5y-RFS	1837	74% [71-78]	67% [64-71]	5.98E-04	5y-RFS	1837	70% [66-73]	72% [68-75]	0.182	5y-RFS	1837	68% [65-72]	73% [70-77]	1.62E-02

Tableau 3. Description des 3 groups de métagènes, (2239) COAD

Les échantillons de tumeurs enrichis pour le métagène *Bile Acid Metabolism* avait une localisation tumorale distale ($p = 2,08E-07$), avec moins de tumeurs de stade 3 ($p = 3,41E-02$), moins de stades pathologiques élevés ($p = 3,77E-02$), moins de ganglions lymphatiques impliqués ($p = 3,57E-02$) et de grade 2 prévalent ($4,63E-03$). Ces tumeurs ont été enrichies pour la classe moléculaire CMS2 ($p = 1,61E-42$). Au total, le groupe « high » du métagène *Bile Acid Metabolism* était composé de tumeurs moins agressives ou avancées, mais cela n'était pas suffisamment significatif pour avoir un impact sur la RFS (**Tableau 3**).

Les échantillons des tumeurs enrichis pour le métagène *Cholesterol Homeostasis* incluait une proportion plus élevée de sujets masculins ($p = 2,90E-02$). Ces tumeurs étaient enrichies pour la classe moléculaire CMS2 ($p = 1,08E-14$) et avaient une meilleure RFS à 5 ans ($p = 1,62E-02$). Au total, le groupe « high » du metagene *Cholesterol*

homeostasis “ était enrichi en tumeurs avec un meilleur pronostic moléculaire, même si cela n'était pas évident d'après les données cliniques seulement. (**Tableau 3; Figure 7B**).

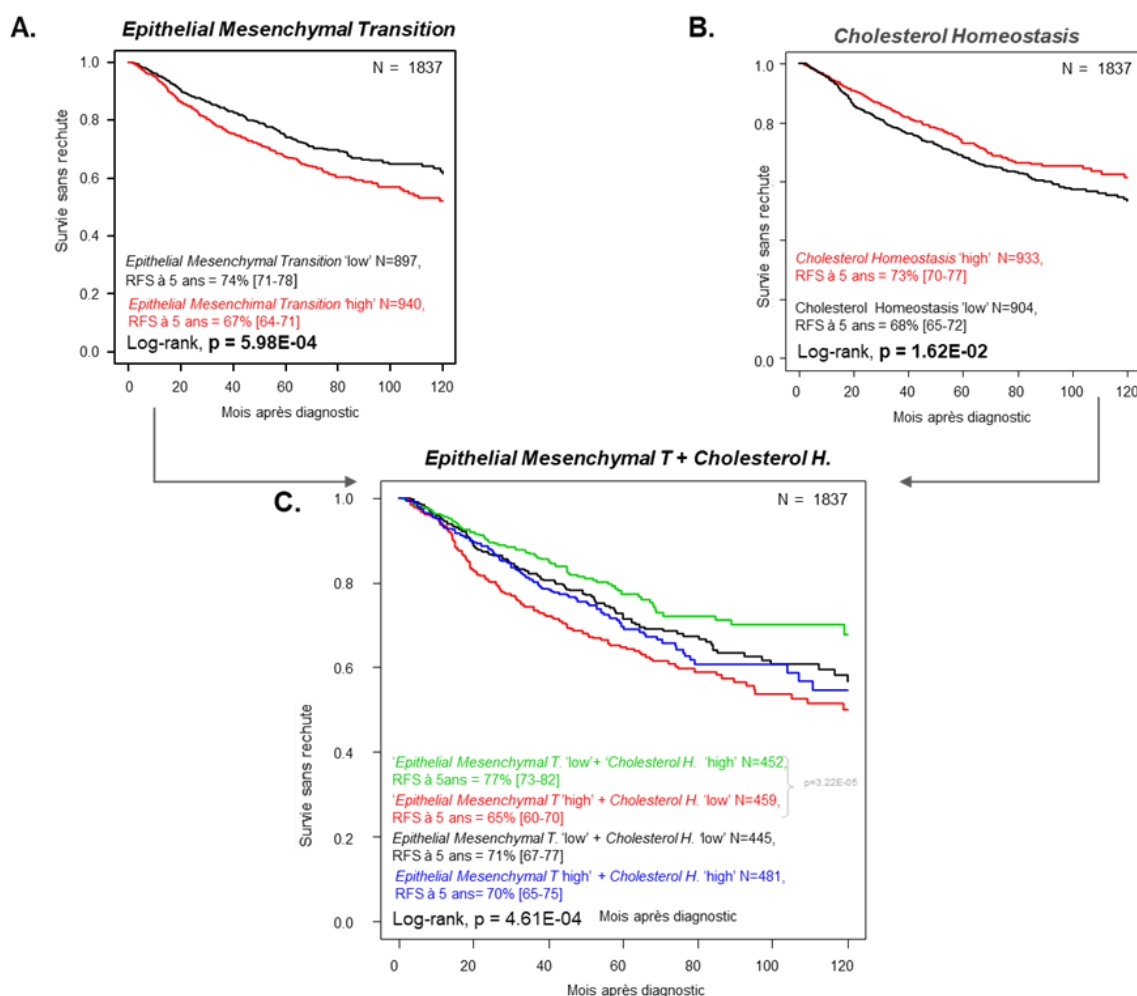


Figure 7 : RFS après corrélations de la base de données public COAD sur l'expression des métagènes (score naturel de 0 utilisé comme seuil pour définir un échantillon comme «high» ou «low» pour chaque métagène).
A. panneau du haut-côté gauche : RFS in Kaplan-Meier sur le metagène Epithelial Mesenchymal Transition
B. panneau du haut-côté droite : RFS in Kaplan-Meier sur le metagène Cholesterol Homeostasis
C. panneau du bas : RFS in Kaplan-Meier sur les deux metagènes ensemble en alternant l'assemblage de «high» et «low»

Au total, nous avons montré que les métagènes construites à partir de l'analyse transcriptomique de cellules tumorales cultivées en microtissus et soumises à un inducteur de la TEM *in vitro*, étaient cohérentes avec nos prédictions dans une base de données à grande échelle de tumeurs humaines: le métagène *Epithelial Mesenchymal Transition* «high» est de mauvais pronostic, tandis que les métagènes *Bile acid metabolism* et *Cholesterol homeostasis* métagènes “high” sont enrichis de tumeurs avec de meilleures caractéristiques cliniques et / ou moléculaires CMS2, dont le taux de survie à 5 ans est de 77%, le meilleur pour les quatre sous-types de CCR.

6.6 La fusion des métagènes *Epithelial Mesenchymal Transition* and *Cholesterol Homeostasis* a montré une amélioration de la valeur pronostique à 5 ans.

Comme le métagène *Epithelial Mesenchymal Transition* « high » et le métagène *Cholesterol Homeostasis* « low » sont des indicateurs de moins bonne survie à 5 ans (**Figures 7A et 7B**), nous nous sommes demandé si la fusion de ces deux métagènes pouvait améliorer la valeur pronostique de la RFS à 5 ans.

Nous avons effectué une estimation de Kaplan-Meier en stratifiant la RFS de 1837 COAD primaires en quatre groupes différents construits en alternant l'assemblage de le métagène *Epithelial Mesenchymal Transition* « low » et « high » avec le métagène *Cholesterol Homeostasis* « low » and « high ». L'objectif était d'observer quelle association fournit la « signature metagénique » pronostique la plus robuste. Nous avons quatre groupes différentes répertoriés comme suit: *Epithelial Mesenchymal Transition* «low» et *Cholesterol homeostasis* «high» (N= 472 ; RFS à 5 ans =77%) *Epithelial Mesenchymal Transition* «high» et *Cholesterol homeostasis* «low» (N= 459; RFS à 5 ans = 65%), L' *Epithelial Mesenchymal Transition* «high» and *Cholesterol homeostasis* «high» (N=481; RFS à 5 ans = 70%), l' *Epithelial Mesenchymal Transition* «low» and *Cholesterol homeostasis* «low» (N=445; RFS à 5 ans= 71%). En accord avec notre hypothèse, la meilleure signification pronostique a été observée pour les courbes *Epithelial Mesenchymal Transition* «high» and *Cholesterol homeostasis* «low» (poor risk) et *Epithelial Mesenchymal Transition* «low» and *Cholesterol homeostasis* «high» (good risk) (p-value=3,22E-05, Log-rank) (**Figure 7C**).

Nous avons ensuite construit un modèle de survie à partir des métagènes *Epithelial Mesenchymal Transition* et *Cholesterol homeostasis* fusionnés.

Pour ce faire, nous avons divisé les données au hasard en deux. Un « jeu de données

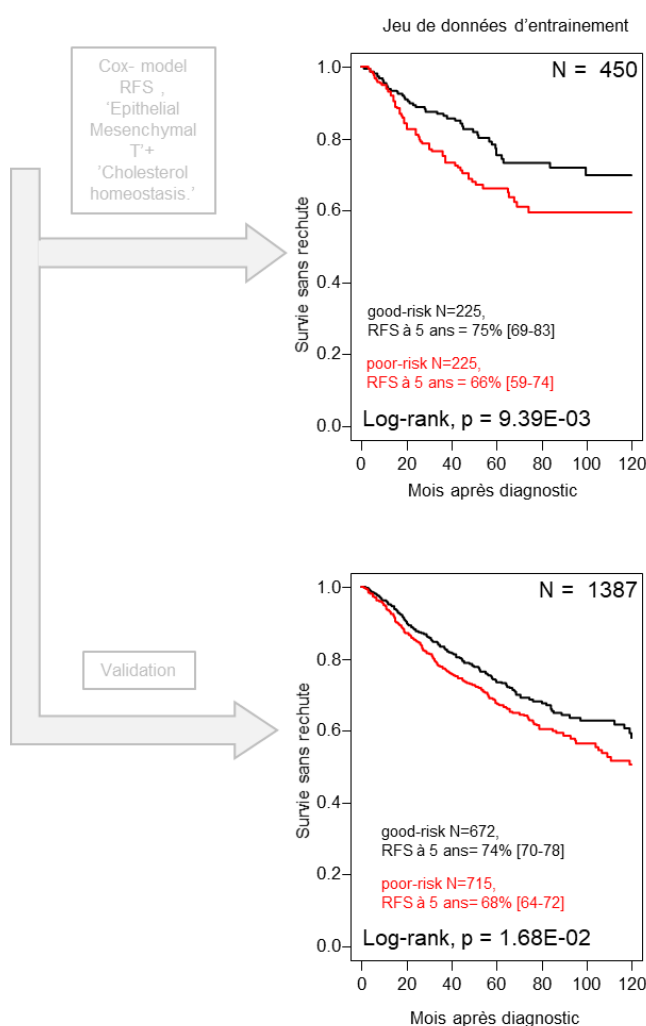


Figure 8. Modèle de survie à partir des métagènes *Epithelial Mesenchymal Transition* et *Cholesterol Homeostasis* fusionnées (« *Epithelial Mesenchymal Transition*+ *Cholesterol Homeostasis metagenes* model »)

A.(panneau du haut). Construction du modèle «COX-RFS *Epithelial Mesenchymal Transition*+ *Cholesterol homeostasis metagenes*», sur le « jeu de données d'entraînement ».

B (panneau du bas). Validation du modèle «COX-RFS *Epithelial Mesenchymal Transition* + *Cholesterol homeostasis metagenes*», sur le « jeu de données de validation »

A.

d'entraînement », composé d'un quart des échantillons (N = 450), a été utilisé pour construire le modèle de survie «COX-RFS *Epithelial Mesenchymal Transition* + *Cholesterol homeostasis metagenes*», en utilisant la méthode de la régression de Cox.

B.

Le reste des échantillons a été utilisé comme « jeu de données de validation » (N = 1387) pour évaluer le modèle.

Nous avons appliqué le modèle sur le « jeu de données d'entraînement

» et nous avons obtenu une différence significative entre le RFS du groupe "good risk" (N=225, with a RFS of 75%), et le

group "poor- risk" (N=225, avec une RFS de 66%) (Log-rank, $p=9.93E-03$) (**Figure 8A**).

Le modèle a ensuite été appliqué à l'ensemble du « jeu de données de validation ».

Encore, nous avons obtenu une différence significative entre le RFS du groupe "good risk" (N=672, avec une RFS de 74%) et le group "poor- risk" (N=715, avec une RFS de 68%) (Log-rank, $p=1.68E-02$) (**Figure 8B**). La validation de notre modèle dans le « jeu de donnée d'entraînement » et le « jeu de donnée de validation » a montré sa robustesse.

6.7. La fusion des métagènes *Epithelial Mesenchymal transition* et *Cholesterol homeostasis* est un facteur pronostique indépendant pour la RFS.

Pour comparer la valeur pronostique de notre modèle pour la RFS avec celle d'autres variables clinico-pathologiques et moléculaires, nous avons effectué des analyses univariées et multivariées dans le « jeu de données d'entraînement ». Dans l'analyse univariée, deux facteurs ont été associés à la RFS (Wald test): le pStage ($p=7.90E-04$) et le model "*COX-RFS Epithelial Mesenchymal Transition + Cholesterol homeostasis metagenes*" ($p=6.93E-03$). En analyse multivariée, ces deux variables sont restées significatives : le pStage ($p=2.58E-02$) et le model "*COX-RFS Epithelial Mesenchymal Transition + Cholesterol Homeostasis metagenes*" ($p=4.21E-02$), suggérant une valeur pronostique indépendante contrairement au classificateur pronostique CMS (**Tableau 4**).

RFS		Univariate			Multivariate		
		N	HR [95%CI]	p-value*/	N	HR [95%CI]	p-value
Age_Diag50	>50 vs. <=50	382	1.28 [0.59-2.76]	0.528			
Sex	male vs. female	406	1.20 [0.82-1.77]	0.348			
Location	proximal vs. distal	349	1.04 [0.69-1.57]	0.842			
pStage	2 vs. 1	341	5.36 [0.73-39.43]	7.90E-04	296	4.22 [0.57-31.45]	0.160
	3 vs. 1		11.79 [1.62-85.86]		296	9.68 [1.32-71.21]	2.58E-02
	4 vs. 1		NA [NA- NA]		296	<NA> [NA- NA]	<NA>
Grade	2 vs. 1	71	2.08 [0.25-17.00]	0.708			
	3 vs. 1		1.20 [0.07-20.81]				
CMS	CMS2 vs. CMS1	393	1.04 [0.56-1.95]	0.134	296	1.64 [0.67-4.05]	0.282
	CMS3 vs. CMS1		1.59 [0.79-3.20]		296	1.96 [0.71-5.41]	0.195
	CMS4 vs. CMS1		1.68 [0.90-3.12]		296	1.8 [0.78-4.17]	0.168
<i>Epithelial Mesenchymal Transition +Cholesterol Homeostasis model</i>		450	1.97 [1.20-3.22]	6.93E-03	296	2.58 [1.03-6.42]	4.21E-02

Tableau 4. Analyses univariées et multivariées dans le « jeu de données d'entraînement ».

Une analyse similaire a ensuite été effectuée dans le « jeu de données de validation ». Cet « jeu de données » étant plus grand et donc plus sensible, trois facteurs étaient associés à la RFS (Wald test) en analyse univariée : le pStage ($p=3.09E-10$) et le modèle «*COX-RFS Epithelial Mesenchymal Transition + Cholesterol homeostasis metagenes*» ($p=2.51E-02$). La classification moléculaire CMS était également associée de manière significative à la RFS ($p=2.29E-03$). Comme pour le « jeu de données de validation »,

seuls le pStage ($p = 1.36E-04$) et le modèle « *COX-RFS Epithelial Mesenchymal Transition + Cholesterol homeostasis metagenes* » ($p = 4.02E-02$) restent significatifs en analyse multivariée mais pas le classificateur pronostique CMS (**Tableau 5**).

RFS		Univariate			Multivariate		
		N	HR [95%CI]	p-value	N	HR [95%CI]	p-value
Age_Diag50	>50 vs. ≤50	1203	0.98 [0.70-1.37]	0.894			
Sex	male vs. female	1271	1.09 [0.87-1.35]	0.458			
Location	proximal vs. distal	1060	1.00 [0.79-1.26]	0.998			
pStage	2 vs. 1	988	3.48 [1.41- 8.62]	3.09E-10	861	2.53 [1.01-6.33]	4.78E-02
	3 vs. 1		7.74 [3.16-18.93]		861	5.77 [2.35-14.20]	1.36E-04
	4 vs. 1		NA [NA- NA]		861	<NA> [NA-NA]	<NA>
Grade	2 vs. 1	325	1.24 [0.39-3.97]	0.569			
	3 vs. 1		1.70 [0.47-6.12]				
CMS	CMS2 vs. CMS1	1225	0.75 [0.54-1.03]	2.29E-03	861	0.69 [0.43-1.10]	0.121
	CMS3 vs. CMS1		0.91 [0.64-1.30]		861	1.13 [0.68-1.90]	0.636
	CMS4 vs. CMS1		1.28 [0.94-1.73]		861	1.31 [0.87-1.97]	0.196
<i>Epithelial Mesenchymal Transition +Cholesterol Homeostasis model</i>							
	poor vs. good	1387	1.35 [1.04-1.75]	2.51E-02	861	1.7 [1.02-2.83]	4.02E-02

Tableau 5. Analyses univariées et multivariées dans le « jeu de données de validation ».

Dans l'ensemble, ces analyses confirment que le modèle « *Epithelial Mesenchymal Transition+ Cholesterol Homeostasis metagenes model* » est un facteur pronostique indépendant robuste pour prédire la survie sans rechute à 5 ans des cancers colorectaux.

7. DISCUSSION

Le cancer du côlon est une tumeur avec une propension métastatique élevée qui lui confère un pronostic nettement défavorable.

Parmi les différentes classifications moléculaires qui ont été établies pour essayer de lier les processus biologiques mis en jeu et le pronostic (43 ; 44 ; 45), la classification CMS reste le référentiel (42). Elle permet notamment d'identifier un sous-groupe dont le pronostic est particulièrement mauvais, le CMS4. Celui-ci est caractérisé par une augmentation de l'expression du facteur de croissance TGF β et une expression élevée des gènes mésenchymateux, reliant cette caractéristique biologique à un pronostic péjoratif.

En provoquant une transition épithélio-mésenchymateuse contrôlée dans un modèle 3D *in vitro*, nous avons réussi à identifier un modèle robuste, grâce à la combinaison de 2 métagènes "*Epithelial Mesenchymal Transition + Cholesterol Homéostase*", associé à la RFS des patients de la base de données COAD.

Le premier metagene « Epithelial to Mesenchymal Transition » est composé de 14 gènes (TNC, DKK1, PMEPA1, CTGF, IL8, TAGLN, FLNA, CYR61, SERPINE1, FSTL3, MYL9, THBS1, GPC1, ITGA2), tous évidemment impliqués dans la TEM. Certains sont de surcroît spécifiquement connus pour leur importance dans le cancer colorectal, comme FLNA, qui favorise également la chimiorésistance (46), ou TNC, qui est un indicateur de mauvais pronostic dans le CCR (47). Dans la même direction de notre expérience, a été montré, sur les lignées cellulaires du cancer du côlon HT29 et HCT116, que la surexpression de GPC1 active la TEM et la migration (48). Dans une autre étude a été démontré que l'axe Snail-FOXK1 favorise l'invasion et les métastases sur des cellules de CCR au travers de la TEM qu'est induit en régulant positivement l'expression de

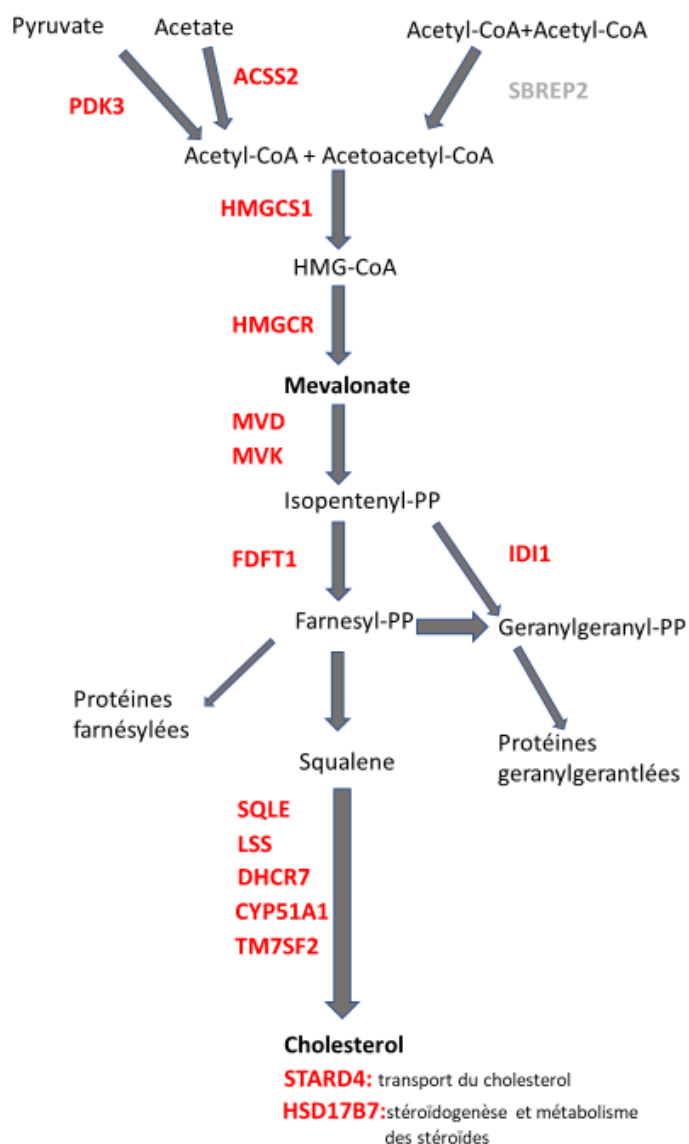
CYR61(49). D'autres études montrent que le CYR61 est surexprimé dans les cancers colorectaux et l'expression est corrélée avec un pronostic plus défavorable (50)

L' IL8 est également connu pour induire la transition épithéliale-mésenchymateuse des cellules de CCR, pour les aider à échapper à l'immunosurveillance de l'hôte, améliorer la résistance à l'anoikis et favoriser la formation des cellules tumorales circulantes (CTC) (51 ;52). SERPINE1 résulte être un gène promoteur de l'adénocarcinome gastrique en facilitant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales grâce à la régulation de la TEM (53). Ce gène a été aussi associé, dans une signature d'expression génique liée à la TEM et induite par TGF β , à deux autres gènes de notre métagène « Epithelial to Mesenchymal Transition » (TAGLN and PMEPA1) (54). THBS1, aussi, facilite les métastases colorectales au foie en renforçant la transition épithélio-mésenchymateuse (55).

Au total, du début de l'étude nous avons évalué notre système de induction de la TEM de différentes manières : tout d'abord nous avons observé l'aspect phénotypique différente des sphéroïdes dans les trois conditions de traitement ; après, le clustering hiérarchique non supervisé sur les données transcriptomiques, a nous révélé trois clusters de gènes significativement différentes et cohérentes avec les trois conditions de traitement ; nous avons aussi montré, ensuite, que notre modèle est physiologiquement pertinent en appliquant la classification moléculaire consensus (CMS) établie par Guinney J et al en 2015 (42) ; nous avons, enfin, obtenu notre métagène « *Epithelial Mesenchymal Transition* » pour lequel, nous avons pu constater, dans la littérature, que la majorité des 21 gènes, est connu pour être impliqué dans l'induction de la TEM sur le cancer colorectal et, certaines de ces 21 gènes, sont considérées comme étant de mauvaise pronostique dans le CCR.

Le second métagène, *Cholesterol Homeostasis*, est plus intéressant car le métabolisme du cholestérol connecté à la TEM est un concept émergent dans de nombreuses tumeurs

solides. Ce métagène est composé de 21 gènes (PCYT2, FDFT1, PDK3, SCD, EBP,



TM7SF2, HMGR, SQLE, DHCR7, CYP51A1, IDI1, TP53INP1, NFIL3, MVD, LSS, HMGCS1, MVK, HSD17B7, STARD4, ACSS2, ALDOC) parmi lequel sont présents des gènes phares de la voie du Mévalonate, comme la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (HMGR) et le Squalene Epoxidase (SQLE) (56) (Figure 8).

Une série de réactions enzymatiques convertis le mévalonate en farnésyl pyrophosphate (FPP), après quoi la voie se divise en trois directions différentes : la formation de le géranylgéranyl

Figure 8. Voie de synthèse du mévalonate.

Des nombreux gènes (en rouge) sous-exprimé dans le *Cholestérol Homéostasie métagène* font partie de la voie métabolique du mévalonate.

pyrophosphate (GGPP), la farnésylation des protéines et notamment la formation du cholestérol. Il est à noter que nous retrouvons la grande majorité des enzymes impliquées dans la formation du cholestérol dans notre métagène *Cholesterol Homeostasis* à 21 gènes qui est sous-exprimé (Figure 8).

Les autres deux voies (GGPP et la farnésylation des protéines) doivent également être touchées car nous trouvons dans notre métagène final (à 21 gènes) l'HMGR, et dans

le métagène de départ (à 31 gènes) le sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) (57 ; 58), donc les régulateurs transcriptionnels majeurs de la voie du Mévalonate qui agissent en amont (59 ; 60). **(Table supplémentaire 2).**

Ces deux voies touchent sur de protéines liantes le GTP (comme Ras and Rho) et qui ont une importance fondamentale dans la transmission des signaux du milieu extracellulaire vers le cytoplasme.

À noter que le *Bile Acid Metabolism* est notre troisième métagène trouvé sous-régulé. *In fine*, nous l'avons exclu du modèle car il n'avait pas de valeur pronostic de la RFS dans notre base de données de patient COAD. Cependant, son identification en association avec le *Cholestérol Homéostasie* est cohérente fonctionnellement.

La reprogrammation métabolique est désormais considérée comme une caractéristique typique du cancer et les cellules cancéreuses en prolifération présentent une reprogrammation évidente du métabolisme des lipides in générale et du cholestérol plus particulièrement.

Le cholestérol peut être obtenu de deux façons : soit en augmentant l'endocytose du cholestérol exogène, principalement issus des aliments ingérés, soit en suractivant la synthèse du cholestérol endogène à partir de l'acetyl-CoA (métagène *Cholesterol Homeostasis*). Les activités de ces deux voies sont coordonnées : ainsi, si une voie diminue, la deuxième compense pour l'autre de façon à maintenir une quantité de cholestérol disponible pour assurer ses fonctions. Dans les cellules cancéreuses ce mécanisme paraît être perdu.

Effectivement, la littérature suggère, dans la majorité des cas, que le métabolisme des lipides soit positivement corrélé à la formation tumorale.

Par exemple, au niveau de la membrane cellulaire, le cholestérol est impliqué dans le mode de transduction lié à la prolifération, et une diminution du cholestérol affecte négativement la transduction des signaux. (61 ; 62 ; 63).

En outre, les hormones stéroïdiennes, sont connues pour leurs interactions avec certains récepteurs qui activent les signaux de transduction régulant l'expression d'oncogènes comme RAS, CCND1 ou EGFR (64 ; 65 ; 66 ; 67).

Plusieurs études sur les CSC (cancer stem cells) montrent l'effet du cholestérol sur leurs maintien à l'état de cellules souches. Une étude portant sur les CSC de l'intestin, montre l'effet mitogène du cholestérol au travers de la composition de la membrane plasmique des cellules (68). Parallèlement à la synthèse du cholestérol, la geranylgeranylation des protéines est aussi essentielle pour maintenir l'état de souche dans le cancer du sein (60).

Dans le mécanisme de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), donc notre centre d'intérêt dans cette étude, il commence à être connu que la reprogrammation métabolique subit une dérégulation générale qui se produit à tous ses niveaux, compris le métabolisme de lipides. À ce jour, peu d'études, et avec des résultats contradictoires, sont apparus dans la littérature scientifique.

Une étude très intéressante sur le SQLE et sa relation avec la E-cadherine montre comment, au front d'invasion des CCR, l'E-Cadherine diminue et le SQLE à augmente. On peut donc imaginer une corrélation entre l'augmentation du SQLE et l'induction de la TEM. En plus, l'augmentation du SQLE semble être en corrélation avec une survie plus courte sur un échantillon d'environ 150 patients (i). Au niveau de la prostate, il a été récemment démontré une corrélation entre la TEM et le cholestérol présente sur la membrane cellulaire grâce à l'activation de la voie extracellulaire des protéine kinase 1

et 2 qui résulte être médié au travers du EGFR et de l'AMAP (adipocyte plasma membrane-associated protein) (69).

Une augmentation de FASN (Fatty acid synthase, un multi-enzyme qui catalyse la synthèse des acides gras) a été démontrée dans des lignées de cellules du cancer du poumon *non à petites cellules* (CBNPC) résistantes au cisplatine (développé à partir des cellules parentales) par rapport à son expression dans les cellules parentales d'origine ; cette différence d'expression a été jugée responsable de l'augmentation de la TEM et du potentiel métastatique des cellules résistantes au cisplatine. La TEM, altérée par la suppression de FASN montre une sous-régulation des marqueurs mésenchymateux via la boucle positive FASN-TGF β 1-FASN spécifiquement dans les cellules résistantes au cisplatine (70 ; 71).

De même l'administration de l'osthole (un inhibiteur du FASN) aux cellules du cancer du sein MCF7 abolit la diffusion cellulaire, l'exécution de l'EMT, la migration et l'invasion induites par le HGF (facteur de croissance des hépatocytes) (72 ; 73).

Mais des observations opposées, et allant plus vers la direction de notre étude, sont également décrites dans la littérature.

L'exposition des cellules CBNPC au TGF- β , qui induit la TEM, supprime la transcription des enzymes impliquées dans la lipogenèse, y compris le FASN et l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (74 ; 73 ; 70)

Ces enzymes sont contrôlées par le carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) et le sterol regulatory element-binding proteins (SREBP). SNAIL intervient dans la suppression du programme lipogénique en réprimant les niveaux de SREBP et de ChREBP. En plus d'une lipogenèse diminuée, l'EMT induite par le TGF- β favorise également le mécanisme d'oxydation et un ATP intracellulaire plus élevé. L'idée est qu'une diminution de la synthèse des acides gras pourrait détourner l'acétyl-CoA vers

l'OXPPOS ou le cycle de Krebs et obtenir une production efficace d'une grande quantité d'énergie qui pourrait soutenir la migration cellulaire requise pour la propagation métastatique.

Dans notre expérience *in vitro* nous trouvons le SREBF2, dans le metagène *Cholesterol Homeostase* d'origine (31 gènes) qui est sous-exprimé entre les sphéroïdes NT et T. Nous pourrions, donc, en déduire que la sous-régulation de notre mutagène pendant la TEM pourrait être associée à une augmentation de l'endocytose, ce qu'il nous faudra vérifier *in vitro*.

Il est à noter que l'expression des enzymes FASN et ACC est sous-régulée dans les cellules cancéreuses circulantes (CTC), par rapport à leurs homologues dans la tumeur primaire. Il s'agit là encore d'une reprogrammation métabolique dans un contexte particulier pour les cellules épithéliales (75).

Cette reprogrammation ou plasticité métabolique est réversible. Il est probable que lorsque les cellules métastatiques finissent par se localiser sur des sites secondaires, elles peuvent rebasculer leur métabolisme vers les voies lipogéniques endogènes, si ce site secondaire se révèle être un environnement favorable au développement de la métastase.

Il est donc intéressant de considérer qu'une diminution du métabolisme du cholestérol pourrait, dans certaines situations particulières ou de transition (TEM /TEM partielle), conduire vers une facilitation de l'invasion cellulaire et la formation des métastases.

Dans l'optique de l'utilisation des médicaments qui ciblent les enzymes lipogéniques pour le traitement du cancer (comme les « statines »), on peut considérer que, dans une vision générale de la croissance de la tumeur, ces médicaments pouvant bloquer et ralentir son développement. Avant de les utiliser avec cet objectif, il faut cependant et avant tout, mieux comprendre le fonctionnement de la reprogrammation métabolique lipidique car,

ce type d'intervention thérapeutique, pourrait, dans certains cas spécifiques, augmenter le risque de métastases.

En effet, il a été montré, aussi, qu'une carence en cholestérol peut activer les voies de signalisation du TGF β , donc la TEM (76) et, en plus, dans la même direction de notre étude, il a été montré la corrélation entre la sous-expression de l' HMGCR (la principale enzyme limitant le taux de biosynthèse du cholestérol) et la diminution de la survie globale sur le CCR (77). Cette étude met en doute le rôle de la synthèse *de novo* du cholestérol et tente d'expliquer les rapports incohérents sur l'efficacité des statines dans le développement et la progression des cancers, incluant le CCR (78). En considérant les contradictions existantes dans les études sur l'utilisation des « statines » et leur effet protecteur ou pro-cancérigène (79 ; 80 ; 81 ; 82), il est sûrement nécessaire de parcourir des nouveaux axes de recherche, pour bien éclaircir ces mécanismes d'interaction. Ils pourraient nous conduire à un approfondissement de la relation entre le métabolisme du cholestérol et le développement du cancer, et, de manière encore plus spécifique, de la relation entre le métabolisme du cholestérol et la TEM.

8. CONCLUSION

Nous avons identifié une signature transcriptomique associée à la survie sans rechute des cancers colorectaux. Cette signature a pu être établie grâce à l'induction d'un processus de transition épithélio-mésenchymateuse à partir d'un modèle pertinent et rigoureusement contrôlé *in vitro*.

Elle a ensuite été validée sur une banque de données transcriptomiques publiques contenant un grand nombre de patients (n=2401). Les gènes de cette signature permettent de mieux classer les patients quant à leur survie, sur la base de fonctions biologiques propres à la tumeur primaire. Les tumeurs plus à risque de rechuter dans les 5 ans sur-expriment des gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse et présentent un phénomène de reprogrammation des voies métaboliques impliquant le cholestérol. Les études mettant ces deux aspects en relation sont en plein essor, notamment pour ce que concerne le métabolisme des lipides en général, et du cholestérol en particulier. Les résultats de la littérature sont encore discordants, soulignant la complexité des mécanismes mis en jeu. Il est donc essentiel d'aborder cette problématique en combinant plusieurs approches ou modèles d'étude (*in vitro*, *in vivo*, *in silico*...) afin de mieux comprendre le processus de reprogrammation métabolique. C'est dans cette optique que nous avons mis au point notre étude, que nous souhaitons continuer d'explorer afin de venir étoffer l'importance des voies métaboliques du cholestérol au cours du processus métastatique. Nous envisageons notamment d'utiliser plusieurs lignées cellulaires, voir des organoïdes dérivés de tumeurs de patients atteints de cancers colorectaux, pour confirmer et étudier plus en profondeur cette piste métabolique. Si cela se confirme, nous pourrions envisager d'utiliser certains des gènes candidats identifiés comme biomarqueur pour mieux classer et sélectionner les patients éligibles à un traitement ciblant la voie du cholestérol.

9. RÉFÉRENCES

1. International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. Latest global cancer data (2018).
2. Institut National du Cancer (2019).
3. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014 Jan-Feb;64(1):9-29. Epub 2014 Jan 7. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2014 Sep-Oct;64(5):364.
4. Weinberg, RA. *The biology of cancer*, Garland Science (2014).
5. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20.
6. Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:347-76.
7. Savagner P. Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity. *Curr Top Dev Biol.* 2015;112:273-300.
8. Weber CE, Li NY, Wai PY, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, TGF- β , and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. *J Burn Care Res.* 2012 May-Jun;33(3):311-8
9. Gurzu S, Turdean S, Kovecsi A, Contac AO, Jung I. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World J Clin Cases.* 2015 May 16;3(5):393-404.
10. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 2009 May;174(5):1588-93.
11. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI, Tomic-Canic M. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):495-506.
12. Byer B, Thiery JP. Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS.* 1993 Apr;101(4):257-68.
13. Davies JA. Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta Anat (Basel).* 1996;156(3):187-201.
14. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* 2013 Nov 8;342(6159):1234850
15. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):131-42.
16. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Mar;15(3):178-96.
17. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1438-49.

18. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1429-37.
19. Kothari AN, Mi Z, Zapf M, Kuo PC. Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition. *Clin Transl Med.* 2014 Oct 15;3:35.
20. De Craene B, van Roy F, Berx G. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal.* 2005 May;17(5):535-47
21. Comaills V, Kabeche L, Morris R, Buisson R, Yu M, Madden MW, LiCausi JA, Boukhali M, Tajima K, Pan S, Aceto N, Sil S, Zheng Y, Sundaresan T, Yae T, Jordan NV, Miyamoto DT, Ting DT, Ramaswamy S, Haas W, Zou L, Haber DA, Maheswaran S. Genomic Instability Is Induced by Persistent Proliferation of Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.* 2016 Dec 6;17(10):2632-2647.
22. Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol.* 2008 Aug;9(8):808.
23. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, Aug 28;98(18):10356-61.
24. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4;280(9):8094-100. Epub 2004 Dec 9.
25. Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Dec;31(3-4):469-78.
26. Williams ED, Gao D, Redfern A, Thompson EW. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2019 Dec;19(12):716-732.
27. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018 Feb;18(2):128-134.
28. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* 2015 Nov;25(11):675-686.
29. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concampnon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science.* 2013 Feb 1;339(6119):580-4.
30. Jolly MK, Boareto M, Huang B, Jia D, Lu M, Ben-Jacob E, Onuchic JN, Levine H. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol.* 2015 Jul 20;5:155.
31. Liu X, Li J, Cadilha BL, Markota A, Voigt C, Huang Z, Lin PP, Wang DD, Dai J, Kranz G, Krandick A, Libl D, Zitzelsberger H, Zagorski I, Braselmann H, Pan M,

- Zhu S, Huang Y, Niedermeyer S, Reichel CA, Uhl B, Briukhovetska D, Suárez J, Kobold S, Gires O, Wang H. Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Sci Adv*. 2019 Jun 19;5(6):eaav4275.
32. Payen VL, Porporato PE, Baselet B, Sonveaux P. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Apr;73(7):1333-48.
 33. Hua W, Ten Dijke P, Kostidis S, Giera M, Hornsveid M. TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Dec 10.
 34. Morandi A, Taddei ML, Chiarugi P, Giannoni E. Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Front Oncol*. 2017 Mar 14;7:40.
 35. Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Jeong EK, Kim CH, Yoo MA, Park HG, Han SI, Kang HS. Dlx-2 is implicated in TGF- β - and Wnt-induced epithelial-mesenchymal, glycolytic switch, and mitochondrial repression by Snail activation. *Int J Oncol*. 2015 Apr;46(4):1768-80.
 36. Yang L, Hou Y, Yuan J, Tang S, Zhang H, Zhu Q, Du YE, Zhou M, Wen S, Xu L, Tang X, Cui X, Liu M. Twist promotes reprogramming of glucose metabolism in breast cancer cells through PI3K/AKT and p53 signaling pathways. *Oncotarget*. 2015 Sep 22;6(28):25755-69.
 37. Kern U, Wischnewski V, Biniossek ML, Schilling O, Reinheckel T. Lysosomal protein turnover contributes to the acquisition of TGF β -1 induced invasive properties of mammary cancer cells. *Mol Cancer*. 2015 Feb 15;14:39.
 38. Li J, Dong L, Wei D, Wang X, Zhang S, Li H. Fatty acid synthase mediates the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Int J Biol Sci*. 2014 Jan 20;10(2):171-80.
 39. Jiang L, Xiao L, Sugiura H, Huang X, Ali A, Kuro-o M, Deberardinis RJ, Boothman DA. Metabolic reprogramming during TGF β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2015 Jul 23;34(30):3908-16.
 40. Kong D, Ahmad A, Bao B, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Histone deacetylase inhibitors induce epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e45045. Epub 2012 Sep 14. PubMed PMID: 23024790;
 41. Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell*. 2011 Jun 10;145(6):926-40.
 42. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas

- T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350-6.
43. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homiczko K, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 2013; 19:619.
 44. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 2013; 19:614.
 45. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 2013; 10:e1001453.
 46. Mengmeng Cheng et al, FLNA promotes chemoresistance of colorectal cancer through inducing epithelial-mesenchymal transition and smad2 signaling pathway *Am J Cancer Res*. 2020 Feb 1;10(2):403-423
 47. Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, Ishibashi M, Takano Y, Akiyoshi S, Iwaya T, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Mimori K. Tumor-derived tenascin-C promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Anticancer Res*. 2013 May;33(5):1927-34.
 48. Li J, Li B, Ren C, Chen Y, Guo X, Zhou L, Peng Z, Tang Y, Chen Y, Liu W, Zhu B, Wang L, Liu X, Shi X, Peng Z. The clinical significance of circulating GPC1 positive exosomes and its regulative miRNAs in colon cancer patients. *Oncotarget*. 2017 Aug 24;8(60):101189-101202.
 49. Huang X, Xiang L, Li Y, Zhao Y, Zhu H, Xiao Y, Liu M, Wu X, Wang Z, Jiang P, Qing H, Zhang Q, Liu G, Zhang W, Li A, Chen Y, Liu S, Wang J. Snail/FOXK1/Cyr61 Signaling Axis Regulates the Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(2):590-603.
 50. Jeong D, Heo S, Sung Ahn T, Lee S, Park S, Kim H, Park D, Byung Bae S, Lee SS, Soo Lee M, Kim CJ, Jun Baek M. Cyr61 expression is associated with prognosis in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2014 Mar 7;14:164.
 51. Bie Y, Ge W, Yang Z, Cheng X, Zhao Z, Li S, Wang W, Wang Y, Zhao X, Yin Z, Li Y. The Crucial Role of CXCL8 and Its Receptors in Colorectal Liver Metastasis. *Dis Markers*. 2019 Nov 20;2019:8023460.
 52. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *Int J Oncol*. 2016 Jan;48(1):5-12.
 53. Yang JD, Ma L, Zhu Z. SERPINE1 as a cancer-promoting gene in gastric adenocarcinoma: facilitates tumour cell proliferation, migration, and invasion by regulating EMT. *J Chemother*. 2019 Nov - Dec;31(7-8):408-418.

54. Foroutan M, Cursons J, Hediye-Zadeh S, Thompson EW, Davis MJ. A Transcriptional Program for Detecting TGF β -Induced EMT in Cancer. *Mol Cancer Res.* 2017 May;15(5):619-631.
55. Liu X, Xu D, Liu Z, Li Y, Zhang C, Gong Y, Jiang Y, Xing B. THBS1 facilitates colorectal liver metastasis through enhancing epithelial-mesenchymal transition. *Clin Transl Oncol.* 2020 Feb 12
56. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Apr;21(4):225-245. doi: 10.1038/s41580-019-0190-7. Epub 2019 Dec 17.
57. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane- bound transcription factor. *Cell* 89, 1997, 331–340.
58. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1125-31
59. Binlu Huang¹ , Bao-liang Song² and Chenqi Xu Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Met:* 2020 Feb; 132–141.
60. Ginestier C, Monville F, Wicinski J, Cabaud O, Cervera N, Josselin E, Finetti P, Guille A, Larderet G, Viens P, Sebti S, Bertucci F, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E. Mevalonate metabolism regulates Basal breast cancer stem cells and is a potential therapeutic target. *Stem Cells.* 2012 Jul;30(7):1327-37. doi: 10.1002/stem.1122. PubMed PMID: 22605458.
61. Waugh MG, Minogue S, Anderson JS, dos Santos M, Hsuan JJ. Signalling and non-caveolar rafts. *Biochem Soc Trans.* 2001 Aug;29(Pt 4):509-11.
62. Menter DG, Ramsauer VP, Harirforoosh S, Chakraborty K, Yang P, Hsi L, et al. Differential effects of pravastatin and simvastatin on the growth of tumor cells from different organ sites, 2011, PLoS ONE.
63. Griner LN, McGraw KL, Johnson JO, List AF, Reuther GW. JAK2V617F-mediated signalling is dependent on lipid rafts and statins inhibit JAK2-V617F-dependent cell growth. *Br J Haematol.* (2013) 160:177–87
64. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* 2003 Oct;144(10):4562-74
65. Sirianni R, Zolea F, Chimento A, Ruggiero C, Cerquetti L, Fallo F, Pilon C, Arnaldi G, Carpinelli G, Stigliano A, Pezzi V. Targeting estrogen receptor- α reduces adrenocortical cancer (ACC) cell growth in vitro and in vivo: potential therapeutic role of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for ACC treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;97(12):E2238-50.
66. Filardo EJ. A role for G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in estrogen-induced carcinogenesis: Dysregulated glandular homeostasis, survival and metastasis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Feb;176:38-48.

67. Chimento A, Casaburi I, Avena P, Trotta F, De Luca A, Rago V, Pezzi V, Sirianni R. Cholesterol and Its Metabolites in Tumor Growth: Therapeutic Potential of Statins in Cancer Treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jan 21;9:807.
68. Wang B, Rong X, Palladino END, Wang J, Fogelman AM, Martín MG, Alrefai WA, Ford DA, Tontonoz P. Phospholipid Remodeling and Cholesterol Availability Regulate Intestinal Stemness and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 2018 Feb 1;22(2):206-220.
69. Kim JH, Kim CN, Kang DW. Squalene Epoxidase Correlates E-Cadherin Expression and Overall Survival in Colorectal Cancer Patients: The Impact on Prognosis and Correlation to Clinicopathologic Features. *J Clin Med*. 2019 May 8;8(5).
70. Hua W, Ten Dijke P, Kostidis S, Giera M, Hornsveld M. TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Dec 10.
71. Yang L, Zhang F, Wang X, Tsai Y, Chuang KH, Keng PC, Lee SO, Chen Y. A FASN-TGF- β 1-FASN regulatory loop contributes to high EMT/metastatic potential of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):55543-55554
72. Hung CM, Kuo DH, Chou CH, Su YC, Ho CT, Way TD. Osteostatin suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition via repression of the c-Met/Akt/mTOR pathway in human breast cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2011 Sep 14;59(17):9683-90.
73. Morandi A, Taddei ML, Chiarugi P, Giannoni E. Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Front Oncol*. 2017 Mar 14;7:40.
74. Jiang L, Xiao L, Sugiura H, Huang X, Ali A, Kuro-o M, Deberardinis RJ, Boothman DA. Metabolic reprogramming during TGF β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2015 Jul 23;34(30):3908-16
75. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, de Carvalho FM, Damascena A, Domingos Chinen LT, Rocha RM, Asara JM, Kalluri R. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014 Oct;16(10):992-1003, 1-15.
76. Linara G et al, Cholesterol deprivation induces TGF β signaling to promote basal differentiation in pancreatic cancer. *BioRxiv*(2019)
77. Sharma B, Gupta V, Dahiya D, Kumar H, Vaiphei K, Agnihotri N. Clinical

- relevance of cholesterol homeostasis genes in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019 Oct;1864(10):1314-1327.
78. Dobrzycka M, Spychalski P, Łachiński AJ, Kobiela P, Jędrusik P, Kobiela J. Statins and Colorectal Cancer - A Systematic Review. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2020 Apr;128(4):255-262
 79. Ravnskov U, McCully KS, Rosch PJ. The statin-low cholesterol-cancer conundrum. *QJM*. 2012 Apr;105(4):383-8.
 80. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *Am J Cancer Res*. 2019 Feb 1;9(2):219-227.
 81. Ravnskov U et al. Statins do not protect against cancer: quite the opposite. *J Clin Oncol*, 2015.
 82. Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med*. 2013 Feb 7;368(6):576-7.

8. DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

8.1 Figures supplémentaires

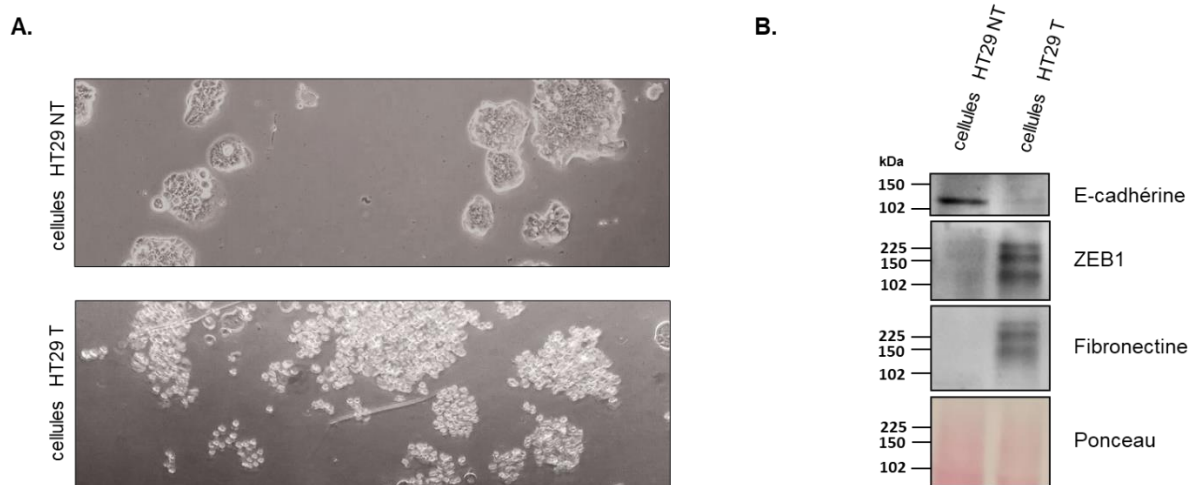


Figure supplémentaire 1. Tests de confirmation du StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement en tant qu'inducteur d'EMT sur les cellules adhérentes de la lignée cellulaire du cancer du côlon HT29.

A. Aspect morphologique de la lignée cellulaire HT 29 cultivée pendant 5 jours en monocouche (2D) sans traitement avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement (tableau du haut) et après 5 jours de traitement avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement (tableau du bas).

In A (tableau du haut) sans aucun traitement spécifique les cellules continuent à pousser en dense ilots de cellules (caractéristique des HT29), inversement in A (tableau du bas) à l'induction du traitement avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement, les ilots de cellules devenaient plus lâches, avec un certain nombre de cellules rondes et viables visibles à la périphérie.

B. Analyse en Western Blot de 3 des principales protéines impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse : E-cadhérine, Fibronectine et ZEB1.

Comme attendu, la E- cadhérine (marqueur de l'état épithéliale) présente dans les cellules non traitées subit une grande diminution dans les cellules traitées avec le *StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement*. Inversement, le ZEB1 et la Fibronectine (caractéristiques de l'état mésenchymateuse) qui ne sont pas exprimé dans les cellules non traitées, augmentent de manière évidente leur niveau d'expressions dans les cellules traitées avec le *StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement*.

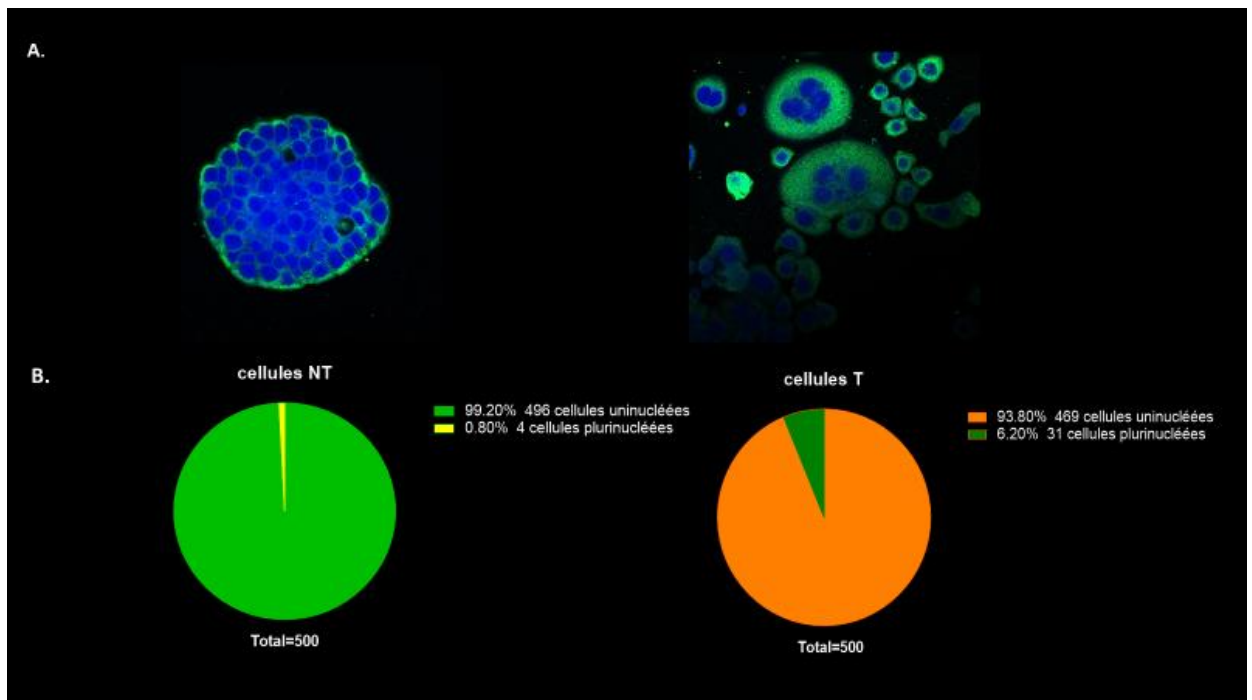


Figure supplémentaire 2. Observation et quantification, en Immunofluorescence , d'un phénomène connu en littérature (V. Comailss et al. ,2016)(21) comme conséquence de l'induction de la transition épithéliale-mésenchymateuse : l'apparition d'erreurs de cytokinèse avec formation conséquente de cellules bi/polynucléées (ligné cellulaire HT 29 cultivée en 2D). **A. (ligne du haut)** Apparition d'un grand nombre de cellules bi/polynucléées dans les cellules traitées (à droite) par rapport au cellules non traitée (à gauche) **B. (ligne du bas)** Le pourcentage de cellules bi/polynucléées, après comptage sur 500 cellules non traitée (à gauche) et 500 cellules traitées (à droite) est du 6,20% de cellules polynucléées pour les cellules traitée contre le 0,80% pour les cellules non traitées.

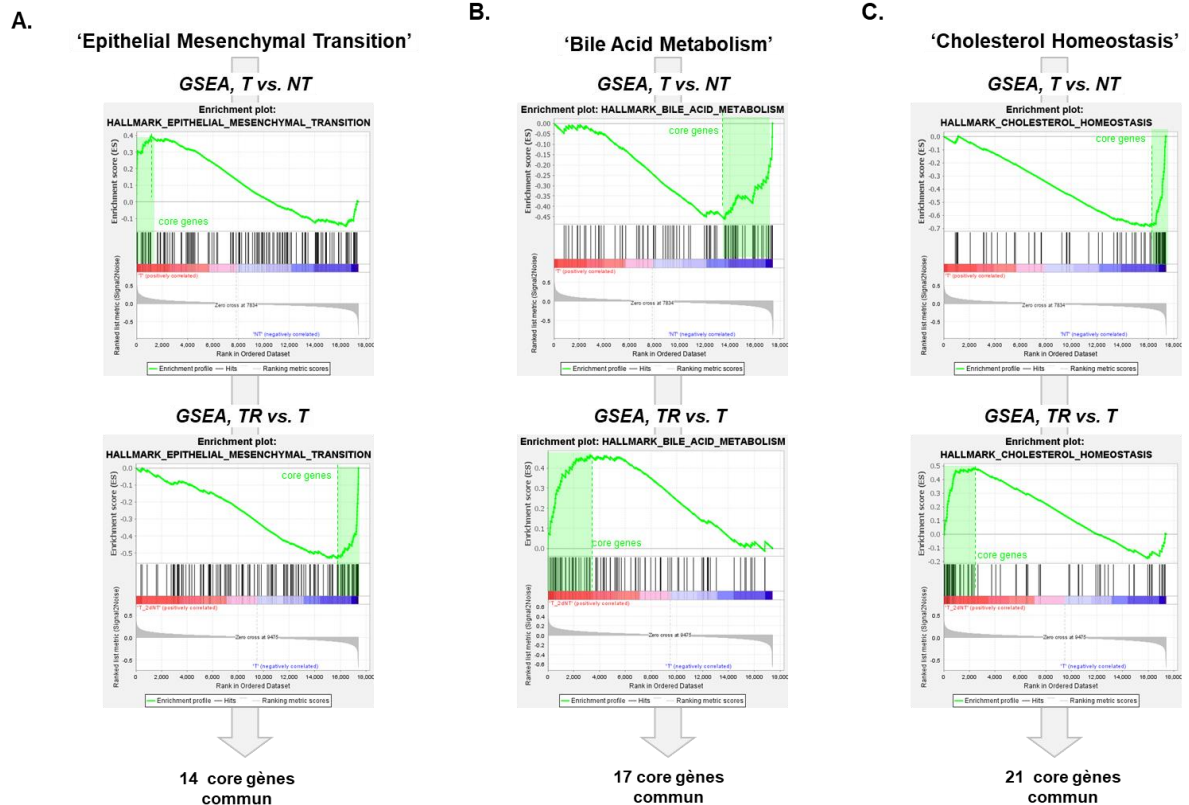


Figure supplémentaire 3. Graphiques d'enrichissement de GSEA comparant les profils d'expression g n ique des sphéroïdes T aux sphéroïdes NT (panel du haut) et des sphéroïdes TR aux sphéroïdes T (panel du bas) pour les 3 listes de gènes *HALLMARK* significatives d'intérêt i.e. 'Epithial mesenchymal transition' (A.), 'Bile acide métabolisme (B.) et 'Cholesterol homeostasis' (C.).

Pour chacun des graphiques, la zone de position des gènes essentiels (i.e. 'core genes', participant au maximum du score d'enrichissement) est mise en avant dans un cadre vert. Le nombre de 'core genes' communs entre les 2 comparaisons est indiqué au bas de chacune des listes de gènes *HALLMARK* illustr es.

8.2 Tableaux supplémentaires

Reference	Source of data	Technological platform	N° of probe sets/genes	N° of samples	Primary (N)	Normal (N)	Metastasis (N)
Jorissen et al., Clin Cancer Res 2009	GEO database, GSE14333	Affymetrix, array U133 Plus 2.0	54K	251	251		
Sheffer et al., Proc Natl Acad Sci 2009	GEO database, GSE41258	Affymetrix, array U133 A	22K	289	168	54	67
Staub et al., J Mol Med (Berl) 2009	GEO database, GSE12945	Affymetrix, array U133 Plus 2.0	54K	29	29		
Smith et al., Gastroenterology 2010	GEO database, GSE17538	Affymetrix, array U133 Plus 2.0	54K	232	232		
de Sousa et al., Cell Stem Cell 2011	GEO database, GSE33113	Affymetrix, array U133 Plus 2.0	54K	90	90		
Kenned et al., J Clin Oncol 2011	Array-Express database, E-MTAB-863	Affymetrix custom array, ADXCRCG2a520319	62K	215	215		
Sveen et al., Genome Med 2011	GEO database, GSE24551	Affymetrix, Human Exon 1.0 ST array	22K	160	160		
Lai et al., OMICS 2012	GEO database, GSE37892	Affymetrix, array U133 Plus 2.0	54K	130	130		
Marisa et al., PLoS Med 2013	GEO database, GSE39582	Affymetrix, array U133 Plus 2.0	54K	455	455		
TCGA, COAD	TCGA portal, https://tcga-data.nci.nih.gov	Illumina, RNA sequencing V2	25K	500	459	41	
IPC	---- submission to ArrayExpress ongoing ----	Affymetrix, array U133 Plus 2.0	54K	50	50		
Total				2401	2239	95	67

Tableau supplémentaire 1. Description des 11 jeux de données publics de colon inclus.

NAME	SIZE	N core gene	Core gene	HT29, T vs NT					N core gene	Core gene	HT29, TR vs T					N common core gene	Common core gene
				ES	NES	p-value	q-value	Associated			ES	NES	p-value	q-value	Associated		
			THBS1, CXCL1, P1MEP1, CTGF, IL8, TAGLN, TGFB, FLNA, CYR11, GUPR1, CXCL1, SERPINE1, SFRP1, FSTL3, DPTSL2, MYL9, CD44, CAPZB, SDC2	0.40	1.70	<1.00E-03	5.61E-03	up T vs. NT	38	MP1, SPARC, ELN, CXCL5, PARCLIN, ECM1, ITGA2, IL13, GPC1B, C12OR3A, PARCLIN	-0.52	-2.25	<1.00E-03	<1.00E-03	down TR vs T	14	THBS1, CXCL1, P1MEP1, CTGF, IL8, TAGLN, FLNA, CYR11, CXCL5, SERPINE1, SFRP1, FSTL3, MYL9, THBS1, GPCL1, TAG2
EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	146	22							38	FGD6, NEDD9, SH2, FLNA, VCL, CDC42EP2, C1	-0.31	-1.37	2.39E-02	6.36E-02		13	FLNA, NEDD9, VCL, EPB41L2, RHGA
MITOTIC_SPINDLE	195	68	FLNA, CEPPE, AURKA, DLGAP5, KIF	0.57	2.56	<1.00E-03	<1.00E-03	up T vs. NT	37	SMAD3, ORC6, SLCTA1, PTTG1, BCL3, CCNT1, J	-0.12	-0.56	1.00E+00	1.00E+00		13	PTTG1, BARD1, LESPL1, TROPAP, YTHD
G2M_CHECKPOINT	199	93	PTTG1, MT2A, CEPPE, AURKA, HMC	0.71	3.16	<1.00E-03	<1.00E-03	up T vs. NT	23	SERPINE1, P1MEP1, THBS1, SMURF2, SMAD1	-0.56	-2.06	<1.00E-03	7.69E-04	down TR vs T	8	P1MEP1, SERPINE1, SMAD7, SMURF
TGF_BETA_SIGNALING	53	8	P1MEP1, SERPINE1, SMAD7, SMU	0.30	1.07	3.38E-01	3.14E-01		86	NAA3B, IUGL, KP01, TK, MLH1, VAR, PRPS1, C	0.21	0.92	6.73E-01	8.14E-01		59	DEPDC1, CDKN3, DLGAP5, BRCS, GIN
EPF_TARGETS	198	140	PTTG1, DEPDC1, CEPPE, SPAG5, A	0.75	3.40	<1.00E-03	<1.00E-03	up T vs. NT	118	CANX, MCM6, ERH, CXCL4, FAM120A, NOC1, C	0.36	1.56	<1.00E-03	1.45E-02		56	FAM120A, NPW1, HNRNP A1, CNA2
MYC_TARGETS_V1	195	111	FAM120A, CDC20, NPW1, HNRNP A1	0.56	2.50	<1.00E-03	<1.00E-03	up T vs. NT	66	TNCF, PLAU, PTGS2, CXCL1, FOSL1, ATF3, GEM	-0.50	-2.18	<1.00E-03	<1.00E-03	down TR vs T	22	CCR2, NFKBIA, SMAD3, DLDR, BHLR
TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	174	65	NFE2L3, ETS2, ID2, TRAF1, HES1, PE	-0.39	-1.57	<1.00E-03	2.98E-02		41	IL8, HAS2, HBEFG, SERPINE1, TNFSF15, EMP3	-0.44	-1.91	<1.00E-03	1.47E-03	down TR vs T	12	CCR2, IRAK2, NFKBIA, DLDR, SCARF3
INFLAMMATORY_RESPONSE	147	36	CCR2, IRAK2, NFKBIA, AHR, FFA2	-0.37	-1.47	9.09E-03	4.78E-02		24	WDR7A, NPW1, PHLB, BSL, WDR43, RRP5, NNO	0.50	1.78	<1.00E-03	1.59E-03	up TR vs. T	4	NPW1, LUN5, MRT0A, NOP36
MYC_TARGETS_V2	56	17	PLXNA1, NPW1, UTP20, PLX1, PA2G4, I	0.45	1.64	2.77E-03	6.30E-03	up T vs. NT	25	IFIH1, IRAD3, MRL1, AMPA3, F127, SAMOPL, I	-0.49	-1.95	<1.00E-03	1.24E-03	down TR vs T	20	NCOAT1, WARS, HLA-C, SAMOBL, GBP
INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	92	55	EP2AK2, FANF1A, B2M, NCOAT1, W	-0.83	-3.07	<1.00E-03	<1.00E-03	down T vs. NT	41	IFIH1, PTGS2, R5A2D, MX1, M2, F127, SECT	-0.39	-1.72	<1.00E-03	5.53E-03	down TR vs T	26	WARS, ST3GAL5, PML, SAMOPL, ICA
INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	165	72	EP2AK2, ZBP1, B2M, WARS, ST3GA	-0.72	-2.91	<1.00E-03	<1.00E-03	down T vs. NT	110	COX17, ATP8V1D, SLC25A5, AIFM1, COX1A2, I	0.48	2.07	<1.00E-03	<1.00E-03	up TR vs. T	26	NDUFV2, NDUF45, ISCA1, ECH1, NOL
OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	195	37	NDUFV2, NDUF45, ISCA1, ECH1, NOL	-0.11	-0.46	1.00E+00	1.00E+00		44	CNLS, SEMA3C, HSD17B4, CROT, ABCD1, PEK1	0.46	1.80	<1.00E-03	3.58E-03	up TR vs. T	21	FIS1, FOPB, PEM6, DHQ2, TSPQ, SCF2, P
PEROXISOME	92	31	ACOX1, SLC25A4, FIS1, FOPB, MVP	-0.36	-1.33	6.47E-02	1.26E-01		80	FH, MELP, PC8D1, REEP6, PSME1, CBR1, ENO3	0.44	1.75	1.69E-03	1.98E-03	up TR vs. T	31	DHCR24, ACSM3, REEP6, FASN, MLC3
FATTY_ACID_METABOLISM	141	45	DHCR24, ACSM3, REEP6, FASN, MLC	-0.40	-1.56	9.09E-03	2.53E-02										
			ABCA4, PEX11G, DHOR2A, PEX16, G							RXRRA, SLC35B2, CYP46A1, ALDH9A1, NR1J2							
			STK1, LCH2, PEX12, P4D3, CYP27A							HSD17B11, ABCA5, SCF2, RBP1, HACL1, PEX11							
			1,8MP1, ABCA2, SCD, PNP4L, R							5,6,7,8,12,24, OH2, PEX6, LONP2, SOD1, PEX7,							
			BPT1, ACSL5, PEYD, ITH1, EPW4U, L							NUOT1, ABCA5, SLC25A5, PEX2, PEXD3, P							
			PE, MYL10, RETSAT, LONP2, SLC22							EXL1PE, GNPAT, CAT, D1, PECA, MYO1D,							
			2618, PEX16, PROD5, ABCA5, TTR														
			OPTN1, LK, ACSL1, LK, D12, NHR9														
			B2							H1, ACSL1, CROT, NHR82	0.46	1.75	<1.00E-03	1,63E-03	up TR vs. T	17	
BILE_ACID_METABOLISM	87	33		-0.46	-1.71	<1.00E-03	9,16E-03	down T vs. NT	33								
			PCYT2, PHOCS1, SREBF2, FODT1A							HMGCR, TMEM97, ETHE1, FASN, PMVK, SQL							
			NTRD2, POK3, SCD, EBP, FAM129A							5, CSD5, NDC94, PCYT2, HMGCS1, STARD4, EBF							
			JAG1, TM7SF2, HMG, GRIK, SODL, DH							P, CPO1A1, DCHR7, D1, ACS2, MDM1, FOPD5,							
			GR, CP, P541, I, D1, TP53NP1, CP							HSD17B7, NP1L3, DPT1, LACT2, MYD2, TSP2, JPD							
			EB2, TRB9, PLSOR1, NP13, SODL														
			WJLDS5, HMGCS1, NP13, HSD17B														
			BT, STARDA4, NP043, ACS2, ALD														
				-0.68	-2.43	<1.00E-03	<1.00E-03	down T vs. NT	28	CS, L3SS, MYL, TP53NP1, LAJDC6	0.49	1.79	<1.00E-03	2,64E-03	up TR vs. T	21	2, LAJDC6
CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	70	31	OC						28								

Tableau supplémentaire 2. Métagènes et core gènes.