



HAL
open science

**L'induction d'un processus de transition
épithélio-mésenchymateuse in vitro révèle une signature
transcriptomique pronostique de la survie sans rechute
du cancer colorectal**

Maria Lucia Liberatoscioli

► **To cite this version:**

Maria Lucia Liberatoscioli. L'induction d'un processus de transition épithélio-mésenchymateuse in vitro révèle une signature transcriptomique pronostique de la survie sans rechute du cancer colorectal. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02967545

HAL Id: dumas-02967545

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02967545>

Submitted on 15 Oct 2020

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

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



Faculté des sciences
médicales et paramédicales
Aix-Marseille Université

**L'induction d'un processus de transition épithélio-mésenchymateuse
in vitro révèle une signature transcriptomique pronostique de la survie
sans rechute du cancer colorectal**

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DES SCIENCES MEDICALES ET PARAMEDICALES

DE MARSEILLE

Le 28 Avril 2020

Par Madame Maria Lucia LIBERATOSCIOLI

Née le 6 janvier 1977 à Guardiagrele (ITALIE)

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. de BIOLOGIE MÉDICALE

Membres du Jury de la Thèse :

Monsieur le Professeur BERTUCCI François	Président
Madame le Docteur (MCU-PH) GELSI-BOYER Véronique	Assesseur
Madame le Docteur (MCU-PH) MOTTOLA-GHIGO Giovanna	Assesseur
Madame le Docteur PALADINO Nunzia Cinzia	Assesseur

FACULTÉ DES SCIENCES MÉDICALES & PARAMÉDICALES

Doyen	:	Pr. Georges LEONETTI
Vice-Doyen aux affaires générales	:	Pr. Patrick DESSI
Vice-Doyen aux professions paramédicales	:	Pr. Philippe BERBIS
Conseiller	:	Pr. Patrick VILLANI

Asseseurs :

➤ aux études	:	Pr. Kathia CHAUMOITRE
➤ à la recherche	:	Pr. Jean-Louis MEGE
➤ à l'unité mixte de formation continue en santé	:	Pr. Justin MICHEL
➤ pour le secteur NORD	:	Pr. Stéphane BERDAH
➤ Groupements Hospitaliers de territoire	:	Pr. Jean-Noël ARGENSON
➤ aux masters	:	Pr. Pascal ADALIAN

Chargés de mission :

➤ sciences humaines et sociales	:	Pr. Pierre LE COZ
➤ relations internationales	:	Pr. Stéphane RANQUE
➤ DU/DIU	:	Pr. Véronique VITTON
➤ DPC, disciplines médicales & biologiques	:	Pr. Frédéric CASTINETTI
➤ DPC, disciplines chirurgicales	:	Dr. Thomas GRAILLON

ÉCOLE DE MEDECINE

Directeur	:	Pr. Jean-Michel VITON
------------------	---	------------------------------

Chargés de mission

▪ PACES – Post-PACES	:	Pr. Régis GUIEU
▪ DFGSM	:	Pr. Anne-Laure PELISSIER
▪ DFASM	:	Pr. Marie-Aleth RICHARD
▪ DFASM	:	Pr. Marc BARTHET
▪ Préparation aux ECN	:	Dr Aurélie DAUMAS
▪ DES spécialités	:	Pr. Pierre-Edouard FOURNIER
▪ DES stages hospitaliers	:	Pr. Benjamin BLONDEL
▪ DES MG	:	Pr. Christophe BARTOLI
▪ Démographie médicale	:	Dr. Noémie RESSEGUIER
▪ Etudiant	:	Elise DOMINJON

ÉCOLE DE DE MAIEUTIQUE

Directrice : **Madame Carole ZAKARIAN**

Chargés de mission

- 1^{er} cycle : Madame Estelle BOISSIER
- 2^{ème} cycle : Madame Cécile NINA

ÉCOLE DES SCIENCES DE LA RÉADAPTATION

Directeur : **Monsieur Philippe SAUVAGEON**

Chargés de mission

- Masso- kinésithérapie 1^{er} cycle : Madame Béatrice CAORS
- Masso-kinésithérapie 2^{ème} cycle : Madame Joannie HENRY
- Mutualisation des enseignements : Madame Géraldine DEPRES

ÉCOLE DES SCIENCES INFIRMIERES

Directeur : **Monsieur Sébastien COLSON**

Chargés de mission

- Chargée de mission : Madame Sandrine MAYEN RODRIGUES
- Chargé de mission : Monsieur Christophe ROMAN

PROFESSEURS HONORAIRES

MM AGOSTINI Serge
ALDIGHIERI René
ALESSANDRINI Pierre
ALLIEZ Bernard
AQUARON Robert
ARGEME Maxime
ASSADOURIAN Robert
AUFFRAY Jean-Pierre
AUTILLO-TOUATI Amapola
AZORIN Jean-Michel
BAILLE Yves
BARDOT Jacques
BARDOT André
BERARD Pierre
BERGOIN Maurice
BERLAND Yvon
BERNARD Dominique
BERNARD Jean-Louis
BERNARD Pierre-Marie
BERTRAND Edmond
BISSET Jean-Pierre
BLANC Bernard
BLANC Jean-Louis
BOLLINI Gérard
BONGRAND Pierre
BONNEAU Henri
BONNOIT Jean
BORY Michel
BOTTA Alain
BOURGEADE Augustin
BOUVENOT Gilles
BOUYALA Jean-Marie
BREMONT Georges
BRICOT René
BRUNET Christian
BUREAU Henri
CAMBOULIVES Jean
CANNONI Maurice
CARTOUZOU Guy
CAU Pierre
CHABOT Jean-Michel
CHAMLIAN Albert
CHARPIN Denis
CHARREL Michel
CHAUVEL Patrick
CHOUX Maurice
CIANFARANI François
CLAVERIE Jean-Michel
CLEMENT Robert
COMBALBERT André
CONTE-DEVOLX Bernard
CORRIOL Jacques
COULANGE Christian
DALMAS Henri
DE MICO Philippe
DESSEIN Alain
DELARQUE Alain
DEVIN Robert
DEVRED Philippe
DJIANE Pierre
DONNET Vincent
DUCASSOU Jacques

MM DUFOUR Michel
DUMON Henri
ENJALBERT Alain
FAVRE Roger
FIECHI Marius
FARNARIER Georges
FIGARELLA Jacques
FONTES Michel
FRANCES Yves
FRANCOIS Georges
FUENTES Pierre
GABRIEL Bernard
GALINIER Louis
GALLAIS Hervé
GAMERRE Marc
GARCIN Michel
GARNIER Jean-Marc
GAUTHIER André
GERARD Raymond
GEROLAMI-SANTANDREA André
GIUDICELLI Roger
GIUDICELLI Sébastien
GOUDARD Alain
GOUIN François
GRILLO Jean-Marie
GRISOLI François
GROULIER Pierre
HADIDA/SAYAG Jacqueline
HASSOUN Jacques
HEIM Marc
HOUEL Jean
HUGUET Jean-François
JAQUET Philippe
JAMMES Yves
JOUVE Paulette
JUHAN Claude
JUN Pierre
KAPHAN Gérard
KASBARIAN Michel
KLEISBAUER Jean-Pierre
LACHARD Jean
LAFFARGUE Pierre
LAUGIER René
LE TREUT Yves
LEVY Samuel
LOUCHET Edmond
LOUIS René
LUCIANI Jean-Marie
MAGALON Guy
MAGNAN Jacques
MALLAN- MANCINI Josette
MALMEJAC Claude
MARANINCHI Dominique
MARTIN Claude
MATTEI Jean François
MERCIER Claude
METGE Paul
MICHOTÉY Georges
MIRANDA François
MONFORT Gérard
MONGES André
MONGIN Maurice

PROFESSEURS HONORAIRES

MM MONTIES Jean-Raoul
NAZARIAN Serge
NICOLI René
NOIRCLERC Michel
OLMER Michel
OREHEK Jean
PAPY Jean-Jacques
PAULIN Raymond
PELOUX Yves
PENAUD Antony
PENE Pierre
PIANA Lucien
PICAUD Robert
PIGNOL Fernand
POGGI Louis
POITOUT Dominique
PONCET Michel
POUGET Jean
PRIVAT Yvan
QUILICHINI Francis
RANQUE Jacques
RANQUE Philippe
RICHAUD Christian
RIDINGS Bernard
ROCHAT Hervé
ROHNER Jean-Jacques
ROUX Hubert
ROUX Michel
RUFO Marcel
SAHEL José
SALAMON Georges
SALDUCCI Jacques
SAN MARCO Jean-Louis
SANKALE Marc
SARACCO Jacques
SARLES Jacques
SASTRE Bernard
SCHIANO Alain
SCOTTO Jean-Claude
SEBAHOUN Gérard
SERMENT Gérard
SOULAYROL René
STAHL André
TAMALET Jacques
TARANGER-CHARPIN Colette
THOMASSIN Jean-Marc
UNAL Daniel
VAGUE Philippe
VAGUE/JUHAN Irène
VANUXEM Paul
VERVLOET Daniel
VIALETTES Bernard
WEILLER Pierre-Jean

EMERITAT

2008

M. le Professeur	LEVY Samuel	31/08/2011
Mme le Professeur	JUHAN-VAGUE Irène	31/08/2011
M. le Professeur	PONCET Michel	31/08/2011
M. le Professeur	KASBARIAN Michel	31/08/2011
M. le Professeur	ROBERTOUX Pierre	31/08/2011

2009

M. le Professeur	DJIANE Pierre	31/08/2011
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2012

2010

M. le Professeur	MAGNAN Jacques	31/12/2014
------------------	----------------	------------

2011

M. le Professeur	DI MARINO Vincent	31/08/2015
M. le Professeur	MARTIN Pierre	31/08/2015
M. le Professeur	METRAS Dominique	31/08/2015

2012

M. le Professeur	AUBANIAC Jean-Manuel	31/08/2015
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2015
M. le Professeur	CAMBOULIVES Jean	31/08/2015
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2015
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2015
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2015
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2015

2013

M. le Professeur	BRANCHEREAU Alain	31/08/2016
M. le Professeur	CARAYON Pierre	31/08/2016
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2016
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2016
M. le Professeur	HENRY Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	LE GUICHAOUA Marie-Roberte	31/08/2016
M. le Professeur	RUFO Marcel	31/08/2016
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2016

2014

M. le Professeur	FUENTES Pierre	31/08/2017
M. le Professeur	GAMERRE Marc	31/08/2017
M. le Professeur	MAGALON Guy	31/08/2017
M. le Professeur	PERAGUT Jean-Claude	31/08/2017
M. le Professeur	WEILLER Pierre-Jean	31/08/2017

2015

M. le Professeur	COULANGE Christian	31/08/2018
M. le Professeur	COURAND François	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2016
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2016
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2016

EMERITAT

2016

M. le Professeur	BONGRAND Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2017
M. le Professeur	BRUNET Christian	31/08/2019
M. le Professeur	CAU Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2017
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2017
M. le Professeur	FONTES Michel	31/08/2019
M. le Professeur	JAMMES Yves	31/08/2019
M. le Professeur	NAZARIAN Serge	31/08/2019
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2017
M. le Professeur	POITOUT Dominique	31/08/2019
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2017
M. le Professeur	VIALETES Bernard	31/08/2019

2017

M. le Professeur	ALESSANDRINI Pierre	31/08/2020
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2018
M. le Professeur	CHAUVEL Patrick	31/08/2020
M. le Professeur	COZZONE Pierre	31/08/2018
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2018
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2018
M. le Professeur	SEBBAHOUN Gérard	31/08/2018

2018

M. le Professeur	MARANINCHI Dominique	31/08/2021
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2019
M. le Professeur	COZZONE Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2019
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2019
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2019

2019

M. le Professeur	BERLAND Yvon	31/08/2022
M. le Professeur	CHARPIN Denis	31/08/2022
M. le Professeur	CLAVERIE Jean-Michel	31/08/2022
M. le Professeur	FRANCES Yves	31/08/2022
M. le Professeur	CAU Pierre	31/08/2020
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2020
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2020
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2020
M. le Professeur	FONTES Michel	31/08/2020
M. le Professeur	MAGALON Guy	31/08/2020
M. le Professeur	NAZARIAN Serge	31/08/2020
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2020
M. le Professeur	WEILLER Pierre-Jean	31/08/2020

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AGOSTINI FERRANDES Aubert	CHOSSEGROS Cyrille	GUEDJ Eric
ALBANESE Jacques	COLLART Frédéric	GUIEU Régis
ALIMI Yves	COSTELLO Régis	GUIS Sandrine
AMABILE Philippe	COURBIERE Blandine	GUYE Maxime
AMBROSI Pierre	COWEN Didier	GUYOT Laurent
ANDRE Nicolas	CRAVELLO Ludovic	<i>GUYS Jean-Michel Surnombre</i>
ARGENSON Jean-Noël	CUISSET Thomas	HABIB Gilbert
ASTOUL Philippe	<i>CURVALE Georges Surnombre</i>	HARDWIGSEN Jean
ATTARIAN Shahram	DA FONSECA David	HARLE Jean-Robert
AUDOUIN Bertrand	DAHAN-ALCARAZ Laetitia	<i>HOFFART Louis Disponibilité</i>
AUQUIER Pascal	DANIEL Laurent	HOUVENAEGHEL Gilles
AVIERINOS Jean-François	DARMON Patrice	JACQUIER Alexis
AZULAY Jean-Philippe	D'ERCOLE Claude	JOURDE-CHICHE Noémie
BAILLY Daniel	D'JOURNO Xavier	JOUVE Jean-Luc
BARLESI Fabrice	DEHARO Jean-Claude	KAPLANSKI Gilles
BARLIER-SETTI Anne	DELAPORTE Emmanuel	KARSENTY Gilles
BARTHET Marc	<i>DELPERO Jean-Robert Surnombre</i>	<i>KERBAUL François détachement</i>
BARTOLI Christophe	DENIS Danièle	KRAHN Martin
BARTOLI Jean-Michel	DISDIER Patrick	LAFFORGUE Pierre
BARTOLI Michel	DODDOLI Christophe	LAGIER Jean-Christophe
BARTOLOMEI Fabrice	DRANCOURT Michel	LAMBAUDIE Eric
BASTIDE Cyrille	DUBUS Jean-Christophe	LANCON Christophe
BENSOUSSAN Laurent	DUFFAUD Florence	LA SCOLA Bernard
BERBIS Philippe	DUFOUR Henry	LAUNAY Franck
BERBIS Julie	DURAND Jean-Marc	LAVIEILLE Jean-Pierre
BERDAH Stéphane	DUSSOL Bertrand	LE CORROLLER Thomas
<i>BERNARD Jean-Paul Retraite au 25/11/2019</i>	EBBO Mikaël	LECHEVALLIER Eric
BEROUD Christophe	EUSEBIO Alexandre	LEGRE Régis
BERTUCCI François	FAKHRY Nicolas	LEHUCHER-MICHEL Marie-Pascale
BLAISE Didier	<i>FAUGERE Gérard Surnombre</i>	LEONE Marc
BLIN Olivier	FELICIAN Olivier	LEONETTI Georges
BLONDEL Benjamin	FENOLLAR Florence	LEPIDI Hubert
BONIN/GUILLAUME Sylvie	FIGARELLA/BRANGER Dominique	LEVY Nicolas
BONELLO Laurent	FLECHER Xavier	MACE Loïc
BONNET Jean-Louis	FOURNIER Pierre-Edouard	MAGNAN Pierre-Edouard
<i>BOTTA/FRIDLUND Danielle Surnombre</i>	FRANCESCHI Frédéric	MANCINI Julien
<i>BOUBLI Léon Surnombre</i>	FUENTES Stéphane	<i>MATONTI Frédéric Disponibilité</i>
BOUFI Mourad	GABERT Jean	MEGE Jean-Louis
BOYER Laurent	GABORIT Bénédicte	MERROT Thierry
BREGEON Fabienne	GAINNIER Marc	METZLER/GUILLEMAIN Catherine
BRETELLE Florence	GARCIA Stéphane	MEYER/DUTOUR Anne
BROUQUI Philippe	GARIBOLDI Vlad	MICCALEF/ROLL Joëlle
BRUDER Nicolas	GAUDART Jean	MICHEL Fabrice
BRUE Thierry	GAUDY-MARQUESTE Caroline	MICHEL Gérard
BRUNET Philippe	GENTILE Stéphanie	MICHEL Justin
BURTEY Stéphane	GERBEAUX Patrick	MICHELET Pierre
CARCOPINO-TUSOLI Xavier	GEROLAMI/SANTANDREA René	MILH Mathieu
CASANOVA Dominique	GILBERT/ALESSI Marie-Christine	MILLION Matthieu
CASTINETTI Frédéric	GIORGI Roch	MOAL Valérie
CECCALDI Mathieu	GIOVANNI Antoine	MORANGE Pierre-Emmanuel
CHAGNAUD Christophe	GIRARD Nadine	MOULIN Guy
CHAMBOST Hervé	GIRAUD/CHABROL Brigitte	MOUTARDIER Vincent
CHAMPSAUR Pierre	GONCALVES Anthony	<i>MUNDLER Olivier Surnombre</i>
CHANEZ Pascal	GRANEL/REY Brigitte	NAUDIN Jean
CHARAFFE-JAUFFRET Emmanuelle	GRANVAL Philippe	NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier
CHARREL Rémi	GREILLIER Laurent	NICOLLAS Richard
CHAUMOITRE Kathia	GRIMAUD Jean-Charles	OLIVE Daniel
CHIARONI Jacques	GROB Jean-Jacques	OUAFIK L'Houcine
CHINOT Olivier		OVAERT-REGGIO Caroline

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

PAGANELLI Franck	ROCH Antoine	TRIGLIA Jean-Michel
PANUEL Michel	ROCHWERGER Richard	TROPIANO Patrick
PAPAZIAN Laurent	ROLL Patrice	TSIMARATOS Michel
PAROLA Philippe	ROSSI Dominique	TURRINI Olivier
<i>PARRATTE Sébastien Disponibilité</i>	ROSSI Pascal	VALERO René
PELISSIER-ALICOT Anne-Laure	ROUDIER Jean	VAROQUAUX Arthur Damien
PELLETIER Jean	SALAS Sébastien	VELLY Lionel
PERRIN Jeanne	<i>SAMBUC Roland Surnombre</i>	VEY Norbert
PETIT Philippe	SARLES/PHILIP Nicole	VIDAL Vincent
PHAM Thao	SARLON-BARTOLI Gabrielle	VIENS Patrice
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique	SCAVARDA Didier	VILLANI Patrick
PIQUET Philippe	SCHLEINITZ Nicolas	VITON Jean-Michel
PIRRO Nicolas	SEBAG Frédéric	VITTON Véronique
POINSO François	SEITZ Jean-François	VIEHWEGER Heide Elke
RACCAH Denis	SIELEZNEFF Igor	VIVIER Eric
RANQUE Stéphane	SIMON Nicolas	XERRI Luc
RAOULT Didier	STEIN Andréas	
REGIS Jean	TAIEB David	
REYNAUD/GAUBERT Martine	THIRION Xavier	
REYNAUD Rachel	THOMAS Pascal	
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth	THUNY Franck	
ROCHE Pierre-Hugues	TREBUCHON-DA FONSECA Agnès	

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

ADALIAN Pascal
AGHABABIAN Valérie
BELIN Pascal
CHABANNON Christian
CHABRIERE Eric
FERON François
LE COZ Pierre
LEVASSEUR Anthony
RANJEVA Jean-Philippe
SOBOL Hagay

PROFESSEUR CERTIFIE

BRANDENBURGER Chantal

PRAG

TANTI-HARDOUIN Nicolas

PROFESSEUR DES UNIVERSITES MEDECINE GENERALE

GENTILE Gaëtan

PROFESSEUR ASSOCIE DE MEDECINE GENERALE A MI-TEMPS

ADNOT Sébastien
GUIDA Pierre

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES (disciplines médicales)

LOUIS-BORRIONE Claude

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AHERFI Sarah	ELDIN Carole	NINOVE Laetitia
ANGELAKIS Emmanouil (<i>disponibilité</i>)	FABRE Alexandre	NOUGAIREDE Antoine
ATLAN Catherine (<i>disponibilité</i>)	FAURE Alice	OLLIVIER Matthieu
BARTHELEMY Pierre	FOLETTI Jean- Marc	PAULMYER/LACROIX Odile
BEGE Thierry	FOUILLOUX Virginie	PESENTI Sébastien
BELIARD Sophie	FRANKEL Diane	RADULESCO Thomas
BENYAMINE Audrey	FROMNOT Julien	RESSEGUIER Noémie
BERGE-LEFRANC Jean-Louis	GASTALDI Marguerite	ROBERT Philippe
BERTRAND Baptiste	GELSI/BOYER Véronique	ROMANET Pauline
BEYER-BERJOT Laura	GIUSIANO Bernard	SABATIER Renaud
BIRNBAUM David	GIUSIANO COURCAMBECK Sophie	SARI-MINODIER Irène
BONINI Francesca	GONZALEZ Jean-Michel	SAVEANU Alexandru
BOUCRAUT Joseph	GOURIET Frédérique	SECQ Véronique (<i>disponibilité</i>)
BOULAMERY Audrey	GRAILLON Thomas	STELLMANN Jan-Patrick
BOULLU/CIOCCA Sandrine	GUERIN Carole	SUCHON Pierre
BOUSSEN Salah Michel	GUENOUN MEYSSIGNAC Daphné	TABOURET Emeline
BUFFAT Christophe	GUIDON Catherine	TOGA Caroline
CAMILLERI Serge	GUIVARCH Jokthan	TOGA Isabelle
CARRON Romain	HAUTIER/KRAHN Aurélie	TOMASINI Pascale
CASSAGNE Carole	HRAIECH Sami	TOSELLO Barthélémy
CERMOLACCE Michel	KASPI-PEZZOLI Elise	TROUSSE Delphine
CHAUDET Hervé	L'OLLIVIER Coralie	TUCHTAN-TORRENTS Lucile
CHRETIEN Anne-Sophie	LABIT-BOUVIER Corinne	VELY Frédéric
COZE Carole	LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina	VION-DURY Jean
CUNY Thomas	LAGIER Aude (<i>disponibilité</i>)	ZATTARA/CANNONI Hélène
DADOUN Frédéric (<i>disponibilité</i>)	LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude	
DALES Jean-Philippe	LEVY/MOZZICONACCI Annie	
DAUMAS Aurélie	LOOSVELD Marie	
DEGEORGES/VITTE Joëlle	MAAROUF Adil	
DELLIAUX Stéphane	MACAGNO Nicolas	
DESPLAT/JEGO Sophie	MAUES DE PAULA André	
DEVILLIER Raynier	MOTTOLA GHIGO Giovanna	
DUBOURG Grégory	NGUYEN PHONG Karine	
DUCONSEIL Pauline		
DUFOUR Jean-Charles		

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

(mono-appartenants)

ABU ZAINEH Mohammad	DEGIOANNI/SALLE Anna	POUGET Benoît
BARBACARU/PERLES T. A.	DESNUES Benoît	RUEL Jérôme
BERLAND/BENHAIM Caroline	MARANINCHI Marie	THOLLON Lionel
BOUCAULT/GARROUSTE Françoise	MERHEJ/CHAUVEAU Vicky	THIRION Sylvie
BOYER Sylvie	MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte	VERNA Emeline
COLSON Sébastien	POGGI Marjorie	

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

CASANOVA Ludovic

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE à MI-TEMPS

BARGIER Jacques
BONNET Pierre-André
CALVET-MONTREDON Céline
JANCZEWSKI Aurélie
NUSSLI Nicolas
ROUSSEAU-DURAND Raphaëlle
THERY Didier (nomination au 1/10/2019)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE à MI-TEMPS

BOURRIQUEN Maryline
EVANS-VIALLAT Catherine
LUCAS Guillaume
MATHIEU Marion
MAYENS-RODRIGUES Sandrine
MELLINAS Marie
REVIS Joana
ROMAN Christophe
TRINQUET Laure

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES et MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS
PROFESSEURS ASSOCIES, MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES mono-appartenants**

ANATOMIE 4201

CHAMPSAUR Pierre (PU-PH)
LE CORROLLER Thomas (PU-PH)
PIRRO Nicolas (PU-PH)

GUENOUN-MEYSSIGNAC Daphné (MCU-PH)
LAGIER Aude (MCU-PH) *disponibilité*

THOLLON Lionel (MCF) (60ème section)

ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES 4203

CHARAFE/JAUFFRET Emmanuelle (PU-PH)
DANIEL Laurent (PU-PH)
FIGARELLA/BRANGER Dominique (PU-PH)
GARCIA Stéphane (PU-PH)
XERRI Luc (PU-PH)

DALES Jean-Philippe (MCU-PH)
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie (MCU PH)
LABIT/BOUVIER Corinne (MCU-PH)
MACAGNO Nicolas (MCU-PH)
MAUES DE PAULA André (MCU-PH)
SECQ Véronique (MCU-PH) *disponibilité*

**ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE ;
MEDECINE URGENCE 4801**

ALBANESE Jacques (PU-PH)
BRUDER Nicolas (PU-PH)
LEONE Marc (PU-PH)
MICHEL Fabrice (PU-PH)
VELLY Lionel (PU-PH)

BOUSSEN Salah Michel (MCU-PH)
GUIDON Catherine (MCU-PH)

ANTHROPOLOGIE 20

ADALIAN Pascal (PR)

DEGIOANNI/SALLE Anna (MCF)
POUGET Benoît (MCF)
VERNA Emeline (MCF)

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE 4501

CHARREL Rémi (PU PH)
DRANCOURT Michel (PU-PH)
FENOLLAR Florence (PU-PH)
FOURNIER Pierre-Edouard (PU-PH)
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier (PU-PH)
LA SCOLA Bernard (PU-PH)
RAOULT Didier (PU-PH)

AHERFI Sarah (MCU-PH)
ANGELAKIS Emmanouil (MCU-PH) *disponibilité*
DUBOURG Grégory (MCU-PH)
GOURIET Frédérique (MCU-PH)
NOUGAIREDE Antoine (MCU-PH)
NINOVE Laetitia (MCU-PH)

CHABRIERE Eric (PR) (64ème section)

LEVASSEUR Anthony (PR) (64ème section)
DESNUES Benoit (MCF) (65ème section)
MERHEJ/CHAUVEAU Vicky (MCF) (87ème section)

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE 4401

BARLIER/SETTI Anne (PU-PH)
GABERT Jean (PU-PH)
GUIEU Régis (PU-PH)
OUAFIK L'Houcine (PU-PH)

BUFFAT Christophe (MCU-PH)
FROMNOT Julien (MCU-PH)
MOTTOLA GHIGO Giovanna (MCU-PH)
ROMANET Pauline (MCU-PH)
SAVEANU Alexandru (MCU-PH)

ANGLAIS 11

BRANDENBURGER Chantal (PRCE)

BIOLOGIE CELLULAIRE 4403

ROLL Patrice (PU-PH)

FRANKEL Diane (MCU-PH)
GASTALDI Marguerite (MCU-PH)
KASPI-PEZZOLI Elise (MCU-PH)
LEVY-MOZZICONNACCI Annie (MCU-PH)

**BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT
ET DE LA REPRODUCTION ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5405**

METZLER/GUILLEMAIN Catherine (PU-PH)
PERRIN Jeanne (PU-PH)
DRH Campus Timone

MAJ 01.09.2019

GUEDJ Eric (PU-PH)
 GUYE Maxime (PU-PH)
 MUNDLER Olivier (PU-PH) *Surnombre*
 TAIEB David (PU-PH)

BELIN Pascal (PR) (69ème section)
 RANJEVA Jean-Philippe (PR) (69ème section)

CAMMILLERI Serge (MCU-PH)
 VION-DURY Jean (MCU-PH)

BARBACARU/PERLES Teodora Adriana (MCF) (69ème section)

**BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE
 ET TECHNOLOGIES DE COMMUNICATION 4604**

GAUDART Jean (PU-PH)
 GIORGI Roch (PU-PH)
 MANCINI Julien (PU-PH)

CHAUDET Hervé (MCU-PH)
 DUFOUR Jean-Charles (MCU-PH)
 GIUSIANO Bernard (MCU-PH)

ABU ZAINEH Mohammad (MCF) (5ème section)
 BOYER Sylvie (MCF) (5ème section)

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE 5002

ARGENSON Jean-Noël (PU-PH)
 BLONDEL Benjamin (PU-PH)
 CURVALE Georges (PU-PH) *Surnombre*
 FLECHER Xavier (PU PH)
 PARRATTE Sébastien (PU-PH) *Disponibilité*
 ROCHWERGER Richard (PU-PH)
 TROPIANO Patrick (PU-PH)

OLLIVIER Matthieu (MCU-PH)

CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE 4702

BERTUCCI François (PU-PH)
 CHINOT Olivier (PU-PH)
 COWEN Didier (PU-PH)
 DUFFAUD Florence (PU-PH)
 GONCALVES Anthony (PU-PH)
 HOUVENAEGHEL Gilles (PU-PH)
 LAMBAUDIE Eric (PU-PH)
 SALAS Sébastien (PU-PH)
 VIENS Patrice (PU-PH)

SABATIER Renaud (MCU-PH)
 TABOURET Emeline (MCU-PH)

AVIERINOS Jean-François (PU-PH)
 BONELLO Laurent (PU PH)
 BONNET Jean-Louis (PU-PH)
 CUISSET Thomas (PU-PH)
 DEHARO Jean-Claude (PU-PH)
 FRANCESCHI Frédéric (PU-PH)
 HABIB Gilbert (PU-PH)
 PAGANELLI Franck (PU-PH)
 THUNY Franck (PU-PH)

CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE 5202

BERDAH Stéphane (PU-PH)
 DELPERO Jean-Robert (PU-PH) *Surnombre*
 HARDWIGSEN Jean (PU-PH)
 MOUTARDIER Vincent (PU-PH)
 SEBAG Frédéric (PU-PH)
 SIELEZNEFF Igor (PU-PH)
 TURRINI Olivier (PU-PH)

BEGE Thierry (MCU-PH)
 BEYER-BERJOT Laura (MCU-PH)
 BIRNBAUM David (MCU-PH)
 DUCONSEIL Pauline (MCU-PH)
 GUERIN Carole (MCU PH)

CHIRURGIE INFANTILE 5402

GUYE Jean-Michel (PU-PH) *Surnombre*
 JOUVE Jean-Luc (PU-PH)
 LAUNAY Franck (PU-PH)
 MERROT Thierry (PU-PH)
 VIEHWEGER Heide Elke (PU-PH)
 FAURE Alice (MCU PH)
 PESENTI Sébastien (MCU-PH)

LOUIS-BORRIONE Claude (PR associé des Universités)

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE 5503

CHOSSEGROS Cyrille (PU-PH)
 GUYOT Laurent (PU-PH)
 FOLETTI Jean-Marc (MCU-PH)

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE 5103

COLLART Frédéric (PU-PH)
 D'JOURNO Xavier (PU-PH)
 DODDOLI Christophe (PU-PH)
 GARIBOLDI Vlad (PU-PH)
 MACE Loïc (PU-PH)
 THOMAS Pascal (PU-PH)

FOUILLOUX Virginie (MCU-PH)
 TROUSSE Delphine (MCU-PH)

CHIRURGIE PLASTIQUE,**RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE ; BRÛLOGIE 5004**

CASANOVA Dominique (PU-PH)
 LEGRE Régis (PU-PH)

BERTRAND Baptiste (MCU-PH)
 HAUTIER/KRAHN Aurélie (MCU-PH)

CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE 5104

ALIMI Yves (PU-PH)
 AMABILE Philippe (PU-PH)
 BARTOLI Michel (PU-PH)
 BOUFI Mourad (PU-PH)
 MAGNAN Pierre-Edouard (PU-PH)
 PIQUET Philippe (PU-PH)
 SARLON-BARTOLI Gabrielle (PU PH)

HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE 4202

LEPIDI Hubert (PU-PH)
 LEPIDI Hubert (PU-PH)

PAULMYER/LACROIX Odile (MCU-PH)

GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE ; ADDICTOLOGIE 5201

BARTHET Marc (PU-PH)
BERNARD Jean-Paul (PU-PH) retraite au 25/11/2019
BOTTA-FRIDLUND Danielle (PU-PH) Surnombre
 DAHAN-ALCARAZ Laetitia (PU-PH)
 GEROLAMI-SANTANDREA René (PU-PH)
 GRANDVAL Philippe (PU-PH)
 GRIMAUD Jean-Charles (PU-PH)
 SEITZ Jean-François (PU-PH)
 VITTON Véronique (PU-PH)

GONZALEZ Jean-Michel (MCU-PH)

DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE 5003

BERBIS Philippe (PU-PH)
 DELAPORTE Emmanuel (PU-PH)
 GAUDY/MARQUESTE Caroline (PU-PH)
 GROB Jean-Jacques (PU-PH)
 RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth (PU-PH)

GENETIQUE 4704

BEROUD Christophe (PU-PH)
 KRAHN Martin (PU-PH)
 LEVY Nicolas (PU-PH)
 SARLES/PHILIP Nicole (PU-PH)

DUSI

COLSON Sébastien (MCF)

BOURRIQUEN Maryline (MAST)
 EVANS-VIALLAT Catherine (MAST)
 LUCAS Guillaume (MAST)
 MAYEN-RODRIGUES Sandrine (MAST)
 MELLINAS Marie (MAST)
 ROMAN Christophe (MAST)
 TRINQUET Laure (MAST)

NGYUEN Karine (MCU-PH)
 TOGA Caroline (MCU-PH)
 ZATTARA/CANNONI Hélène (MCU-PH)

GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5403

AGOSTINI Aubert (PU-PH)
BOUBLI Léon (PU-PH) Surnombre
 BRETELLE Florence (PU-PH)
 CARCOPINO-TUSOLI Xavier (PU-PH)
 COURBIERE Blandine (PU-PH)
 CRAVELLO Ludovic (PU-PH)
 D'ERCOLE Claude (PU-PH)

**ENDOCRINOLOGIE ,DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES ;
GYNECOLOGIE MEDICALE 5404**

BRUE Thierry (PU-PH)
 CASTINETTI Frédéric (PU-PH)
 CUNY Thomas (MCU PH)

AUQUIER Pascal (PU-PH)
 BERBIS Julie (PU-PH)
 BOYER Laurent (PU-PH)
 GENTILE Stéphanie (PU-PH)
 SAMBUC Roland (PU-PH) Surnombre
 THIRION Xavier (PU-PH)

BLAISE Didier (PU-PH)
 COSTELLO Régis (PU-PH)
 CHIARONI Jacques (PU-PH)
 GILBERT/ALESSI Marie-Christine (PU-PH)
 MORANGE Pierre-Emmanuel (PU-PH)
 VEY Norbert (PU-PH)

LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude (MCU-PH)
 RESSEGUIER Noémie (MCU-PH)

DEVILLIER Raynier (MCU PH)
 GELSI/BOYER Véronique (MCU-PH)
 LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina (MCU-PH)
 LOOSVELD Marie (MCU-PH)
 SUCHON Pierre (MCU-PH)

MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte (MCF)(06ème section)
 TANTI-HARDOUIN Nicolas (PRAG)

POGGI Marjorie (MCF) (64ème section)

IMMUNOLOGIE 4703

MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE 4603

KAPLANSKI Gilles (PU-PH)
 MEGE Jean-Louis (PU-PH)
 OLIVE Daniel (PU-PH)
 VIVIER Eric (PU-PH)

BARTOLI Christophe (PU-PH)
 LEONETTI Georges (PU-PH)
 PELISSIER-ALICOT Anne-Laure (PU-PH)
 PIERCECCHI-MARTI Marie-Dominique (PU-PH)

FERON François (PR) (69ème section)

TUCHTAN-TORRENTS Lucile (MCU-PH)

BOUCRAUT Joseph (MCU-PH)
 CHRETIEN Anne-Sophie (MCU PH)
 DEGEORGES/VITTE Joëlle (MCU-PH)
 DESPLAT/JEGO Sophie (MCU-PH)
 ROBERT Philippe (MCU-PH)
 VELY Frédéric (MCU-PH)

BERLAND/BENHAIM Caroline (MCF) (1ère section)

BOUCAULT/GARROUSTE Françoise (MCF) 65ème section)

MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION 4905

MALADIES INFECTIEUSES ; MALADIES TROPICALES 4503

BENSOUSSAN Laurent (PU-PH)
 VITON Jean-Michel (PU-PH)

BROUQUI Philippe (PU-PH)
 LAGIER Jean-Christophe (PU-PH)
 MILLION Matthieu (PU-PH)
 PAROLA Philippe (PU-PH)
 STEIN Andréas (PU-PH)

MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL 4602

LEHUCHER/MICHEL Marie-Pascale (PU-PH)

ELDIN Carole (MCU-PH)

BERGE-LEFRANC Jean-Louis (MCU-PH)
 SARI/MINODIER Irène (MCU-PH)

MEDECINE D'URGENCE 4805

KERBAUL François (PU-PH) détachement
 MICHELET Pierre (PU-PH)

MEDECINE INTERNE ; GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT ; ADDICTOLOGIE 5301

BONIN/GUILLAUME Sylvie (PU-PH)
 DISDIER Patrick (PU-PH)
 DURAND Jean-Marc (PU-PH)
 GRANEL/REY Brigitte (PU-PH)
 HARLE Jean-Robert (PU-PH)
 ROSSI Pascal (PU-PH)
 SCHLEINITZ Nicolas (PU-PH)

BENYAMINE Audrey (MCU-PH)

EBBO Mikael (MCU-PH)

DRH Campus Timone

MAJ 01.09.2019

GENTILE Gaëtan (PR Méd. Gén. Temps plein)

CASANOVA Ludovic (MCF Méd. Gén. Temps plein)

ADNOT Sébastien (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)

GUIDA Pierre (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)

BARGIER Jacques (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)

BONNET Pierre-André (MCF associé Méd. Gén à mi-temps)

CALVET-MONTREDON Céline (MCF associé Méd. Gén. à temps plein)

JANCZEWSKI Aurélie (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)

NUSSLI Nicolas (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)

ROUSSEAU-DURAND Raphaëlle (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)

THERY Didier (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps) (nomination au 1/10/2019)

NUTRITION 4404

DARMON Patrice (PU-PH)

RACCAH Denis (PU-PH)

VALERO René (PU-PH)

ATLAN Catherine (MCU-PH) disponibilité

BELIARD Sophie (MCU-PH)

MARANINCHI Marie (MCF) (66ème section)

ONCOLOGIE 65 (BIOLOGIE CELLULAIRE)

CHABANNON Christian (PR) (66ème section)

SOBOL Hagay (PR) (65ème section)

OPHTALMOLOGIE 5502

DENIS Danièle (PU-PH)

HOFFART Louis (PU-PH) Disponibilité

MATONTI Frédéric (PU-PH) Disponibilité

OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE 5501

DESSI Patrick (PU-PH)

FAKHRY Nicolas (PU-PH)

GIOVANNI Antoine (PU-PH)

LAVIEILLE Jean-Pierre (PU-PH)

MICHEL Justin (PU-PH)

NICOLLAS Richard (PU-PH)

TRIGLIA Jean-Michel (PU-PH)

RADULESCO Thomas (MCU-PH)

REVIS Joana (MAST) (Orthophonie) (7ème Section)

BRUNET Philippe (PU-PH)

BURTEY Stéphanie (PU-PH)

DUSSOL Bertrand (PU-PH)

JOURDE CHICHE Noémie (PU PH)

MOAL Valérie (PU-PH)

NEUROCHIRURGIE 4902

DUFOUR Henry (PU-PH)

FUENTES Stéphane (PU-PH)

REGIS Jean (PU-PH)

ROCHE Pierre-Hugues (PU-PH)

SCAVARDA Didier (PU-PH)

CARRON Romain (MCU PH)

GRAILLON Thomas (MCU PH)

NEUROLOGIE 4901

ATTARIAN Sharham (PU PH)

AUDOIN Bertrand (PU-PH)

AZULAY Jean-Philippe (PU-PH)

CECCALDI Mathieu (PU-PH)

EUSEBIO Alexandre (PU-PH)

FELICIAN Olivier (PU-PH)

PELLETIER Jean (PU-PH)

MAAROUF Adil (MCU-PH)

PEDOPSYCHIATRIE; ADDICTOLOGIE 4904

DA FONSECA David (PU-PH)

POINSO François (PU-PH)

GUIVARCH Jokthan (MCU-PH)

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE - PHARMACOLOGIE CLINIQUE; ADDICTOLOGIE 4803

BLIN Olivier (PU-PH)

FAUGERE Gérard (PU-PH) Surnombre

MICALLEF/ROLL Joëlle (PU-PH)

SIMON Nicolas (PU-PH)

BOULAMERY Audrey (MCU-PH)

RANQUE Stéphane (PU-PH)

LE COZ Pierre (PR) (17ème section)

CASSAGNE Carole (MCU-PH)

MATHIEU Marion (MAST)

L'OLLIVIER Coralie (MCU-PH)

TOGA Isabelle (MCU-PH)

PHYSIOLOGIE 4402**PEDIATRIE 5401**

ANDRE Nicolas (PU-PH)

BARTOLOMEI Fabrice (PU-PH)

CHAMBOST Hervé (PU-PH)

BREGEON Fabienne (PU-PH)

DUBUS Jean-Christophe (PU-PH)

GABORIT Bénédicte (PU-PH)

GIRAUD/CHABROL Brigitte (PU-PH)

MEYER/DUTOUR Anne (PU-PH)

MICHEL Gérard (PU-PH)

TREBUCHON/DA FONSECA Agnès (PU-PH)

MILH Mathieu (PU-PH)

BARTHELEMY Pierre (MCU-PH)

OVAERT-REGGIO Caroline (PU-PH)

BONINI Francesca (MCU-PH)

REYNAUD Rachel (PU-PH)

BOULLU/CIOCCA Sandrine (MCU-PH)

TSIMARATOS Michel (PU-PH)

DADOUN Frédéric (MCU-PH) (disponibilité)

DELLIAUX Stéphane (MCU-PH)

COZE Carole (MCU-PH)

RUEL Jérôme (MCF) (69ème section)

FABRE Alexandre (MCU-PH)

THIRION Sylvie (MCF) (66ème section)

TOSELLO Barthélémy (MCU-PH)

PSYCHIATRIE D'ADULTES ; ADDICTOLOGIE 4903**PNEUMOLOGIE; ADDICTOLOGIE 5101**

BAILLY Daniel (PU-PH)

ASTOUL Philippe (PU-PH)

LANCON Christophe (PU-PH)

BARLESI Fabrice (PU-PH)

NAUDIN Jean (PU-PH)

CHANEZ Pascal (PU-PH)

CERMOLACCE Michel (MCU-PH)

GREILLIER Laurent (PU PH)

PSYCHOLOGIE - PSYCHOLOGIE CLINIQUE, PCYCHOLOGIE SOCIALE 16

REYNAUD/GAUBERT Martine (PU-PH)

AGHABABIAN Valérie (PR)

TOMASINI Pascale (MCU-PH)

RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE 4302**RHUMATOLOGIE 5001**

BARTOLI Jean-Michel (PU-PH)

GUIS Sandrine (PU-PH)

CHAGNAUD Christophe (PU-PH)

LAFFORGUE Pierre (PU-PH)

CHAUMOITRE Kathia (PU-PH)

PHAM Thao (PU-PH)

GIRARD Nadine (PU-PH)

ROUDIER Jean (PU-PH)

JACQUIER Alexis (PU-PH)

MOULIN Guy (PU-PH)

PANUEL Michel (PU-PH)

PETIT Philippe (PU-PH)

VAROQUAUX Arthur Damien (PU-PH)

VIDAL Vincent (PU-PH)

THERAPEUTIQUE; MEDECINE D'URGENCE; ADDICTOLOGIE 4804

AMBROSI Pierre (PU-PH)

VILLANI Patrick (PU-PH)

STELLMANN Jan-Patrick (MCU-PH)

DAUMAS Aurélie (MCU-PH)

REANIMATION MEDICALE ; MEDECINE URGENCE 4802**UROLOGIE 5204**

GAINNIER Marc (PU-PH)

BASTIDE Cyrille (PU-PH)

GERBEAUX Patrick (PU-PH)

KARSENTY Gilles (PU-PH)

PAPAZIAN Laurent (PU-PH)

LECHEVALLIER Eric (PU-PH)

ROCH Antoine (PU-PH)

ROSSI Dominique (PU-PH)

HRAIECH Samir (MCU-PH)

MAJ 01.09.2019

Remerciements

Á...

Ma deuxième Thèse en Médecine !

J'espère que ça sera la dernière, mais sait-on jamais ?...La vie...

Oui, la Vie ! Je dédie cette thèse à la Vie, si imprévisible, si compliqué, tellement incroyable et magnifique !

Et à la liberté...la liberté des idées, de l'esprit, de sourire « malgré tout » et n'importe où...à la Vie.

Je dédie cette thèse à moi-même, à mes faiblesses, à ma propre force... « malgré tout » et n'importe où.

Á Marseille pour m'avoir appris que « tutto il mondo è paese » ... « malgré tout et n'importe où.

Á ma mère...le tout...« malgré tout » et n'importe où.

Á mon père, qui est toujours là...« malgré tout » et n'importe où.

Á «fratello Fedele» et à «la nuora». Á Cip et « ses maisons », à Po't. Á ma famille.

Á Dona et Witanaa, parce que « c'est de votre faute ! »

Á Sofiane, merci pour tout, mon ami !

et « attends !!!! on fait pas les canards, ici » , on n'oublie pas Baïdy !

Merci...

Merci à mon Président et à tout mon jury de thèse : merci d'avoir accepté d'être là, vous n'êtes pas là par hasard. Chacun de vous a joué un rôle fondamental pendant mon cursus d'études à Marseille.

Désolée pour ce remerciement peu officiel, mais il est « trop vrai » pour être officiel.

Merci Pr Fournier, vous n'êtes pas dans ma commission de Thèse. J'ai hésité jusqu'à la dernière minute, mais vous avez mieux à faire à l'IHU en ce moment historique particulier. Votre humanité est quelque chose de très rare.

Un « grande grazie » à Daniel Birnbaum qui m'a accueilli dans son laboratoire, je ne pouvais avoir meilleur cadeau.

Merci à Émilie et Claire, sans vous tout ça n'aurait pas été possible.

Merci à tout le groupe « Mangerrrr » du laboratoire pour tous les bons moments passé ensemble et à tous les techniciens du labo pour leur aide et leur présence humaine constante.

Merci à mes nouveaux amis de bureau, Arnaud et Pascal, pour m'avoir acceptée dans « le bureau des magies bioinformatiques ». Merci Pascal, pour m'avoir « traduit » l'incompréhensible avec une patience hors norme.

Merci à mes amis « marseillais » et à mes amis d'une vie ! Présence constante!

Merci Sandrine, merci Ivana, merci Fatma, merci Morgane, merci zia Josée.

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 consécutive 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.

Ces 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.

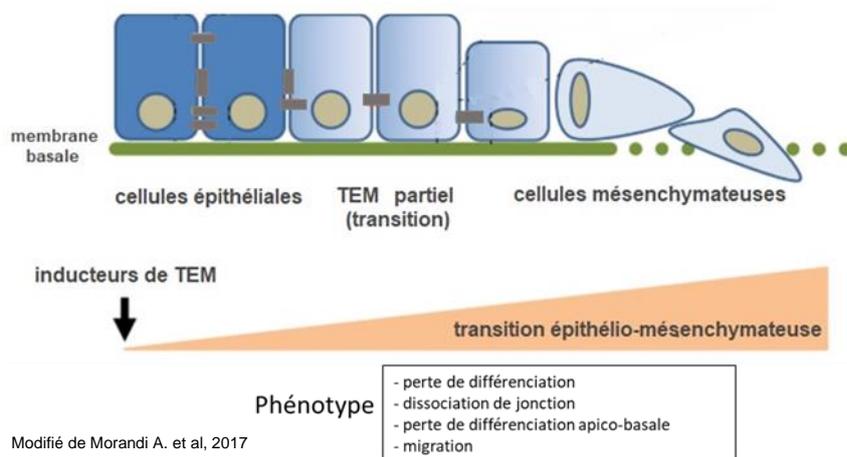


Figure 1. Caractéristiques générales de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

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 pangéome (*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 HT29ensemencées 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**).

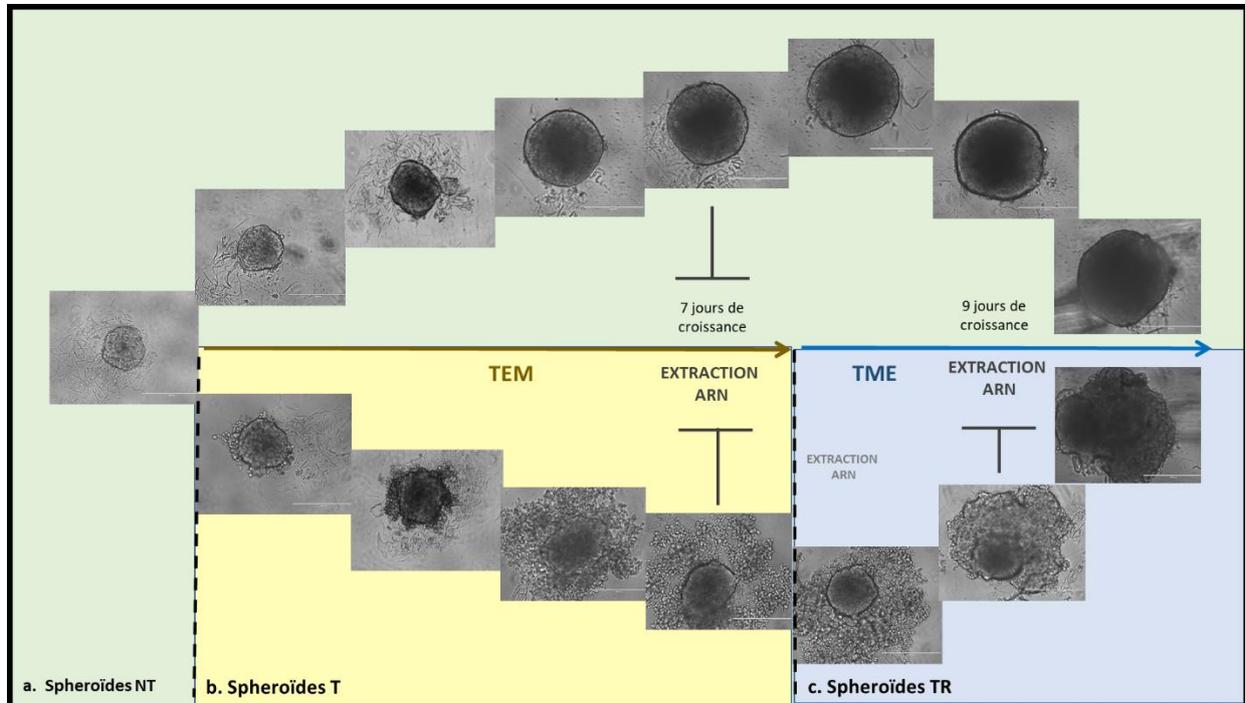


Figure 2. Phénotype des cellules traitées avec le StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement.
a, côté gauche (vert) : sphéroïde compact après 48 heures ; **a, partie supérieure (vert)** : sphéroïde NT, continue la croissance comme une sphéroïde dense ; **b (jaune)** : sphéroïdes T , il devient plus lâche 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.

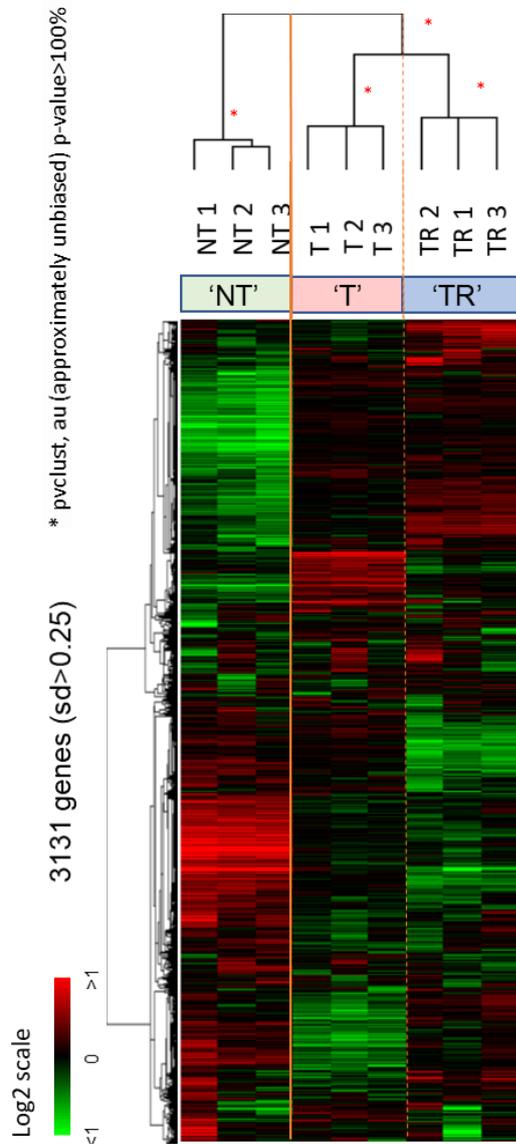
Cette première expérience montre que le supplément StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement induit un relâchement des sphéroïdes qui pourrait être assimilé à un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse en considération du fait que les cellules perdent leur capacité d'adhésion.

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 poussé, 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 prédominants 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 prédominante du TGF β , invasion stromale et angiogénèse). 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 ($p =$

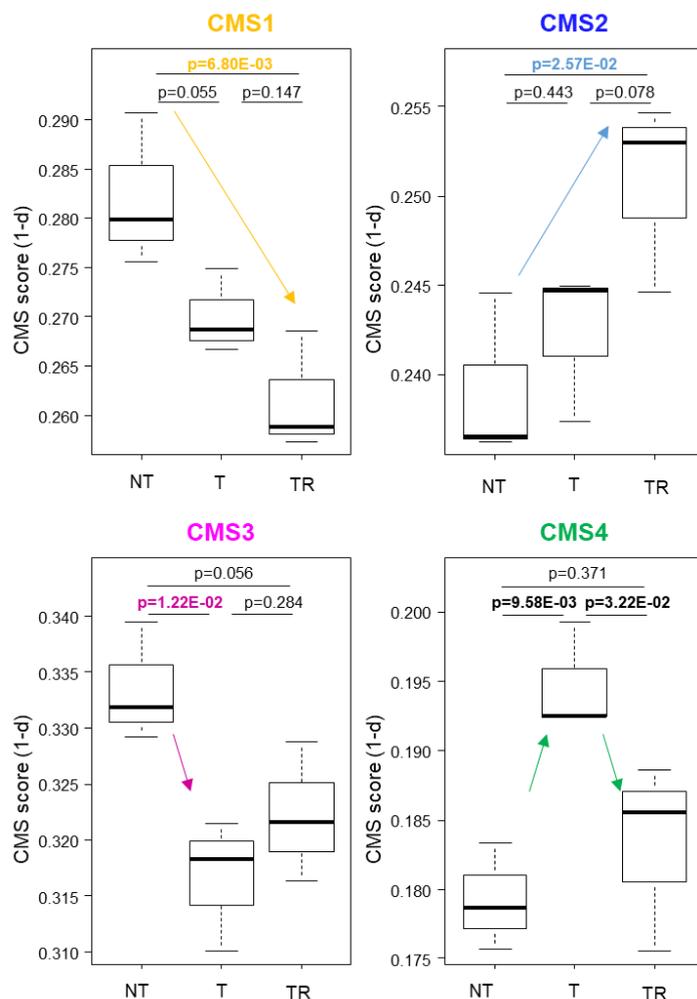


Figure 4. Évaluation du traitement sur les sous-types moléculaires consensus CMS.

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

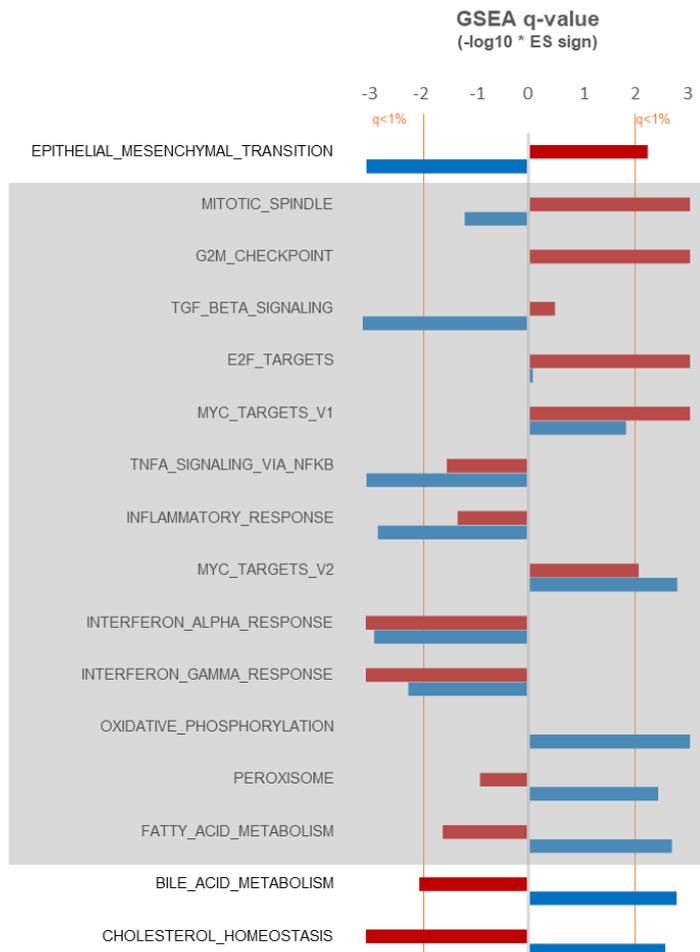


Figure 5. Construction de trois robustes métagenes corrélés avec l'induction de la TEM. Analyses supervisées effectuées avec l'algorithme Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). 16 gènes-set ont été régulés de manière différentielle dans au moins une condition : T vs NT ou TR vs T et suivantes. 3 de ces 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.

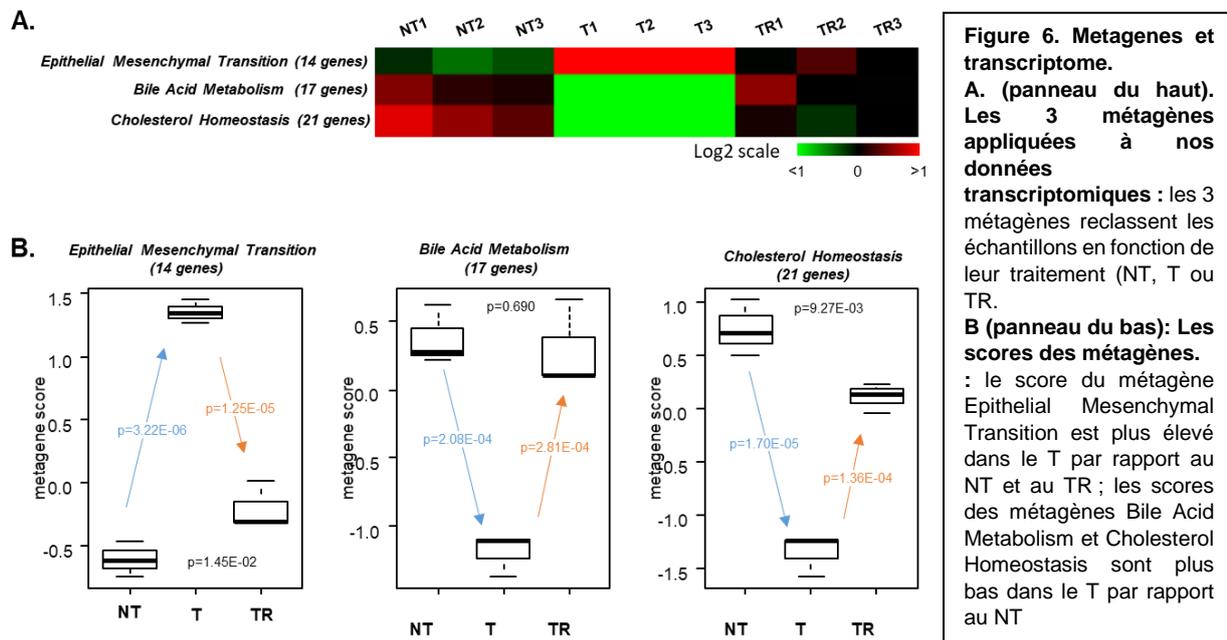
Ce set de gènes était composé de 22 gènes sur-exprimé dans les sphéroïdes T par rapport aux NT (q-value = 5,61E-03) et de 38 gènes

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 metagène *Epithelial Mesenchymal Transition* était composé de tumeurs plus agressives ou avancées (Tableau 3 ; Figure 7A).

'Epithelial Mesenchymal Transition'					'Bile Acid Metabolism'					'Cholesterol Homeostasis'				
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%)	359 (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 ($p = 1,61 E-42$). 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 metagène *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).

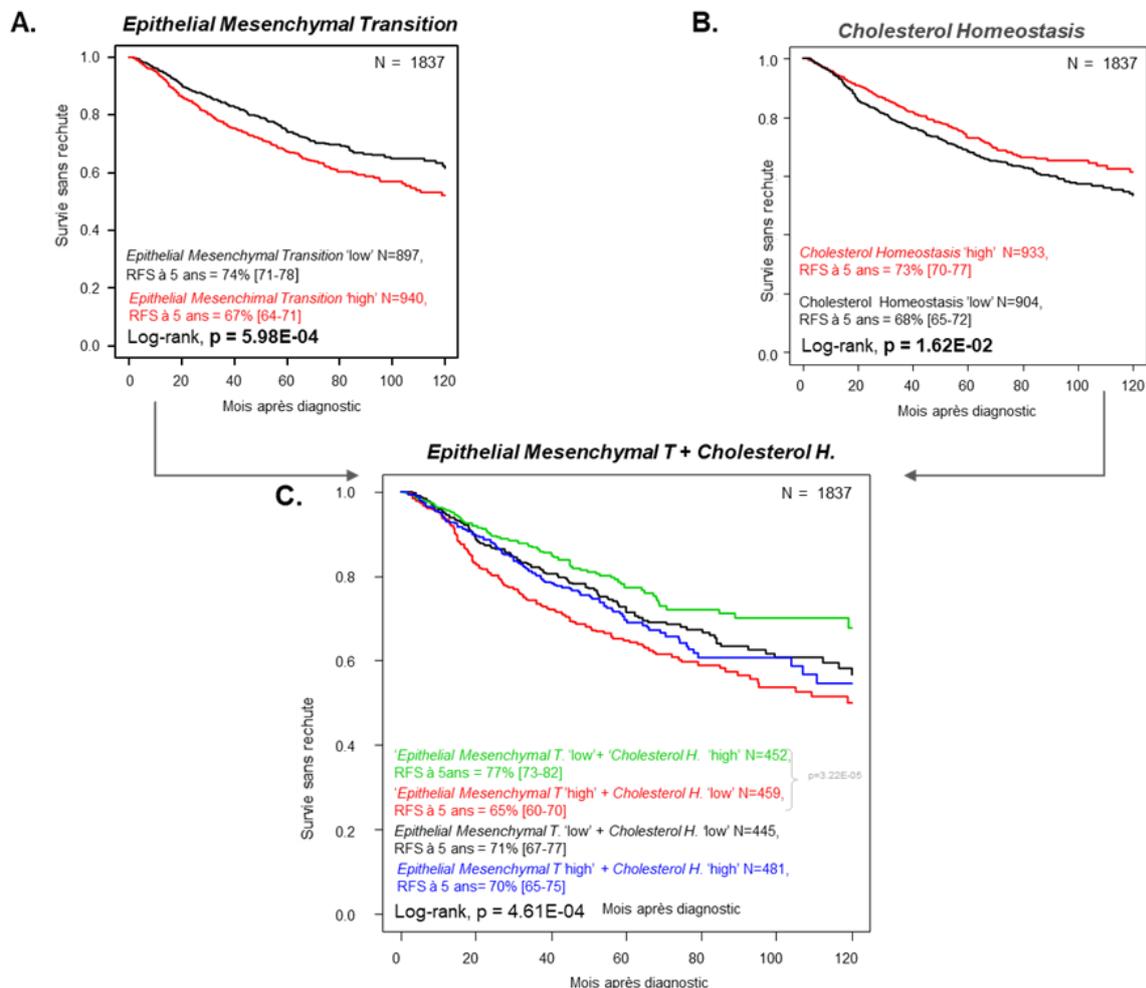


Figure 7 : RFS après corrélations de la base de données public COAD sur l'expression des métagènes (score naturel de 0 utilisé comme seuil pour définir un échantillon comme «high» ou «low» pour chaque métagène).
 A. panneau du haut-côté gauche : RFS in Kaplan-Meier sur le metagène Epithelial Mesenchymal 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 Mesenchimal Transition* and *Cholesterol Homeostasis* a montré une amélioration de la valeur pronostique à 5 ans.

Comme le métagène *Epithelial Mesenchimal 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 Mesenchimal 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

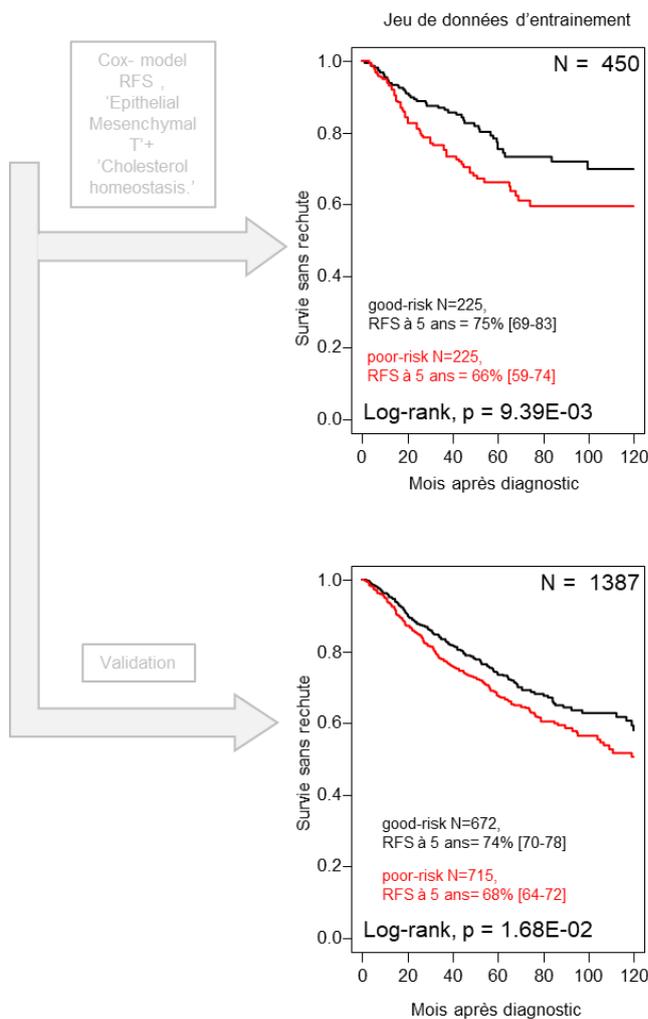


Figure 8. Modèle de survie à partir des métagènes *Epithelial Mesenchymal Transition* et *Cholesterol Homeostasis* fusionnées (« *Epithelial Mesenchymal Transition*+ *Cholesterol Homeostasis metagenes* model »)

A.(panneau du haut). Construction du modèle «COX-RFS *Epithelial Mesenchymal Transition*+ *Cholesterol homeostasis metagenes*», sur le « jeu de données de 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 modèle «*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 modèle «*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</i> model	poor vs. good	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

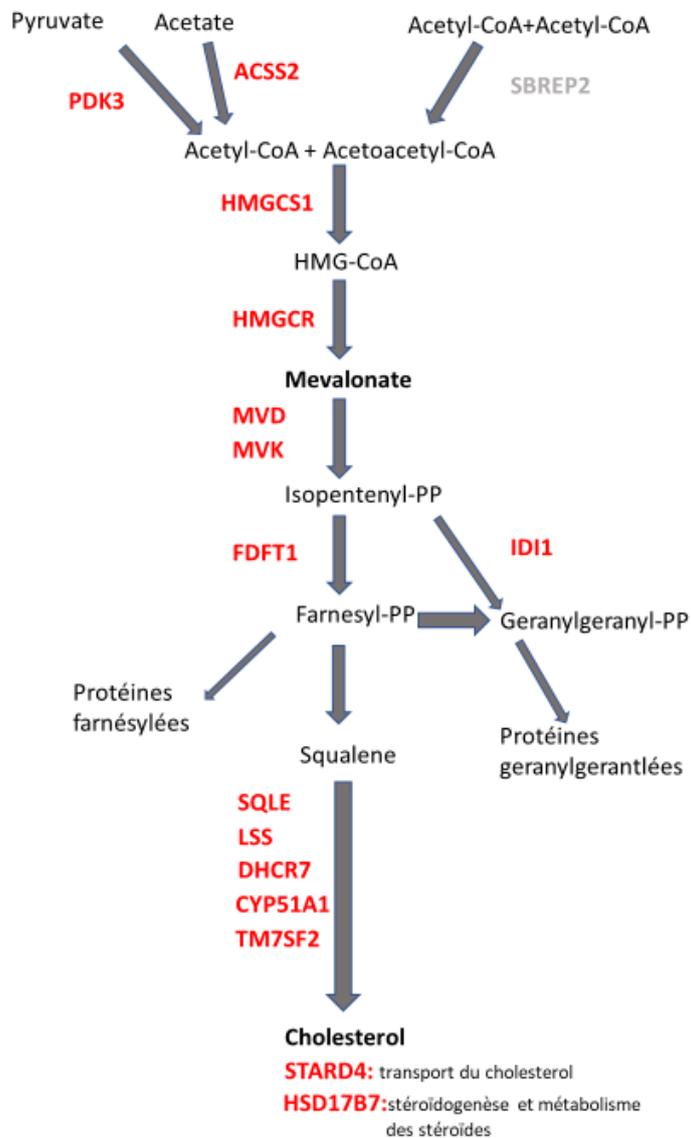
CYR61(49). D'autres études montrent que le CYR61 est surexprimé dans les cancers colorectaux et l'expression est corrélée avec un pronostic plus défavorable (50)

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 lié 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, HMGCR, SQLE, DHCR7, CYP51A1, IDI1, TP53INP1, NFIL3, MVD, LSS, HMGCS1, MVK, HSD17B7, STARD4, ACS2, ALDOC) parmi lequel sont présents des gènes phares de la voie du Mévalonate, comme la 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR) 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 géranylgeranyl

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 *Cholestérol Homeostasie* 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'HMGCR, 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 lipogénèse, 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 lipogénèse 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'OXPHOS 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' HMGCRCR (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, Kovacs 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, Concampion 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, Hornsveld 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, Sonesson 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, Marud, 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, Homicsko 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. Osteocalcin 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, Spsychalski 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

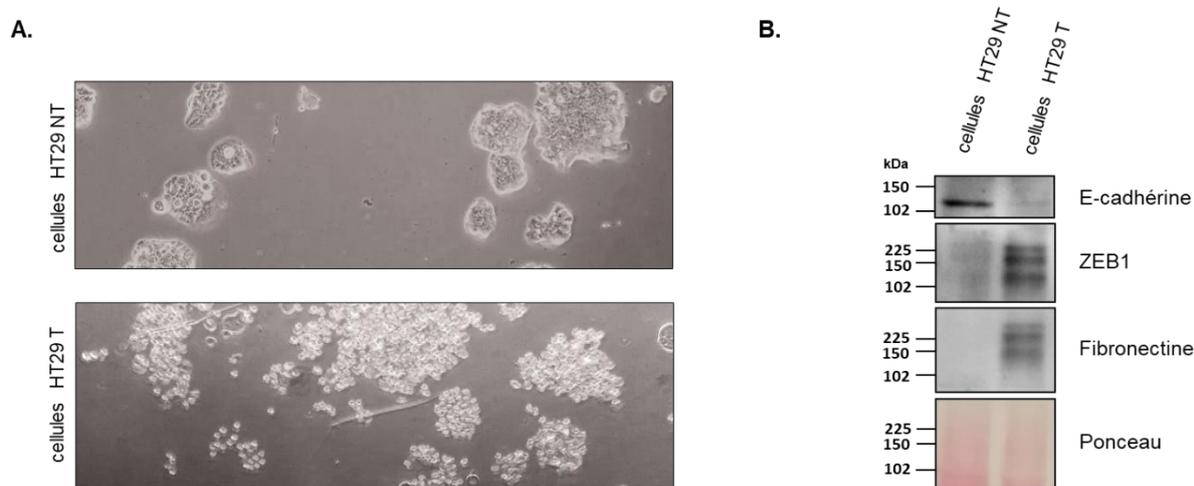


Figure supplémentaire 1. Tests de confirmation du StemXVivo® EMT Inducing Media Supplement en tant qu'inducteur d'EMT sur les cellules adhérentes de la lignée cellulaire du cancer du côlon HT29.

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*.

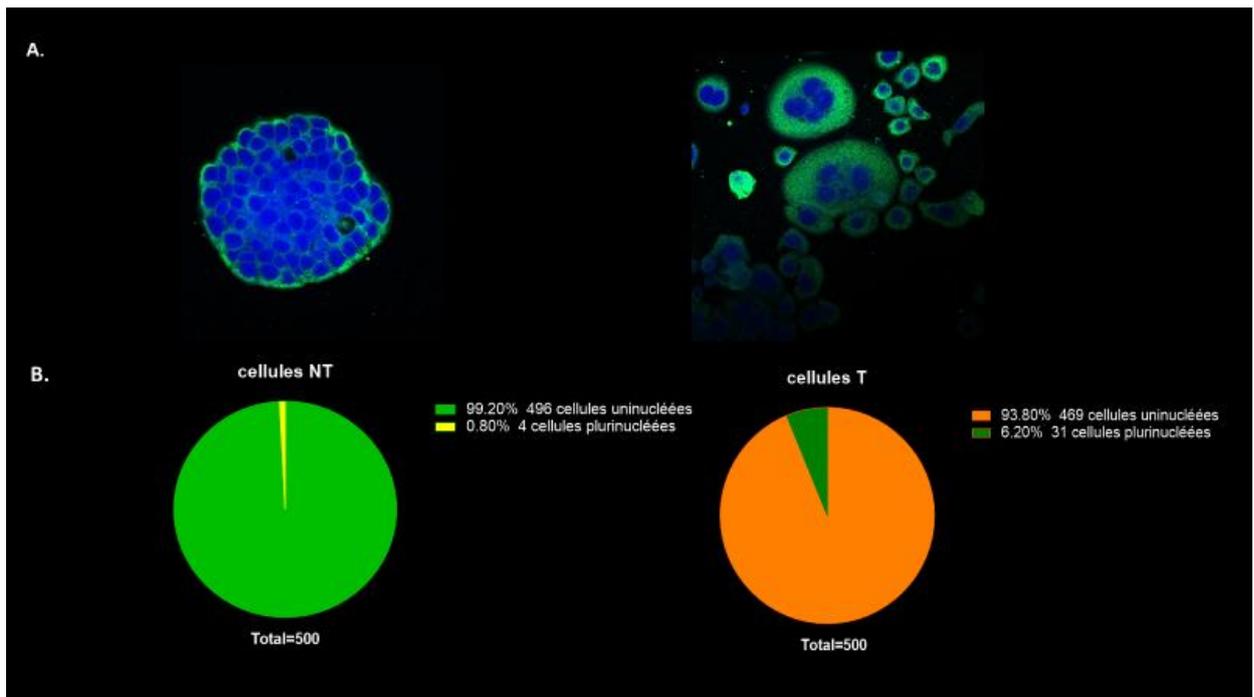


Figure supplémentaire 2. Observation et quantification, en Immunofluorescence , d'un phénomène connu en littérature (V. Comailss et al. ,2016)(21) comme conséquence de l'induction de la transition épithéliale-mésenchymateuse : l'apparition d'erreurs de cytokinèse avec formation conséquent de cellules 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.

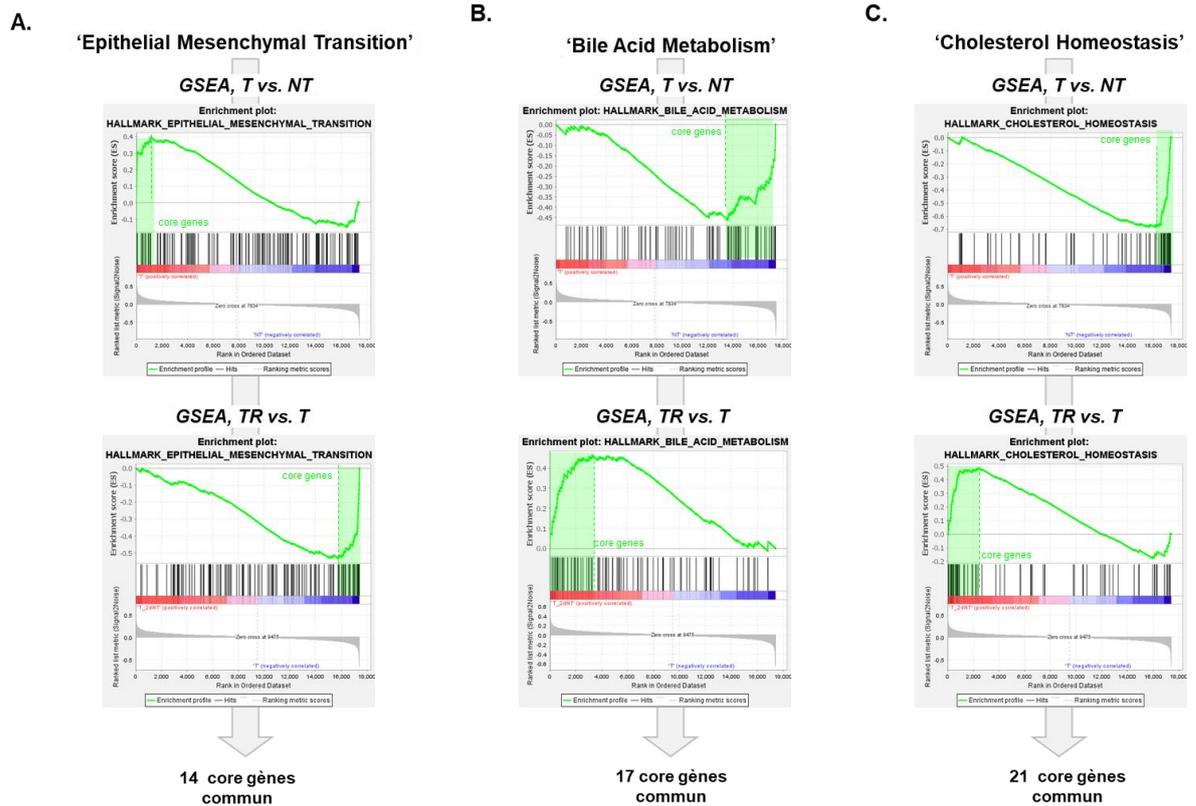


Figure supplémentaire 3. Graphiques d'enrichissement de GSEA comparant les profils d'expression génique des sphéroïdes T aux sphéroïdes NT (panel du haut) et des sphéroïdes TR aux sphéroïdes T (panel du bas) pour les 3 listes de gènes *HALLMARK* significatives d'intérêt i.e. 'Epithelial mesenchymal transition'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

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* illustrées.

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		
Laibe 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 ge	Core gene	HT29, T vs NT					Associated	N core ge	Core gene	HT29, TR vs T					N common core gene	Common core gene
				ES	NES	p-value	q-value	ES				NES	p-value	q-value	Associated			
EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION1	146	22	TNC,DKK1,PMEPA1,CTGF,IL8,TA,GN,TFEB,FLNA,CYR11,GLPR1,OXCL1,SERPINE1,SPR1,FSTL3,DPYSL2,MYL9,CD44,CAP2,SCC8	0.40	1.70	<1.0E-03	5.61E-03	up T vs. NT	38	MP1,SPARC,ELN	-0.52	-2.25	<1.00E-03	<1.00E-03	down TR vs T	14	TNC,DKK1,PMEPA1,CTGF,IL8,TA,GN,FLNA,CYR11,OXCL1,SERPINE1,FSTL3,MYL9,THBS1,GPC1,ITGA2	
MITOTIC_SPINDLE	195	68	FLNA,CENPE,AURKA,DLG4,P5,KIF	0.57	2.56	<1.0E-03	<1.0E-03	up T vs. NT	38	FGD6,NEDD9,SSH2,FLNA,VCL,CCD42EP2,C1	-0.31	-1.37	2.39E-02	6.36E-02	down TR vs T	13	FLNA,NEDD9,VCL,EPH4,ITGA2,RHG4	
G2M_CHECKPOINT	199	93	PTTG1,MTA2,CENPE,AURKA,HMC	0.71	3.16	<1.0E-03	<1.0E-03	up T vs. NT	37	SMAD3,ORC5,SLC7A1,PTTGL,BCL3,CNTN1,L	-0.12	-0.56	1.00E+00	1.00E+00	down TR vs T	13	PTTGL,BARD1,LESPL1,TROAP,THSD	
TFG_BETA_SIGNALING	53	8	PMEPA1,SERPINE1,SMAD7,SMU	0.30	1.07	3.38E-01	3.14E-01	up T vs. NT	23	SERPINE1,PMEPA1,THBS1,SMURF2,SMAD	-0.56	-2.06	<1.00E-03	7.69E-04	down TR vs T	8	PMEPA1,SERPINE1,SMAD7,SMURF	
EP_TARGETS	198	140	PTTG1,DEPDC1,CENPE,SPAG5,A	0.75	3.40	<1.00E-03	<1.00E-03	up T vs. NT	86	NAAB3,ILG1,KPO1,TK1,MLH1,VAR,PRPS1,	0.21	0.92	6.73E-01	8.14E-01	down TR vs T	59	DEPDC1,CDKN3,DLGAP5,BIRC5,GM	
MYC_TARGETS_V1	195	111	FAM120A,CD201,NPM1,HNRNP1A	0.56	2.50	<1.00E-03	<1.00E-03	up T vs. NT	118	CANX,MCME,ERH,CDK4,FAM120A,NOC1,	0.36	1.56	<1.00E-03	1.45E-02	down TR vs T	56	FAM120A,NPM1,HNRNP1A,CNA2	
TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	174	65	NFE2L2,ETS2,CD2,TRAF1,HES1,PE	-0.39	-1.57	<1.00E-03	2.98E-02	down TR vs T	66	TNC,PLAU,PTGS2,OXCL1,FOSL1,LAIF3,GE	-0.50	-2.18	<1.00E-03	<1.00E-03	down TR vs T	22	CCR2L2,NFKBIA,SMAD3,DLR,BHLHE	
INFLAMMATORY_RESPONSE	147	36	CCR2L2,IRAK2,NFKBIA,AHR,FFAR2	-0.37	-1.47	9.09E-03	4.78E-02	down TR vs T	41	IL8,HAS2,HBEFG,SERPINE1,TNFSF15,EMP3	-0.44	-1.91	<1.00E-03	1.47E-03	down TR vs T	12	CCR2L2,IRAK2,NFKBIA,DLR,SCARF3	
MYC_TARGETS_V2	56	17	FKBP4,NP11,UTP20,FLK1,PA2G4,I	0.45	1.64	2.77E-03	6.30E-03	up T vs. NT	24	WR74,NPML,PHB,PHL,WR49,RRP9,NO	0.30	1.78	<1.00E-03	1.59E-03	up TR vs. T	4	NPML,LUNG,MRTO4,NOP26	
INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	92	55	EP2AK2,IFM15A,SON,NCOA7,I	-0.83	-3.07	<1.0E-03	<1.0E-03	down T vs. NT	25	IFIH1,RSAD2,MYL18A,IFIT2,SAHNP,IL	-0.49	-1.55	<1.00E-03	1.19E-03	down TR vs T	20	NCOA7,WAARS,HLA-C,SAMSN1,GBP	
INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	165	72	EP2AK2,ZBP1,BSM,WAARS,ST3GA	-0.72	-2.91	<1.0E-03	<1.0E-03	down T vs. NT	41	IFIH1,PTGS1,RSAD2,MYL18A,IFIT2,SECT	-0.39	-1.72	<1.00E-03	5.53E-03	down TR vs T	26	WAARS,ST3GAL5,PNL3,SAMSN1,ICAN	
Oxidative_Phosporylation	195	37	NDUFB2,NDUFA5,ISCA1,ECH1,ND	-0.11	-0.46	1.00E+00	1.00E+00	down T vs. NT	110	COX17,ATP8V1D,SIC2SAS,AFM1,COX7A2	0.48	2.07	<1.00E-03	<1.00E-03	up TR vs. T	26	NDUFB2,NDUFA5,ISCA1,ECH1,ND	
PEROXISOME	92	31	ACOX1,SLC25A4,FIS1,FDP5,MVP	-0.36	-1.33	6.47E-02	1.26E-01	down T vs. NT	44	CLN8,SMAC3,HSJ17B4,CBAT,ABCD1,PEX	0.46	1.80	<1.00E-03	3.58E-03	up TR vs. T	21	FIS1,FDP5,PEX6,HDH2,TSPQ,SCP2,P	
FATTY_ACID_METABOLISM	141	45	DHCR24,ACSM3,REEP3,FA5N,MC	-0.40	-1.56	9.00E-03	2.53E-02	down T vs. NT	80	FH,ME1,PCBD1,REEP3,PSME1,CBR1,ENO3	0.44	1.79	1.69E-03	1.98E-03	up TR vs. T	31	DHCR24,ACSM3,REEP3,FA5N,MC	
BILE_ACID_METABOLISM	87	33	ABCA4,PEX11G,DHORA,PEX6,G,STRK1,LDH4,PEX12,PAO3,CY227A,15BM,PA,ABCA2,SCP2,PIPLA8,R,BP1,ACSL5,PEX7,LDH4,EPH2,LU,PE,MLY,CD,RETSAT,LONP2,SLC22A18,PEX16,PRDX5,ABCA5,ITR,CPT1N,IDLK,ACSL1,NR1H2,NR9D,EL	-0.46	-1.71	<1.0E-03	9.16E-03	down T vs. NT	33	RXR,SLC35B2,CY4P6A1,AIDH9A1,NR1J2,HSJ17B1,ABCA5,SCP2,RPB1,HA,CL,PEX1,6,SLC7A2,LDH4,PEX5,LDH4,ISOC1,PEX7,NUOT1,ABCA1,SLC22A5,EPH2,PRDX5,EXLL,PGMPAT,CAT,IDL,PECR,MLY,CD	0.46	1.75	<1.00E-03	1.62E-03	up TR vs. T	17	PEX6,HDH2,SCP2,RPB1,PEX1,LDH4,EPH2,LIFE,MLY,CD,LONP2,PEX5,PRDX5,ABCA5,IDL,ACSL1,NR1J2,NR9D	
CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	70	31	OC	-0.68	-2.43	<1.0E-03	<1.0E-03	down T vs. NT	28	HMGCR,TMEM97,ETHE1,FA5N,PMVK,SQL,E,SCO,NSD4,PCYT2,HMGCS1,STARDA4,EB,P,CYPS3A1,DHCR7,IDL1,ACSS2,MVD,FDP5,HSJ17B7,NF1L3,DFT1,ACAT2,TM7SF2,P,D,K3,LS5,MVK,TP53NP1,A1DDC	0.49	1.79	<1.00E-03	2.64E-03	up TR vs. T	21	PCYT2,DFT1,PKK3,SCO,EBP,TM7SF2,HMGCR,SQL,LDHCR7,CYPS3A1,IDL1,TP53NP1,NF1L3,MVD,LS5,HMGCS1,MVK,HSJ17B7,STARDA4,ACSS2,A1DDC	

Tableau supplémentaire 2. Métagènes et core gènes.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans **aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions**. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas **usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité**.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai **jamais leur confiance** et **n'exploiterai pas le pouvoir hérité** des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. **Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers** et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.