



**HAL**  
open science

# Etude de la dissémination du cancer colorectal

Guillaume Belthier

► **To cite this version:**

Guillaume Belthier. Etude de la dissémination du cancer colorectal. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT061 . tel-03210962

**HAL Id: tel-03210962**

**<https://theses.hal.science/tel-03210962>**

Submitted on 28 Apr 2021

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

CBS2 N°168, École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche CNRS 5203 / Inserm U1191

## Étude de la dissémination du cancer colorectal

Présentée par Guillaume BELTHIER

Le 10 Novembre 2020

Sous la direction de Julie PANNEQUIN

Devant le jury composé de

Mme. Géraldine GUASCH-GRANGEON, Chargé de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille	Rapporteuse
Mme. Julie GUILLERMET, Chargé de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse	Rapporteuse
Mr. Ulrich VALCOURT, Professeur des Universités, Université de Lyon	Examineur
Mr. Damien GREGOIRE, Chargé de Recherche, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier	Examineur
Mme. Julie PANNEQUIN, Directrice de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle	Directrice de thèse
Mme. Emmanuelle CHARAFE-JAUFFRET, Professeur des Universités/Praticien Hospitalier, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille – Institut Paoli-Calmettes	Présidente du Jury



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



# Remerciements

Je remercie les Drs Julie Guillermet-Guibert, Ulrich Valcourt, Géraldine Guash-Grangeon, Damien Grégoire et le Pr Emmanuelle Charafe-Jauffret pour avoir accepté avec enthousiasme de participer à mon jury de thèse et de consacrer du temps à la lecture de mon manuscrit de thèse. Je connais la presque totalité d'entre vous depuis mon arrivé en thèse à Montpellier, d'autres du temps où je préparais le concours doctoral à leur côté et enfin Ulrich qui était mon référant pédagogique en première année de licence en 2010 et qui m'a soutenu jusqu'à ce que je décroche une bourse doctorale. C'est donc également grâce à vous que j'ai pu rédiger ce manuscrit. Je remercie également Christophe Ginestier qui chaque année, acceptait de faire parti de mon comité de thèse et qui m'a toujours encouragé et donné de très bons conseils.

Ces quatre années arrivant à leur terme, je tiens premièrement à remercier l'ensemble du personnel de l'Institut de Génomique Fonctionnelle que ce soit le personnel de maintenance, le magasin, la laverie, le service informatique et administratif et évidemment la direction dont le directeur de l'IGF, Monsieur Jean-Philippe Pin. Aucune thèse n'est possible sans chacune de ces personnes et je leur dois également d'avoir pu réaliser ma thèse dans de bonnes conditions. J'ai une pensée particulière pour Carmen qui a été la première personne à m'accueillir à l'IGF et qui jusqu'à son départ récent, était la personne sur qui on pouvait compter pour résoudre un problème ! Malgré son caractère de dragon espagnol, elle nous trouvait toujours un moment pour parler et régler nos soucis. J'aimerais également remercier Muriel avec qui j'ai passé beaucoup de temps pour la réalisation des figures de mon article. Que d'aller-retour pendant le confinement pour parvenir à satisfaire les demandes de l'éditeur. Je tiens également à remercier les autres chercheurs des diverses équipes avec qui j'ai pu travailler ou tout simplement passer du bon temps comme Federica, Chrystel, Lama, Yasmine et Juri.

Je tiens à remercier également l'ensemble du personnel de l'animalerie sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu. Ce personnel qui pendant le confinement, a veillé sur toutes les souris, les rats et les poissons zèbres pour que nous puissions tant bien que mal repartir relativement vite à notre retour. Certains d'entre eux ont passé beaucoup de temps avec moi et se sont même impliqués directement dans mon projet. Je pense à Michel qui m'apportait mes biopsies de génotypage. Je pense à Luc qui durant le changement des cages me prévenait lorsqu'une souris n'était pas bien. Mais je pense surtout à Steeve et Denis qui me demandaient régulièrement les résultats de mes expériences, qui réalisaient les chirurgies et qui étaient toujours motivés pour tester plein de nouvelles idées, mêmes les plus loufoques. Maintenant que Denis est responsable de l'animalerie de l'INM, je pense que je vais enfin pouvoir irradier quelques



souris ! Quant à Steeve, je retiens qu'être chasseur peut s'avérer très utile pour un chercheur souhaitant transparer des souris entières et que Limoux est le centre du monde !

Je tiens à remercier Julie Pannequin, ma directrice de thèse pour ne m'avoir jamais fait faux bond et pour avoir toujours tenu sa parole. Tu avais accepté, sans ne m'avoir jamais vu, que je sois ton candidat au concours de l'école doctorale de Montpellier. Je n'oublierai jamais le jour où tu m'as annoncé que je n'avais pas été retenu à la présélection du concours. Au travers de mon mail tu avais ressenti l'énorme déception que j'éprouvais ainsi que ma volonté de ne rien lâcher. Tu m'as alors proposé d'être ton candidat pour La Ligue Contre le Cancer. De nouveau, sans ne m'avoir jamais vu ! Il nous aura fallu 5 mois de péripéties et de batailles administratives pour que finalement je débute mon doctorat dans ton équipe et à tes côtés. Nous nous sommes très vite apprivoisés et ce fut 4 années de pur bonheur à tes côtés. Je te remercie d'avoir toujours laissé la porte ouverte ne serait-ce que pour parler quelques secondes du résultat d'une expérience ou d'un problème technique. Ta passion pour la science, ton excitation à initier de nouvelles collaborations ou de nouveaux projets m'ont permis d'apprendre énormément de choses et de rencontrer de nombreuses autres personnes telles que Iron Man (alias Raphaël Rodriguez), Julie Vendrell ou Andreï Turtoi. Merci de m'avoir fait confiance pour tous ces projets et collaborations ainsi que de m'avoir recommandé pour faire partie du conseil de laboratoire. Tu as toujours trouvé du temps pour que l'on discute de projets, de nouvelles idées, pour préparer des présentations et rédiger des rapports. Directement et indirectement, ce manuscrit a pu voir le jour également grâce à toi. Mais tu n'as pas été qu'une directrice de thèse, tu es également une directrice d'équipe qui fait de son mieux pour que chacun se sente à sa place et soit heureux. Nos repas du vendredi et notre propension à sortir les bulles dès que l'on a une bonne nouvelle, n'aident peut-être pas à travailler efficacement le vendredi après-midi mais c'est un moment qui compte dans la vie de l'équipe et qui va me manquer. Sans parler de nos innombrables soirées de gala du SUNRiSE et du Cancéropole GSO. Tu es également devenue une amie qui compte dans ma vie. Ton enthousiasme, ton franc parler, ton goût de la vie et ta sincérité sont d'autant de qualités qui te rendent unique ! Je sais que nous dégusterons des huîtres et une Giulietta avec un petit verre de blanc dans les halles de Sète pendant encore de très nombreuses années et j'espère qu'un jour nous referons une sortie d'équipe pour faire du canoé ensemble. Merci encore pour tout !

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes de l'équipe passées comme actuelles. Tous vous m'avez aidé et appris quelque chose à un moment et nous avons également tous passé de très bons moments ensemble :

-Emmanuelle Samalin, notre médecin de l'équipe sans qui nous n'aurions aucun échantillon humain et qui nous aide au quotidien pour donner une pertinence clinique à tous nos projets

même les plus fondamentaux. Merci d'avoir fait ton maximum pour les inclusions de sang de patients et m'avoir éclairé sur les stratégies thérapeutiques dès que j'avais une question. C'est une chance de t'avoir au sein de l'équipe et les choses seraient plus simple si chaque équipe de recherche translationnelle avait une clinicienne comme toi.

- Philippe Crespy qui m'a appris à faire des coupes de paraffines et qui a dû gérer mes innombrables commandes de sang et d'anticorps !

- Alexandre David qui a toujours été à l'écoute et prêt à donner des conseils.

- Sebastien Relier, un partenaire de discussions interminables et peu recommandables en salle de culture !

- Hélène Guilloit toujours là pour me soutenir et m'encourager durant mes journées interminables à courir à travers tout l'IGF et d'instituts en instituts pour récupérer au final 10 cellules.

- Françoise Macari pour toujours avoir proposé des solutions lors de mes contaminations d'échantillons de patients rares. Je te voyais peu à cause de tes enseignements mais ta bonne humeur était toujours un vrai plaisir à voir.

- Armelle Choquet qui a toujours su être une oreille attentive à mes soucis et mes baisses de moral. Tes conseils en biochimie ont été extrêmement précieux !

- Amandine Bastide, l'inspecteur des salles rangées ! Je ne sais pas combien de fois tu m'as traité de patate ! Mais bon ce qui compte c'est qu'à la fin tu m'aidais à trouver telle ou telle chose égarée !

- Amandine Amalric, le peu de fois où nous avons eu à travailler ensemble, c'était un plaisir ! J'espère vraiment que le plasma donnera quelque chose ! C'est également un vrai plaisir de voir toutes tes photos sur facebook ! je suis ton plus grand fan saches le !

- Chris Planque, notre boutentrain ! Que de moments à rire et à chanter en salle de culture ! Et que de discussions également peu recommandables ! La République je ne sais pas, mais la rigolade c'est toi !

- Jean-Marc Pascussi avec qui j'ai énormément échangé pour le projet nanobody. Que de patience pour que je parvienne à comprendre ce qui a été fait à Luminy ! Enfin j'espère avoir compris ! Et maintenant que ce manuscrit est terminé, on peut aller pêcher !

- Lucile, je me rappellerai toujours tes dernières semaines au labo le ventre tout rond et me demandant de révéler pour toi tes membranes de WB. Et tu as bien fait ! Quel beau bébé tu as eu ! J'espère te revoir bientôt rigoler avec Chris en salle de culture !

-Céline Bouclier, que de sueur à gérer nos saisines ! Que de navettes durant le confinement avec Karim ! Mais après je ne sais combien de mois, on y est enfin arrivés ! On est parvenu à faire valider ces saisines débutées il y a plus de 2 ans juste avant mon départ ! Rien que pour ça je devrai t'offrir une bouteille !

-Julie Treguier, l'ingénieure par excellence ! Efficace en toutes circonstances ! Tu manques déjà à l'équipe pour ton savoir-faire et ta bonne humeur bretonne ! Bon vent dans ma ville et profite bien de la capitale gastronomique !

-Olivia Villeronce, ma compagne de thèse ! Nous sommes arrivés presque en même temps et nous sommes tous les deux les thésards de Julie ! On a été les bébés de Jiji ! Et on a stressé tous les deux en même temps pour finir ce manuscrit dans les temps ! Que de rigolades et de discussions inutiles dans notre bureau ! Je t'avoue que ces derniers mois de rédaction chez moi ont été peut-être plus productifs mais ça me manque de ne pas t'entendre parler toute seule ! Et oui mon avocat est prêt ! Allez courage tu y es presque toi aussi et après *an nou pran on lagout* comme on dit chez toi !

-Laura Yazdani, ma raviolle ! Même si tu es partie depuis quelques temps déjà, ta voix résonne encore dans les couloirs et dans nos têtes ! Que de temps à papoter avec toi ! Tu m'as appris à prendre soin de mes bébés les CTCs ! Tu m'as filé tous les bons filons pour les WB ! J'utilise encore ton anti-mouse HRP qui marche du feu de dieu ! Je ne peux m'empêcher de repenser à toi en ce moment ! Je te revois durant la rédaction passer nuits et jours telle un ermite dans ce bureau dans lequel je me suis réfugié également pour rédiger ! Nos sessions massages et fondues savoyardes me manquent ! Mais je pense que les narines sensibles s'en portent mieux !

-Zeinab Homayed, mon ancienne stagiaire, ma relève ! Que de chemin parcouru avec toi. Et que d'émotions pour que tu puisses être celle qui poursuit mon projet, mon bébé, qui devient ton bébé ! Je pense que ce projet est dans les meilleures des mains ! Julie et toi vous allez mener cette histoire très loin, j'en suis certain ! En tout cas je suis vraiment très heureux que le destin nous ait fait te choisir Julie et moi. Je n'ai sans doute pas été le meilleur des encadrants mais j'ai vraiment eu beaucoup de plaisir à t'apprendre ce que je savais puis à travailler de pair avec toi depuis que tu es en thèse. Tu es une fille merveilleuse et très courageuse. Tu es également une force de la nature car tu as pu tenir dans moins de 16 m2 avec Olivia, Jihane et moi ! Les trois plus bruyants de tout l'IGF réunis en un seul endroit, celui où tu devais travailler. Tu m'as beaucoup soutenu ces derniers temps et même si tes gâteaux libanais ont définitivement ruiné mon régime estival, ces petites attentions m'ont beaucoup aidé à tenir le choc pour le sprint final ! J'emporterai un peu de toi avec moi où que j'aille grâce à tes épices libanaises !

- Jihane Vitre, ma Jiji l'amoroso ! Qu'aurait été cette thèse sans toi... Je garde la gorge serrée en repensant aux jours précédant ton départ. Je voyais passer les semaines puis les jours à une vitesse déconcertante. Ces 3 années avec toi ont été une succession d'émotions fortes !

Énormément de rires, du désespoir avec ces nanobodies, et même parfois des larmes ! Tu étais ma bouée de sauvetage dès que je rentrais dans le bureau ! Je te revois hurler de rire lorsque je suis arrivé dans le couloir en criant « j'ai un prolapsus, j'ai un prolapsus ! J'emporterai avec moi ta petite feuille plastifiée pour m'aider à prioriser les urgences. On se fera une soirée Italienne et sans à avoir à se casser la tête avec ces satanés nanobodies ! Tu auras deux petits jeunes rien que pour toi !

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe Jay qui était également un peu mon équipe d'adoption (un peu à l'insu de leur plein gré). Je remercie Philippe Jay pour son écoute et sa disponibilité malgré son temps très précieux et pour m'avoir permis d'obtenir les modèles murins. Merci Julie, Alicia, Marieme, Celima et Fabien pour tous ces moments de partage et discussion autour de votre machine à café. Promis je reviens bientôt m'incruster dans votre bureau ! et comme dirait Célina : Anba latè, pa ni plézi. Quant à François Gerbe, merci pour ta patience incroyable afin de trouver une cohérence à tous ces problèmes incompréhensibles de recombinaison... Et encore désolé pour avoir chanté un peu trop fort en Italien avec Marco et Alessandro ! Marco je pense également à toi ! Tu m'avais dit dès le début de ma thèse qu'il fallait que j'en garde sous la pédale sinon je ne tiendrais pas le rythme ! tu avais raison !

Mais je tiens à adresser un message particulier aux personnes suivantes :

- Pierre Cesses, celui qui m'a permis de m'imposer au sein de l'équipe Jay ! Tu avais eu pitié de moi avec mon protocole imbuvable d'IHC ! Et tu m'as appris à prélever le sang comme personne d'autres sur une souris ! Bon je pense que ma présence t'a fait faire beaucoup d'erreurs de génotypages mais on sait tous qu'au fond, il t'en fallait déjà peu pour te déconcentrer ! J'étais toujours heureux de te voir pour papoter je ne sais combien de fois par jour. Mais rassures toi, j'ai pas fini et je continue !

-Nathalie Coutry, une personne à l'écoute et qui est la voie de la sagesse. Il nous a fallu un peu de temps pour nous connaître. Petit à petit on discutait le soir de tout et de rien avec Manue et depuis j'aime continuer nos petites discussions du soir. Je suis vraiment content de t'avoir connue et j'espère encore faire de nombreuses marches dans Montpellier avec toi !

-Laure Granier, notre pistache internationale ! Si grâce à Pierre j'ai pu glisser un pied dans l'équipe Jay, c'est définitivement toi qui me l'as ouverte en grand. Heureusement que les hottes font beaucoup de bruit car je n'ose imaginer ce qu'aurait entendu Philippe... Nous en avons passé des moments toi et moi à l'IGF et en ville. Jamais je ne pourrais oublier une fille aussi incroyable que toi !

-Emmanuelle Sidot, ma manue ! Par où commencer ! Je t'en ai vendu du rêve avec toutes mes manip rocambolesques et toutes mes galères ! Et oui je me voyais déjà, en haut de l'affiche ! Résultats trois ans après on n'y est toujours pas ! Tu m'en as appris des choses sur les souris ! Ce projet a pu se lancer et avancer au début grâce à toi ! Il contient également un peu de toi ! En tout cas, ce que qui est certains c'est que nos routes vont certainement se recroiser d'ici peu ! Tu ne seras malheureusement pas là à ma soutenance mais je penserai fortement à toi ce jour-là. Je compte sur toi pour venir me voir à Amsterdam ! On va leur retourner la ville comme on a retourné Londres ! Et puis rappelle toi qu'on a dit que le bureau de Philippe et Julie seraient les nôtres un jour !

Je tiens aussi à remercier les personnes avec qui j'ai travaillé en collaboration :

- Raphaël Rodriguez et Sebastien Müller

- Andrei Turtoi et Ambre Giguelay

-Peter Friedl et Veronika te Boekhorst pour ses yeux de lynx et ses magnifiques vidéos de migration

-Serge Roche et Marie Laffite

-Agnes Bernet et Justine Legrand

-Julie Vendrell, Romain Senal et Lakhdar Khellaf pour ces innombrables recherches de mutations

Un grand merci également aux plateformes du RHEM et MRI avec une pensée particulière pour Christophe Duperray avec qui j'ai passé 4 ans à trier des cellules représentant moins de 0,001% de l'échantillon et également Chantal Ripoll pour tout ce temps passé sur la transposition.

Un petit mot pour ces personnes qui ont cru en moi alors que rien ne présageait. Mme Colongeat et Johanna qui, sur leur temps personnel, m'ont aidé à avoir mon BAC.

Je me dois également de ne pas oublier La Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer qui depuis 4 ans me finance et à mon grand soulagement, finance également Zeinab pour permettre la continuité des projets. Sans les donateurs bien des choses auprès des patients et de la recherche ne pourraient se faire. Merci également aux patients pour leurs dons de sang.

Enfin je tiens à remercier toute ma famille. Certains ont eu à me supporter chez eux pendant que je préparais le concours doctoral de Lyon et Marseille tout en rédigeant en catastrophe ma demande de financement à La Ligue pour Montpellier. Merci à mon compagnon Irvin de me soutenir depuis plus de deux ans ! Sans lui sans doute que je n'aurais pas tenu le choc ! Je ne peux évidemment pas oublier de remercier mon père, qui me porte à lui seul depuis tant d'année. Que de surprises depuis le lycée où personne ne donnait cher de mon avenir. J'espère que maintenant tu seras plus tranquille sur l'avenir de ton fils et pourra plus penser au tiens.

Pour conclure ces longs remerciements, je veux dédier cette thèse à ma mère qui je l'espère, serait sans fier de moi. Grâce au Campbell, acheté à l'origine pour ses études, j'ai pu réussir mes premières années de fac. D'une certaine manière, elle m'a accompagné au travers de ce livre.

# Sommaire

## Table des matières

<b>Liste des principales abréviations :</b> .....	<b>15</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>17</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>20</b>
<b>A Le cancer colorectal</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Épidémiologie et prise en charge globale</b> .....	<b>20</b>
a) Épidémiologie .....	20
b) Prise en charge globale .....	22
<b>2. Initiation et progression tumorale : de l'adénome au carcinome</b> .....	<b>24</b>
a) Modèle de Vogelstein et Fearon .....	25
b) Les tumeurs festonnées .....	30
<b>3. Hétérogénéité intra-tumorale, cellule d'origine du cancer et cellules souches cancéreuses (CSC)</b> .....	<b>31</b>
a) Définitions et modèles .....	31
b) Origine des CSC .....	33
c) Caractérisation des CSC .....	37
i. Caractérisation moléculaire .....	37
ii. Caractérisation fonctionnelle : Side population, formation de sphères, tumorigénicité et différenciation .....	50
iii. Chimiorésistance .....	52
d) Plasticité tumorale .....	57
i. Les facteurs de transcription embryonnaires .....	57
ii. Modifications épigénétiques .....	58
iii. Modifications épitranscriptomiques .....	59
iv. La transdifférenciation : de l'EMT à la MET .....	62
<b>B La dissémination tumorale dans le cancer colorectal</b> .....	<b>67</b>
<b>1. Progression tumorale : du carcinome In situ à invasif</b> .....	<b>67</b>
a) Invasion locale : de la rupture de la lame basale à l'invasion des tissus voisins .....	68
b) Invasion locale et migrations .....	74
c) Rôle du microenvironnement tumoral primaire dans la dissémination .....	77
i. Émergence d'un nouveau type cellulaire pro-tumoral : les neurones .....	77
ii. La réponse immunitaire : le Dr Jekyll et Mr Hyde du microenvironnement tumoral .....	79
iii. Les fibroblastes, des adjudants de l'invasion tumorale .....	85
iv. Les cellules endothéliales .....	88
89	
<b>2. Les cellules tumorales circulantes (CTCs)</b> .....	<b>90</b>
a) Intérêt clinique des CTCs .....	90
b) Méthodes de détection et d'isolement .....	91
i. Méthodes basées sur l'immun sélection .....	92
ii. Méthodes basées sur caractéristiques physiques .....	96
c) Les CTCs : des cellules initiatrices de métastases (CIMs) .....	100
d) CTCs individuelles ou en clusters : impact sur la survie et propriétés agressives des CTCs .....	103
e) Extravasation .....	107
f) Caractérisation des CTCs : .....	110
i. Moléculaires .....	110

ii. Fonctionnelles.....	111
<b>3. Colonisation des sites secondaires : les métastases .....</b>	<b>113</b>
a. Sites métastatiques du CRC.....	113
b. Survie, dormance et prolifération des CTDs : rôle du microenvironnement métastatique.....	116
i. Définition du concept de dormance .....	116
ii. Caractéristiques de la dormance et intérêt thérapeutique.....	117
iii. Propriétés intrinsèques des CTDs et système immunitaire : régulateurs de l'entrée et sortie de dormance .....	120
iv. Evidence cliniques et expérimentale de la dormance du colorectal et influence du microenvironnement sur la dissémination. ....	123
c. La dissémination tumorale : un processus uniquement tardif ? .....	126
d. Modèles murins et observations cliniques dans les autres cancers .....	128
i. Observations cliniques dans le CRC .....	128
ii. Modèles murins de dissémination tumorale dans le CRC .....	129
<b><i>Hypothese et objectifs .....</i></b>	<b>132</b>
<b><i>Resultats expérimentaux .....</i></b>	<b>134</b>
<b><i>Partie 1 : Caractérisations.....</i></b>	<b>134</b>
<b>1. Introduction et résultats principaux.....</b>	<b>134</b>
<b>2. CD44v6 : nouveau marqueur de CTC .....</b>	<b>135</b>
<b>3. Identification des nouveaux marqueurs membranaires des CTCs grâce à la sélection phage display et aux nanobodies.....</b>	<b>138</b>
a) Etablissement de la banque de nanobodies candidats .....	139
b) Selection des meilleurs candidats : criblage et séquençage .....	141
i. Criblages.....	141
ii. Séquençage des 17 nanobodies candidats .....	143
c) Optimisation de la production et purification des nanobodies .....	143
d) Conclusion et perspectives .....	145
<b>4. Enrichissement du milieu de culture des CTCs.....</b>	<b>146</b>
a) Effet des différents milieux conditionnés sur la formation des sphères des CTCs .....	147
b) Perspectives.....	152
<b>5. Migration amiboïde individuelles et collectives des cellules tumorales colorectales 152</b>	
a) Phénotypes épithéliales des lignées de CTCs colorectales .....	153
b) Observation <i>in vitro</i> d'une migration amiboïde .....	155
c) Confirmation <i>in vivo</i> .....	157
d) Validation d'une migration de type amiboïde sur des coupes de tumeurs colorectales et métastases hépatiques humaines .....	159
e) Conclusion et perspectives .....	159
<b>6. Conclusion et Discussion PARTIE 1 .....</b>	<b>161</b>
<b><i>Partie 2 : Modeles murins d'etudes de la dissemination precoce du CCR .....</i></b>	<b>166</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>166</b>
<b>2. Validation et optimisation du modèle.....</b>	<b>169</b>
<b>3. Caractérisations des polypes.....</b>	<b>171</b>
<b>4. Évidences d'une dissémination précoce .....</b>	<b>172</b>
<b>5. Remodelage du microenvironnement hépatique.....</b>	<b>176</b>
<b>6. Confirmation des observations sur d'autres modèles murins .....</b>	<b>179</b>



7. Le recrutement des macrophages et indépendant de la présence des polypes.....	182
8. Conclusion et discussion .....	184
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>188</b>
<b>Partie 1 .....</b>	<b>188</b>
<b>Co-culture et migration amiboïde .....</b>	<b>188</b>
Culture des lignées cellulaires en suspension .....	188
Culture des lignées de fibroblastes .....	188
Milieux de culture.....	188
<b>Test ELDA (Extreme Limiting Dilution Assay) &amp; test de formation de sphères.....</b>	<b>189</b>
<b>Préparation d'échantillons biologiques pour des analyses immunohistologiques .....</b>	<b>189</b>
<b>Greffes intra-cæcales : Greffe sur le cæcum de suspension cellulaire des lignées de CTC</b>	
190	
<b>Immunofluorescence et Immunohistochimie .....</b>	<b>190</b>
<b>Extraction ARN et RT-qPCR.....</b>	<b>191</b>
<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>191</b>
<b>Nanobodies :.....</b>	<b>192</b>
<b>Grandes étapes de production de la banque de nanobodies par la plateforme de à Luminy.....</b>	<b>192</b>
<b>Criblage .....</b>	<b>193</b>
<b>Séquençage des 17 nanobodies candidats .....</b>	<b>194</b>
<b>Purification des nanobodies.....</b>	<b>194</b>
<b>Western blot.....</b>	<b>194</b>
<b>Partie 2 : .....</b>	<b>195</b>
<b>Modèles murins utilisés pour les croisements : .....</b>	<b>195</b>
<b>Génotypage .....</b>	<b>195</b>
<b>Recombinaison des séquences <i>LoxP</i> induite au Tamoxifène.....</b>	<b>196</b>
<b>Tumorigenèse induite à l'AOM/DSS (Azoximéthane et Dextran Sulfate Sodium ) .....</b>	<b>196</b>
<b>Prélèvement et préparation des intestins.....</b>	<b>196</b>
<b>Immunohistochimie et immunofluorescence .....</b>	<b>197</b>
<b>Révélation en fluorescence .....</b>	<b>197</b>
<b>Révélation en visible .....</b>	<b>197</b>
<b>Dissociation des organes : .....</b>	<b>198</b>
<b>Culture des tumoroides.....</b>	<b>199</b>
<b>Injections intra-splénique.....</b>	<b>199</b>
<b>Injections sous-cutanées.....</b>	<b>199</b>
<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>199</b>
<b>Communications scientifiques .....</b>	<b>200</b>

<i>Références</i> .....	<b>201</b>
<i>Publications</i> .....	<b>243</b>



## Liste des principales abréviations :

5FU	5-Fluoro-Uracile
ABC	ATP-Binding cassette transporter
ABCG2	ATP-Binding cassette transporter
ALDH	Aldéhyde deshydrogénase
ADN	Acide desoxyribo nucléique
APC	Adenomatous polyposis coli
AOM	Azoximethane
ARN	Acide ribo nucléique
bFGF	basic Fibroblast Growth factor
BMP	Bone morphogenic protein
BrdU	Bromodéoxyuridine
CBC	Crypt base columnar cell
CCR	Cancer Colorectal
CIM	Cellule initiatrice de métastase
CIN	Chromosomal instability
CIT	Cellules initiatrice de tumeur
CK	Cytokératine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTC	Cellule tumorale circulante
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CSI	Cellule souche intestinale
CYP	Cytochrome
CTD	Cellules tumorale disséminée
DSS	Dextran sodium sulfate
EGF	Epithelial growth factor
eGFP	Enhanced Green fluorescent Protein
EGFR	Epithelial growth factor receptor
ELDA	Extreme limiting dilution assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FAC	Fibroblaste associé au cancer

HGF	Hepatocyte growth factor
HDAC	Histone désacétylase
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
iPSC	Cellule souche embryonnaire induite
IRES	Inositol requiring enzyme
JAK	Janus Kinase
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
Lgr5	leucine-rich-repeat-containing G protein-coupled-receptor
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDR	Multidrug resistance
MET	Transition mésenchymo-épithéliale
mi-ARN	micro-ARN
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MSI	Microsatellite instability
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural Killer
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
RE	Réticulum endoplasmique
SOX	SRY-box
TGF	Transforming growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
ZEB	Zinc finder E-box homeobox
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin

## Liste des figures

FIGURE 1 CLASSIFICATION CLINIQUE DU CANCER COLORECTAL (CCR).....	22
FIGURE 2: VOIES MAJEURES IMPLIQUEES DANS L'HOMEOSTASIE INTESTINALE ET PERMETTANT L'APPARITION D'UN CANCER COLORECTAL. ....	27
FIGURE 3: SCHEMAS REPRESENTATIFS DES DIFFERENT MODELES DE LA TUMORIGENESE ET DE LA CELLULE A L'ORIGINE DU CANCER. ....	35
FIGURE 4: LGR5 PROMEU LA VOIE WNT/ $\beta$ -CATENINE : .....	40
FIGURE 5: ÉPISSAGES ALTERNATIFS DE CD44 .....	45
FIGURE 6: CD44V6 RECEPTEUR ET CO-RECEPTEUR. ....	49
FIGURE 7: L'EXPRESSION DE CD44V6 CONFERE DES CAPACITES DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES (CSCS) CAPABLES DE DISSEMINER.....	50
FIGURE 8: MODELE PROPOSE POUR SEQUESTRATION DE FAS PAR LES VARIANT CD44. ....	56
FIGURE 9 : DE L'EMT A LA MET. ....	66
FIGURE 10: ACTEURS IMPLIQUES DANS LE REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE (MEC). ....	69
FIGURE 11: : RUPTURE DE LA LAME BASALE ET REMODELAGE DE LA MEC DURANT L'INITIATION ET PROGRESSION TUMORALE. ....	73
FIGURE 12 : PLASTICITE DES DIFFERENTS TYPES DE MIGRATION TUMORALE. ....	76
FIGURE 13: IMPLICATION DU SYSTEME NERVEUX DANS L'INITIATION ET PROGRESSION DU CANCER COLORECTAL (CCR).....	78
FIGURE 14: : MICROENVIRONNEMENT TUMORAL IMMUNO-REGULATEUR. ....	83
FIGURE 15: PARTENARIAT DES CELLULES CANCEREUSES ET DES MACROPHAGES DANS LE PROCESSUS D'INTRAVASATION. ....	84
FIGURE 16: SCHEMA REPRESENTANT LES MECANISMES IMPLIQUES DANS L'ACTIVATION DES FIBROBLASTES EN FIBROBLASTES ASSOCIES AU CANCER (FACS).....	85
FIGURE 17: SCHEMA RECAPITULATIF DES FONCTIONS PRO-CANCEREUSES ASSOCIEES AUX FIBROBLASTES ASSOCIES AU CANCER (FACS).....	86
FIGURE 18: : ROLE PRO-TUMORALE INDIRECTE DU TGF-B DANS LA DISSEMINATION DU CCR .....	87
FIGURE 19: INTRAVASATION PARACELLULAIRE ET TRANSCELLULAIRE DES CELLULES TUMORALES ...	89
FIGURE 20: DISPOSITIF CELLSEARCH® ET EXEMPLES D'IMAGES CAPTUREES PAR LE DISPOSITIF.....	94
FIGURE 21: SCHEMA ILLUSTRANT LA CAPTURE DES CTCS EN INTRAVEINEUSE GRACE AU DISPOSITIF GILUPI CELLCOLLECTOR® .....	95
FIGURE 22: PHOTOGRAPHIES ET COLORATIONS DE CTCS FILTRES PAR LE DISPOSITIF ISET .....	97
FIGURE 23: SCHEMA ILLUSTRANT LE DISPOSITIF SCREENCELL® CYTO PERMETTANT L'ANALYSE CYTOLOGIQUE DES CTCS .....	98
FIGURE 24: PHOTOS DU SYSTEME PARSORTIX® ET SCHEMA ILLUSTRANT DU PROCESSUS DE SEPARATION DES CTCS .....	99
FIGURE 25: DIVERSITE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES (CTCS) ET POPULATIONS INITIATRICES DE METASTASES .....	102
FIGURE 26: LES CTCS GROUPEES (CLUSTER) PRESENTENT UN ETAT DE METHYLATION DE L'ADN FAVORISANT LEUR CAPACITE A INITIER DES METASTASES.....	104

FIGURE 27: MAINTIEN OU ACQUISITION DU PHENOTYPE MESENCHYMATEUX DES CTCS GRACE A L'INTERACTION PHYSIQUE DES PLAQUETTES ET LEURS SECRETIONS DE TGF-B1.....	105
FIGURE 28: ROLE DES NEUTROPHILES POUR L'ARRIMAGE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES (CTCS) AUX CELLULES ENDOTHELIALES ET LEUR EXTRAVASATION.....	109
FIGURE 29: LES PROGRAMMES DE DORMANCE ET LEURS POTENTIELLES CIBLES THERAPEUTIQUES.....	119
FIGURE 30: PRESSION DES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES SUR LES CTDS DORMANTES.....	121
FIGURE 31: : REVEIL DES CTDS DORMANTES SUITE A LA NETOSE PULMONAIRE.....	122
FIGURE 32: DORMANCE DES SOUS-POPULATIONS DE CTDS.....	128
FIGURE 33: EXPRESSION SPECIFIQUE ET FORTE DE CD44V6 A LA MEMBRANE DES LIGNEES DE CTCS.....	135
FIGURE 34: SCHEMA REPRESENTATIF DES DIFFERENTS FORMATS D'ANTICORPS.....	138
FIGURE 35: SCHEMA DES ETAPES DE PRODUCTION DE LA BANQUE DE NANOBODIES.....	140
FIGURE 36: SCHEMA RECAPITULANT LES ETAPES DE SCREENING DE LA BANQUE DE NANOBODIES.....	142
FIGURE 37: SEQUENÇAGE DES SEQUENCES CODANTES DES VHH CANDIDATS.....	143
FIGURE 38: OPTIMISATION DE LA PRODUCTION BACTERIENNE ET LIMITE DES RESINES DE COBALT POUR LA PURIFICATION.....	144
FIGURE 39: OPTIMISATION DE LA PURIFICATION DES NANOBODIES.....	145
FIGURE 40: PHOTOGRAPHIE DES CTCS INDIVIDUELLES OU EN CLUSTER ISOLEES GRACE AU DISPOSITIF PARSORTIX®.....	147
FIGURE 41: PRODUCTION DE MILIEUX CONDITIONNES ENRICHIS ET REALISATION DE TEST ELDA ET DE FORMATION DE SPHERE.....	149
FIGURE 42: ENRICHISSEMENT DES MILIEUX DE CULTURES ET AMELIORATION DE LA CAPACITE A FORMER UNE SPHERE DE LA LIGNEE CTC-44.....	150
FIGURE 43 : ENRICHISSEMENT DES MILIEUX DE CULTURES ET AMELIORATION DE LA CAPACITE A FORMER UNE SPHERE DE LA LIGNEE CTC-45.....	151
FIGURE 44: MARQUEURS EPITHELIAUX ET MESENCHYMATEUX DES CTCS ET CPPS.....	154
FIGURE 45: MIGRATION AMIBOÏDE DES CTCS.....	156
FIGURE 46: DETECTION DES CTCS QUITTANT LA MASSE TUMORALE.....	158
FIGURE 47: : MARQUAGE HEMATOXILINE EOSINE SUR DES COUPES D'EXERESSES DES PATIENTS 44 ET 45.....	160
FIGURE 48: SCHEMAS ILLUSTRANT LE MODELE MURIN DE TUMORIGENESE INTESTINALE ET COLIQUE PRECOCE.....	168
FIGURE 49: VALIDATION DU MODELE VIL-CREERT2 ; APC F/+ ; MTMG.....	170
FIGURE 50: ACTIVATION CONSTITUTIVE DE LA VOIE WNT.....	171
FIGURE 51: CARACTERISATION DES POLYPES.....	173
FIGURE 52: FENETRES D'ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES CELLULES EXPRIMANT LA TOMATO, LA GFP ET EPCAM DANS DIFFERENTS ORGANES.....	174
FIGURE 53: PHOTOGRAPHIES DE ZONES TRANSPARISEES D'INTESTIN (A), DE POUMON (B) ET DE FOIE (C) DE SOURIS VIL-CREERT2 ; APC F/+ ; MTMG INDUITES AU TAMOXIFENE.....	176
FIGURE 54: : SCHEMA RECAPITULATIF DES ETAPES PERMETTANT L'INJECTION SOUS-CUTANEEES DE CELLULES CANCEREUSES EXPRIMANT LA GFP.....	177

FIGURE 55: COMPARAISON DU NIVEAU D'INTENSITE DE MARQUAGE ENTRE DES FOIES DE SOURIS CONTROLES ET DE SOURIS PORTEUSES DE POLYPES. ....	177
FIGURE 56: PHOTOGRAPHIES ILLUSTRANT LA PLUS FORTE PRESENCE DE MACROPHAGES (IBA1) ET DE FIBROBLASTES ACTIVES ( $\alpha$ -SMA) REVELEE PAR IMMUNOHISTOCHEMIE SUR DES COUPES DE FOIE DE SOURIS CONTROLES ET DE SOURIS PORTEUSES DE POLYPES. BARRE D'ECHELLE 100 UM.....	178
FIGURE 57: SCHEMA EXPLICATIF DU MODELE AOM/DSS ET OBTENTION DE RESULTATS CONCORDANTS .....	179
FIGURE 58: : SCHEMA EXPLICATIF DU MODELE VILLIN-CREERT2, APC+/, AI14 ET VALIDATION DU MODELE. SCHEMAS ILLUSTRANT LE MODELE MURIN DE TUMORIGENESE INTESTINALE ET COLIQUE PRECOCE. ....	181
FIGURE 59: DISSEMINATION DE CELLULES EXPRIMANT LA TOMATO ET RECRUTEMENT DE MACROPHAGES DANS LE FOIE DE SOURIS PORTEUSES DE TUMEUR. ....	182
FIGURE 60: SCHEMA EXPERIMENTAL DES INJECTIONS INTRA-SPLENIQUES.....	183



## Introduction

### A Le cancer colorectal

#### 1. Épidémiologie et prise en charge globale

Dans les pays développés, le cancer demeure l'une des premières causes de mortalité avec les maladies cardio-vasculaires. Pour l'année 2019, l'Institut National du Cancer (INCA) dénombrait 382 000 nouveaux cas de cancer en France. 177 400 cas chez les femmes, essentiellement des cas de cancers du sein puis de cancers colorectaux (CCR) et du poumon, et 204 600 pour les hommes avec majoritairement des cancers de la prostate, du poumon et des cancers colorectaux. Ces chiffres sont cependant à relativiser car deux facteurs essentiels expliquent ce grand nombre de cas. D'abord de manière générale en France, il y a une amélioration des conditions de vie, d'hygiène et de soin qui, fort heureusement, augmente l'espérance de vie. Les français meurent moins de maladies infectieuses ou de certaines maladies chroniques comme le diabète ou l'asthme. Le cancer, ou plutôt les cancers, étant pour leur grande majorité, des maladies liées à des inflammations chroniques et au vieillissement, ils ont donc une probabilité plus forte de pouvoir se développer lorsqu'on l'on vit plus longtemps. Ensuite, l'autre facteur qui explique ce nombre de cas, c'est l'augmentation du dépistage des cancers, grâce notamment aux campagnes de dépistage (test Hemocult pour le CCR) et de prévention pour les cancers du sein (Octobre Rose), les cancers de la prostate (Movember) ou les cancers colorectaux (Mars Bleu).

##### a) Épidémiologie

Un certain nombre d'indicateurs sont nécessaires pour mieux appréhender la prise en charge des cancers. C'est par exemple le nombre de décès, de la mortalité, l'état en bonne santé une fois diagnostiqué et traité et enfin les taux de survie 5 ans après le diagnostic. Ces indicateurs reflètent la potentielle amélioration de la prise en charge de la maladie. A titre indicatif, en 2018, il y a eu 157 400 décès par cancer en France mais lorsque l'on regarde sur la période 2010-2018, la proportion des personnes qui décèdent d'un cancer a diminué aussi bien chez la femme que chez l'homme. Enfin, l'autre élément qui explique la baisse du taux de mortalité (0,7% par an et 2% par an entre 2010 et 2018 chez l'homme et la femme respectivement), c'est le moment du diagnostic, ou plus précisément, à quel stade de la maladie se trouve le patient lors du diagnostic. 60% des cancers du sein, 44% des cancers du côlon et 47% des cancers du rectum sont diagnostiqués à un stade précoce et essentiellement chez des personnes entre 50 et 75 ans. En étant diagnostiqué à un stade précoce et à un âge peu avancé, le patient supporte mieux la prise en charge thérapeutique et celle-ci a plus de chance de fonctionner. A contrario, les 10% des malades atteints d'un cancer du sein et les 33% des cancers colorectaux diagnostiqués à un stade avancé, ont une chance de survie fortement réduite [1]. Sans entrer tout de suite dans les détails, le succès de la prise en charge tient au fait que moins la tumeur est agressive et grosse, plus il est facile de

l'éliminer et potentiellement de diminuer les risques de dissémination. L'évolution d'une tumeur solide comporte 5 stades distincts et chaque stade contient des sous catégories afin de définir au mieux, l'avancée de la maladie. Le stade 0 débute par des lésions précancéreuses et peut évoluer jusqu'à une masse tumorale de petite taille mais qui reste *in situ*. On parle alors de polypes. Lorsque le volume de la tumeur a augmenté et a envahi jusqu'à la couche musculuse, il s'agit d'un stade 1. On parle alors d'adénomes précoces. Un envahissement de la tumeur jusqu'à la couche séreuse mais sans atteinte des ganglions lymphatiques indique un stade 2. Ce sont des adénomes avancés. Si ces derniers sont atteints, la tumeur ne nomme alors carcinome et la maladie est au stade 3. Enfin, lorsqu'il y a une dissémination dans des ganglions distants du site primaire et dans des organes distants (on parle alors de sites secondaires ou de métastases), le patient se trouve alors à un stade métastatique, le stade 4 (Figure 1A). Les organes principalement atteints dans le cas du CCR sont le foie, les poumons et le péritoine [2]. Cause majeure des décès imputables aux cancers, les métastases provoquent en effet le dysfonctionnement des organes vitaux envahis. En l'absence de stratégies thérapeutiques efficaces à ce stade avancé, le dépistage et une prise en charge à des stades plus précoces restent donc les meilleures chances de survie.

Le point de départ du cancer est une cellule normale qui se transforme et parvient à s'affranchir des mécanismes régulant l'homéostasie tissulaire en comparaison aux autres cellules normales avoisinantes du même tissu. Le colon et le rectum sont des organes composés de différents tissus (épithéliaux, nerveux ou conjonctifs) où chaque type cellulaire peut potentiellement être à l'origine d'un cancer. Cependant, dans la grande majorité des cas (plus de 90%) le tissu à l'origine du cancer est le tissu épithélial qui tapisse l'intérieur de la paroi du côlon et du rectum. Ce type de cancer est aussi appelé plus communément adénocarcinome. À l'intérieur de ce type de cancer, il existe des sous-groupes d'adénocarcinomes colorectaux. Le sous-groupe le plus fréquent concerne les tumeurs qui se forment au niveau des glandes de Lieberkühn (d'où la dénomination d'adénocarcinomes lieberkühniens) (Figure 1B). Les autres sous-groupes, plus rares sont les adénocarcinomes mucineux (ou colloïdes) et les adénocarcinomes dits à cellules en bague à chatons. Nous nous concentrerons dès à présent sur la forme la plus répandue pour la suite : Les adénocarcinomes lieberkühniens [3]. A l'instar d'autres cancers, les CCR peuvent être dû à des prédispositions génétiques, mais elles ne suffisent pas à elles seules à expliquer le développement d'un CCR. L'exposition répétée à différents facteurs de risques environnementaux reste la cause majeure identifiée pour expliquer l'apparition de la maladie. Les facteurs environnementaux liés aux CCR sont le tabagisme, la consommation importante de viande rouge et de charcuterie, l'excès d'alcool, l'absence d'activité physique ainsi que l'obésité [1]. Ces facteurs de risque concernent plutôt les hommes et les personnes âgées (incidence augmentant à partir de 50 ans et diagnostic vers 70 ans). La prévention porte donc également sur la modification de ces habitudes de vie. Outre les prédispositions génétiques et le mode de vie, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) prédisposent également au développement d'un CCR. En effet, les patients

souffrant de la maladie de Crohn ou de rectocolites hémorragiques ont un risque non négligeable de développer un CCR à terme par rapport au reste de la population [4].

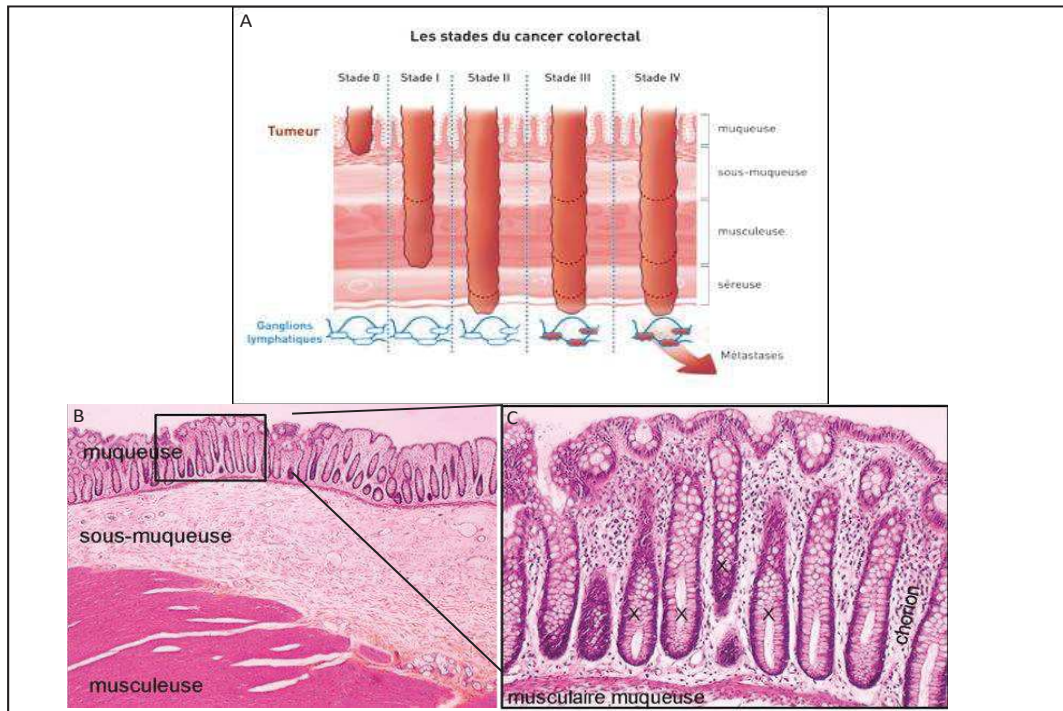


Figure 1 Classification clinique du cancer colorectal (CCR)

(A) Schémas illustrant la classification des stades du CCR selon la profondeur d’envahissement de l’intestin et l’atteinte des ganglions lymphatique et organes distants. (B) Coupe histologique de colon humain permettant de visualiser la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculature. (C) Coupe histologique de colon humain agrandie afin de visualiser le tissu épithélial monocouche, organisé en crypte et plateau au niveau du colon, le chorion (ou lamina propria) qui est le tissu conjonctif et qui repose sur la musculature muqueuse.

## b) Prise en charge globale

La prise en charge thérapeutique est décidée tout d’abord par la localisation de la tumeur et par une classification anatomopathologique. Elle prend en compte la taille et la profondeur de la tumeur, l’atteinte ou non des ganglions lymphatiques, le nombre de ganglions atteints et enfin, la présence ou non de métastases dans des organes à distance. Cette classification dite TNM (tableau 1) est permise grâce à un bilan d’extension (examen visant à évaluer l’étendue du cancer et l’atteinte des ganglions) puis par des analyses histologiques sur des biopsies [5]. Que la tumeur soit localisée au niveau de la partie droite, gauche supérieure ou droite inférieure du colon ou sur le rectum, le premier acte thérapeutique consiste en une intervention chirurgicale afin de retirer la partie anormale, et ceci indépendamment de la classification TNM.

Classification TNM du CCR			
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade 1	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Stade 2a	T3	N0	M0
Stade 2b	T4a	N0	M0
Stade 2c	T4b	N0	M0
Stade 3a	T1-T	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stade 3b	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
Stade 3c	T4a	N2a	M0
	T3-T	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Stade 4a	Tout T	Tout N	M1a
Stade 4b	Tout	Tout N	M1b
Stade 4c	Tout T	Tout N	M1c

**Tableau 1 : Classification TNM du CCR.**

Tis : carcinome intra-épithélial ou intra-muqueux (Carcinome in situ, adénocarcinome intra-muqueux envahissant le chorion ou la musculaire muqueuse)

T1 : tumeur envahissant la sous-muqueuse

T2 : tumeur envahissant la musculuse

T3 : tumeur envahissant la sous-séreuse

T4 : tumeur pénétrant le péritoine viscéral et/ou envahissant au moins une structure/organe de voisinage

T4a : pénétration du péritoine viscéral

T4b : envahissement d'une structure de voisinage

N0 : pas de métastase ganglionnaire régionale

N1 : métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux

N1a : métastase dans 1 ganglion lymphatique régional

N1b : métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux

N1c : dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, en l'absence de ganglion métastatique

N2 : métastase ≥ 4 ganglions lymphatiques régionaux

N2a : métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux

N2b : métastase dans ≥ 7 ganglions lymphatiques régionaux

M0 : pas de métastase à distance

M1a : métastases à distance confinées à un organe sans atteinte péritonéale : foie, poumon, ovaire, ganglions non régionaux

M1b : métastases atteignant plus d'un site métastatique

M1c : métastase péritonéale avec ou sans autre organe atteint

En cas d'envahissement des ganglions de voisinage ou des organes distants, il est alors indispensable de mettre en place une chimiothérapie en plus de la chirurgie, on parle alors de chimiothérapie adjuvante. Elle permet une sécurité supplémentaire pour prévenir le risque de rechute car elle agit sur les quelques cellules pouvant persister après l'ablation des tumeurs et sur d'éventuelles masses encore trop petites et difficiles d'accès pour être enlevées. En l'absence d'envahissement ganglionnaire ou de métastase détectable, le choix d'une chimiothérapie se fait au cas par cas. Les molécules de chimiothérapies pour traiter un CCR sont le 5-Fluorouracile (5FU), l'Oxaliplatine, l'Irinotecan et le Raltitrexed (acide folique) souvent données en bi ou trithérapie. La Capecitabine et le Tegafur (précurseurs du 5FU) sont également utilisés et présentent l'avantage d'être administrés oralement.

Selon le stade de la maladie et pour une efficacité optimale, il existe des protocoles particuliers et utilisant le plus souvent des molécules en combinaison [6]. Par exemple le protocole FOLFIRI (combinaison d'Irinotecan, de 5FU et d'une vitamine potentialisant les effets du 5FU ; l'acide folinique) ou le protocole FOLFOX (où l'on remplace l'Irinotecan par de l'Oxaliplatine). Chacune des chimiothérapies a un mode d'action spécifique mais de manière générale, elles sont cytotoxiques, c'est-à-dire qu'elles visent l'activité mitotique des cellules. Par exemple, les molécules de la famille des platines, tel que l'oxaliplatine, induisent des ponts inter et intra brins d'ADN et entraînent une interruption de la synthèse de l'ADN ; expliquant l'activité cytotoxique et anti-tumorale de cette famille de molécules. Une action cytotoxique synergique a été observée en association avec les composés de la famille des fluoropyrimidines tel que le 5-FU, qui eux perturbent la synthèse d'ADN mais aussi la synthèse de protéines en s'incorporant dans l'ARN.

Tous ces mécanismes d'actions sont le plus généralement liés à des cellules ayant une forte activité de prolifération (augmentation de la réplication de l'ADN, de la synthèse d'ARN, de lipides et de protéines) mais affectent également les cellules saines dans une moindre mesure, ce qui explique en partie l'apparition d'effets secondaires.

La radiothérapie qui est souvent utilisée pour d'autres types de cancer est limitée à des indications à visée curative pour le cancer du rectum avant l'intervention chirurgicale pour réduire la taille de la tumeur (notamment pour épargner l'ablation de l'anus selon la zone) et prévenir les risques de récurrence locale de la tumeur. Elle peut également avoir des indications à visée palliative en cas de métastase osseuse douloureuse (site de métastase relativement rare pour le CCR). Le but d'une irradiation localisée est de générer des espèces réactives oxygénées (ROS en anglais) qui endommagent l'ADN des cellules tumorales tout en épargnant, le plus possible, le tissu sain avoisinant[6].

Enfin, en parallèle de la chimiothérapie, des thérapies ciblées peuvent être proposées. Par exemple l'anticorps Bévécizumab, cible le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et l'anticorps Cetuximab qui lui empêche la fixation des ligands de l'EGFR (Epidermal Growth factor) à condition que le patient n'ait pas de mutation sur le gène de la protéine K-RAS car la voie des MAP kinases en amont de ce récepteur est déjà constitutivement activée [7].

## 2. Initiation et progression tumorale : de l'adénome au carcinome

Il n'existe pas une mais plusieurs classifications des CCR selon que l'on se place d'un point de vue histologique ou moléculaire (génétique ou épigénétique) ou que l'on soit un médecin ou un biologiste. De plus, depuis 2014, il est possible de classer les CCR à partir du profil moléculaire des tumeurs (classification CMS pour consensus molecular subtypes). Selon les gènes exprimés par les cellules tumorales mais également par les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales et cellules immunitaires), une tumeur peut être classifiée dans l'un des 4 sous-types moléculaire. Une nouvelle classification CMS actualisée et divisée en 6 groupes a été proposée en 2013 mais est encore peu retrouvée dans la littérature [8]. Il est intéressant d'observer que ces classifications ne sont pas exclusives, bien au contraire et que leur superposition permet de mieux comprendre le processus d'évolution de la maladie et donc de trouver des moyens plus efficaces pour éliminer les cellules cancéreuses même celles résistantes aux chimiothérapies conventionnelles. Le génie génétique, les modèles murins transgéniques et les cultures d'organoïdes ont permis de proposer et valider certaines hypothèses comme la voie conventionnelle proposée par B. Vogelstein et E.R. Fearon.



### a) Modèle de Vogelstein et Fearon

Le vieillissement d'un tissu est un facteur clé pour comprendre l'évolution d'un cancer. Cette maladie reste essentiellement une conséquence de l'âge et de la fréquence d'exposition à des facteurs inflammatoires et mutagènes. L'accumulation de mutations est une conséquence inévitable du temps sur le génome d'un organisme. Le plus souvent ces mutations sont « supposées » sans conséquence délétère pour l'intégrité du génome et donc le bon fonctionnement des cellules. Ce sont des mutations dites « passagers ». Malheureusement, certaines mutations touchent parfois des gènes dont le rôle peut être fondamental pour le bon fonctionnement de la cellule à un moment donné ou dans un organe donné. Ainsi, pour quelques organes tels que le colon et le rectum, un petit nombre de gènes clés ont été identifiés comme responsables des CCR lorsqu'ils sont mutés. On parle alors de mutations « drivers » car elles vont conduire à perturber l'homéostasie cellulaire du tissu et conduire à l'acquisition d'avantages sélectifs par quelques cellules les poussant à se transformer.

L'épithélium intestinal et colique est composé d'une monocouche de cellules polarisées, tapissant le chorion (ou lamina propria) et capable de se renouveler intégralement en 5 à 7 jours. Ce renouvellement perpétuel est permis grâce à une homéostasie cellulaire finement régulée comme illustré en figure 2B. À la base de l'invagination glandulaire de la muqueuse que l'on appelle crypte, se trouve deux compartiments. Le plus profond est le compartiment où se localisent deux sous populations de cellules épithéliales appelées cellules souches intestinales (CSIs). La première sous population de cellules souches dite CBC (pour Crypt Base Columnar Cells), est celle qui assure en condition d'homéostasie cellulaire, le renouvellement intégral de l'épithélium [9]. Ces cellules sont espacées les unes des autres par des cellules différenciées nommées cellules de Paneth (pour l'intestin) ou cellules en gobelet (pour le colon). La deuxième sous population de CSIs se trouve à l'interface de ce compartiment et du compartiment supérieur, juste au-dessus de la cellule de Paneth la plus éloignée du fond de crypte. On parle des CSIs en position +4 et ces dernières restent en état de quiescence en condition d'homéostasie cellulaire. En cas de lésions atteignant les CSIs CBC, les cellules en position +4 sont en charge du repeuplement du fond de la crypte en CSIs et du rétablissement de l'homéostasie normale de l'épithélium intestinal [10]. Le compartiment supérieur de la crypte, dite région d'amplification transitoire, contient des cellules prolifératives encore peu différenciées : les progéniteurs. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, les progéniteurs dérivent en direction de la villosité mais finissent par épuiser leur capacité de prolifération au profit d'une différenciation et spécialisation. Débute alors le compartiment différencié : la villosité. Ce dernier compartiment se termine à l'apex de la villosité (pour l'intestin) ou du plateau épithélial (pour le colon et le rectum qui ne comportent pas de villosité). Les cellules différenciées ne prolifèrent plus. Elles se déplacent parce que le compartiment d'amplification transitoire génère constamment de nouvelles cellules qui poussent les cellules différenciées vers le sommet (Figure 2A). Arrivées à l'extrémité de ce dernier compartiment, les cellules

différenciées desquamèrent (mourront) dans la lumière intestinale par anoïkis, sous la contrainte mécanique qu'exercent les cellules en amont. Ceci est sans gravité puisqu'un nouveau pool de cellules a déjà été généré dans la crypte par les CSIs pour être, en 7 jours, au niveau de la lumière. Ainsi, l'ensemble des cellules épithéliales dérivent des cellules de la crypte, On décrit alors un axe bas-haut dit axe crypte-villosité où des voies de signalisations vont maintenir une zone de CSIs, une zone de cellules peu différenciées mais prolifératives et une zone de cellules très différenciées mais non prolifératives. Il a été mis en évidence ces dernières décennies, que les signaux régulant positivement l'autorenouvellement et la prolifération des CSIs sont la voie WNT (Figure 2B), la voie de l'EGFR/MAPK et la voie NOTCH. A contrario, la voie des BMPs/TGF- $\beta$  assurent un effet cytotatique et de différenciation. Un modèle de gradient de concentration des molécules dites « pro-souches » et « pro-différenciation » a été proposé selon l'axe crypte-villosité pour expliquer l'organisation des cellules épithéliales intestinales [11] (Figure 2A).

Au cours de la vie d'un individu, la succession de mitoses réalisées par les cellules de la crypte, conduit statistiquement, à plus accumuler de mutations comparées aux cellules de la villosité qui ne prolifèrent plus. Or une mutation sur un des gènes participant à l'une des 4 voies clés (citées dans le paragraphe précédent) peut donc très fortement perturber l'homéostasie cellulaire et déclencher le processus de transformation de l'épithélium. Cependant, l'ordre des voies perturbées, ainsi que les acteurs mutés dans chacune des voies, ne le sont pas tout à fait de manière aléatoire (Figure 2C). En effet, Vogelstein et Fearon ont proposé pour l'initiation et le développement des adénocarcinomes lieberkühniens (dit de morphologie tubulaire et caractérisé par une instabilité chromosomique), une chronologie de perturbations de ces voies de signalisation avec comme point de départ, une activation constitutive de la voie Wnt [12]. L'altération des autres voies permettent à la tumeur d'évoluer jusqu'au stade de carcinome mais si l'activation constitutive de la voie Wnt est perdue, la tumeur dégénère et disparaît. Réalisée à l'aide de souris transgénique et d'un *ShAPC*, une étude a clairement démontré qu'une tumeur tubulaire peut se maintenir et évoluer si et seulement si, la voie Wnt est activée de manière constitutive, d'où l'expression anglaise « gate keeper » désignant *APC* comme un gène « garde du corps » de l'intégrité intestinale [13].

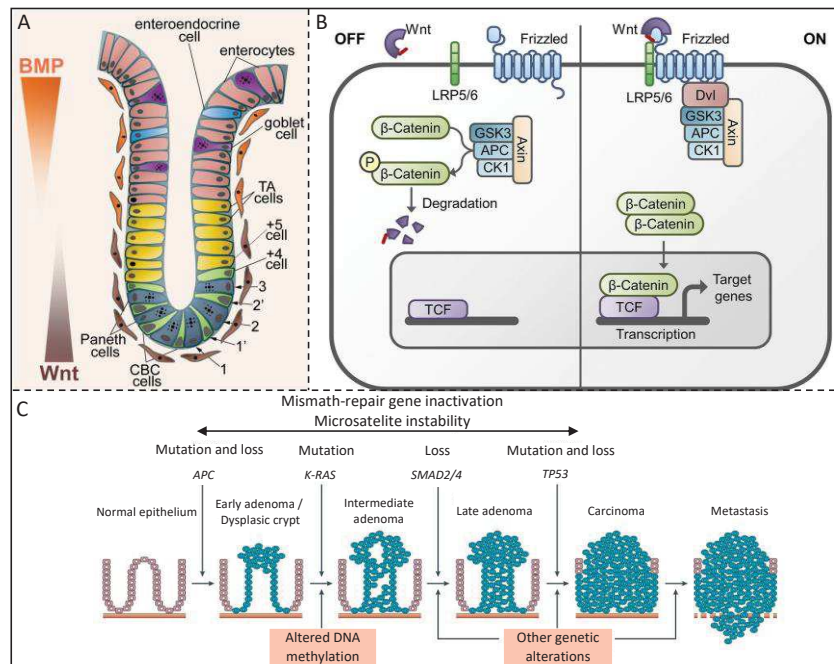


Figure 2: Voies majeures impliquées dans l'homéostasie intestinale et permettant l'apparition d'un cancer colorectal.

(A) Schéma représentatif de l'architecture cellulaire d'une crypte colique (Issue de Krausova, M. & Korinek, V. Cellular Signalling. 2013). (B) Représentation schématique de la voie Wnt avant et après la fixation du ligand Wnt par Frizzled. Lorsque la voie est active, le complexe Axine/CK1/GSK3 migre au niveau de la membrane, entraînant la libération de la β-caténine dans le cytoplasme. L'accumulation de celle-ci entraîne sa translocation au noyau. Elle pourra se lier au facteur de transcription TCF pour induire l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (Issue de Haigis, K.M. The molecular pathogenesis of colorectal cancer. 2013). (C) Représentation schématique des séquences d'altération génétiques responsable de la transformation d'une épithélium colique normal en adénocarcinome (Adapté de Davies, R.J. et al. Nat. Rev. 2005)

Dans la très grande majorité des cas d'adénomes précoces (80%), l'élément initiateur du processus de cancérisation des muqueuses coliques et rectales est une mutation inactivant le gène suppresseur de tumeur APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) [14]. Pour les 20% de cas restants, il s'agit essentiellement d'une mutation activant de manière constitutive la β-caténine [15] et dans une moindre mesure, une mutation rendant l'Axine non fonctionnelle [16]. Cette activation constitutive de la voie WNT promet un autorenouvellement continu et un phénotype proche des cellules souches. En relativement peu de temps, des lésions dysplasiques vont apparaître et évoluer en différents grades. L'évolution du polype bénin (ou adénome précoce) en polype hyperplasique se fait au grès de l'accumulation de mutations bien spécifiques et séquentielles. Il évolue petit à petit en adénome tardif puis en carcinome. Le carcinome devient invasif lorsqu'il parvient à rompre la lame basale et envahir les tissus sous-jacents tels que la muqueuse, la musculuse et la séreuse.

Nous privilégierons dorénavant cette classification « biologique » plutôt que la classification clinique et TNM car la définition de tumeur (adénome comme carcinome) *in situ* correspondront ainsi mieux à ce qui est par exemple défini pour le cancer du sein. En effet, contrairement à d'autres organes, un CCR infiltrant uniquement la muqueuse est considéré comme *in situ* pour les



cliniciens et anatomopathologistes, malgré la rupture de la lame basale. Ils considèrent en effet, que le risque de dissémination d'un cancer uniquement intra muqueux est nul [17].

Il existe deux types de polypes selon leur devenir au cours du temps :

- Des polypes qui ne dégèrent pas en carcinomes ; on parle de polypes hyperplasiques et inflammatoires. Ils restent cependant des polypes à surveiller car si leur diamètre excède 1cm, ils ont potentiellement évolué en polypes festonnés qui eux risquent de devenir cancéreux.
- Des polypes avec un risque d'évolution en carcinomes. Ce sont des polypes adénomateux ou adénomes. Ils représentent environ 70% des polypes. Seuls 10% des adénomes atteignent 1cm ou plus et globalement, 25% seulement d'entre eux deviendront des carcinomes. Malheureusement, à défaut de pouvoir les différencier et en absence de marqueurs lors de la coloscopie, ils sont donc tous retirés afin de prévenir de tout risque d'évolution en carcinome [17].

L'activation constitutive de la voie Wnt et plus précisément une mutation sur le gène APC s'avère être l'une des deux causes d'une forme rare (1%) et héréditaire des CCR ; le syndrome de polypose adénomateuse familiale (PAF) [18][19]. Ce syndrome autosomique dominant se traduit par une mutation germinale du gène APC se transmettant à la descendance. La conséquence est le développement dès l'adolescence, de dizaines jusqu'à des milliers de polypes adénomateux au niveau du colon et du rectum mais parfois aussi au niveau de l'intestin et de l'estomac. Pris individuellement, ces polypes ne sont pas plus susceptibles de devenir malins que ceux observés chez une personne non atteinte de PAF mais vu leur très grand nombre, le risque que l'un d'entre eux évolue est accru. La chirurgie prophylactique visant à supprimer tout ou une partie du colon reste malheureusement nécessaire car près de 100% de ces patients risquent de développer un cancer avant l'âge de 40 ans. Des modèles murins transgéniques ont permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle la mutation sur le gène APC et plus largement l'activation constitutive de la voie WNT représente l'origine des polypes intestinaux [20][21][22]. Nous reviendrons en détail sur ces modèles à la fin de cette introduction.

Cependant cette seule mutation sur APC et la prolifération qu'elle induit ne permet pas de récapituler l'évolution des CCR. Tout d'abord, que ce soit des personnes atteintes de PAF ou non, les CCR mettent plusieurs dizaines d'années pour évoluer et à terme devenir un carcinome métastatique. Cette observation soutient donc l'idée que l'évolution d'un cancer ne repose pas seulement sur une prolifération anarchique linéaire. D'autres processus interviendront dans quelques rares polypes à des moments clés, notamment par l'altération d'autres voies de signalisation telle que la voie de l'EGFR/MAPK par exemple.

À tout niveau de la voie de l'EGFR/MAPK, que ce soit au niveau du récepteur à l'EGF (EGFR), de la protéine GTPase K-RAS juste en aval, ou la sérine-thréonine kinase B-RAF, des altérations (mutations ou des amplifications du gène pour l'EGFR) ont pour conséquences de rendre la voie constitutivement active, renforçant les stimuli autonomes de prolifération et pro-survie des cellules cancéreuses tout en stimulant l'angiogenèse. On retrouve de nouveau, certains acteurs de cette voie plus souvent altérés que d'autres. Le premier d'entre eux, l'oncogène K-RAS, est muté dans un peu plus de 35% des cas de CCR. Il s'agit essentiellement d'une substitution sur le codon 12, 13 ou 61 [23]. La protéine devient ainsi, indépendante de l'EGFR (ou tout autre récepteur) et lui permet ainsi de phosphoryler la sérine-thréonine kinase RAF, premier élément de la cascade MAPK. Cette dernière peut également être mutée, plus précisément l'isoforme B-RAF dans 10% des CCR [7]. Ces deux mutations sont exclusives dans une même cellule tumorale mais il n'est pas impossible que des cellules acquérant l'une ou l'autre de la mutation coexiste au sein de la même tumeur ce qui complique la prise en charge thérapeutique. Les altérations de cette voies (majoritairement des amplifications et peu de mutations activatrices) est compris dans une fourchette très large entre 25% et 77 % des cas de CCR selon les études et les techniques utilisées [24]. Enfin, on retrouve également des altérations affectant la voie PI3K/AKT, voie alternative à la voie MAPK pour K-RAS. Par exemple, une mutation inactivatrice du gène suppresseur de tumeur PTEN ou l'activation constitutive des oncogènes PI3K ou AKT induisent de manière directe ou indirecte, des stimuli pro-survie et mitotique [25].

La 4<sup>ème</sup> voie la plus fréquemment touchée dans les CCR est la voie des BMP/ TGF- $\beta$ . Dans la majorité des cas, il s'agit d'une mutation perte de fonction sur le gène du récepteur TGFBR2 ou sur le gène d'une des Smad. Pour ces dernières, les mutations concernent le plus souvent la Smad commune Smad4 et plus rarement la Smad régulatrice Smad2 [26]. Cette perte de fonction a pour conséquence de court-circuiter l'effet différenciant et antimitotique des fortes concentrations de TGF- $\beta$  provenant des fibroblastes du chorion. L'effet différenciant des BMP est également perdu dans le cas d'une mutation de Smad4. De plus, dans le cas où la mutation concerne Smad4, des voies alternatives peuvent être activées comme la voie MAPK ou Rho/ROCK, complexifiant un peu plus cette dualité entre le rôle anti-apoptotique et pro-tumorale du TGF- $\beta$  observé dans de nombreux cancer [27]. Ce rôle pro-tumoral de TGF- $\beta$  sera abordé en détail plus tard. Pour conclure sur cette voie, en termes de morphologie et phénotype, cette insensibilisation au TGF- $\beta$  permet l'évolution d'un adénome intermédiaire en adénome de grande taille et peu différencié : un adénome tardif.

Enfin, la voie P53, qui se trouve la dernière au niveau chronologique, est altérée par mutation inactivatrice de la protéine éponyme ou plus rarement du gène codant pour la protéine ATM. Cette inactivation de p53 par mutation de TP53 est le 2<sup>nd</sup> événement génétique majeur dans le CCR puisqu'il est retrouvé 30 à 50% des CCR. Cette étape ultime est cruciale pour la survie et l'évolution des adénomes de grande taille et malins en carcinomes car la protéine p53 joue le rôle de gardien de l'intégrité du génome. Avec d'autres protéines telles que ATM, p53 permet une régulation fine des points de contrôle mitotiques, des arrêts du cycle cellulaire en cas de dommage à l'ADN et l'entrée en apoptose si ces dommages ne peuvent être réparés. Les mutations peuvent alors s'accumuler dans le génome sans entraîner l'apoptose et les conséquences potentielles sont des résistances à la radiothérapie ou aux chimiothérapies dont le but est de provoquer des dommages à l'ADN. Cette instabilité génétique renforce la divergence des profils mutationnels au sein de la population tumorale, amenant la notion d'hétérogénéité tumorale. Un chapitre à venir sera dédié en détail à l'hétérogénéité tumorale.

#### **b) Les tumeurs festonnées**

En parallèle du modèle conventionnel, un autre modèle a été proposé pour le cas des tumeurs festonnées, un sous type morphologique représentant 7 à 15% des CCR. On parle également de polypes mucineux ou de polypes « en dent de scie » et ils sont caractérisés par une instabilité micro-satellitaire. Son évolution est assez similaire à celle du syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) qui eux représentent environ 3% des CCR [28]. Comme pour la PAF, il s'agit d'une transmission de mutations autosomiques dominantes. Ces mutations germinales sont situées sur les gènes qui codent pour des protéines clés de la réparation des dommages à l'ADN, notamment les protéines du système MMR (MisMatch Repair) tels que MLH1, MSH2, MSH6. Le syndrome de Lynch se caractérise par le développement de multiples tumeurs avec une instabilité des microsatellites non seulement au niveau du côlon mais également au niveau de l'estomac, le tractus urinaire et l'endomètre. Leur nombre en comparaison avec la PAF reste moindre. Cependant, la survenue d'un CCR chez ces patients est très importante (80%) et prédispose également à des cancer des ovaires, gastriques ou de l'endomètre [29][30].

La cascade d'altération génétique des tumeurs festonnées n'est pas aussi clairement définie que pour la voie conventionnelle mais certains acteurs ainsi que l'ordre des altérations sont aujourd'hui élucidés. Outre le gène *MLH1* participant à l'instabilité micro-satellitaire, les gènes potentiellement altérés et permettant la progression tumorale des polypes festonnés sont tout d'abord des protéines B-RAF (et dans une moindre mesure K-RAS), les protéines de la voie Wnt (rarement APC), puis P16, P53 (Figure 2C) [30][31]. D'autres acteurs ont depuis émergés comme l'IGF1R et surtout NOTCH.

### 3. Hétérogénéité intra-tumorale, cellule d'origine du cancer et cellules souches cancéreuses (CSC)

La précédente section a décrit les différentes formes sporadiques et héréditaires des CCR, illustrant la notion d'hétérogénéité inter patient (entre les patients). Elle a également expliqué que pour un même patient, la totalité des polypes ne dégénérera pas en carcinome, soulignant ici la notion d'hétérogénéité inter-tumorale. De plus, elle a également décrit le modèle de progression linéaire, où des altérations génétiques permettaient le passage de simple adénome *in situ* à un carcinome invasif. Cependant, cela n'implique pas que parmi les cellules qui forment l'adénome et qui sont mutées sur le gène *APC*, toutes vont acquérir une mutation impliquant la voie de signalisation suivante. De plus, une même voie de signalisation altérée dans deux cellules, peut être due à une mutation sur deux acteurs clés mais différents de la même voie. Au sein de la même tumeur, se forment alors différents clones, introduisant le concept d'hétérogénéité génétique intra-tumorale. Pendant longtemps, il était admis qu'au sein de ces clones toutes les cellules avaient relativement le même potentiel tumorigène, c'est-à-dire qu'elles participent toutes de manière comparable, à la progression tumorale et que chacune était capable d'initier une tumeur. Ce modèle est nommé stochastique. Cependant, ce modèle ne permettait ni de refléter l'évolution tumorale des cancers dont le CCR, ni de définir l'identité des cellules dans lesquelles les cascades d'altération génétiques doivent se passer pour permettre à un polype d'évoluer en carcinome. Les notions de cellules souches, de progéniteurs et cellules différenciées de la hiérarchie cellulaire des tissus sains ont alors été proposées pour tenter de mieux l'évolution tumorale tout en conduisant à de nombreuses questions. Faut-il que ce soit nécessairement une cellule souche ? Ou à partir du moment où l'ensemble des voies est altéré, peut-il s'agir d'un progéniteur ou d'une cellule différenciée ? De plus, après une chimiothérapie, quelles sont les cellules résiduelles et sont-elles toutes capables de reformer une tumeur ? Cette nouvelle tumeur sera-t-elle homogène c'est-à-dire contenir des cellules toutes identiques à la cellule dont elles découlent ? Ou bien cette nouvelle tumeur sera une tumeur hétérogène c'est-à-dire contenant différents clones ? Ces questions amènent plus largement des questionnements sur la notion de cellule à l'origine du cancer, de cellule souche cancéreuse et de plasticité tumorale.

#### a) Définitions et modèles

En 1988, il fût proposé que la diversité phénotypique des cancers puisse provenir d'une différenciation spontanée des cellules cancéreuses. Cette hypothèse fût énoncée comme ceci par G. Barry Pierce : « les carcinomes sont composés d'un mélange de cellules souches malignes, lesquelles ont des capacités de prolifération et une capacité limitée de différenciation dans des conditions homéostatiques normales, et des cellules cancéreuses différenciées, potentiellement bénignes, descendant de ces cellules malignes » [33]. Cette hypothèse a été validée pour la

première fois dans la leucémie aigüe myéloïde par l'équipe de J.E. Dick en 1994. Son équipe a démontré que la majorité des cellules cultivées à partir de tumeurs humaines puis xénotransplantées dans des souris immunodéprimées SCID, avaient des capacités prolifératives limitées. En partant de l'hypothèse qu'une sous-population très rare devait permettre le maintien de la croissance tumorale, ils ont tout d'abord réalisé des xénotransplantations orthotopiques de sang de patients dans des souris immunodéprimées. Sachant que les cellules de leucémie aigüe myéloïdes nécessitent de nombreuses cytokines rien que pour leur culture éphémère *in vitro*, les auteurs ont également traité les souris avec ces cytokines afin d'améliorer la transplantation. Le but de ces transplantations étant de permettre la formation de tumeurs et de pouvoir vérifier l'existence d'une sous-population cancéreuse à l'origine de ces tumeurs. Après plus d'un mois, la moelle osseuse des souris contenait entre 10 et 100% de cellules humaines avec les mêmes caractéristiques tumorales que chez les patients. Des métastases ont par exemple été constatées dans le cas de transplantation depuis des patients à un stade avancé de la maladie. À partir de ces transplantations, les auteurs ont ensuite identifié une sous-population tumorale capable d'initier des leucémies et qui exprimait à leur surface, le marqueur CD34. Ce marqueur était déjà connu pour être à la surface des cellules souches hématopoïétiques et quelques progéniteurs encore très peu différenciés. Parmi les cellules leucémiques exprimant CD34, celles qui exprimaient le marqueur CD38, perdaient cette capacité d'initiation tumorale, indiquant qu'il s'agissait de progéniteurs tumoraux. La xénotransplantation des cellules cancéreuses exprimant seulement CD34 conduisait à la formation de tumeur contenant toujours une rare population de cellules exprimant seulement CD34 mais également des cellules exprimant CD34 et CD38 ainsi que des cellules n'exprimant aucun de ces deux marqueurs. Ainsi les auteurs ont proposé qu'il existe une population cancéreuse rare au sommet de l'organisation tumorale, exprimant des marqueurs de cellules souches saines, capables de générer le reste des cellules qui compose la tumeur dont les progéniteurs [34]. Ces cellules capables d'initier des tumeurs seront par la suite également nommées cellules souches cancéreuses (CSCs) par analogie aux cellules souches saines.

Plus récemment, l'existence des cellules souches cancéreuses (CSCs) a été également confirmée dans les tumeurs solides telles que les tumeurs du sein et glioblastomes [35][36]. De nombreuses autres études ont par la suite, validé l'existence des CSC dans le CCR [37][38][39]. Chacune identifia parmi les cellules cancéreuses d'une tumeur de CCR humain, une population minoritaire ayant des capacités tumorigènes ; c'est à dire capables de générer une tumeur, une fois injectées dans des souris immuno-déficientes. Ces cellules furent également nommées cellules initiatrices de tumeur (CIT). De plus, « l'homéostasie » d'une tumeur est aussi régulée par les CIT et notamment grâce à leur capacité d'autorenouvellement. Ces CIT et les autres cellules cancéreuses plus différenciées de la tumeur reflètent donc ainsi la hiérarchie rencontrée dans un tissu sain. La hiérarchie au sein d'une tumeur débute au sommet par des cellules aux propriétés similaires à celles des cellules souches (CSs) (très peu différenciées et qui s'auto-renouvellent). En aval se

trouvent les cellules progénitrices peu différenciées et avec un potentiel prolifératif fort mais limité. Ces dernières, au fur et à mesure des divisions s'engagent dans une voie de différenciation et deviennent des cellules différenciées non prolifératives et bénignes. Ce nouveau modèle dit hiérarchique ou CSC, s'oppose dans un premier temps, puis s'impose au modèle stochastique où il n'existe pas ou peu de hiérarchie entre les différents clones et où toutes les cellules contribuent de la même manière au développement tumoral. Aujourd'hui, la communauté scientifique considère que ces deux modèles ne sont pas exclusifs et que le modèle stochastique doit être intégré au modèle hiérarchique [40][41] (Figure 3A). En effet, depuis 1994, la littérature fait état de nombreuses évidences prouvant que divers cancers, aussi bien leucémiques que solides, seraient organisés hiérarchiquement et soutenus par une sous population de cellules s'auto-renouvelant et générant l'intégralité des types de cellules cancéreuses (aussi bien tumorigènes que non tumorigènes) [34][35][42][43][36][37]-[39][44]. S'il semble plus correspondre à l'évolution de la maladie, le modèle CSC est-il forcément unidirectionnel? Et la cellule à l'origine du cancer était-elle donc une CSC ?

#### b) Origine des CSC

Les cellules souches ont été les candidates privilégiées pour être les cellules où se déroulerait la transformation, c'est à dire à l'origine du cancer. En effet, l'accumulation d'altérations épigénétiques, épitranscriptomiques et de mutations génétiques s'échelonne sur plusieurs années. Or la progression tumorale nécessite la présence de ces mutations et altérations. Il est donc plus probable que les cellules souches, grâce à leurs propriétés inhérentes de longévité et d'autorenouvellement, soient les cellules à l'origine du cancer. Cependant, toute cellule dans la hiérarchie, avec une capacité proliférative minimale, pourrait devenir une cellule à l'origine du cancer si elle acquiert des mutations qui empêchent la différenciation et réinitialisent de manière pérenne, les capacités d'autorenouvellement. Ainsi, ses divisions symétriques généreront un pool de CSCs assurant le maintien de la tumeur, sa progression et en cas de résection ou chimio/radiothérapie, la reformation d'une tumeur composée de CSCs, de progéniteurs et cellules différenciées (Figure 3B).

Dans quelques cancers, plusieurs études ont identifié un même type cellulaire au sein de la hiérarchie dans lequel peut se dérouler la transformation tumorale. Mais pour beaucoup de cancers, l'identification de la cellule à l'origine du cancer, que ce soit à l'aide de modèle murin ou d'études sur des échantillons humain, n'a pas conduit à discriminer un seul type cellulaire. C'est particulièrement le cas pour le cancer du prostate [45]-[49], le glioblastome [50]-[56] ou le cancer du sein[57]-[59][59][60]. Dans ces trois exemples, le phénotype de la cellule à l'origine du cancer semble ainsi déterminer le sous-type de cancer qui en découle. La cellule à l'origine reste parmi les cellules en haut de la hiérarchie (CSs ou progéniteurs précoces) qui possèdent donc

toujours une relative capacité d'autorenouvellement. Plus la transformation à lieu au sommet de la hiérarchie, et plus le sous-type tumoral qui en découle sera agressif (Figure 3C)

Concernant le cancer du côlon, suite à l'identification du marqueur *Lgr5*, exprimé spécifiquement dans les cellules souches intestinales (CSI), appelées encore "CBC" [62], l'équipe de Hans Clevers aux pays bas, a pu générer en 2008, un élégant modèle murin inductible (*Lgr5-EGFP-ires-Cre<sup>ERT2</sup> ; Apc<sup>Loxp/Loxp</sup>*) dans lequel la perte d'*APC* est restreinte aux CSI exprimant *Lgr5*. Ils ont ainsi démontré que la seule perte des deux allèles *APC*, spécifiquement dans les cellules souches exprimant *Lgr5*, suffisait pour l'initiation d'un adénome intestinal [63] ou gastrique [64]. L'utilisation d'autres marqueurs spécifiques des CSIs comme CD133 ont conduit aux mêmes résultats [65]. Ce fût également le cas pour le marqueur *Bmi1* (pour le petit intestin) ou *KRT19* (au niveau du colon), spécifiques de l'autre sous-population de CSI en position +4 [8][9][65]. Ces travaux sont controversés car l'équipe de H. Clevers avait montré que cette même perte d'*APC* dans les cellules du compartiment d'amplification, c'est à dire les progéniteurs, n'était pas suffisante pour former des tumeurs. Ces travaux suggèrent que les deux sous populations de cellules souches représentent les seules cellules capables d'initier des tumeurs suite à une mutation oncogénique. Cependant, le modèle utilisé par Clevers comporte quelques biais expérimentaux. En effet, ils ont recours au modèle *Ah-cre/Apc<sup>flox/flox</sup>/Rosa26R* pour induire la perte fonctionnelle d'*APC* dans l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal, dont les CSI et les progéniteurs. Cette perte d'*APC* n'est donc pas dans ce modèle, spécifiquement restreinte aux progéniteurs. De plus, le composé utilisé pour induire la recombinaison est la  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF) et elle est administrée oralement. Il est donc difficile de comparer exactement les résultats obtenus par ce modèle avec ceux obtenus avec le modèle *Lgr5-EGFP-ires-Cre<sup>ERT2</sup> ; Apc<sup>Loxp/Loxp</sup>* dans lequel, l'induction se fait par une injection péritonéale de Tamoxifène.

Enfin, l'ensemble de ces études conclue unanimement à l'incapacité des cellules différenciées à être à l'origine du cancer. Cela tient au fait que la vitesse de renouvellement de l'épithélium intestinal est le plus rapide de l'organisme et que les cellules différenciées ont une capacité de prolifération faible ou nulle. Donc, elles n'ont statistiquement presque aucune chance d'acquérir suffisamment d'altérations génétiques avant de mourir.



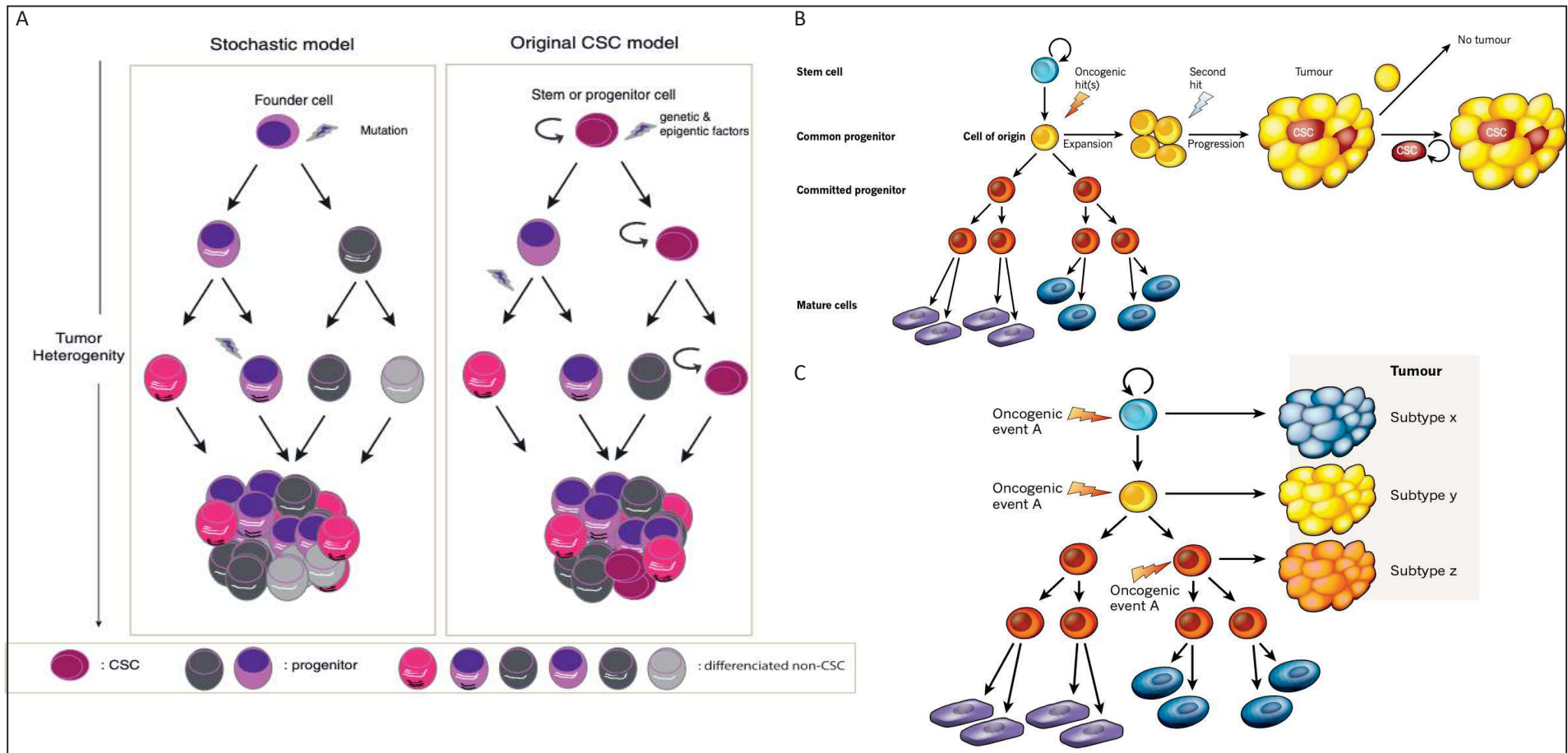


Figure 3: Schémas représentatifs des différents modèles de la tumorigénèse et de la cellule à l'origine du cancer.

A) Le modèle stochastique et des cellules souches cancéreuses. Le modèle stochastique ou clonal considère que des clones dérivent tous d'un ancêtre commun mais que chaque clone dispose d'un pouvoir tumorigène comparable. Le modèle des cellules souches cancéreuses repose lui sur l'apparition d'une altération génétique (mutation ou modification épigénétique) au sein d'une cellule souche. Cet événement entraîne la transformation de cette cellule et de toutes les cellules qui en dérivent. Ces dernières n'ont cependant pas un pouvoir tumorigène comparable (Adapté de Hamai, A. *et al. Cancer Stem Cell Res.* 2014). (B) Cellule à l'origine du cancer et évolution des cellules souches cancéreuses. La hiérarchie des cellules normales repose sur des cellules souches qui progressivement génèrent des progéniteurs. Ces derniers se multiplient et se différencient au fur et à mesure, générant les cellules spécialisées d'un tissu. Un progéniteur très peu différencié peut accumuler des altérations génétiques et épigénétiques permettant l'émergence d'une cellule souche cancéreuse (CSC). Dans le modèle illustré, seule la CSC est capable de soutenir la tumorigénèse notamment après une chimiothérapie éliminant la plupart des cellules cancéreuses non-souches (Issue de Visvader, J.E. *Nature.* 2011). (C) Hétérogénéité inter-tumorale. Parmi les cellules qui composent la hiérarchie cellulaire normale, chaque type cellulaire peut servir de cellule à l'origine d'un cancer. Selon la cellule à l'origine, des cancers de différents sous-type seront générés et avec des caractéristiques de résistance et d'agressivités différentes (Issue de Visvader, J.E. *Nature.* 2011).



Il est cependant important de noter que quelques études soutiennent qu'une CSI peut ne pas être l'unique cellule à l'origine du cancer. Des auteurs avaient déjà proposé que la co-expression de Bcl-2 et de la protéine de fusion BCR/ABL, suffisait à des cellules myéloïdes progénitrices d'être à l'origine d'une leucémie chez la souris [67]. Dans l'épithélium intestinal, l'expression de BCL-2 est forte dans les cellules exprimant Lgr5 et diminue dans les cellules au fur et à mesure de leur différenciation. Il est également connu que le gène codant pour la protéine anti-apoptotique BCL-2 est l'une des cibles de la voie Nuclear factor- $\kappa$ B (Nf- $\kappa$ B) [68]. Or dans le cas du CCR, une étude rapporte qu'une activation constitutive de la voie Wnt dans la villosité, combinée à une activation de la voie Nf- $\kappa$ B, mène à une dédifférenciation et à la formation de larges excroissances adénomateuses dans les compartiments différenciés [69]. Il est également démontré que dans un contexte fortement inflammatoire, des facteurs tels que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  vont activer la voie Nf- $\kappa$ B et induire une expression de BCL-2 dans les cellules différenciées. Il est donc possible qu'une cellule différenciée, exposée à des facteurs inflammatoires et avec une seule mutation driver, se dédifférencie, réactivant un phénotype souche et relativement prolifératif. La tumeur peut ainsi croître et se maintenir en court-circuitant les signaux apoptotiques qui auraient, en temps normal, contenu cette anomalie en une structure cystique indolente comme décrit dans le modèle *Ahcre/Apc<sup>flox/flox</sup>/Rosa26R* [63]. Quelques observations médicales viennent appuyer l'hypothèse que les CSI ne sont pas les seules cellules capables d'initier une tumeur. En effet, les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales chroniques (MICI) telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite, ont plus de risques de développer un CCR. De plus, des traitements anti-inflammatoires (l'Aspirine, le Celecoxib ou un inhibiteur de COX-2) réduisent fortement la formation de polypes et le développement de CCR [70]–[75]. L'ensemble de ces observations et résultats suggèrent, que l'inflammation participe à l'évolution des polypes en carcinomes. Ainsi, des cellules probablement progénitrices (et peut-être différenciées) peuvent, sous l'effet synergique de l'inflammation et d'une mutation driver, se dédifférencier en CSCs et être des cellules à l'origine du CCR. De nouvelles expériences de traçage cellulaire, avec une perte spécifique d'APC dans tous les types cellulaires combinée à des facteurs inflammatoires, permettraient de valider cette autre potentielle source de CSC. Cependant, l'hypothèse que la cellule initialement transformée soit une cellule souche n'est pas forcément exclusive de l'hypothèse qu'un progéniteur peu différencié puisse également être une cellule à l'origine du contraire. Au contraire, ces deux hypothèses peuvent se compléter pour correspondre au mieux à la genèse des CCR.

Pour clore cette section, notons que la difficulté à identifier la cellule à l'origine d'un cancer est bien souvent reliée au départ, à la difficulté de définir précisément la population de cellules souches dans un tissu. Malgré les quelques alternatives proposées sur l'identité de la cellule à l'origine du CCR, la caractérisation des CSIs et de leurs marqueurs a fortement facilité la caractérisation des CSCs puis l'identification de la cellule à l'origine du CCR. Cela démontre

l'importance d'avoir des moyens moléculaires et fonctionnels pour comprendre au mieux l'homéostasie d'un tissu, l'initiation tumorale dans ce tissu et l'évolution de la maladie.

#### d) Caractérisation des CSC

A l'instar du tissu intestinal sain avec les CSI, les caractéristiques d'une CSC peuvent être résumées selon 4 critères :

- Leur phénotype qui correspond à une morphologie et à l'expression de marqueurs associés à un profil souche (multipotence et autorenouveaulement).
- Leur activité qui indique comment une population présente un « comportement » souche actif notamment grâce à des expériences de traçage linéaire *in vivo* à l'aide d'un gène rapporteur. Si une CSC est bien active (et non quiescente ou dormante), cette activité dans la tumeur sera reflétée par la présence d'une multitude de cellules avec le même gène rapporteurs et des phénotypes différents.
- Leur potentiel état souche qui indique que ce potentiel souche est absente ou inactivé en contexte homéostatique mais que dans certaines conditions, cet état souche se réveille ou s'acquiert. Par exemple, les cellules en position +4 sont quiescentes et ne montrent donc pas une activité souche en contexte homéostatique. Une atteinte des CBC conduit cependant au réveil de l'activité souche des cellules en position +4, démontrant leur potentiel état souche. Ce potentiel appliqué au cancer sera illustré lorsque nous aborderons la dormance tumorale. Que l'on soit en contexte physiologique ou pathologique, il s'agit donc d'une influence externe par du microenvironnement des cellules souches ou des CSCs
- Leur fonctionnalité qui indique la particularité d'une sous-population de cellules (cancéreuses) souches parmi l'ensemble des cellules (cancéreuses) souches actives dans une situation donnée. En situation homéostatique normale pour les cellules souches et en situation de croissance tumorale pour les CSC. Le lien entre un marqueur et le profil souche est dans ce cas décrypté. Il peut s'agir par exemple d'une population de CSCs ayant une capacité d'invasion et dissémination plus importante que d'autres populations de CSCs.

#### i. Caractérisation moléculaire

La spécificité tissulaire ainsi que la nature dynamique des CSC établies à partir d'une tumeur, ont rendu difficile l'identification des marqueurs de CSC. Ces marqueurs permettent à la fois de définir un phénotype mais également une activité biologique pour certains. Les premières identifications de marqueurs de CSC ont été initiées dans les tumeurs liquides. Pour cela, ils ont utilisé des marqueurs de surface associés à des types cellulaires immatures pour trier, par cytométrie en flux, différentes sous-populations tumorales. Ces diverses sous populations furent ensuite

injectées dans des souris immunodéprimées afin de tester leur capacité à initier une leucémie [33][75]. Cette approche fût ensuite appliquée pour l'identification de marqueurs de CSC dans des tumeurs solides. [35], [36], [77]. Bien qu'utilisés également pour étudier les CSCs d'autres types de cancer, la section suivante va énumérer les marqueurs des CSC colorectales les plus communément utilisés dans la bibliographie. Leur rôle fonctionnel, lorsqu'il est connu, sera également décrit. Il s'agit d'une liste des marqueurs les plus utilisés et n'est donc pas exhaustive.

- CD133 : Également nommée Prominine 1, CD133 est une glycoprotéine de 5 domaines transmembranaires, elle a été initialement identifiée comme un marqueur de cellules souches hématopoïétiques. Puis l'expression de ce marqueur de cellules souches a été élargie à divers tissus (cerveau, rein, prostate et pancréas)[78]–[81]. Cette protéine interagit avec le cholestérol et selon le tissu, est exprimée sous 3 isoformes. Son rôle biologique au sein des cellules souches normales et CSCs reste encore mal défini. L'activation de certains acteurs ou voies de signalisation (Wnt/ $\beta$ -Caténine, CXCR4 ou Oct4) participent à l'expression de CD133. Il est associé à des protrusions membranaires et des vésicules d'export. Il s'agirait donc plutôt d'un rôle dans l'organisation de la membrane plasmique, la régulation de ses composants lipidiques ainsi que la ségrégation du matériel intracellulaire durant les division asymétriques [82]. Cette protéine a été proposée comme biomarqueur de CSC dans diverses tumeurs solides tels que le mélanome, le sarcome, le cerveau, la prostate, les poumons, les ovaires et le côlon [83]. En effet, deux équipes en 2007, ont isolé une sous population de cellules cancéreuses exprimant CD133 à partir de tumeurs coliques de patients [36][37]. Injectées dans des souris immuno-déficientes en très faible quantité, ces cellules étaient capables de former des tumeurs. Dans ces mêmes tumeurs chez la souris, ils ont isolé les cellules exprimant CD133 pour les injecter de nouveau. L'opération fût répétée plusieurs fois de suite, afin de tester l'épuisement, le maintien ou l'enrichissement de cette population mais également le maintien de leur potentiel tumorigène. Ils ont pu ainsi corréler l'expression de CD133 à l'enrichissement en CSC dans ces xénogreffes en dilution limite. Ils démontrent également par des injections successives (sériées), que l'hétérogénéité (ratio de cellules exprimant CD133 sur celles qui ne l'exprime pas) était similaire au ratio observé dans les tumeurs humaines à l'origine. Si globalement dans le CCR, CD133 est proposé par ces équipes comme un solide marqueur de CSC, une étude sur des tumeurs cérébrales soutient que les cellules n'exprimant pas CD133 auraient une capacité tumorigène similaire aux cellules exprimant CD133 [83] [84]. Pour ne rien simplifier, G. Stassi & J.P. Medema ont remarqué que la protéine CD133 serait également exprimée par les cellules intestinales non CSC et que les observations faites jusqu'à présent étaient dues à la spécificité de l'anticorps à une certaine conformation de CD133 propre aux CSC [86]. Finalement, aux vues de toutes ces études, Shmelkov et ses collaborateurs ont confirmé que CD133 est tout simplement un marqueur de cellules épithéliales mais qu'il est plus fortement exprimé par les CSCs. Ils proposent ainsi que les

cellules qui n'expriment pas CD133 étaient en fait les cellules du stroma et qu'il est donc logique que l'injection sous-cutanée de cellules stromales ne conduise pas à la formation de tumeur. Les auteurs observent par contre sur des biopsies de patients atteints d'un CCR métastatique ou de leur modèle murin de CCR, que les cellules épithéliales des métastases hépatiques contenaient des cellules exprimant ou non CD133. Ces deux populations épithéliales étaient capables d'initier des tumeurs mais seules les cellules exprimant CD133 généreraient des tumeurs contenant les deux populations. Les injections de cellules n'exprimant pas ce marqueur ne génèrent que des tumeurs sans expression de CD133. Ces dernières étaient cependant plus agressives et les tumeurs grossissaient plus vite. En conclusion, les auteurs proposent que la population n'exprimant pas CD133 dérive de la population exprimant CD133 et que le phénotype plus agressif de ces premières serait dû à un début de perte globale de marqueurs de différenciation, signe d'un début de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) [85] [87]. Dans tous les cas, il devient désormais difficile d'utiliser CD133 comme un marqueur de CSC dans le compartiment métastatique. En attendant de mieux comprendre fonctionnellement comment CD133 agit en faveur d'un phénotype souche, ce dernier est depuis, utilisé en combinaison avec d'autres marqueurs spécifiques des CSCs. C'est par exemple le cas dans le cancer du pancréas où des cellules cancéreuses qui expriment à la fois CD133, EpCAM et CXCR4 semblent présenter un phénotype CSC invasif et métastatique [88].

- Lgr5 : Nous l'avons évoqué précédemment, Lgr5 (pour Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) fût identifié par l'équipe de H. Clevers, comme un marqueur spécifique des cellules souches au fond des cryptes (aussi appelées CBC pour Crypt Base Columnar Cells) dans un modèle murin transgénique. Lorsque Lgr5 a fixé son ligand ; la R-Spondine (RSPO), sa fonction est de prévenir l'internalisation et la dégradation du récepteur Frizzled (Figure 4). La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine peut donc être activée et maintenue de manière plus importante dans les CBC que dans les progéniteurs par exemple. Dans les CBC, les deux voies s'autoalimentent puisque Lgr5 est un des gènes cibles de la voie Wnt [62]. L'expression de ce marqueur fût également confirmée dans les CBC humaines [89]. Dans le cas des CCRs de type sporadique, (avec une activation constitutive de la voie Wnt), Lgr5 est un candidat potentiel comme marqueur de CSC. Tout d'abord, l'équipe de H. Clevers démontre que les CSs murines exprimant Lgr5 étaient les cellules à l'origine d'adénomes, et qu'au sein de ces adénomes, quelques rares cellules cancéreuses (6,5%) continuaient à exprimer Lgr5 [63]. De plus, l'intensité des marquages de la  $\beta$ -caténine nucléaire combinée au niveau d'expression de ses gènes cibles (dont Lgr5), démontrent que la voie Wnt est activée plus fortement dans les CSCs que dans les cellules tumorales différenciées non tumorigènes.

On peut ainsi supposer que d'autres facteurs agissent sur l'activité de cette voie [90]. La culture en suspension (permettant un enrichissement des CSCs) a également permis de voir la forte expression de Lgr5 parmi les cellules qui composent les sphères [77]. De même que la détection et le tri de cellules exprimant Lgr5 dans des tumeurs primaires ont démontré qu'il s'agissait d'une sous population avec un fort potentiel clonal et tumorigène.

Enfin, la surexpression ou l'inactivation de Lgr5 promeut ou diminue respectivement, ce potentiel clonal. Les auteurs de l'étude définissent Lgr5 comme un biomarqueur de CSI et de CSC, et que fonctionnellement, Lgr5 a un rôle potentialisateur de la voie Wnt [86]. Il est important de noter que la fiabilité des anticorps utilisés fût fortement remise en question par la communauté scientifique. Pour l'heure, aucun anticorps suffisamment robuste n'a permis de confirmer ou d'invalider ces travaux qui doivent être pris avec prudence. Cependant, grâce à la technologie CRISPR-Cas9, l'équipe de E. Batlle a pu confirmer, sans le recours à des anticorps spécifique, que Lgr5 est un marqueur de CSC dans un élégant modèle de traçage linéaire sur des tumoroides (organoïdes cancéreux dérivés d'une culture cellulaire dans du matrigel) colorectaux humain. Les cellules cancéreuses exprimant un gène rapporteur indiquant l'expression de Lgr5 ont une capacité à initier des tumeurs in vivo, expriment des gènes de CBC et génèrent une tumeur ou un organoïde contenant des cellules différenciées [91].

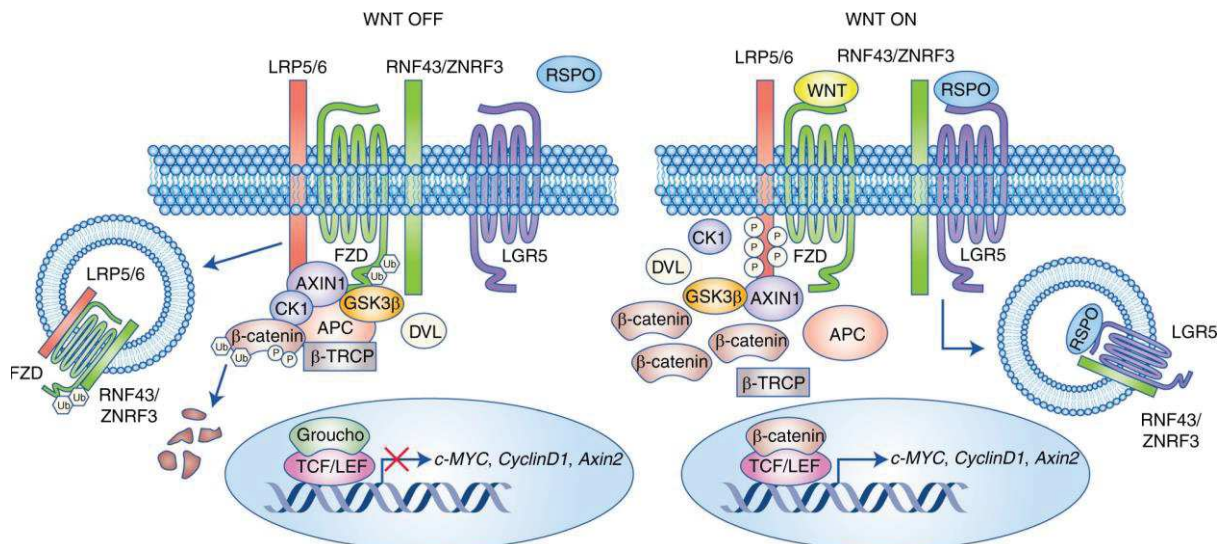


Figure 4: Lgr5 promeut la voie Wnt/ $\beta$ -caténine :

Lgr5 est un récepteur couplé à une protéine G (RCPG), caractérisé par 7 domaines transmembranaires et un large domaine extracellulaire riche en leucine. Sans fixation du ligand R-Spondine (RSP0) sur Lgr5, les protéines transmembranaires E3 ligases RNF43/ZNRF3 vont ubiquitiner le récepteur de Wnt, Frizzled (FZD). Ceci a pour conséquence d'internaliser ce dernier avec ses co-récepteurs LRP5/6 puis leur dégradation. Ceci menant à une dégradation en aval de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique et le maintien de la  $\beta$ -caténine membranaire en interaction avec l'E-cadhérine. En présence de RSP0 fixé sur Lgr5, ce dernier va neutraliser l'action des E3 ligases RNF43/ZNRF3. FZD et ses co-récepteurs peuvent alors stabiliser la  $\beta$ -caténine cytoplasmique dont les gènes cibles participent au maintien d'un état souche indifférencié et prolifératif. On retrouve notamment comme gènes cibles ceux de l'oncogène c-MYC, de la CyclineD1, de l'Axine2 mais également le gène de Lgr5.). Adapter de Morgan, R.G. Mortensson, E. & Williams, A.C. 2018



- EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) ou CD326 est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans de très nombreux processus biologiques (signalisation cellulaire, migration, prolifération [92]–[94] mais son rôle le plus évident, de par sa localisation baso-latérale, est l'adhésion cellulaire homotypique [95]. En effet, EpCAM est exprimée à la membrane des cellules épithéliales et permet de lier une autre molécule EpCAM présente à la surface d'une cellule épithéliale voisine. Les tissus épithéliaux contiennent des cellules exprimant EpCAM mais son niveau d'expression peut varier. Par exemple, le long du tractus gastro-intestinal, l'épithélium gastrique exprime faiblement EpCAM alors qu'à partir du petit intestin, il est fortement exprimé [96]. Bien qu'impliquées dans la connexion de cellules homotypiques, en termes de force d'adhésion, les interactions entre molécules EpCAM ne sont pas aussi fortes que celles existant entre d'autres molécules comme les cadhérines (en particulier la E-cadhérine). Une perte d'EpCAM n'est pas suffisante pour individualiser deux cellules homotypiques. Contre intuitivement, sa surexpression conduit à une diminution de l' $\alpha$ -caténine et donc réduit les associations du complexe cadhérine -  $\alpha/\beta$ -caténine avec le cytosquelette au niveau de la membrane [97]. La forte activité proliférative et la faible différenciation des cellules de la crypte ont été corrélées avec le niveau d'expression d'EpCAM [94]. Cependant, à lui seul, il ne se révèle pas être un marqueur suffisant pour identifier des cellules souches normales ni des CSCs. En effet, même si l'expression d'EpCAM est plus forte au niveau des cellules de la crypte, elle n'est pas nulle dans les cellules de la villosité et c'est également le cas dans les tumeurs solides. Il s'agirait donc plutôt de dire que des cellules peu différenciées ont un plus fort niveau d'expression d'EpCAM. Afin de mieux définir la population CSC, d'autres marqueurs membranaires comme CD166 et CD44 sont proposés en combinaison [39].
- CD166 : Également appelé ALCAM (pour activated leukocyte cell adhesion molecule), CD166 est une protéine d'adhésion transmembranaire exprimée dans de très nombreux types cellulaires. Entre autres, elle permet aux leucocytes de passer au travers de la barrière céphalique, mais également aux monocytes de migrer au travers des jonctions endothéliales [98]–[104]. Dans le tissu intestinal, CD166 est fortement exprimé au niveau des cryptes, aussi bien au niveau des CSI exprimant Lgr5 que des cellules de Paneth mais également dans les cellules souches en position +4 (exprimant Bmi1) lorsqu'elles prolifèrent [105], [106]. Le rôle de CD166 dans la crypte et plus précisément sur les CSI n'est pas encore bien caractérisé mais il semble fortement associé au maintien de l'homéostasie au sein des cryptes. CD166 maintiendrait en prolifération les CSI et favoriserait la différenciation terminale des cellules de Paneth [106]. Comme beaucoup de marqueurs de CSC, CD166 fût d'abord proposé comme marqueur de mauvais pronostic pour les patients porteurs d'un CRC [107]. En voulant

caractériser les marqueurs exprimés à la surface des CSC colorectales, Dalerba et son équipe [39] ont noté l'expression de CD166 au sein de la population de CSC exprimant CD44 et fortement EpCAM. Cependant, les expériences de xénogreffes ayant été réalisées sur un petit nombre d'animaux, les conclusions sur le réel pouvoir tumorigène de CD166 restent à confirmer et les auteurs proposent plutôt d'utiliser CD166 comme un marqueur en combinaison avec EpCAM et CD44.

- EphB2 high : L'ephrin type-B receptor 2 (EphB2) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase fixant les ligands ephrines B. Les récepteurs aux ephrines B sont exprimés tout le long de l'axe crypte-villosité. Mais selon la localisation des cellules le long de l'axe, le niveau d'expression des différents types de récepteurs varie. Gènes cibles de la voie Wnt, les EphB ont des expressions corrélées au niveau d'activité de cette voie le long de l'axe et participe à la position des différents types cellulaires le long de l'axe. En effet, contrairement à l'EphB3, spécifiquement localisée dans la crypte, l'EphB1 est localisée dans la villosité. Comme l'EphB3, l'EphB2 exprimée au niveau de la crypte, mais plus les progéniteurs migrent vers la villosité, moins ils l'expriment. De plus, les cellules différenciées de la villosité et les cellules de Paneth n'expriment pas l'EphB2 [108]. Son expression est donc la plus forte au fond des cryptes, dans les cellules où la voie Wnt est la plus active [109]. Pour corrélérer cette forte expression avec les CSI, des cellules présentant divers niveaux d'expression de l'EphB2 ont été mises en culture en présence de matrigel et de facteurs nécessaires à la survie d'une CSI. Seules les cellules intestinales exprimant le plus fortement l'EphB2 formèrent des organoïdes intestinaux contenant les différents types de cellules intestinales au fur et à mesure des passages. En effet les auteurs constatent une corrélation entre la forte expression de l'EphB2 et l'expression des gènes de prolifération et de CSI comme Lgr5, et une corrélation inverse avec les gènes de différenciation et corrélation [89].

À l'instar d'EpCAM, les cellules cancéreuses les plus indifférenciées (donc potentiellement les CSC) sont celles qui expriment le plus EphB2. Dans la continuité de leurs travaux précédents sur le sujet, l'équipe d'E. Battle [110] a voulu s'avoir si ce marqueur de CSI était également un marqueur des CSC colorectales. Similairement au tissu sain, l'EphB2 est exprimée par l'ensemble des cellules tumorales mais selon des intensités différentes. A l'inverse de la cytokératine 20 (CK20 qui est un marqueur de différenciation intestinale), l'EphB2 est fortement exprimée là où l'expression de Lgr5 est la plus forte. Dans cette même étude, la population définie comme une population de CSC grâce à son expression du marqueur CD44 (que nous développerons à la fin de cette partie) contient les cellules dont l'expression de l'EphB2 est la plus forte. Mais la totalité des cellules exprimant CD44 n'exprimait pas forcément l'EphB2 à un très haut niveau alors que la réciproque est vraie. Ceci indique que

l'expression de CD44 est moins spécifique des CSC que la forte expression d'EphB2. Enfin des injections de cellules primaires tumorales humaines en dilution limite dans des souris immunodéprimées, confirment que les cellules tumorales EphB2<sup>high</sup> étaient les plus capables, à de très faibles concentrations, d'initier des tumeurs qui récapitulaient l'hétérogénéité tumorale observée dans la tumeur primaire du patient.

- L'activité des enzymes ALDH : Les aldéhydes déshydrogénases sont des enzymes de détoxification capables de transformer les aldéhydes endogènes comme exogènes en acides carboxyliques. Cette enzyme de détoxification est notamment fortement exprimée dans le foie et les reins. Elle intervient dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et joue un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire. L'activité enzymatique des ALDH est mesurable grâce à des kits commerciaux dans lesquels un substrat spécifique des ALDH est métabolisé en un produit fluorescent, permettant d'isoler la population de cellules ayant une importante activité enzymatique. Ce marqueur, validé comme marqueur de CSC dans de nombreux cancers (poumon, prostate, foie et vessie) l'a tout d'abord été dans le cas du cancer du sein [111], [112]. En effet, Christophe Ginestier et ses collaborateurs ont montré que des cellules humaines de cancer du sein isolées selon leur forte activité enzymatique ALDH étaient tumorigènes et capables de régénérer l'hétérogénéité de la tumeur initiale. Ceci démontrait bien l'autorenouvellement et les capacités de différenciation de ces cellules cancéreuses exprimant l'ALDH [111]. Dans le CCR, de équipes ont également confirmé que les cellules cancéreuses ayant une forte activité ALDH avaient un plus fort potentiel tumorigène [113], [114].
- CD26 : CD26 est une Glycoprotéine membranaire avec une activité dipeptidyl IV (DPPIV) intrinsèque, CD26 est exprimée par de très nombreux types cellulaires telles que des cellules épithéliales, les lymphocytes T et des cellules endothéliales. Elle est donc impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques. Elle interagit avec de nombreuses molécules extracellulaires et participe à la transduction de signaux intracellulaires. Contrairement aux marqueurs précédents, l'expression de CD26 n'a pas été corrélée à une population de cellules souches saines puis par extension aux CSCs. L'expression de CD26 a tout d'abord été corrélée à un marqueur de cancers à phénotype agressif. Ce phénotype agressif repose sur les capacités d'interaction de CD26 avec les molécules de la matrice extracellulaire (MEC) comme la fibronectine et le collagène. Elle peut également induire l'expression de la protéase MMP-9 (pour matrix métalloprotéase 9) permettant de dégrader certains composants de la MEC et d'activer certaines cytokines. CD26 facilite ainsi l'étape d'invasion des tissus environnants et



à terme, la dissémination [115]. Ce n'est qu'en 2010, que l'équipe de Wong [116] a associé l'expression de CD26 à une population de CSC exprimant CD133 et CD44 dans le CRC. Mais contrairement à ces deux derniers marqueurs de CSC, les auteurs ont remarqué que pour l'ensemble des patients avec des métastases hépatiques, il y avait toujours des cellules tumorales exprimant CD26 dans la tumeur primaire et dans les métastases. Dans le cas des patients sans métastase hépatique, moins d'un tiers présentaient des CSC exprimant CD26. De plus, les cellules tumorales exprimant à la fois CD133, CD44 et CD26, ont démontré le meilleur potentiel tumorigène et une meilleure capacité à former des sphères, en comparaison aux autres combinaisons pour ces mêmes marqueurs. Les auteurs constatent également que les CSC exprimant CD26 présentaient une chimiorésistance plus importante. L'ensemble de ces résultats conduit les auteurs à conclure que CD26 est un marqueur de CSC avec un potentiel invasif et disséminant. Combiné à une capacité de chimiorésistance plus importante, cela peut expliquer pourquoi les métastases répondent moins bien aux chimiothérapies que la tumeur primaire. Plus récemment, une équipe a démontré que l'expression de CD26 par les CSC serait fortement favorisée suite aux mutations des gènes *PIK3CA* et *TP53*, propres au stade IV du CCR [117].

- CD44 et une de ses isoformes CD44v6 : CD44 est une glycoprotéine transmembranaire, récepteur de l'acide hyaluronique (AH) mais également corécepteur de nombreux autres récepteurs tels que le récepteur couplé à une protéine G CXCR4, des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou Frizzled, par exemple. Ainsi, Ponta, et al ont proposé en 2003 que CD44 serait à la fois une protéine de surface se liant à la MEC, régulant l'adhésion et la migration des cellules au travers de la MEC et un récepteur de l'AH. Enfin CD44 est également un corécepteur potentialisant les signaux de transduction intracellulaires [118]. C'est à la surface des lymphocytes T qu'il a été décrit pour la première fois puis ensuite dans de nombreux tissus et cancers [119]. Chez l'Homme, le gène codant pour CD44 est localisé sur le chromosome 11 et contient 20 exons et 19 introns. L'isoforme standard est la plus petite (CD44s) mais dispose des modules permettant à son extrémité globulaire N-terminale de fixer l'AH et à l'extrémité C-terminale cytoplasmique d'interagir avec d'autres protéines cytoplasmiques. Selon le tissu et le contexte biologique ou pathologique (comme un cancer), un épissage alternatif utilisant un ou plusieurs des exons 6 à 15 va générer les variants (Figure5).

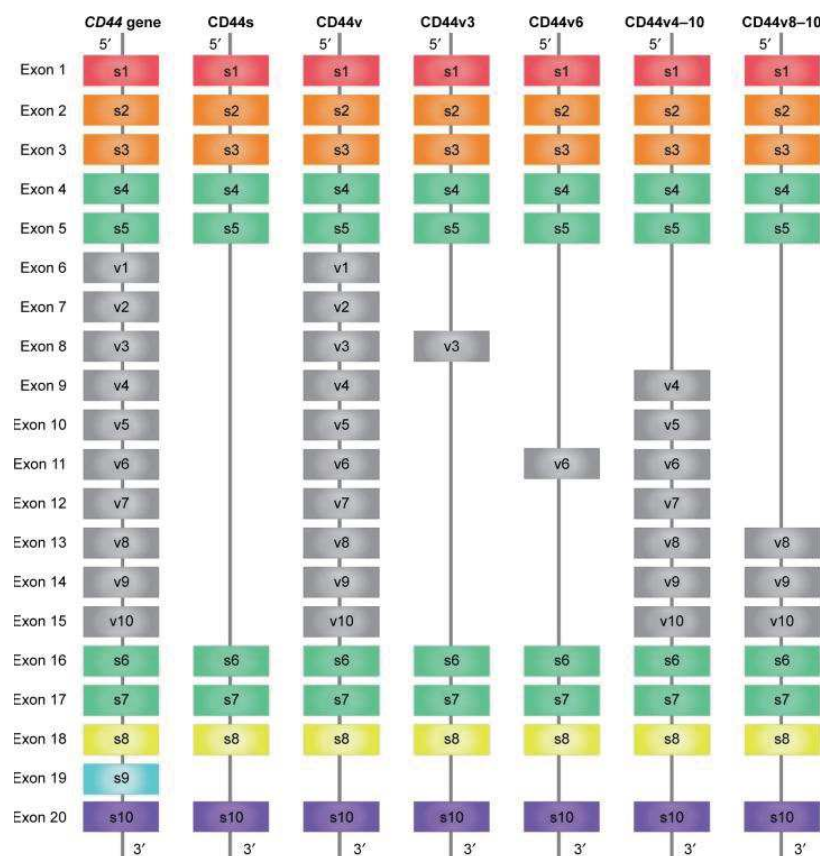


Figure 5: Épissages alternatifs de CD44

Le gène CD44 contient 20 exons, qui selon l'épissage alternatif, permettent de produire l'isoforme standard (CD44s) ou des variants (CD44v). L'exon 1, positionné à l'extrémité N-terminal, est une séquence signal tandis que l'exon 2 et 3 sont des modules permettant de fixer l'acide hyaluronique (AH). Les exons 4, 5, 16 et 17 définissent la tige extracellulaire invariable située entre les modèles de fixation de l'AH et l'exon 18 codant pour le domaine transmembranaire. L'exon 20 code la partie intracellulaire et d'interaction avec d'autres protéines cytoplasmiques. L'exon 19 est quant à lui toujours épissé dans toutes les isoformes de CD44. En plus de tous ces codons retrouvé dans l'isoforme standard, les variants sont composés en plus d'un ou plusieurs ou l'ensemble des codons 6 à 15. Le nom de l'isoforme est défini selon la position et le nombre de codons conservés. Par exemple, l'isoforme CD44v3 est dénommée ainsi car sa partie variable contient l'exon 8 qui est en troisième position dans la liste des codons alternatifs. Issue de Xu, H. et al *OncoTargets and Therapy*2015

CD44s étant exprimé de manière hétérogène dans des tumeurs, c'est dans un premier temps dans le cancer du sein qu'il fut associé à une population de CSC. Après une xéno greffe humaine de tumeur mammaire au niveau des coussins adipeux mammaire de souris immunodéprimées, l'équipe de Max Wicha a isolé une population de cellules exprimant CD44s et n'exprimant pas (ou peu) CD24 et qui avait des capacités d'autorenouveaulement et de différenciation [35]. En effet, à partir de ces xéno greffes, 200 cellules de la population exprimant CD44s (et peu ou pas CD24) ont été injectées de nouveau et ont formé une tumeur récapitulant l'hétérogénéité initiale. Cette capacité à initier des tumeurs et à se différencier est constatée même après plusieurs injections sériées alors que 20 000 cellules n'exprimant que CD24 en sont incapables.

Au niveau intestinal, CD44 est un des gènes cibles de la voie Wnt. Il est exprimé dans un contexte physiologique mais ses épissages alternatifs sont finement régulés le long de l'axe crypte/villosité. L'isoforme standard est exprimée essentiellement dans le compartiment d'amplification tandis que les isoformes CD44v4-10 et CD44v6 sont essentiellement présentes dans les cellules souches intestinales exprimant Lgr5 (CBC) [120], [121]. Dans le cas du CCR, l'activation constitutive de la voie Wnt induit également l'expression de l'isoforme standard de CD44 dès les premiers stades (de la dysplasie à l'adénome) jusqu'au stade invasif de la maladie [122]. CD44 de manière générale, semble d'ailleurs jouer un rôle crucial durant l'initiation tumorale puisque sa perte d'expression atténue fortement la formation de polypes suite à l'activation constitutive de la voie Wnt. Les auteurs proposent que ce lien avec la voie Wnt et la formation des polypes repose sur la capacité de CD44 à être un corécepteur de Frizzled et d'induire indirectement la stabilisation de la  $\beta$ -caténine [123]. Cependant, dans une tumeur, son expression est hétérogène et son niveau d'expression est corrélé à son pouvoir tumorigène. En effet, isolées à partir de tumeurs primaires humaines, les cellules exprimant fortement CD44 sont les plus tumorigènes. Des injections de seulement 10 à 100 cellules exprimant fortement CD44 suffit à former des tumeurs dans des souris immunodéprimées, permettant de corréler ce fort niveau d'expression avec un potentiel tumorigène [113].

D'autres isoformes, CD44v4-10 et CD44v6, sont également fortement exprimées dans le CCR [120]. Il est d'ailleurs important de noter que dans les travaux cités précédemment, les anticorps utilisés contre CD44s reconnaissent un épitope retrouvé sur toutes les isoformes et ne sont donc pas spécifiques de l'isoforme standard. Les autres isoformes fortement exprimées participeraient à la formation d'adénomes mais également à l'évolution du cancer, particulièrement à son agressivité. Par ailleurs, dans le cas des Polyposes Adénomateuses Familiales (PAF), le niveau d'expression de l'isoforme standard est diminué en faveur des isoformes CD44v4-10 et CD44v6 et que leur niveau d'expression est significativement plus élevé dans les polypes que dans des cryptes saines. [121], [123], [124]. Il fût également observé il y a longtemps, que les CCR à un stade agressif, exprimaient fortement l'isoforme CD44v6 [120]. Ce lien avec les cellules cancéreuses a été confirmé par plusieurs observations cliniques [125]–[127]. Pour de nombreux cancers solides, selon le stade, le pourcentage de cellules exprimant CD44v6 au sein de la tumeur est un facteur de mauvais pronostic et est ainsi inversement corrélé avec la survie des patients [128]–[133]. Dans une étude portant sur 57 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal (stade III et IV), l'espérance de vie à 5 ans des patients avec des cellules exprimant CD44v6 dans la tumeur primaire est seulement de 52,78% tandis que pour les patients sans cellules exprimant cette isoforme, elle augmente à 80,95%. En effet, dans cette même étude, le pourcentage de cellules cancéreuses exprimant CD44v6 était fortement lié au stade mais aussi au degré de différenciation (18,18%, 67,65%

et 91,67% de cellules exprimant CD44v6 dans les CRR bien différenciés, moyennement différenciés et peu différenciés respectivement) [134]. Ce pourcentage très important de cellules exprimant CD44v6 est cependant très surprenant en comparaison avec les pourcentages observés dans d'autres études citées précédemment. Enfin, dans des tumeurs primaires de patients sans atteinte des ganglions régionaux, la présence de cellules exprimant CD44v6 est retrouvée dans 66% des tumeurs. Dès lors que l'on retrouve une atteinte dans quelques ganglions régionaux, ce taux augmente à plus de 80%. Les auteurs concluent que le variant v6 est un meilleur facteur pronostique de l'évolution de la maladie que l'isoforme standard [125]. L'ensemble de ces observations cliniques indiquent que des tumeurs primaires riches en cellules exprimant CD44v6 sont des tumeurs peu différenciées et plus à même d'évoluer et conduire à une invasion massive des ganglions lymphatiques. Une méta-analyse portant sur 3918 cas de CCR confirme ces observations et étend également la corrélation de la surexpression de CD44v6 avec la présence de métastases distantes [135]. Enfin, les tumeurs qui se développent sur la partie droite du colon sont plus riches en cellules exprimant CD44v6 que les tumeurs qui se développent sur la partie gauche, or les tumeurs se développant sur la partie droite sont de plus mauvais pronostic, renforçant l'idée que CD44v6 est un marqueur de tumeurs fortement agressives.

Expérimentalement, le rôle de CD44v6 comme marqueur conférant des capacités à développer des métastases fût étudié en 1991 sur des rats [136]. Des cellules cancéreuses BSp73ASAM parvenues à disséminer dans un modèle de carcinome pancréatique spontané avaient acquis l'expression d'une isoforme de CD44 contenant notamment l'exon qui code pour le variant v6. Cette même lignée BSp73AS qui ne disséminait pas n'avait pas acquis ce variant. La présence de ce variant v6 semble donc être fortement discriminante dans la capacité des cellules cancéreuses à disséminer ou non. De plus dans cette même étude, des expériences de gain et de perte de fonction de l'isoforme v6 démontrent son rôle clé dans la capacité à développer des métastases. Depuis cette étude et de multiples publications décrivant l'implication de CD44v6 dans l'activation des lymphocytes T, de nombreuses équipes ont disséqué le fonctionnement de l'isoforme v6.

La première fonction de CD44 (comme ses autres isoformes) est d'être un récepteur à l'acide hyaluronique (AH) [137] même si l'isoforme standard montre une bien moins forte affinité pour son ligand que l'isoforme v6 [138]. De plus, des N- ou O-glycosylation peuvent modifier son affinité à l'AH [118] qui est un composant majeur de la matrice extracellulaire. Une fois fixé, l'AH induit la phosphorylation du domaine cytoplasmique des isoformes CD44. Brièvement, deux voies de signalisation sont activées de manière directe, la voie MAPK/ERK et PI3K/AKT, conduisant à une inhibition de l'apoptose et une stimulation de la prolifération

[139], [140]. L'activation de la voie AKT participe également à stabiliser la  $\beta$ -caténine cytoplasmique dont les gènes cibles sont, pour certains, ceux du programme de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), de CD44 (épissé ensuite en v6) et de l'enzyme HA synthase 3 [141], [142]. Cette boucle de rétrocontrôle positif est également potentialisée par la stimulation de production des métalloprotéases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9). CD44v6 sert alors de plateforme d'ancrage à la MMP-9 afin de remodeler la MEC et libérer certains facteurs de croissance, renforçant pour certains, cette boucle de rétrocontrôle positif [143], [144]. Par exemple, maturé par MMP-9, le TGF- $\beta$  stabilise également de manière indirecte, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique [145]. En résumé, l'interaction de l'AH, particulièrement plus forte en présence du variant v6, participe aux adhésions cellule-cellule et cellule-matrice, à la prolifération, la progression tumorale et l'invasion par l'activation du programme de l'EMT (Figure 6A).

Le processus d'EMT sera développé dans la partie plasticité tumorale mais notons simplement pour le moment que cette transition d'un phénotype épithélial à mésenchymateux confère des capacités de migration et d'initiation tumorale. Cette corrélation entre l'EMT et CD44 a été récemment mieux décryptée par l'équipe de R. Rodriguez. Il était décrit que le ligand AH et son récepteur CD44 subissait une endocytose et que cette internalisation de l'AH agissait en faveur de l'expression de gènes impliqués dans l'EMT [146], [147]. La manière dont l'AH internalisé agissait au niveau de la chromatine restait cependant incomprise. Müller, *S et al* ont depuis démontré que l'expression de ces gènes est permise suite à la déméthylation oxydative de l'histone H3K9me2. Cette réaction enzymatique repose sur une enzyme dépendante de l'atome Fe<sup>2+</sup>, atome dont la charge positive permet une forte interaction avec l'AH chargé négativement. De plus, cette déméthylase requiert également de l' $\alpha$ -Ketoglutarate, produit par le cycle de Krebs et dépendant de l'atome Fe<sup>2+</sup>. L'atome Fe<sup>2+</sup> permet donc directement et indirectement le fonctionnement de la déméthylase. La machinerie de transcription peut alors permettre l'expression des gènes de l'EMT et potentialise la signalisation d'autres voies impliquées également dans l'EMT [148].

Parmi les autres molécules avec lesquelles CD44 interagit, il y a en particulier une cytokine connue pour contribuer fortement à la dissémination de nombreux cancers : l'ostéopontine (OPN) [149]. De nouveau, la partie codée par le variant v6, confère une meilleur affinité à l'OPN [138] [145]. La fixation de cette cytokine conduit également à la phosphorylation du domaine cytoplasmique de CD44v6. Il est important de noter que l'activation de la voie MAPK/ERK passe cette fois, spécifiquement par la protéine H-RAS. La seconde conséquence majeure de la fixation de l'OPN est d'activer des facteurs de transcriptions impliqués dans l'expression des gènes codant les MMP2/9 et des chemokines (cytokine ayant un rôle chimio-attractant) CCL5 et CXCL12 (nommé aussi SDF-1 $\alpha$ ) [151].



Seule ou en association avec CD44v3 [136] [147], CD44v6 interagit physiquement avec certains récepteurs tyrosine kinase (RTK) et est capable de fixer de nombreux facteurs de croissance comme l'HB-EGF (pour heparin-binding epidermal growth factor), le b-FGF (pour basic-fibroblast growth factor) [153] et le VEGF [154]. CD44v6 devient alors un corécepteur de nombreux RTK. La transduction des signaux ne passe cependant plus par son activité kinase propre. De plus, l'isoforme v6 est également capable de fixer l'HGF et de le présenter au récepteur c-Met. Or comme toutes les isoformes de CD44, sa queue cytoplasmique peut se lier à diverses protéines en lien avec le cytosquelette, [155], [156], potentialisant l'activation de RAS par les RTK c-Met et VEGFR-2. Enfin, pour les isoformes avec le variant v6, SDF-1 $\alpha$  a besoin que son récepteur CXCR4 interagisse indirectement avec CD44v6 via les sous-unités de la protéine G de CXCR4 [157].

Pour résumer, le récepteur CD44v6 est également un corécepteur. Il interagit directement ou indirectement avec d'autres récepteurs afin de potentialiser leurs voies de signalisation. Parmi celles-ci, on retrouve les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT. Déjà mentionné pour leur rôle de stabilisateur de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique, ces voies induisent indirectement l'expression des gènes cibles de la  $\beta$ -caténine, notamment CD44 [158] (Figure 6B)

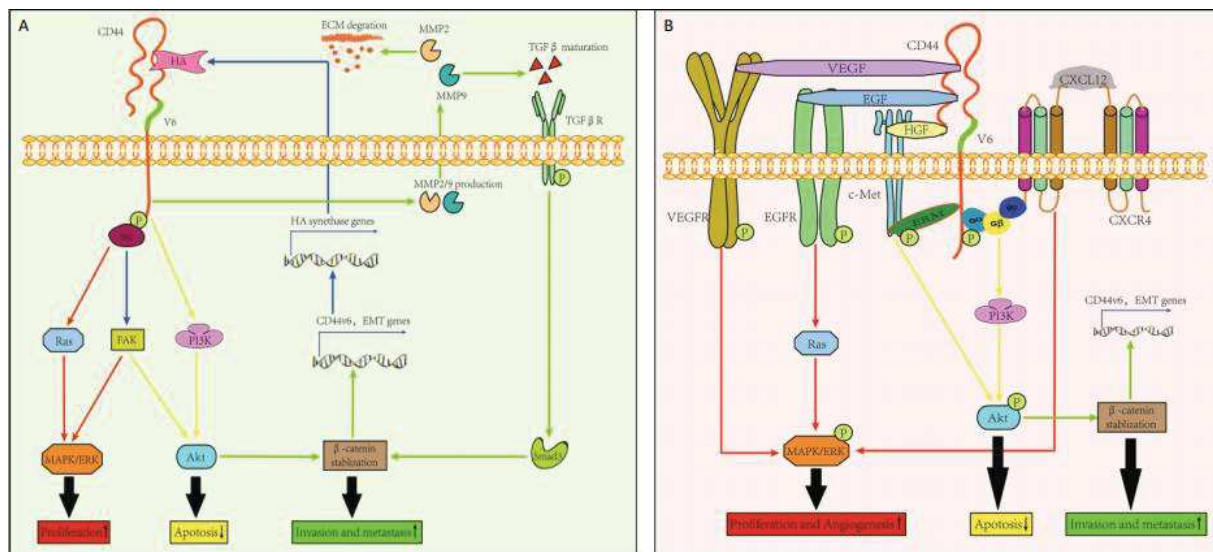


Figure 6: CD44v6 récepteur et co-récepteur.

(A) L'acide hyaluronique interagit avec l'ecto-domaine de CD44v6 et permet la phosphorylation de la partie cytoplasmique de CD44v6. Il peut alors activer Ras et FAK, conduisant à une activation de la voie MAPK/ERK (flèches rouges). De plus, il active également la voie PI3K/AKT (flèches jaunes) qui participe à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine. L'ensemble de ces voies provoque l'expression de gènes participant à la croissance, invasion et dissémination tumorale. Parmi les gènes exprimés, il y a celui de CD44 ainsi que ceux permettant la transition épithélio-mésenchymateuse. L'activation du récepteur CD44v6 conduit indirectement à la production des métalloprotéinases MMP2/9 qui permettent de dégrader la matrice extracellulaire (MEC). Ils permettent également de libérer le TGF- $\beta$  sous sa forme active. Ce dernier renforce indirectement la stabilisation de la  $\beta$ -caténine (flèches vertes). (B) L'ecto-domaine de CD44v6 sert de plateforme fixant différentes cytokines telles que l'EGF, l'HGF, VEGF, CXCL12. Ces cytokines sont alors présentées à leurs récepteurs respectifs et activent des voies de signalisations renforçant la prolifération, la migration, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose. Issue de Ma, L *et al. Cell Death & Disease*. 2019

L'équipe de G. Stassi [159] fût la première à démontrer que CD44v6 était un marqueur d'une sous population de CSCs très agressives dans le CCR. En effet, ils ont remarqué qu'au sein d'une population exprimant CD133, CD166, Lgr5 et fortement l'EphB2, résidait une petite population de cellules qui exprime CD44v6. Dans cette étude ils ont montré que seule la population exprimant CD44v6 avait un potentiel tumorigène qui perdurait au cours des injections orthotopiques sériées. Cette population exprimant CD44v6 était non seulement plus tumorigène, mais également la seule capable de former d'importantes métastases intestinales, hépatiques et pulmonaires. De plus, exposés aux cytokines HGF, OPN et SDF-1 $\alpha$ , les progéniteurs n'exprimant pas CD44v6 vont l'exprimer et acquérir des capacités métastatiques et vont surtout réacquérir de manière pérenne, des capacités d'initiation de tumeur (Figure 7). Ces travaux démontrent que CD44v6 est un marqueur robuste de CSC colorectales ayant un fort potentiel métastatique et que des progéniteurs peuvent acquérir ce phénotype de CSC capables de disséminer grâce au microenvironnement tumoral.

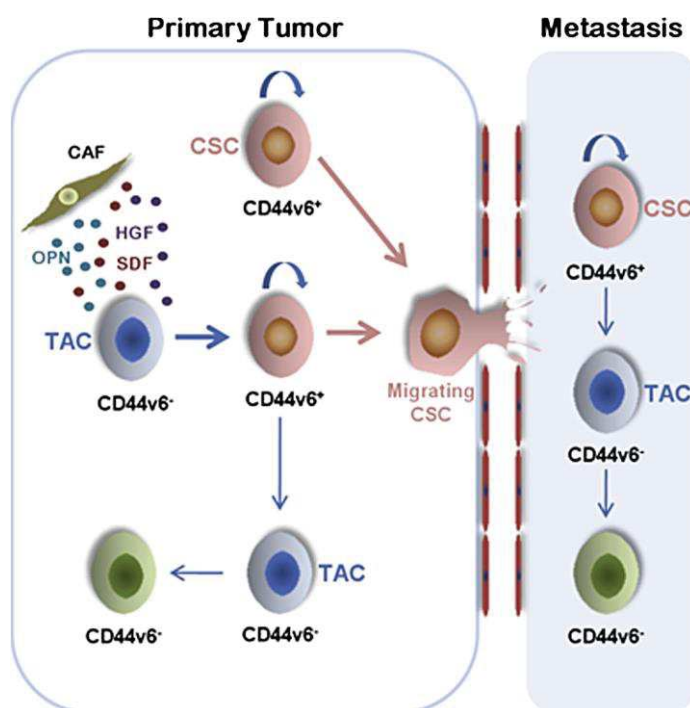


Figure 7: L'expression de CD44v6 confère des capacités de cellules souches cancéreuses (CSCs) capables de disséminées.

Les cellules progéniteurs tumoraux (TAC pour transit amplifying cells) exposés à des sécrétions d'ostéopontine, d'HGF et de SDF par les fibroblastes associés au cancer (FAC), peuvent se reprogrammer en CSCs et expriment CD44v6. Ces CSCs ont alors une capacité plus importante pour disséminer et coloniser de nouveaux organes. Les CSCs dans un organe distant vont alors initier une tumeur et les progéniteurs qui en découlent perdront l'expression de CD44v6. Issue de Todaro, M. et al. Cell Stem Cell. 2014

## ii. Caractérisation fonctionnelle : Side population, formation de sphères, tumorigénicité et différenciation

Définir et caractériser une population tumorale comme une population de CSC nécessite toujours une validation par des tests fonctionnels s'appuyant sur leurs propriétés intrinsèques. En effet, tout comme les cellules souches normales, les CSC sont capables de proliférer tout en s'auto-renouvelant et en se différenciant. Combiné aux mutations, cela leur confère ainsi un potentiel tumorigène mais également une résistance supérieure aux traitements anti-cancéreux en comparaison aux cellules plus différenciées.

- Side population : la résistance des CSC face aux traitements s'explique en partie par une forte expression de pompes à efflux à la membrane (comme ABCG2/BCRP1 pour *ATP-binding cassettes/breast cancer resistance protein*). En jouant sur cette capacité d'efflux, on peut, à l'aide d'un cytomètre en flux, visualiser et trier la population de CSCs parmi l'ensemble des cellules cancéreuses. Il faut pour cela commencer par séparer les cellules cancéreuses dans deux conditions. Dans la première, les cellules cancéreuses, exposées uniquement à un colorant fluorescent comme le Hoechst33342, vont toutes absorber ce colorant. Seule la population de CSCs parviendra à effluer le Hoechst33342 et apparaîtra peu fluorescente au moment de l'analyse. Deux populations apparaissent donc distinctement, l'une très fluorescente et l'autre peu. Dans la deuxième condition, l'exposition préalable des cellules cancéreuses à un inhibiteur de ces pompes (le vérapamil), empêchera les CSCs d'effluer le colorant et elles ne seront plus discriminables des autres cellules cancéreuses. Afin de récupérer la population de CSCs dans la première condition, il faut définir une fenêtre de tri pour tous les événements qui apparaissent peu fluorescents ; la side population. Par cette technique, une side population a été identifiée par exemple dans les lignées humaines de cancer du sein MCF-7 ou de gliome de rat C6. Ne représentant que 2% de la population totale, la side population est la seule, lorsqu'elle est injectée dans une souris NOD/SCID (immunodéprimée), à pouvoir former une tumeur présentant l'hétérogénéité initiale [160], [161].

Cette approche de tri cellulaire sur la base d'une activité fonctionnelle est comparable à celle développée par la suite avec les kits commerciaux mesurant l'activité des enzymes ALDH, un substrat en un produit fluorescent.

- Formation de sphères : Cultivées dans des conditions adhérentes, les lignées cancéreuses (obtenues à l'ATCC ou dérivées à partir de biopsies humaines ou murines), ont une proportion de CSC très faible (2% pour la lignée MCF-7 selon le test de side-population par exemple). Cependant, lorsque ces mêmes lignées sont cultivées en suspension (flasques non traitées pour empêcher l'adhérence cellulaire), à faible densité, sans sérum de veau fœtal (qui favorise la différenciation cellulaire) et dans un milieu enrichi en facteurs de croissance (EGF et b-FGF), on constate une très forte mortalité de la majorité des cellules. Seules quelques cellules parviennent à survivre et croître en formant des sphères. La résistance intrinsèque des CSC à l'anoïkis (mort cellulaire en absence de contact basal cellule-matrice) et à l'apoptose (mort cellulaire provoquée notamment en absence de contact latéral cellule-cellule) leur confère une capacité spécifique de survivre dans ces conditions. De plus, cette condition conduit les cellules à privilégier la division symétrique plutôt qu'asymétrique ce qui à terme, génère une culture enrichie en CSC. Ainsi en 2007, l'équipe de G.Stassi observa en effet que des tumeurs



colorectales humaines contenaient une proportion de cellules exprimant CD133 très faible en condition adhérente. En suspension par contre, les sphères contenaient majoritairement des cellules exprimant CD133, validant le modèle de culture en suspension pour promouvoir la survie des CSC [159]. Si l'on désire maintenir cette forte proportion de CSC pour faire des expériences spécifiquement sur les CSC, il est nécessaire de dissocier régulièrement les sphères car plus elles grossissent, plus des cellules différenciées peuvent être générées. Néanmoins, l'apparition de cellules différenciées dans une sphère après quelques jours de culture et la capacité de maintenir les sphères indéfiniment est également un moyen de valider les propriétés de CSC [36], [162], [163]. Partant du postulat qu'une sphère dérive d'une cellule souche cancéreuse, un test utilisant cette culture en suspension avec des concentrations cellulaires décroissantes (ELDA pour Extreme limiting Dilution Analysis) permet aujourd'hui d'estimer la fréquence des CSC dans une lignée cellulaire et dans une condition donnée [164].

- Tumorigénicité et différenciation *in vivo* : Pour valider la purification ou l'enrichissement en CSCs, le recours à des injections hétérotopiques ou orthotopiques (car plus proche du microenvironnement initial) dans des souris demeure une étape indispensable. Il doit s'agir de souris immunodéprimées si l'on désire travailler sur des CSCs humaines mais dans le cas de CSCs murines, il est possible d'utiliser des souris syngéniques. Tout d'abord, il est important de réaliser des injections en dilution limite pour calculer *in vivo*, la fréquence des CSCs dans la population initiale de cellules cancéreuses. Ensuite, des réimplantations sériées sont nécessaires afin de corréliser le potentiel tumorigène à une population de CSCs et non pas à des progéniteurs dont la capacité d'autorenouvellement reste limitée. Ces réimplantations permettent également de vérifier si la population de CSCs étudiée est capable de récapituler l'hétérogénéité tumorale de la population initiale de cellules cancéreuses grâce à leur capacité de différenciation.

### iii. Chimiorésistance

L'échappement tumoral en réponse aux traitements reste un phénomène rencontré par de nombreux patients et est responsable de la récurrence tumorale. La notion même de récurrence tumorale et le fait qu'une tumeur résurgente contienne de nouveau, différents types de cellules cancéreuses différenciées, indiquent fortement la persistance de cellules cancéreuses capable d'initier une tumeur et de se différencier. A ce titre, les CSC sont les cellules les plus aptes à supporter les traitements et initier de nouveau, une tumeur plusieurs mois ou années après la fin du traitement. Les mécanismes et protéines impliqués dans la chimiorésistance sont certes retrouvés dans les diverses populations de cellules tumorales qui constituent une tumeur, mais ceux-ci sont en effet particulièrement exacerbés dans la population de CSCs. Par exemple,

l'ensemble des cellules cancéreuses d'une tumeur auront en commun d'avoir moins de pompes SLCs (pour Superfamily of Solute Carriers), diminuant l'absorption de certaines molécules. Cependant, les CSC disposent de plus de pompes à efflux telles que les transporteurs actifs de la famille ABC évoqués précédemment. En guise d'exemple, c'est le cas de la glycoprotéine P (Pgp) dont l'expression dans les tumeurs colorectales est plus importante comparée au tissu sain adjacent. Cette différence d'expression serait plus particulièrement imputable aux CSCs qui sur-exprimeraient la Pgp en réponse à la chimiothérapie [112], [165].

Le transporteur ABCG2 (ou BCRP pour Breast Cancer Resistance Protein) est également très impliqué dans la résistance des CSCs aux chimiothérapies [166]. Physiologiquement, il est exprimé au niveau de la barrière hémato-encéphalique et le tractus gastro-intestinal et joue un rôle protecteur contre les agents xénobiotiques en particulier dans le foie. Son rôle a été étudié dans de nombreux cancers où il participe activement à l'efflux des traitements puisque ses substrats sont notamment des chimiothérapies tels que l'irinotecan (et son métabolite actif le SN38), la doxorubicine, la mitoxantrone mais également les inhibiteurs de RTK comme l'imatinib.

Dernier exemple de propriétés des CSC pour lutter contre les xénobiotiques : leur métabolisme particulier. Certaines voies métaboliques vont être suractivées afin de métaboliser en produits inactifs certaines molécules. C'est le cas de la dihydropyrimidine déshydrogénase, permettant de métaboliser le 5-FU ou l'enzyme CYP3A4 du cytochrome P450, permettant d'inactiver le paclitaxel et l'irinotecan [165]. Des enzymes comme l'UGT1A1 (surexprimée dans certains cancers) peuvent également inactiver certains de ces métabolites actifs tel que le SN38 [167]. A l'inverse, certaines voies métaboliques sont diminuées dans les CSCs afin de ne plus métaboliser certains substrats en produits actifs. C'est le cas par exemple des enzymes Carboxylesterases dont le niveau d'expression est bien moins important dans les cellules de CCR résistantes à l'irinotecan que celles qui y sont sensibles [168].

Les cellules cancéreuses et notamment les CSC, tirent profit de leur propension à accumuler des mutations. Elles peuvent ainsi modifier les cibles des molécules de chimiothérapie de différentes manières. La première manière de résister à une chimiothérapie est une réduction d'interaction entre le métabolite actif d'une chimiothérapie avec sa cible. Par exemple, le SN38 agit en se fixant au DNA topoisomérases. Or certains des patients porteurs d'un CCR résistants à l'Irinotecan ont une tumeur avec une mutation sur le gène *TOP1* ou une augmentation du nombre de copie de ce gène. Cette anomalie a pour conséquence d'induire une perte d'affinité du SN38 pour la Topoisomerase 1 dans le premier cas, ou une trop faible concentration de la molécule dans le deuxième cas [169], [170]. Cette même stratégie est retrouvée pour faire face au 5-FU avec un polymorphisme sur le promoteur de la thymidylate synthase (TYS) FU. La recherche du polymorphisme est maintenant réalisée chez tous les patients avant de recevoir du 5-FU [171]–[173]. Si malgré tout, les métabolites actifs des chimiothérapies interagissent avec leurs cibles,

cela peut également ne pas suffire pour tuer la cellule. Le mécanisme d'action le plus fréquent des chimiothérapies encore demeure les dommages à l'ADN générés en trop grand nombre sur des cellules en prolifération, activant une cascade de signaux pro-apoptotiques. Les cellules cancéreuses sont par exemple très efficaces pour surexploiter les programmes de réparation de l'ADN afin de contrecarrer l'effet de ce type de chimiothérapies [174]. Mais le moyen le plus évident pour une cellule d'empêcher ces dommages à l'ADN est de passer d'un état prolifératif à un état de dormance, état similaire à la quiescence mais spécifique des cellules cancéreuses. Le programme de dormance n'est pas exclusif aux seules CSCs mais il requiert certains programmes communs aux cellules souches embryonnaires et adultes qui ont arrêté de proliférer. Les CSCs, sans forcément entrer en dormance, sont malgré tout moins sensibles aux chimiothérapies cytotoxiques grâce à leur cycle cellulaire plus lent comparé à celui des progéniteurs tumoraux. Nous reviendrons bien plus en détail sur la dormance à la toute fin de l'introduction.

Enfin, de différentes manières, elles parviennent à atténuer les signaux pro-apoptotiques ou à rendre inopérant un acteur majeur de l'entrée en apoptose : p53. Dans le cas du CCR par exemple, il est fréquent de retrouver une forte surexpression des gènes codant pour les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL [165]. Mais c'est avant tout la mutation inactivatrice de la protéine p53, l'une des altérations majeures des CCR, qui permet la progression de la maladie tout en empêchant l'entrée en apoptose. N'étant plus fonctionnelle, la protéine p53 ne peut plus remplir son rôle de détecteur de dommages à l'ADN causés par l'oxaliplatine ou le 5FU, ni initier la mise en place de signaux pro-apoptotiques [175].

La plus grande tolérance aux dommages à l'ADN des cellules cancéreuses ne leur permet pas que de résister aux chimiothérapies cytotoxiques. Ces dommages participent à l'accumulation de mutations et permettent parfois de court-circuiter les effets d'une thérapie ciblée. Les mutations activatrices sur les récepteurs ou sur les premiers effecteurs d'une voie de signalisation sont très fréquentes dans les cancers. Les cellules cancéreuses deviennent très rapidement dépendantes, on parle même d'addiction à un oncogène, au point qu'une petite molécule ou un anticorps bloquant spécifiquement cette voie puissent entraîner l'apoptose de la cellule. Or une mutation en aval d'une voie de signalisation réduit, voire supprime, le bénéfice d'une thérapie ciblée visant des effecteurs ou récepteurs en amont. C'est le cas d'une mutation d'activation constitutive sur le gène *Ras* (en aval de l'EGFR) qui devient une contre-indication à l'utilisation du cetuximab dans le traitement du CCR [176]. L'acquisition d'une mutation K-Ras par une CSC va permettre l'apparition d'une sous-population peut être minoritaire avant le traitement mais qui résistera à la thérapie ciblée et sera à l'origine d'une rechute localisée ou à distance. Les mutations ne sont d'ailleurs pas le seul moyen pour court-circuiter les effets d'une thérapie ciblée. Des voies alternatives peuvent compenser l'inactivation d'une voie canonique suite à un traitement [177].

Enfin, les analyses de xénogreffes humaines, comme des expériences *in vitro* ont permis d'observer un fort enrichissement en cellules exprimant des marqueurs CSC en réponse à des traitements conventionnels [178]. Certains des marqueurs de CSC participent même activement à la résistance des CSCs aux traitements. Dans le cas de CD44 (et plus particulièrement de son isoforme v6), nous avons vu que sa fixation à l'AH activait entre autres, la voie PI3K/AKT. Parmi les multiples effets de cette activation, la baisse de sensibilité à l'apoptose s'explique notamment par l'expression du gène *MDR1*, codant la pompe à efflux Pgp [179]. Il a également été observé *in vitro*, qu'une lignée de cancer pancréatique dont l'expression de CD44v6 était bloquée grâce à un siRNA (pour small interfering RNA), devient plus sensible à la chimiothérapie et à la radiothérapie [180]. Outre la diminution d'expression du gène *MDR*, d'autres acteurs de l'apoptose sont impactés par l'expression et activation de CD44v6. La protéine p53, tant qu'elle n'est pas mutée et par conséquent non fonctionnelle, contrebalance les effets associés à CD44v6, et réprime également l'expression du gène de CD44 [181]. L'extrémité C-terminal de CD44v6 contient un motif de liaison à la protéine iASPP (pour inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53)[182] qui est ainsi recrutée et pourrait interagir avec Mdm2 et p53. Cette interaction empêcherait p53 d'induire l'expression des gènes *PUMA* et *NOXA*, tous deux impliqués dans l'apoptose [183]. Notons que dans le cas du CCR, l'effet anti-apoptotique de CD44v6 médié par iASPP ne devrait être pertinent qu'aux premiers stades de la maladie puisque l'évolution de l'adénome en carcinome requiert une mutation inactivatrice de p53 [184]. Enfin, bien que très efficaces mais pour peu de patients, les immunothérapies (CTLA-4, PD-1 et les anticorps anti-PD-L1) étaient envisagées dans le cas particulier des CCR présentant une forte instabilité microsatellitaire (IMS). Les tumeurs avec cette IMS sont en effet très infiltrées en lymphocytes T cytotoxiques. Malheureusement, la forte infiltration lymphocytaire doit s'accompagner de l'activation de ces lymphocytes et bien souvent, les cellules cancéreuses présentent à leur surface la protéine PD-L1, que les lymphocytes T reconnaissent par leur récepteur PD-1 et qui les empêche de s'activer. Ces thérapies servent donc à optimiser l'activation de ces lymphocytes et qu'ils aient une action cytotoxiques contre les cellules cancéreuses [185]–[187]. Pour diverses raisons, les études cliniques se sont avérées décevantes même dans le cas des CCR avec des IMS. Parmi les explications possibles, le récepteur Fas, à l'origine d'une voie de signalisation apoptotique. Lorsqu'il est sous forme tétramérique, Fas fixe alors le ligand Fas-L présenté par les lymphocytes T cytotoxiques, induisant à terme, l'apoptose de la cellules cancéreuses. Sous forme monomérique, Fas peut être séquestré par la région extracellulaire codée par le variant v6 et ne peut plus se tétramériser pour fixer son ligand présenté par les lymphocytes T cytotoxiques [188] (Figure 8).

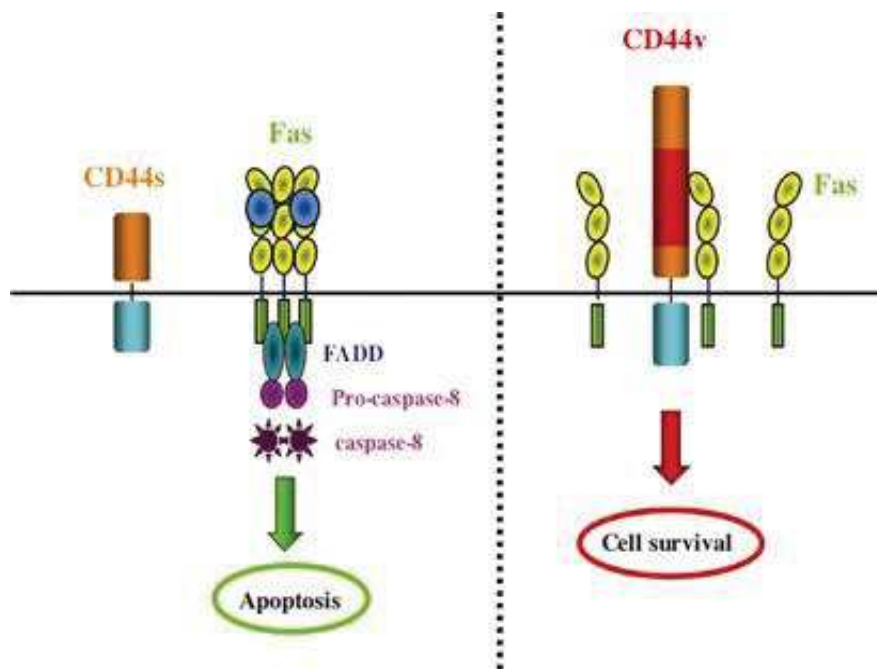


Figure 8: Modèle proposé pour séquestration de Fas par les variant CD44.

La partie variable extracellulaire des variant CD44 pourrait interagir avec PLAD (pre-ligand assembly domain) de Fas et ainsi prévenir sa trimérisation qui est un prérequis pour que Fas lie sont ligand. Ainsi, Fas ne peut produire un signal d'entrée en apoptose. Issue de Mielgo, A. et al. Cell Death and différenciation. 2006

Cette diversité des mécanismes de résistance au sein d'une tumeur illustre très bien l'immense avantage que représente l'hétérogénéité tumorale. Qu'ils soient présents avant le traitement, ou qu'ils soient induits par la pression de sélection que représente un traitement, ces mécanismes de résistance permettent à certaines populations tumorales de survivre. Mais c'est avant tout au sein des CSCs que cet arsenal est le plus exacerbé, impliquant donc un plus grand risque de rechute pour les patients. Cibler plus efficacement les CSCs est donc aujourd'hui un impératif pour les oncologues afin d'éviter la rechute des patients. Des équipes de recherche proposent par exemple de forcer l'entrée en différenciation des CSCs notamment grâce aux BMPs, ou de cibler des processus biologiques vitaux pour les CSCs grâce à de nouvelles thérapies ciblées. On peut imaginer des stratégies visant Lgr5 ou bien CD44v6 et/ou des processus en aval de ces récepteurs. Il ne faut cependant pas oublier de prendre en compte le reste des cellules cancéreuses qui compose une tumeur. En particulier les progéniteurs, dont la capacité à initier une tumeur de manière provisoire, peut dans un contexte bien particulier, être reprogrammé de manière pérenne et donner lieu à une nouvelle population de CSCs. C'est ce que l'on appelle la plasticité tumorale.

## a) Plasticité tumorale

L'organisation hiérarchique des cellules souches dont dérivent toutes les cellules différenciées d'un tissu ou d'une tumeur a pendant longtemps été décrite d'une manière unidirectionnelle. Cependant, la biologie de certains organes lors de dommages globaux ou atteinte spécifique des cellules souches a permis de remettre en question ce caractère unidirectionnel de l'organisation hiérarchique. C'est notamment le cas du foie où la définition de la population souche reste toujours sujette à débat alors qu'il s'agit d'un des organes avec le plus fort potentiel de régénération. En effet, après l'ablation d'un lobe de foie, les hépatocytes vont proliférer et avoir aussi la capacité de générer les autres types cellulaires différenciés afin de redonner à l'organe, non seulement sa masse initiale, mais aussi son fonctionnement initial. Dans le pancréas et dans des conditions homéostatiques, les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans ont toujours une capacité de prolifération, démontrant bien qu'il existe une certaine plasticité même dans un compartiment différencié. Ce phénomène est le fruit d'une régulation extrêmement fine qui fait intervenir de nombreux acteurs.

### i. Les facteurs de transcription embryonnaires

La plasticité cellulaire a notamment été démontrée suite aux expériences de reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Après d'innombrables tests de combinaisons de molécules, l'équipe du Pr Yamanaka a démontré que cette reprogrammation était possible en utilisant seulement 4 facteurs de transcription: Oct-3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (également nommés les facteurs de Yamanaka OSKM) [189]–[191] tous déjà identifiés dans des cellules pluripotentes [192]. Une autre combinaison (Oct4, Sox2, Lin28 et Nanog ou facteurs Thomson OSLN) a également conduit à l'obtention d'iPSC [193]. Puis, ces iPSC, exposées à certains facteurs bien définis, peuvent générer tous les types de cellules différenciées, et indépendamment du tissu d'origine des iPSC. Cette découverte a ouvert de nombreuses perspectives dans le domaine de la médecine régénératrice notamment comme alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires. Ces iPSC peuvent également permettre de reproduire fidèlement la maladie d'un patient, afin de comprendre les mécanismes moléculaires de la maladie et tester des molécules thérapeutiques. Mais d'un point de vue strictement fondamental, cette découverte a démontré que l'expression de gènes bien spécifiques, permet à elle seule, d'acquérir un potentiel souche. Ce potentiel souche ne serait donc pas une caractéristique innée mais acquise et supportée par une régulation très fine. Or dans le cas du cancer, il est intéressant de noter que ces facteurs de transcription sont également exprimés par les progéniteurs, les CSCs et les cellules entrées en EMT. Dans de nombreux cancers, et notamment le CCR, la voie Wnt induit l'expression de nombreux gènes cibles dont c-Myc [194]. Une mutation sur une

voie de signalisation impliquant l'expression d'un de ces 4 facteurs de transcription, combinée à d'autres mutations ou à des facteurs extrinsèques, pourrait dédifférencier des cellules cancéreuses non-souches comme observé dans un modèle de CCR ou de gliome [63], [69], [195].

## ii. Modifications épigénétiques

Outre les facteurs de transcription nécessaires et suffisants pour reprogrammer une cellule différenciée en une cellule souche, l'expression de ces gènes essentiels pour l'acquisition de ce caractère souche passe également par une régulation fine de l'ensemble de la machinerie de transcription [196]. Un facteur de transcription serait comme une clé qui doit trouver le trou d'une serrure (son site de fixation ou ses partenaires qui eux se lient à l'ADN) pour permettre d'ouvrir la porte (ici permettre la transcription d'un gène en ARN messager). A l'instar des phosphorylations ou ubiquitinations qui définissent l'activité ou le devenir d'une protéine, de nombreuses petites modifications moléculaires (méthylations sur l'ADN ou acétylation sur les histones) modulent l'expression d'un gène de différentes manières, on parle alors d'épigénétique. La méthylation de l'ADN est une modification consistant en un transfert covalent d'un groupe méthyl sur une cytosine et catalysée par un groupe d'enzymes appelées des DNA methyltransferases (DNMTs). DNMT1 interagit préférentiellement sur de l'ADN déjà hémiméthylé tandis que DNMT3A et DNMT3B ont une plus grande affinité pour les îlots CpG non méthylés [197], [198]. Les îlots CpG proches de la région 5' d'un gène, une fois méthylés, vont interagir avec des methyl-CpG binding domain proteins (MBD) ou zinc-finger protein (ZBTB) qui à leur tour vont recruter des corépresseurs transcriptionnels. Il n'y a donc pas de transcription du gène en aval [199]–[202]. Par exemple, une méthylation de l'ADN dans des zones enhancers et promoteurs est corrélée à l'activation de l'expression des gènes spécifiant les futurs tissus et types cellulaires durant le développement embryonnaire et post-natal [203], [204]. De la même manière dans les tissus adultes, les promoteurs des gènes « souches » deviennent plus méthylés lorsqu'une cellule entreprend sa différenciation [205]. Or des profils de méthylation de l'ADN anormaux sur l'ensemble du génome ont été associés à de nombreux types de cancers [206]–[210]. De la même manière que dans le tissu sain, ces modifications épigénétiques associées aux cancers, affectent des régions d'ADN distinctement, avec des hypométhylations sur des éléments de régulation et répétitifs et des hyperméthylations sur les îlots de CpG [206]. Ces modifications impactent l'expression des gènes environnants et contribuent à l'acquisition d'un phénotype cancéreux de ces cellules [207], [209] mais également à la dérivation de cellules différenciées en CSC [211]–[216] et à la progression tumorale [217].



### iii. Modifications épitranscriptomiques

Un gène codant pour une protéine s'exprime tout d'abord par l'intermédiaire d'un ARN messagers, qui nécessite ensuite d'être traduit en protéine pour effectuer la fonction du gène. Cette étape de traduction est également extrêmement régulée par les nombreux acteurs impliqués dans la machinerie traductionnelle (protéines, ARN ribosomiaux et transferts). Les acteurs de cette machinerie influencent fortement le produit fonctionnel d'un programme génétique (c'est à dire le protéome) requis pour chaque type cellulaire [68], [218], [219]. Cette machinerie permet tout d'abord, des épissages alternatifs générant des isoformes d'une même protéine, modifiant la composition protéique d'une cellule à l'autre dans un même tissu [220]. La plus vaste diversité d'isoformes se retrouve dans les cellules souches embryonnaires (CSE) et elle décroît au cours de la différenciation. Ce phénomène qui est en quelque sorte une spécialisation de l'isoforme, est médiée par de nombreux acteurs de l'épissage se fixant les ARNm. Ces acteurs sont exprimés différemment durant le développement [221]. Le profil d'expression des isoformes permet également de distinguer des cellules souches, des progéniteurs mais aussi des cellules malignes [222], [223]. Par exemple, une perte de SRSF2, un acteur du complexe d'épissage des pré-ARNm, induit une diminution d'expression de gènes souches *OCT4* et *NANOG* et perturbe l'autorenouvellement des CSE. Étonnamment, Oct4 lui-même peut se lier au promoteur de *SRSF2* et une perte d'Oct4 diminue également l'expression de *SRSF2*, suggérant une régulation réciproque des facteurs d'épissage et de pluripotence [224]. A l'inverse, une isoforme spécifique du facteur de transcription FOXP1, exprimée par les CSE, ne l'est plus durant la différenciation. L'exon propre à cette isoforme de FOXP1 lui confère une spécificité d'interaction aux promoteurs d'*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et empêche l'expression de facteurs de différenciation [225].

Aux vues de l'importance de l'épissage des ARNm dans la régulation de la diversité du transcriptome et protéome des cellules souches, l'étude de ce mécanisme conférant une plasticité cellulaire a été étendue aux cancers et plus particulièrement aux CSCs. Dans le cas des leucémies, il a été démontré qu'une absence d'épissage de GSK3 $\beta$  concomitante à une activation de la  $\beta$ -caténine, était importante pour l'autorenouvellement des CSCs tandis qu'un variant pro-apoptotique de la famille BCL2 favorisait la survie de ces CSCs [226], [227]. Enfin, pour illustrer au mieux l'importance de l'épissage alternatif pour les CSCs, il suffit de revenir au cas de CD44 et de ces variant, longuement développé précédemment [159], [228], [229]. Il est important de noter que la synthèse d'une isoforme particulière peut être provoquée dans des cellules qui ne l'exprimaient pas suite à une exposition à certains facteurs [159] démontrant que le processus d'épissage alternatif peut également être au service de la plasticité des cellules cancéreuses.

Les ARNm et les autres ARN de la machinerie traductionnelle, sont eux-mêmes sujet à des petites modifications telles que des méthylations, impactant fortement leur devenir, on parle alors d'épi-transcriptomique. La modification des ARNm la plus fréquente est une méthylation de l'adénosine



en position nitrogen-6 (N6-methyl adenosine [m<sup>6</sup>A] [230]. Cette méthylation est catalysée par les enzymes m<sup>6</sup>A méthyltransférase 3 ou 14 (METTL3 ET METTL14) également nommées « writer » [231]. Récemment, les protéines FTO et ALKBH5 ont été identifiés comme m<sup>6</sup>A déméthylase ou « erasers » [232], [233]. La possibilité d'ajouter ou d'enlever cette méthylation confère alors une nature dynamique à ce processus. En effet, les protéines « readers » qui reconnaissent et se fixent à cette modification, vont pouvoir modifier le devenir du brin d'ARN et notamment, la stabilisation et maturation de l'ARNm [234]. Le profil des ARNm va également beaucoup varier en fonction du stade du développement, le tissu et le type cellulaire. Ainsi, la méthylation m<sup>6</sup>A sera cruciale lors du développement embryonnaire [235], [236] par son fort impact sur l'autorenouvellement et la différenciation des CSE. En effet, pour que les CSE conservent leur capacité d'autorenouvellement et ne se différencient pas, les ARNm de SOX2 et NANOG doivent avoir la modification m<sup>6</sup>A [236], [237]. Il est intéressant de noter qu'en jouant sur la surexpression du writer METTL3, la méthylation m<sup>6</sup>A augmente l'efficacité de la reprogrammation de fibroblastes humains en iPSC, notamment en stabilisant les facteurs de pluripotence [221]. Cela souligne pour la première fois la participation de l'épitranscriptomique dans la plasticité cellulaire. Le rôle de la méthylation m<sup>6</sup>A dans le maintien (ou acquisition) d'un phénotype souche ou en faveur d'une différenciation reste cependant un sujet de débat. Et plus particulièrement dans le cas des cancers où l'impact de la méthylation m<sup>6</sup>A semble être dépendant du type de cancer. En effet, m<sup>6</sup>A agit en faveur de la différenciation dans le cas du cancer du sein [238], du cancer cervical [239], des leucémies [240] et du glioblastome [241] mais est incompris ou a des effets contradictoire dans de nombreux autres cancers comme le CCR. Cependant, il est intéressant de noter qu'une surexpression de la déméthylase FTO permet de diminuer une autre méthylation (m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>) et de dédifférencier des cellules cancéreuses différenciées en CSC capables de former des sphères et exprimant de nombreux marqueurs de CSC [242]. Cependant d'autres études in vitro et in vivo sont encore nécessaires pour confirmer le rôle de la déméthylation des ARNm dans la plasticité cellulaire. De plus, les conditions et les facteurs qui contrôlent et favorisent dans un sens ou dans l'autre ces méthylations et déméthylations des ARNm restent également à identifier.

Parmi les régulations post-transcriptionnelles impactant le devenir d'un ARNm et donc la quantité de protéines qui en découlent, les micros-ARN (miRNA) émergent également aujourd'hui comme des acteurs majeurs de l'homéostasie tissulaire et tumorale. Les miRNA sont de petits brins d'ARN non codants qui s'hybrident à des ARNm spécifiquement afin de réduire ou de réprimer l'expression d'un gène. L'inhibition de l'expression de gènes par des mi RNA est un mécanisme régulant fortement la perte de pluripotence et favorisant la différenciation des CSE dans le développement embryonnaire. Observée tout d'abord chez la souris [243], [244] puis confirmée chez l'Homme [245], une perte d'expression des protéines synthétisant les miR-134, miR-296 et miR-470 conduit les CSE, à ne pas pouvoir se différencier et à exprimer fortement les gènes de pluripotence *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*. Les miRNA sont également fortement impliqués dans la

régulation de la prolifération et différenciation des cellules souches somatiques [246]. De la même manière, leur absence ou leur inhibition souvent observée dans les cancers, participe à la progression de la maladie [247]–[249]. Par exemple, miR-34a dont l'absence a été observée dans de très nombreux cancers [250], s'avère être un très bon inhibiteur de la prolifération des CSC mammaires [251]. Le rôle anti CSC de miR-34a a été plus particulièrement décrypté dans le cancer de la prostate puisqu'il induit la dégradation de l'ARNm de CD44 [252]. Récemment, d'autres miRNAs ont été identifiés comme inhibiteurs de la transduction du signal des voies souches Wnt, Notch et Hedgehog [250]. Il est important de noter que si certains de ces acteurs permettent la différenciation de cellules souches, d'autres peuvent au contraire favoriser une reprogrammation de fibroblastes embryonnaires murins en iPSC [253] ou de cellules cancéreuses humaines de peau en des cellules pluripotentes [254]. Certaines équipes ont même démontré que certains mi-RNA suffisaient à eux seuls pour reprogrammer des fibroblastes en iPSCs [255], [256].

Même si le plus souvent les mi-RNA semblent sous-exprimés dans les CSC et ont donc un rôle pro-différenciation, quelques publications rapportent également que des mi-RNA peuvent conférer un phénotype CSC à des cellules cancéreuses différenciées. Dans cette étude de Liu, S. *et al*, des cellules humaines de cancer du foie sont transfectées avec le miR-135a, ciblant l'ARNm de la DNA méthylase DNMT1. La dégradation de ce dernier conduit à une diminution de la méthylation du promoteur de *Nanog* et permet ainsi son expression dans des cellules qui ne l'exprimaient pas. Outre l'augmentation d'expression de *Nanog*, l'équipe a également observé que cette surexpression de miR-135a favorisait la croissance tumorale *in vivo* [257]. L'étude n'a cependant pas vérifié le gain d'expression de marqueurs CSC, la capacité à former des sphères, ni réalisé des xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques sériées afin de confirmer réellement la reprogrammation des cellules différenciées en CSCs. Une autre étude elle observe tout d'abord que suite à un traitement FOLFOX de lignées commerciales de CCR, l'expression de miR-21 était très importante dans les cellules résistantes. Les cellules résistantes aux chimiothérapies ayant un phénotype CSC, les auteurs corrélaient ainsi l'expression de ce mi-RNA avec le phénotype souche. Surexprimé dans une de ces lignées commerciales de CCR, miR-21 confère aux cellules une capacité à former des sphères 3,5 fois supérieure, avec une taille de sphère 30 à 40% plus importante et surtout une capacité d'auto-renouvellement supérieure de 60% comparée à la condition contrôle. L'injection sous-cutanée dans des souris immunodéprimées de 550 000 cellules de chaque condition, démontre que miR-21 confère un pouvoir tumorigène bien plus important. L'équipe attribue enfin les effets pro-tumoraux et pro-CSC du miR-21 à une forte diminution d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs PTEN, PDCD4 et plus particulièrement l'ARNm de TGF $\beta$ 2, qui (s'il était traduit), permet de réprimer la voie Wnt. Ainsi cette étude propose que le rôle pro-tumoral de miR-21 soit dû à l'acquisition d'un phénotype souche pour mieux résister à une chimiothérapie [258]. Cependant, certains tests fonctionnels et moléculaires (injections *in vivo* en dilution limite et sériées, récapitulation de l'hétérogénéité

tumorale initiale et l'expression de marqueurs CSC) auraient permis de consolider ce potentiel pro-souche de ce mi-RNA et implique de relativiser cette conclusion. En effet, cette implication des mi-RNA à reprogrammer des cellules cancéreuses non-souches en CSCs émerge de plus en plus comme nous venons de le voir suite à des chimiothérapies ou aux phénomènes d'hypoxie [259] mais cette implication reste encore bien moins caractérisée que l'implication inverse. Le laboratoire de Charafe-Jauffret et Ginestier ont identifié par exemple le miR-600 comme un miRNA ayant un rôle pro-différenciation en empêchant la production de protéines Wnt actives par les CSCs mammaires [260]. Parmi les mi-RNA bien moins exprimés dans les cellules capables d'initier une tumeur de nombreux cancers, se trouvent les membres de la famille de miR-200 [261], [262]. Ces derniers cibles notamment les gènes mésenchymateux, en faveur d'un phénotype épithélial, empêchant donc l'entrée en EMT de cellules cancéreuses et la ré-acquisition d'un phénotype souche [263], [264].

#### iv. La transdifférenciation : de l'EMT à la MET

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus dynamique complexe par lequel des cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux. Elle se caractérise par une perte des jonctions intercellulaires (jonctions serrées, jonctions adhérentes ou desmosomes), d'une perte de la polarité cellulaire apico-basale (noyau coté basal et réseau d'actine majoritairement apical), et de la perte des intégrines au pôle basal. Ces dernières interagissent avec les protéines de la lame basale sur laquelle repose le tissu épithélial et sépare ce dernier de la matrice extracellulaire (MEC) [265]. Cette altération de l'organisation et de la composition du cytosquelette ainsi que les pertes de polarité et d'adhésion cellulaire fortes sont remplacées par la synthèse de vimentine, de N-cadhérine et de métalloprotéases (MMPs) conférant une morphologie mésenchymateuse (similaire à des fibroblastes) et des capacités de motilité accrue [266]. Devenue ainsi plus plastiques et très mobiles, les cellules peuvent alors quitter le tissu épithélial pour rejoindre d'autres tissus voisins. Cette EMT est réversible (on parle alors de transition mésenchymo-épithéliale ou MET) et une cellule peut ne s'engager que partiellement dans un sens ou un autre de transition (Figure 9A). Il existe trois types d'EMT, celle développementale, celle régénérative et celle pathologique. Durant le développement embryonnaire, l'EMT primaire concerne la formation de l'endoderme pariétal, l'infiltration de l'endomètre, la mise en place du mésoderme au cours de la gastrulation et enfin la migration des cellules de la crête neurale. Les événements de TME secondaires et tertiaires sont ceux qui arrivent dans des tissus embryonnaires qui ont déjà subi un ou deux processus d'EMT ou MET. L'EMT secondaire concerne par exemple les somites pour former à terme des cellules musculaires, des cellules satellites ou des tendons. Parmi les EMT tertiaires, on retrouve un exemple particulier : la transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) qui permet la formation des

valves cardiaques [267], [268]. L'EMT intervient également bien après le développement de l'embryon et du fœtus ; il s'agit de la EMT régénérative. En effet, la situation la plus commune où notre corps à recours à la EMT est la réparation de la peau suite à une blessure cutanée. Le processus de cicatrisation sera enclenché par l'inflammation au niveau de la plaie. Elle sera un signal de recrutement des fibroblastes environnants pour qu'ils se différencient en myofibroblastes mais également, pour transdifférencier partiellement les kératinocytes pour qu'ils effectuent une migration collective. La plaie se referme et cicatrise grâce à cette forte concentration de myofibroblastes se contractant au niveau de la plaie, combinée à la synthèse de collagène, de fibronectine [269].

Ce type de plasticité cellulaire peut également être impliqué dans certaines pathologies. Dans le cas des fibroses et particulièrement la fibrose rénale [270], le pool de fibroblastes activés est constitué des fibroblastes résidents proliférant anormalement mais est également enrichi en néo-fibroblastes suite à l'EMT des cellules épithéliales rénales et suite à la EndMT des cellules endothéliales rénales.

Le cancer est l'autre pathologie où l'EMT est un processus clé à divers moments de la maladie [271]–[274]. Nous avons vu que la croissance tumorale et la transformation maligne d'une tumeur primaire sont permises par diverses altérations (génétiques, épigénétiques et épitranscriptomiques) conférant progressivement des avantages à certaines sous-populations de cellules cancéreuses (auto-renouvellement, prolifération, indépendance aux facteurs de croissance et insensibilité aux signaux antiprolifératifs, d'apoptose ou de senescence) [275]. Une tumeur peut donc contenir plusieurs populations de CSCs et de non-CSCs qui en découlent. Une sous-population peut être majoritaire à un moment donné de la maladie et, quelques mois plus tard, devenir minoritaire. Parallèlement, une autre sous-population dont les altérations lui confèrent un avantage sélectif dans ces nouvelles conditions tire avantage de la situation et devient majoritaire. L'une des conditions les plus fréquentes et évidentes est l'instauration d'une condition d'hypoxie au fur et à mesure que la tumeur croît. Ce stress hypoxique a pour effet de provoquer la mort de certaines cellules, c'est à dire une nécrose tumorale, mais également pour certaines cellules, l'induction d'un programme de néo-angiogenèse [276] ou un programme d'EMT [277]. En effet, l'éloignement géographique d'une partie des cellules cancéreuses des vaisseaux sanguins explique cette nécrose. Mais des cellules étant à une distance similaire d'un vaisseau sanguin peuvent finalement passer outre ce stress, grâce justement à cette altérité qui existe au sein d'une tumeur. Une sous-population, avec ses altérations propres, peut par exemple, ne pas avoir d'avantage sélectif en condition de normoxie. En condition d'hypoxie par contre, ses altérations lui confèrent la capacité d'attirer à elle des néo-vaisseaux via un programme de néo-angiogenèse, et/ou de se rapprocher des nutriments nécessaires à sa survie via un programme d'EMT [278]. La croissance tumorale se heurte également à la barrière mécanique que représente

la lame basale. Pour pouvoir franchir cette barrière naturelle et ne pas rester contenues dans son tissu d'origine, les cellules cancéreuses épithéliales vont entrer en EMT et acquérir des capacités de migration (perte des jonctions intercellulaires, formation d'invadopodes) et de dégradation de la lame basale (productions de métalloprotéases). L'EMT fait donc appel à des mécanismes et propriétés très proches de ceux mis en place au cours de l'embryogénèse mais pas seulement. Les cellules cancéreuses entrées en EMT partagent avec les CSCs, des capacités d'auto-renouveaulement, de différenciation, de résistance à l'anoïkis et à initier des tumeurs. L'acquisition de capacités souches suite à l'entrée en EMT a été constatée dans divers type de cancer, ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme dépendant d'un tissu ou d'un organe particulier mais plutôt d'un contexte biologique [279]–[283]. L'étude de Mani, S.A. *et al* est la première à démontrer assez solidement le lien entre le concept de CSCs et le concept d'EMT tout en les distinguant bien. L'EMT permet de reprogrammer des cellules cancéreuses épithéliales non-souches en cellules mésenchymateuses avec un fort phénotype souche. Cette reprogrammation *in vitro* est certes très efficace (doublement de la fréquence de cellules définies comme CSCs selon l'expression de CD44 et CD24 ou de la capacité à former des sphères) mais dépend du maintien des signaux d'entrée en EMT. En leur absence, cette capacité à initier une tumeur sera, *in fine*, perdue par les cellules qui découlent des cellules initialement entrées en EMT. Cependant les auteurs constatent que la perte de phénotype souche n'est pas concomitante à la perte des signaux d'entrée en EMT et est transmise de cellule en cellule un certain temps. Ils proposent qu'une EMT transitoire dans une population de cellules cancéreuses non-CSCs peut rendre possible la génération d'une population de cellules cancéreuses avec un potentiel souche relativement illimité [284]. Notons qu'il n'y a pour l'heure, aucune indication qu'une CSC caractérisée comme épithéliale, ne puisse-t-elle aussi, entrer en EMT puis redevenir épithéliale dans le but de migrer et initier une nouvelle tumeur.

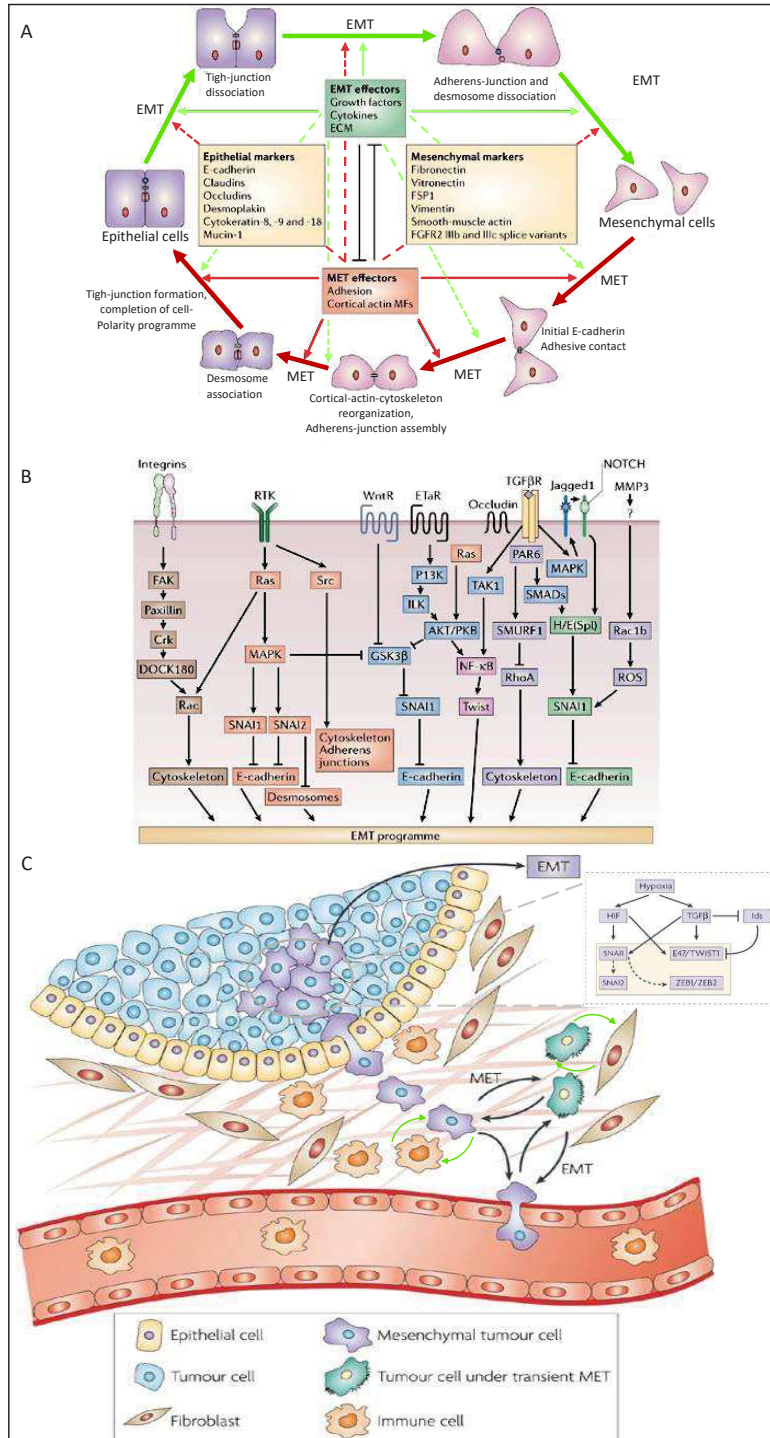
Dans le détail, l'expression de gènes communs entre les CSCs et le programme d'EMT est orchestrée par la réactivation de deux types de machinerie transcriptionnelle ; celle des facteurs de transcription de type bHLH (facteurs de transcription possédant un domaine basique hélice-boucle-hélice) comme E47, Twist1 et Twist2, et celle des facteurs à doigts de zinc comme les protéines Snail1, Slug, Zeb1 et Sip1 [285]. Brièvement, ces facteurs de transcription permettent l'EMT par les mécanismes suivant : soit en réprimant la transcription des gènes codant pour les protéines des jonctions adhérentes, telle que la E-cadhérine [286], soit en activant l'expression de gènes mésenchymateux (N-cadhérine, la vimentine), du remodelage du cytosquelette et de production d'enzymes pour dégrader la lame basale (les métalloprotéases qui également diminuent les jonctions intercellulaires dues à l'E-cadhérine). Étonnamment, une perte d'expression et de localisation membranaire de cette dernière suffit à elle seule pour induire une TEM, démontrant la relation intrinsèque de cette protéine avec l'initiation de la TEM [287]. Il est également important de noter que l'EMT est un processus très dynamique et réversible. Il est possible d'observer des cellules devenues totalement mésenchymateuses (ou redevenues

totallement épithéliales) et d'autres dans un état intermédiaire que l'on nomme métastable. Ce dynamisme et réversibilité est la conséquence de nombreuses voies de signalisations induisant la TEM (Figure 9B) ou inversement la TME [266].

Il semblerait d'ailleurs que cette EMT partielle, que certains nomment EMP, soit l'état où le phénotype souche est le plus optimal, tout en favorisant l'adaptation des cellules dans un nouvel environnement. En effet, l'invasion du tissu conjonctif sous-jacent offre de nouvelles sources de nutriments mais pas seulement. Le tissu conjonctif expose les cellules cancéreuses à de nombreux facteurs séquestrés par la MEC et permet de nouvelles interactions avec les cellules qui composent ce tissu. Pour prolonger la discussion menée dans l'étude de Mani, S.A. *et al* [284] sur l'acquisition d'un phénotype souche presque illimité, nous allons aborder non seulement le phénotype invasif acquis grâce à l'EMT mais également l'éducation des cellules du microenvironnement provoquée par les cellules cancéreuses. Cette éducation s'accompagne d'un remodelage du microenvironnement et est essentiel pour subvenir aux besoins des cellules cancéreuses et surtout, pour leur fournir constamment des signaux d'entrée en EMT, pérennisant entre autres, la capacité d'initiation tumorale (Figure 9C).



Figure 9 : De l'EMT à la MET.



(A) Schéma récapitulant les stades et marqueurs majeurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et de la transition mésenchymo-épithéliale MET. Les premiers marqueurs épithéliaux perdus sont ceux qui participent aux jonctions serrées. Puis, les cellules s'individualisent, perdent leur polarité et perdent les marqueurs épithéliaux participant aux jonctions adhérentes ainsi qu'aux desmosomes. Ces étapes sont favorisées grâce à des inducteurs de l'EMT (cadre vert). A l'inverse, des inducteurs de la MET (cadre rouge) vont promouvoir la ré-acquisition par étape d'un phénotype épithéliale. Les inducteurs de l'EMT et de la MET se répriment mutuellement, participant ainsi au dynamisme de l'EMT et la MET et permettant à une cellule d'être par exemple en transition épithélio-mésenchymateuse partielle (EMP) et de redevenir épithéliale sans à avoir à terminer le processus d'EMT puis de MET.

(B) Schéma non-exhaustif des voies de signalisation les plus connues pour induire l'entrée et l'avancé d'une cellule en EMT. (C) Schéma des principales causes induisant une EMT ou MET. Les cellules privées de nutriments et d'oxygène, et/ou exposées à des protéines inductrices de l'EMT tel que le TGF- $\beta$ , vont exprimer les protéines orchestrant l'EMT. L'EMT confère des capacités migratoires et des capacités d'initiation tumorale. Une fois arrivée dans un environnement favorable, la cellule mésenchymateuse peut redevenir épithéliale en entrant en MET. Elle pourra de nouveau, s'engager dans l'EMT afin de rejoindre un autre site favorable, par exemple un organe distant grâce à la circulation sanguine. Ces aller-retours sont finement régulés par les interactions des cellules cancéreuses avec leur microenvironnement (flèches vertes).

## B La dissémination tumorale dans le cancer colorectal

### 1. Progression tumorale : du carcinome In situ à invasif

Entre le stade adénome et carcinome, les cellules cancéreuses évoluent et réagissent à un environnement particulier et ce dernier est également impacté par celles-ci. Dès la formation d'un polype adénomateux, l'environnement immédiat de la tumeur, c'est à dire son microenvironnement, va réagir à cet évènement anormal. Il s'agit premièrement des cellules résidentes de la lamina propria, à savoir les différents types fibroblastes, les cellules endothéliales ou encore les cellules immunitaires. Les molécules qui composent la lamina propria et les molécules sécrétées par les cellules résidentes impacteront le comportement et/ou le phénotype des cellules cancéreuses.

L'homéostasie du tissu sain est un bon exemple. En effet, nous avons jusqu'à présent, développé la régulation de l'homéostasie intestinale en nous concentrant sur les cellules épithéliales, les marqueurs et les voies de signalisation qui les caractérisent ainsi que leur localisation le long de l'axe crypte-villosité. Nous avons brièvement évoqué que certains facteurs (les BMP, Wnt, la R-Spondin) étaient cruciaux pour le bon positionnement des cellules et le maintien des CBC en fond de crypte. Cependant, ces facteurs sont pour une bonne partie d'entre eux, produits par les cellules du stroma. Brièvement, une partie des fibroblastes forme une sorte de réseau continu juste en dessous des cellules épithéliales. Un dialogue moléculaire s'établit entre les fibroblastes et les cellules intestinales et selon la nature des cellules (différenciées, progéniteurs ou cellules souches), les fibroblastes réagiront différemment. Ainsi, les fibroblastes des villosités et ceux des cellules différenciées sont à l'origine du gradient de BMPs (pro-différenciation) [288]–[290] et les fibroblastes du fond de crypte sécrètent des facteurs pro-souches (Wnt et la R-Spondine) et antagonistes des BMPs (Gremlines et Noggin) [291], [292]. Les cellules de Paneth vont quant à elles, sécréter des facteurs paracrines pro-prolifération (EGF, TGF $\alpha$ , FGF) et des facteurs pro-souches (Wnt3a, Wnt11, Notch Dll4 et Notch Dll4) [293]. De plus, une étude récente a montré que l'activité métabolique des cellules de Paneth, en particulier la glycolyse, joue un rôle crucial pour permettre la fonction des cellules souches intestinales (CSI) [294]. Essentielles pour maintenir les CSI, les cellules de Paneth quant à elles requièrent une sous-population de macrophages à proximité pour se différencier totalement et accomplir leurs fonctions [295].

Ce microenvironnement spécifique aux CSI est également nommé la niche. Comme la plupart des concepts autour des cellules souches que nous avons développés, celui de la niche fût initialement décrit en étudiant les cellules souches hématopoïétiques. L'émergence des CSC et la prise en compte du microenvironnement tumoral ont conduit à transposer ce concept de niche également aux cancers. Nous aborderons dans les sections suivantes comment ces interactions



microenvironnement-cellules cancéreuses peuvent impacter la progression de la maladie et notamment la formation de métastases.

#### a) Invasion locale : de la rupture de la lame basale à l'invasion des tissus voisins

La prolifération « anarchique » des cellules cancéreuses doit faire face à divers mécanismes et barrières qui freinent ou empêchent la progression tumorale. L'apoptose, la senescence, les stress génotoxiques induits par les oncogènes ou l'altération des télomères sont des facteurs intrinsèques aux cellules cancéreuses qui freinent la progression tumorale [275]. Cependant, la tumeur doit également faire face à plusieurs types de pression extrinsèques comme le manque de nutriments et d'oxygène, un contexte inflammatoire, les attaques du système immunitaire inné et adaptatif, certains composants de la MEC et surtout une barrière physique : la lame basale.

La lame basale est une zone de la MEC située à l'interface entre une couche de cellules épithéliales (ou de cellules endothéliales) et le tissu conjonctif. C'est un maillage fin mais très dense de glycoprotéines et protéoglycanes tels que le collagène de type IV, la lamine et le perlécane par exemple. La composition moléculaire de la lame basale varie selon les organes. Elle est fabriquée dans une moindre mesure par les cellules épithéliales mais surtout par les fibroblastes. Dans le cas de l'intestin, sa composition varie selon que l'on se situe au niveau de la crypte ou de la villosité (ou du plateau au niveau du colon) (Figure 10A). La lame basale délimitant le tissu épithélial intestinal du tissu conjonctif (lamina propria ou chorion) diffèrent également de celle qui délimite le chorion des cellules endothéliales [296]–[298]. Une lame basale bien organisée est un élément clé pour maintenir la structure de l'épithélium. Elle confère à la fois un support d'attache physique et est un signal d'orientation pour les cellules épithéliales grâce aux adhésions basales dues aux intégrines.

Pour les tumeurs épithéliales naissantes jusqu'au stade de carcinome non invasif, la lame basale agit comme une barrière empêchant l'invasion du stroma sous-jacent par les cellules transformées [299]. Des clones tumoraux devenus capables de dégrader la lame basale par une activité protéolytique, vont permettre à la tumeur de devenir maligne et de débiter le processus d'invasion locale. En effet, la dégradation de la lame basale et plus généralement de la MEC permet de libérer des facteurs de croissance séquestrés et vont favoriser l'acquisition d'un phénotype malin [300]. L'activité des protéases de la MEC (activité essentiellement due aux MMPs) est normalement finement régulée par une production localisée, un rétrocontrôle négatif de la production des MMPs par les cellules elles-mêmes et également par une sécrétion d'inhibiteurs tels que TIMP-1 (pour tissue inhibitor of metalloproteinases) par les autres cellules du tissu [301], [302]. Les cellules cancéreuses utilisent divers mécanismes pour perturber cette fine régulation et libérer cette activité protéolytique contre la lame basale et la MEC interstitielle. Les sources de

MMPs au sein de la tumeur sont diverses (Figure 10B). Les cellules tumorales peuvent elles-mêmes sécréter des MMPs. Nous l'avons entre autres évoqué avec l'exemple de la fixation de l'AH sur CD44v6 qui induisait une production de MMP9 et MMP2. Ces dernières participant à la dégradation de la MEC et la libération sous forme active de facteurs de croissance (en particulier l'EGF et le TGF- $\beta$ ) [301].

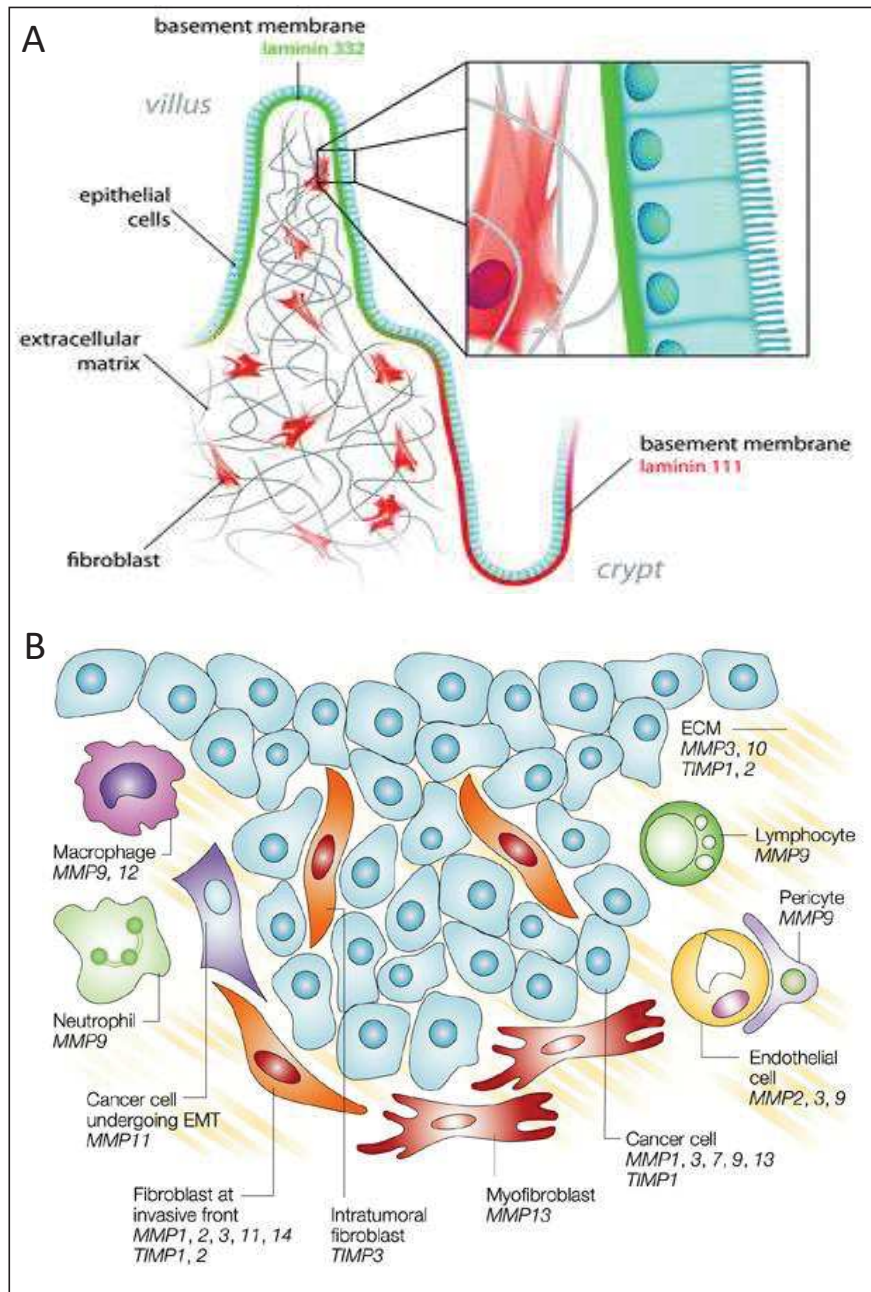


Figure 10: Acteurs impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC).

A) Schéma représentatif de la membrane basale intestinale. La composition de la lame basale varie selon l'axe crypte/villosité et indique une fonction protectrice différente entre la crypte et la villosité. Cette composition est définie par les fibroblastes répartis le long de la lame basale. Issue de Glentis, A. et al. *Cell Adhesion & migration*. 2014. (B) Types cellulaires et metalloprotéinases (MMPs) impliqués dans le remodelage de la MEC. Chaque type cellulaire peut sécréter diverses MMPs, chacune ciblant des constituant particulier de la MEC. Issue de Egeblad, M. & Werb, Z. *Nat. Rev.* 2002.

L'infiltrat immunitaire est également une des sources majeures de MMPs. En utilisant un élégant modèle d'oncogénèse épidermique précoce sur poisson zèbre, l'équipe de P. Martin a ainsi démontré que les neutrophiles et les macrophages exploitaient la présence de micropores au sein de la lame basale pour pénétrer l'épithélium tumoral. Ainsi, ces cellules, bien que capables de dégrader la lame basale, privilégient ces voies d'entrée naturelles plutôt que de recourir à une activité protéolytique très énergivore [303]. Ces micro-perforations ont par ailleurs été observées au niveau de l'intestin de rats en condition normale [304] mais en particulier dans le cas des maladies inflammatoires intestinales pour lesquelles ces micro-perforations deviendront plus tard, la voie d'entrée des cellules immunitaires durant l'initiation tumorale [305], [306]. S'installera alors une dualité entre un rôle anti-tumoral et pro-tumoral des cellules immunitaires et en particulier pour les macrophages et les neutrophiles. Cette dualité est assez peu étudiée à des stades précoces et la littérature décrit plutôt le rôle du système immunitaire dans le cas de carcinomes invasifs. Cette dualité du système immunitaire sera abordée en détail dans la partie dédiée au rôle du microenvironnement tumorale primaire dans la dissémination.

Mais pour revenir aux mécanismes permettant la dégradation de la lame basale et la MEC, le dialogue entre les cellules tumorales, les fibroblastes et les cellules immunitaires, peut provoquer le passage d'un rôle anti à pro-tumoral des macrophages et des neutrophiles. Or parmi les différents modes d'action pro-tumoraux que disposent les macrophages, il y a notamment la production de protéases. Ainsi les cathepsines et les MMPs de ces cellules immunitaires aideront les cellules tumorales à dégrader la lame basale et la MEC du stroma [307], [308] et donc à envahir le parenchyme sain.

Enfin, les fibroblastes qui constamment synthétisent et dégradent les composants de la MEC, sont la source majeure de protéases, particulièrement lorsque les fibroblastes sont activés en fibroblastes associés au cancer (FAC) [309]. Cependant, à des stades précoces, où les fibroblastes ne sont pas encore en contact direct avec la tumeur, le rôle de ces derniers demeurerait assez flou. Une étude *in vitro* récente a démontré la traversée de cellules cancéreuses au travers de la lame basale grâce à la présence de fibroblastes phénotypiquement similaires à des FAC de l'autre côté de la lame basale. Ce phénomène s'avère être indépendant de la production de MMPs aussi bien par les cellules cancéreuses que par les fibroblastes. Dans cette étude, les cellules cancéreuses déploient des protrusions au travers de micropores afin d'entrer en contact direct avec les fibroblastes situés de l'autre côté de la lame basale. En quelques jours, les fibroblastes adoptent une morphologie typique des FAC et débute un remodelage de la lame basale notamment en élargissant les micropores préexistants. L'inhibition des contractions actine-myosine des FAC empêche l'élargissement de ces pores, indiquant que le passage de la lame basale par les cellules cancéreuses est dépendant de mécanismes de contractilité des fibroblastes afin d'élargir les micropores. Néanmoins, les auteurs n'excluent pas que ces micropores soient créés initialement par l'action de MMPs ou d'autres protéases telle que l'uPA (urokinase-type plasminogen activator)

[310]. Bien que ces résultats reposent sur un modèle *in vitro* mimant la lame basale à un stade non invasif, elle permet d'expliquer certaines observations *in vivo* et cliniques où des cellules cancéreuses parviendraient à disséminer alors qu'histologiquement, la tumeur primaire est toujours contenue dans le tissu épithélial et donc sans accès à des vaisseaux sanguins. Ce processus nommé dissémination tumorale précoce fera l'objet d'un développement détaillé à la fin de l'introduction.

Parmi les différentes conséquences d'une inflammation chronique qui contribue à l'apparition et/ou l'évolution d'un cancer, l'augmentation de rigidité du parenchyme a des effets non négligeables sur la MEC, dont la lame basale [311]–[316]. Cette inflammation participe à l'infiltration immunitaire et active les fibroblastes en myofibroblastes. Ces derniers vont ensuite initier un remodelage de la MEC et présenter une activité contractile plus importante. La MEC devient plus fibreuse notamment par une forte production de fibre de collagène et par conséquent devient alors plus dense. En plus du remodelage du tissu conjonctif, le stroma tumoral interstitiel se rigidifie à cause de l'infiltration immunitaire. Cette rigidité stimule à son tour la contractilité du cytosquelette des cellules cancéreuses, augmentant encore plus cette rigidité. La rigidité stimule également la formation sur les macrophages et les cellules cancéreuses de structures protrusives riches en actine filamenteuse : les invadosomes (les podosomes et dans le cas des cellules cancéreuses, les invadopodes) ainsi que la sécrétion de MMPs [317]–[321]. Parmi les trois types de structure d'actine filamenteuse (filopodes, lamellipodes et invadosomes), les invadosomes sont les seuls à pouvoir dégrader la MEC [322]. Cette rigidité du tissu conjonctif et du stroma tumoral interstitiel, combinée à la contractilité épithéliale, potentialise les voies de signalisation des cytokines impliquées dans la dégradation de la lame basale et dans la mobilité des cellules cancéreuses.

Des analyses biophysiques de tumeurs mammaires humaines à différents stades révèlent qu'il y a une augmentation du nombre totale de fibres de collagène. Petit à petit durant l'évolution de la tumeur, ces fibres deviennent plus denses et sont produites et organisées par les fibroblastes de manière linéaire. Ceci est particulièrement vrai au niveau du front d'invasion [323]. D'un point de vue clinique, dans le cas du cancer du pancréas à un stade encore non-invasif, la survie des patients ne s'avère pas corrélée à la quantité de fibres de collagène mais est significativement corrélée à une plus forte rigidité de ces fibres adjacentes à l'épithélium tumoral [324]. Outre ces observations et les données épidémiologiques corrélant la rigidité du tissu conjonctif (suite à des fibroses) avec le développement d'un cancer, des données expérimentales *in vitro* viennent confirmer, et partiellement décrypter, les mécanismes mis en œuvre. Des cellules épithéliales de glandes mammaires saines, cultivées dans du matrigel avec une rigidité similaire à celle du tissu mammaire sain, forment des acini mammaires, parfaitement polarisés et non prolifératifs. Elles présentent également une lumière centrale ainsi que des jonctions adhérentes entre les cellules.

Dès que la rigidité du matrigel atteint des niveaux comparables à ceux des tumeurs mammaires, les acini perdent leur conformation et leur polarisation cellulaire. Ceci s'accompagne de regroupements membranaires d'intégrines, une activation de FAK (focal adhesion kinase), une contractilité accrue du cytosquelette dépendante de la voie Rho et une plus forte activation de ERK dépendante de facteurs de croissance extracellulaires [325]. Dans le cas du cancer du sein, le triptyque FAK/ERK/Rho participent fortement à l'acquisition d'un phénotype motile afin de permettre à la cellule d'évoluer au travers de la lame basale en même temps qu'elle la dégrade. La mobilité des cellules et le rôle particulier de Rho fera l'objet de la prochaine section. En résumé, la formation des invadopodes et la sécrétion de MMPs sont tous les deux stimulés par la rigidité du stroma et les cellules en bordure du front d'invasion développent de nombreux invadopodes. La rigidité du stroma alimente donc les mécanismes qui favorisent la dégradation de la lame basale ainsi que la migration des cellules dans le même temps.

Il est important de noter que la mobilité des cellules cancéreuses ne dépend pas de deux mécanismes distincts. La production de protéases et la formation d'invadopodes sont en réalité intimement liées. Concentrées à l'intérieur des invadopodes, les protéases MT1-MMP (membrane type 1-MMP), ADAM (une désintégrine et MMP), MMP2 et MMP9 permettent la lyse de la MEC au niveau du front d'invasion [326]–[329]. Par conséquent, les invadopodes sont essentiels à la libération des MMPs afin de permettre ensuite, le franchissement de la lame basale et l'invasion du tissu conjonctif [330] (Figure 11). Dans le détail, MT1-MMP est le chef d'orchestre de la protéolyse de la lame basale car il rend biologiquement actives les MMP2 et MMP13 tout en dégradant lui-même les composants majeurs de la MEC comme le collagène de type I, II, III et IV, la laminine 1 et 5, la fibronectine et la fibrine [331]. Grâce aux techniques d'imagerie en temps réel *in vitro* il a été montré que la dégradation de la MEC débutait très rapidement après le recrutement de MT1-MPP au niveau des invadopodes [332]. Quant à MMP2 et MMP9, toutes deux collagénases de type IV, elles ont un rôle majeur pour la dégradation de la lame basale au niveau du front d'invasion [333].

En plus de permettre physiquement l'invasion du tissu conjonctif, cette dégradation de la lame basale conduit à une libération de diverses protéines séquestrées dans la lame basale et la MEC et qui, une fois libre, présentent une activité biologique pour l'ensemble des cellules qui compose le stroma mais également pour les cellules cancéreuses. Certaines d'entre elles peuvent en effet, impacter favorablement les capacités de migration, de prolifération et la survie des cellules cancéreuses tout comme stimuler la néo-angiogenèse. Elles peuvent également induire la formation d'invadopodes et permettre l'acheminement et la libération des MMPs dans les invadopodes. C'est notamment le cas de l'EGF, de l'HB-EGF, du PDGF et du TGF- $\beta$ . L'HGF quant à lui augmente le nombre d'invadopodes [334]–[342]. De plus, notons que les invadopodes sont un lieu de forte concentration de récepteurs tels que CD44 et de ses isoformes [343]. Cette



localisation facilite l'interaction de CD44 avec son ligand principal l'AH qui est un des composants de la MEC. Elle améliore également l'exposition de CD44 aux facteurs de croissance libérés (EGF, VEGF et HGF), et les présente à leurs récepteurs respectifs. Enfin en plus d'induire l'acquisition de capacité migratoire grâce à l'EMT, ces facteurs de croissance et en particulier le TGF- $\beta$ , renforcent la formation d'invadopodes des cellules cancéreuses de manière indirecte. Maturé par MMP-9 afin de le rendre biologiquement actif, le TGF- $\beta$  peut agir sur les cellules cancéreuses n'ayant pas encore de mutations inactivant la voie du TGF- $\beta$  mais celui-ci agit surtout sur les cellules du stroma. En effet, le TGF- $\beta$  est un puissant inducteur de l'activation des fibroblastes en FAC.

En résumé, une boucle de rétrocontrôle positif se met donc en place entre la formation d'invadopodes, le remodelage de la MEC, l'activation des fibroblastes en FAC et la libération de cytokines. Cependant l'invasion du tissu conjonctif repose sur deux processus interdépendants : le remodelage de la MEC et la mobilité des cellules. En effet, parmi les trois enzymes très reliées au contrôle des podosomes et invadopodes, on retrouve la phosphoinositide 3 kinase (PI3K), kinase Src et surtout la famille des GTPases Rho [344], [345]. La voie Rho/ROCK joue certes un rôle important dans la formation et le turnover des invadopodes [346], mais c'est avant tout une voie incontournable dans le choix du type de mobilité que les cellules cancéreuses vont choisir pour traverser les différents tissus d'un organe.

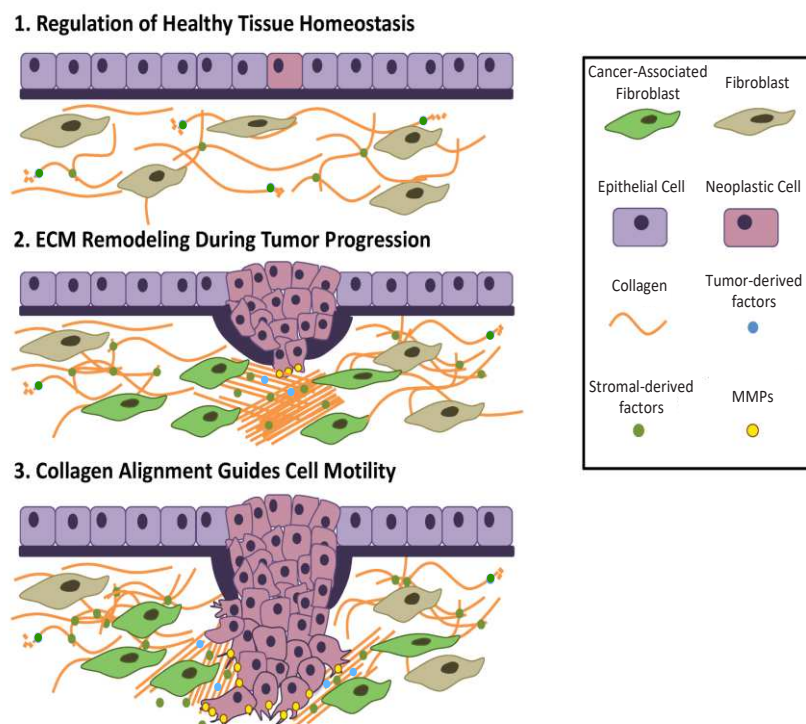


Figure 11: : Rupture de la lame basale et remodelage de la MEC durant l'initiation et progression tumorale.

La prolifération rapide des cellules néoplasiques génère une forte pression sur la lame basale et également un niveau des fibres de collagène environnante. En réponse, les fibroblastes du stroma s'activent en fibroblastes associés au cancer (FACs). Leur activation réarrange les fibres de collagène et stimule la sécrétion de certains facteurs dans la MEC. Cette pression combinée à des sécrétions de metalloprotéinases provoque des points de rupture de la lame basale. Les cellules cancéreuses peuvent évoluer dans la MEC en prenant appui sur les fibres réarrangées de collagène tout en tirant profit des sécrétions des FACs. Adaptée de Walter, C. *et al. Int. J. Mol.* 2018

## b) Invasion locale et migrations

Pour disséminer, rompre la lame basale et survivre aux attaques immunitaires ne suffisent pas pour qu'une tumeur ait accès aux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules, au sein de la tumeur, doivent donc trouver un moyen de rejoindre et/ou de stimuler la formation de néo-vaisseaux sanguin dans leur direction. La migration est une propriété fondamentale des cellules aussi bien en contexte physiologique par exemple, lors de la neurulation ou la formation des crêtes neurales, qu'en contexte pathologique avec par exemple l'endométriose ou le cancer. Celle-ci est en réalité possible grâce à deux modes de migrations dites soient collectives soient individuelles. Les cellules intègrent de nombreux paramètres physiques de la MEC ainsi que des cytokines (tels que le TGF- $\beta$  ou l'EGF) en les traduisant en un signal intrinsèque particulier. Selon les forces qu'elle peut exercer sur la MEC ou sur les cellules voisines et selon le type de signalisation activée, la réponse cellulaire déterminera l'aspect de la cellule, sa polarité et sa contractilité. De plus, deux types de migration individuelle existent, chacun impliquant des protéines et une organisation du cytosquelette très particulières [347]. Le choix entre ces deux types de migration individuelle est également une réponse mise en place par les cellules face à des stimuli externes afin d'avoir la migration la plus efficace pour l'environnement dans lequel elle évolue. Une grande plasticité est de nouveau observée dans les mécanismes de migration puisqu'ils sont inter-convertibles en fonction du microenvironnement [348].

La migration individuelle la plus décrite est la migration mésenchymateuse. Elle est permise suite à l'activation du programme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) [349]. L'activation de l'EMT est dépendante des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral comme le TGF- $\beta$ , l'EGF, l'interleukine 6 (IL6), le TNF- $\alpha$  ou encore de la production de ROS [350], [351]. Basée sur la traction, l'interaction des intégrines avec la MEC et la formation d'adhésion focale permettent de convertir des fibres d'actine réticulées en larges protrusions. Ainsi la cellule utilise ces protrusions pour « s'agripper » à la MEC et se tracter au travers de ce substrat [352]. La voie de signalisation spécifique de la migration mésenchymateuse est caractérisée essentiellement par la signalisation Cdc42 et Rac. Enfin, les cellules cancéreuses mésenchymateuses se distinguent des cellules cancéreuses épithéliales par leur très grand nombre d'invadopodes et la forte production de protéases (MMP, uPA, MT-MMP) au niveau des invadopodes afin de dégrader le stroma, libérer des cytokines et faciliter la progression de la cellule.

A l'inverse, dans un contexte où une cellule n'a que peu de force de traction, elle adopte un aspect arrondi et un mécanisme de migration similaire à la morphologie de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, d'où le terme de migration amiboïde. Initialement associée aux cancers hématologiques comme les lymphomes et les leucémies, cette migration ne repose pas sur une capacité de traction car elle est indépendante de la formation d'adhésions focales. Elle repose sur une locomotion propulsive permise par la contractilité de l'actine et la myosine à l'arrière de la



cellule [353], [354]. Ainsi, les cellules immunitaires saines, ou les cellules des cancers du sang, peuvent facilement et rapidement, traverser les capillaires sanguins ou lymphatiques et migrer au travers des tissus interstitiels et indépendamment de l'organisation linéaire des fibres de collagène. Cette propulsion ne requiert pas ou peu de dégradation/réorganisation de la MEC [355], [356] et la modification du cytosquelette ainsi que la contractilité est régulée essentiellement par la voie RhoA/ROCK. L'acquisition d'une capacité de migration amiboïde fait également appel à un programme spécifique appelé transition mésenchymato-amiboïde (AMT) qui est réversible et bien plus rapide à mettre en place que l'EMT. Comme l'indique son nom, elle n'est possible qu'à partir d'un phénotype mésenchymateux. Ainsi cette transition semble naturellement possible pour les cellules d'origine mésenchymateuses mais dans le cas des cellules épithéliales, cela impliquerait une EMT partielle préalable. En effet, une équipe a pu démontrer en 2013 que suite à l'induction d'une EMT par des FAC sur des cellules de cancer de la prostate, les FAC recrutaient des progéniteurs endothéliaux qui à leur tour allaient permettre l'induction d'une AMT sur les cellules cancéreuses [357]. Bien qu'il faille confirmer *in vivo* cette nécessité de passer par un phénotype mésenchymateux avant le phénotype amiboïde, cette étude démontre également l'importance de prendre en compte globalement les différents types cellulaires du microenvironnement tumoraux et non pas séparément.

Pour résumer les mécanismes mis en jeu selon le type de migration individuelle, la migration amiboïde tend à pousser la cellule et dépend essentiellement de la voie RhoA/ROCK alors que la migration mésenchymateuse tend à tirer la cellule sur son support et dépend plutôt de Rac et Cdc42.

Enfin, la migration peut être collective lorsque persistent les jonctions cellule-cellule (notamment par l'intermédiaire de l'E-Cadhérine). Ainsi, les cellules se déplacent de manière cohésive [358]–[360] mais de deux manières différentes. La première stratégie de migration collective, dite en groupe, est un envahissement du tissu entourant la tumeur tout en restant en contact avec la tumeur primaire. Cette migration collective groupée est assez commune dans les cancers épithéliaux comme le cancer du sein et le CRC. Au niveau du front de migration, les cellules en tête développent des protrusions proéminentes où l'action combinée de la polymérisation de l'actine et l'engagement des intégrines permet la formation d'adhésions focales et de lamellipodes. Utilisant la MEC comme une ancre, les cellules en tête tractent et entraînent les cellules à l'arrière, leur donnant une direction et générant une importante force de traction [361], [362]. Cette migration s'apparente donc plus à une migration de type mésenchymateux collectif avec des cellules au front d'invasion ayant subi une EMT partielle. La deuxième stratégie de migration collective, dite en cohorte, est un groupe de cellules devenues indépendantes de la tumeur primaire et plus spécifiques de certains cancers comme le mélanome mais également des cancers épithéliaux. Elle peut directement se mettre en place depuis la tumeur primaire ou faire suite à

une migration collective groupée [358] (Figure 12). L'acquisition d'une capacité à franchir la lame basale et l'adaptation des cellules cancéreuses à leur environnement pour pouvoir se déplacer, leur offrent la possibilité d'envahir les tissus sous-jacents, de s'exposer à de multiples cytokines et des types cellulaires et ainsi de démultiplier les phénotypes qui composent la tumeur primaire.

Pour résumer, au sein d'une tumeur on trouve des cellules épithéliales qui interagissent essentiellement avec les autres cellules cancéreuses, au niveau du front d'invasion, on trouve des cellules avec un phénotype épithélio-mésenchymateux intermédiaire et enfin, on trouve des cellules détachées de la tumeur primaire avec une morphologie mésenchymateuse ou amiboïde, interagissant uniquement avec les cellules du stroma. Comme développé dans la section suivante, cette forte diversité complique l'efficacité des différentes stratégies thérapeutiques. Cette diversité d'altérations génétiques ou épigénétiques, de morphologies et de capacité migratoire permet d'augmenter les possibilités d'adaptation des cellules tumorales aux futures conditions micro-environnementales auxquelles elles devront faire face durant le processus de dissémination.

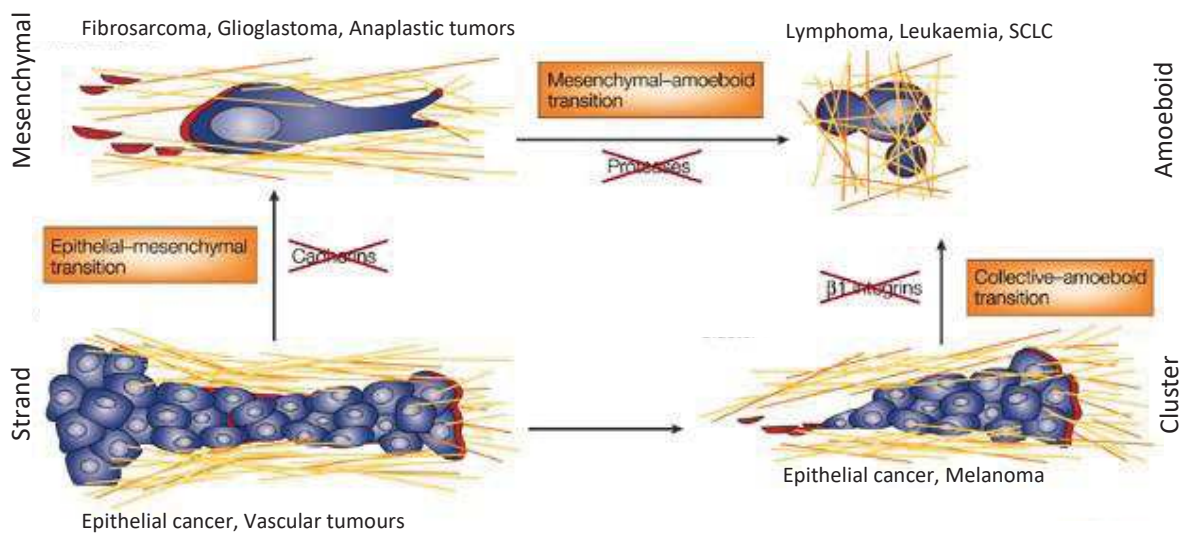


Figure 12 : Plasticité des différents types de migration tumorale.

Selon le microenvironnement dans lequel se trouve des cellules tumorales durant l'étape de dissémination, elles vont adapter leur stratégie de déplacement. La migration collective implique des jonctions cellules-cellules. La perte d'expression de l'E-cadhérine réduit fortement les interactions cellules-cellules et tend à individualiser les cellules et les faire entrer en transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ces dernières parviennent à évoluer sur les fibres qui composent la matrice extracellulaire (MEC) tout en la remodelant grâce à la sécrétion de protéases. Les cellules devenues indépendantes de la tumeur primaire soit sous forme individuelle soit sous forme de cluster peuvent également migrer de manière amiboïde. Cette migration ne nécessite pas la production de protéases et ne repose pas sur l'interaction des intégrines avec les fibres qui composent la MEC. Adaptée de Friedl, P. & Wolf, K. Nat, Rev, Can. 2003.

### c) Rôle du microenvironnement tumoral primaire dans la dissémination

La croissance tumorale, contrairement à ce qui est pensé par le grand public, n'est pas un processus continu. Elle ne résulte pas seulement d'une capacité de prolifération anarchique puisque la majorité des cancers mettent de très nombreuses années avant d'atteindre le stade métastatique. Nous avons vu, pour certains brièvement et pour d'autres dans le détail, les mécanismes intrinsèques comme extrinsèques qui pourraient partiellement expliquer la raison de cette latence temporaire. Dans la section précédente, nous avons également évoqué la frontière mécanique majeure que représentent la lame basale et dans une moindre mesure la matrice extracellulaire (MEC). Nous avons vu que la réorganisation de la MEC et que le réarrangement du cytosquelette de la cellule, en réponse à des stimuli extérieurs, lui permettait de passer outre ces obstacles puis d'évoluer dans ce nouveau tissu notamment grâce à l'activation du programme d'EMT. De manière individuelle ou collective, les cellules cancéreuses des différents clones qui composent la tumeur, choisissent d'activer un programme qui leur semble le plus correspondre à l'environnement auquel elles font face et toujours en accord avec ce que leur profil mutationnel leur permet de faire. Nous allons maintenant entrer un peu plus dans le détail du troisième facteur clé de l'hétérogénéité intra-tumorale : le microenvironnement tumoral et les cellules qui le composent.

Parmi tous les types cellulaires que pourront rencontrer les cellules d'un CCR, des interactions particulièrement importantes pour l'évolution de la maladie auront lieu avec les neurones, les cellules immunitaires, les fibroblastes et les cellules endothéliales.

#### i. Émergence d'un nouveau type cellulaire pro-tumoral : les neurones.

Les neurones sont de plus en plus décrits comme des acteurs majeurs dans l'évolution de nombreux cancers tels que le pancréas, la prostate, le sein, l'estomac ou encore la peau [363]–[367]. Récemment, il fut démontré à l'aide de modèles murins de cancer du pancréas, que la tumeur recrute des progéniteurs neuronaux depuis le cerveau afin de soutenir le développement tumoral du site primaire comme des métastases [368]. Très étudiés pour leur rôle dans ce qui est communément nommé « le second cerveau », l'implication des neurones du tractus digestif dans le CRC commence seulement à être décrypté. En contexte physiologique, les neurones participent au maintien de la voie Wnt au niveau de la niche des CSI. En contexte tumoral, les neurones contribuent à exacerber l'activité de la voie Wnt. En effet, les cellules Tuft (un des types de cellules différenciées des villosités) et les neurones innervant la lamina propria, sont une source importante d'acétylcholine (ACh). Les CSI sont capables de fixer ce ligand via le récepteur muscarinique de l'ACh de type 3 (M3R) et dont la conséquence concrète est une déphosphorylation de la protéine YAP (Yes-Associated Protein). YAP fait partie des multiples co-

activateurs transcriptionnels requis par le facteur de transcription TCF activé par la  $\beta$ -caténine. Ainsi les fibres nerveuses autour des CSI participent au maintien de l'activité de la voie Wnt et du phénotype souche. La déphosphorylation de la protéine YAP par l'acétylcholine permet également d'alimenter l'expansion clonale à la suite de la perte fonctionnelle d'*Apc*. Cette production d'Ach augmente avec le développement tumoral, tout d'abord grâce à l'expansion éphémère des cellules Tuft, puis par l'augmentation de l'innervation de la lamina propria. En effet, en plus de son effet sur la voie Wnt, l'acétylcholine induit également la production de NGF (nerve growth factor) par la tumeur. Le NGF étant un puissant facteur stimulant la croissance des neurones en direction de la tumeur, l'innervation augmente autour de la tumeur. Ce recrutement de neurone sécrétant de l'Ach, renforce ainsi l'activité de la voie Wnt sur les cellules tumorales à proximité des fibres nerveuses (Figure 13A). Les auteurs démontrent également qu'à des stades plus tardifs (c'est-à-dire suite à l'accumulation d'autres mutations clés), la production d'Ach par les neurones reste un facteur renforçant la croissance tumorale. Cependant, dans cette étude, le rôle des neurones est réduit seulement à un support de la voie Wnt des cellules cancéreuses [369]. Il est possible qu'à l'instar du cancer du pancréas, le remodelage des fibres nerveuses pourrait également servir de rail sur lesquelles, les cellules cancéreuses pourraient se déplacer pour une dissémination locorégionale ou à distance [370], [371]. Malheureusement, la littérature ne fait état que d'une seule étude portant sur des coupes de tumeurs humaines et des expériences in vitro où des cellules de CRC migrent le long de fibres nerveuses [372] (Figure 13B). De l'imagerie intravitale permettrait de démontrer que l'invasion périneurale est une des nombreuses possibilités utilisées par les cellules cancéreuses colorectales pour se déplacer dans un tissu.

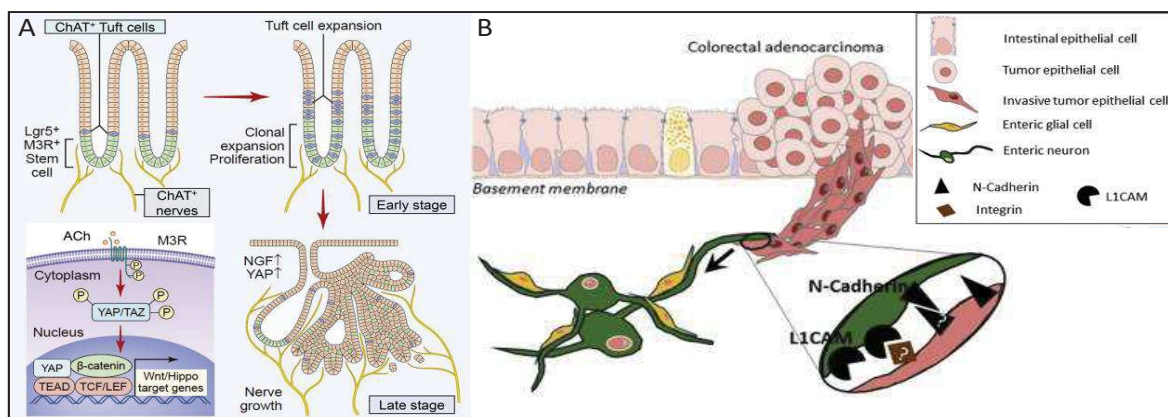


Figure 13: Implication du système nerveux dans l'initiation et progression du cancer colorectal (CCR).

(A) Rôle de l'acétyl choline (Ach) et du facteur de croissance nerveux (NGF) dans la tumorigenèse colorectale. La dérégulation de sécrétion d'acétyl choline par les neurones et les cellules tuft agit au niveau des cellules souches intestinales (CSI). La fixation de l'Ach par les CSI favorise l'activité transcriptionnelle du duo  $\beta$ -caténine/TCF. La stimulation plus importante de la voie Wnt, provoque une expansion clonale des cellules de la crypte. En cas de perte fonctionnelle d'APC, cette stimulation démultiplie l'activité de la voie Wnt et favorise le développement tumoral. Les cellules cancéreuses produisent alors du NGF afin de stimuler l'innervation du microenvironnement tumoral afin de continuer à profiter des sécrétions d'Ach par les neurones. Issu de Hayakawa, Y. *et al. Cancer Cell*. 2017. (B) Adhésion et migration des cellules cancéreuses colorectales sur les neurones du système entérique. Les cellules cancéreuses colorectales parvenues à envahir les différents tissus sous-jacent au tissu épithélial peuvent entrer en contact avec les neurones du système nerveux entérique. Grâce à l'interaction entre les protéines membranaires L1CAM des neurones et les intégrines de cellules cancéreuses, ces dernières parviennent à migrer le long des neurones pour faciliter leur invasion dans des couches plus profonde de l'organe. Issu de Duchalais, E. *et al. Cell, Moll, Gastroenterol, Hepatol*. 2017.

## ii. La réponse immunitaire : le Dr Jekyll et Mr Hyde du microenvironnement tumoral

Le système immunitaire repose sur divers mécanismes et implique différents acteurs très spécifiques et dont le rôle est finement régulé. Les situations pathologiques sont d'abord caractérisées par une réponse inflammatoire où la réponse immunitaire qui en découle, doit être finement contrôlée pour éviter un emballement du système. Dans le cas du cancer, qui est une maladie vouée à durer plusieurs années, il s'agit donc d'une inflammation chronique dans laquelle les mécanismes immuno-modulateurs jouent un rôle crucial. Ils comprennent des molécules co-inhibitrices (inhibiteurs de point de contrôle immunitaire), des altérations dans les processus participant à la présentation d'antigènes, l'activation des cellules immuno-régulatrices (les lymphocytes T régulateurs) et des libérations de cytokines immuno-régulatrices [373]. Bien qu'agissant sur les acteurs de la réponse immunitaire innée [374], ces mécanismes immuno-modulateurs affectent surtout l'action du type cellulaire le plus efficace dans la réponse anti-tumorale : les lymphocytes T cytotoxiques exprimant le marqueur CD8 (également nommé CTL) [375]. Les patients avec un CRC et présentant une forte infiltration tumorale de CTL ont une survie globale plus longue [376], [377]. Cette forte activité immuno-modulatrice est initiée par les cellules cancéreuses puis exacerbée et menée à terme (c'est-à-dire en agissant sur les CTL) par les différentes cellules immunitaires. La tumeur induit une situation d'inflammation chronique tout en générant un contexte immunosuppresseur. L'inactivation de la réponse cytotoxique des CTL peut se faire à différentes étapes, en lien avec un ou plusieurs autres types de cellules immunitaires. Tout d'abord, pour que le priming et l'activation des CTL aient lieu, les CTL localisés dans les organes lymphoïdes secondaires nécessitent que des cellules immunitaires leur présentent des antigènes tumoraux. Ensuite il faut qu'ils soient reconnus comme du « non-soi ». Cette première étape repose donc sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) que sont les macrophages et les cellules dendritiques (CD). Une fois les CTL activés, ils vont pouvoir infiltrer la tumeur. Enfin, l'étape ultime est la mise en place de l'activité cytotoxique à l'encontre des cellules tumorales. Nous allons maintenant voir de manière générale (et très simplifiée) comment la tumeur détourne les différents acteurs de la réponse immunitaire afin d'impacter les CTL durant les différentes étapes que nous venons d'évoquer.

Bien qu'étant les plus nombreux, les macrophages au sein de la tumeur (les MAC pour macrophages associés au cancer), sont des CPA peu efficaces comparés aux cellules dendritiques (CD) [378], [379]. Le recrutement des CD, et en particulier du sous-groupe spécialisé dans la réponse anti-tumorale (les CDc1) est une étape cruciale qui est cependant souvent perturbée. En effet, dans les tumeurs échappant aux attaques du système immunitaire, a été constaté un moindre recrutement systémique et intra-tumoral des CDc1 ou tout simplement un mauvais



fonctionnement de ces derniers pour présenter les antigène cancéreux et permettre le priming des CTL [380], [381] [382], [383], [384] (Figure 14 a).

Lorsque les CDc1 ont rejoint les organes lymphoïdes secondaires, ils présentent les antigènes de la tumeur aux Lymphocytes T CD4 (LT CD4) afin d'amorcer la première activation (le priming) des CTL [385]. Étant donné qu'une tumeur provient à l'origine du « soi », il peut arriver que l'antigène présenté par les CDc1 soit considéré comme du « soi » par les LT CD4 [386]. Dans ce cas, les LT CD4 vont provoquer l'expansion clonale des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui vont rejoindre la tumeur afin d'atténuer la réponse cytotoxique des CTL. Si par contre l'antigène est considéré comme du non soi, le trio LT CD4 - CDc1 - CTL peut se former. Outre le priming et la seconde activation des CTL permise cette fois par des interactions directes, la sécrétion d'IL12 sera également très importante dans le maintien de l'activité cytotoxique [387], [388] (Figure 14 a).

La dernière étape nécessaire pour que puissent agir les CTL est l'infiltration tumorale puis la mise en place de la réponse cytotoxique. De nouveau, cette étape peut être empêchée de différentes manière et ainsi réduire considérablement la survie des patients [376], [389]. Premier exemple ; il a été observé dans le CCR, que des dérivés réactifs du nitrogène étaient fortement produits par les macrophages et les neutrophiles intra-tumoraux et qu'ils conduisaient notamment à la nitration de la chemokine CCL2 produite par la tumeur [389]. Cette forme nitrée de CCL2 réduit l'infiltration dans la tumeur des CTL qui demeurent ainsi dans le stroma (Figure 14 c). La mise en place de la réponse cytotoxique peut rencontrer de nouveaux obstacles. Tout d'abord, les cellules cancéreuses tentent de passer inaperçues en réduisant l'expression de leur CMH-1 afin que les CTL ne puissent pas retrouver l'antigène qui leur a été présenté lors du priming [375], [390]. Les cellules tumorales peuvent également sur-exprimer des inhibiteurs du point de contrôle immunitaire (CTLA4 et PDL1) afin d'inactiver les CTL [391]. Enfin les cellules immunitaires myéloïdes dans la tumeur participent également directement et indirectement à l'inactivation des CTL par de très nombreux processus décrit dans la Figure 14 (c, d et f) [392]–[394], [395] [396], [397],[398] [399]–[401].

Les exemples donnés dans la Figure 14 montre que la tumeur et son microenvironnement sécrètent de nombreuses cytokines afin d'activer la prolifération et la différenciation des précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse et le recrutement des monocytes et des neutrophiles. C'est par exemple le cas de l'IL17, l'IL1 $\beta$  et CCL2 et le G-CSF qui participent au recrutement des neutrophiles dans la tumeur [402]. Facteurs de mauvais pronostic [403], les neutrophiles sont une source majeure de dérivés réactifs de l'oxygène et du nitrogène [404] (Figure 14 f) et ils sont également capables de protéger les cellules tumorales des CTL en se « suicidant ». Propre aux

neutrophiles, la NETose (NET pour neutrophil extracellular traps qui signifie filet en anglais) est une mort cellulaire conduisant à la libération d'ADN et de certaines protéines dans l'environnement proche. Les cellules cancéreuses induisent la NETose, mécanisme initialement décrit comme anti bactérien et anti fongique, grâce à une production d'IL8. Cette NET agit comme une couche protectrice, empêchant physiquement la proximité nécessaire des NK et CTL pour que leur activité cytotoxique ne puisse avoir lieu contre les cellules cancéreuses [405].

Les cellules malignes parviennent ainsi, dans certains contextes bien particuliers, à initier une réaction en cascade, rendant inopérante la réponse anti-tumorale. Cependant, l'interaction avec le système immunitaire ne s'arrête pas là. La littérature décrit les macrophages associés au cancer (MAC) et depuis peu, les neutrophiles associés au cancer (NAC) comme les types cellulaires les plus aptes à passer d'un rôle anti-tumoral à un rôle immuno-modulateur et pro-tumoral [406]. De nombreuses expériences visant à bloquer le recrutement des MAC et des NAC démontrent une forte réduction de l'évolution de la maladie et en particulier de la formation de métastases [407], [408]. Selon le contexte tumoral, les MAC et les NAC se polarisent pour acquérir un phénotype antitumoral (M1 et N1) ou protumoral (M2 et N2).

Comme nous l'avons évoqué, des cytokines produites par le microenvironnement tumoral jouent un rôle essentiel dans le recrutement de ces cellules mais elles interviennent également au niveau des communications entre les cellules tumorales et le reste des cellules du microenvironnement [409]. Par exemple, la perte fonctionnelle de *SMAD4*, fréquemment détectée dans les cellules malignes du CRC, permet d'insensibiliser les cellules à l'effet cytostatique du TGF- $\beta$ 1 tout en stimulant la sécrétion accrue des chemokines CCL15 et CCL2 recrutant les cellules myéloïdes [410], [411]. Parmi elles, les neutrophiles adopteront un phénotype N2 suite à la production de TGF- $\beta$ 1 par les CSC colorectales et les cellules stromales (MAC et FAC) [412], [413]. Le phénotype N2 se caractérise par exemple par la dégradation de la MEC en particulier par la sécrétion de la MMP9. Tout en stimulant l'angiogenèse, cette MMP dégrade la lame basale entre le tissu conjonctif et les vaisseaux sanguins, ce qui facilite la dissémination des cellules cancéreuses [414]–[416]. Quant à l'action pro-tumorale directe des neutrophiles sur les cellules cancéreuses, elle repose sur deux points. Premièrement, l'instabilité génétique et donc l'acquisition de mutations ponctuelles due à une libération faible (propre au phénotype N2) de dérivés réactifs de l'oxygène et nitrogène à leur rencontre [417]. Et deuxièmement, la levée d'inhibition de la voie de signalisation du PDGFR et de la PI3K ainsi que l'activation du programme d'EMT par l'élastase produite par les neutrophiles (NE pour Neutrophil Elastase) [418], [419]. Observées dans le cas de cancer du poumon, ces actions directes des neutrophiles sur les cellules cancéreuses du CRC restent cependant à démontrer.

Le rôle des MAC M2 est quant à lui, bien plus décrypté puisque les évidences expérimentales et cliniques d'un rôle pro tumoral des macrophages s'accumulent depuis près de vingt ans [420]–



[423]. Les macrophages résidents du tissu ou dérivés de monocytes, sont attirés par la tumeur et se retrouvent souvent dans des zones hypoxiques et exposées à des cytokines promouvant un phénotype M2 [424]. La majorité des acteurs moléculaires et les mécanismes pro-tumoraux qui découlent du phénotype N2 s'avèrent être les mêmes que l'on retrouve avec les macrophages : la stimulation de l'instabilité génétiques des cellules tumorales, le remodelage de la MEC et surtout, une puissante capacité à promouvoir l'angiogenèse [308], [425]. C'est cependant sur la participation à l'intravasation tumorale que les macrophages se différencient des neutrophiles. Tout d'abord, une étude clinique a démontré une corrélation significative entre la densité de macrophages dans la tumeur et l'angiogenèse [426]. De plus, grâce à de l'imagerie intravitale sur un modèle murin transgénique, il fût possible de suivre des cellules tumorales se diriger en direction de vaisseaux sanguins pour potentiellement intravaser. Ce phénomène était dépendant de la proximité immédiate des macrophages et des vaisseaux sanguins [427]. Une autre équipe a démontré qu'il s'agissait de sécrétions paracrines de CSF-1 et EGF entre les cellules tumorales et les macrophages, conduisant à une migration commune des macrophages et des cellules tumorales en direction des vaisseaux [428],[429]. Ce duo conduit *in fine*, à la migration des cellules cancéreuses en direction des vaisseaux sanguins. Puis l'intravasation des cellules cancéreuses est permise grâce à la production de VEGF par les macrophages afin d'augmenter la perméabilité endothéliale et par la formation d'invadosomes (podosomes et invadopodes), dégradant la lame basale [430][431](Figure 15).

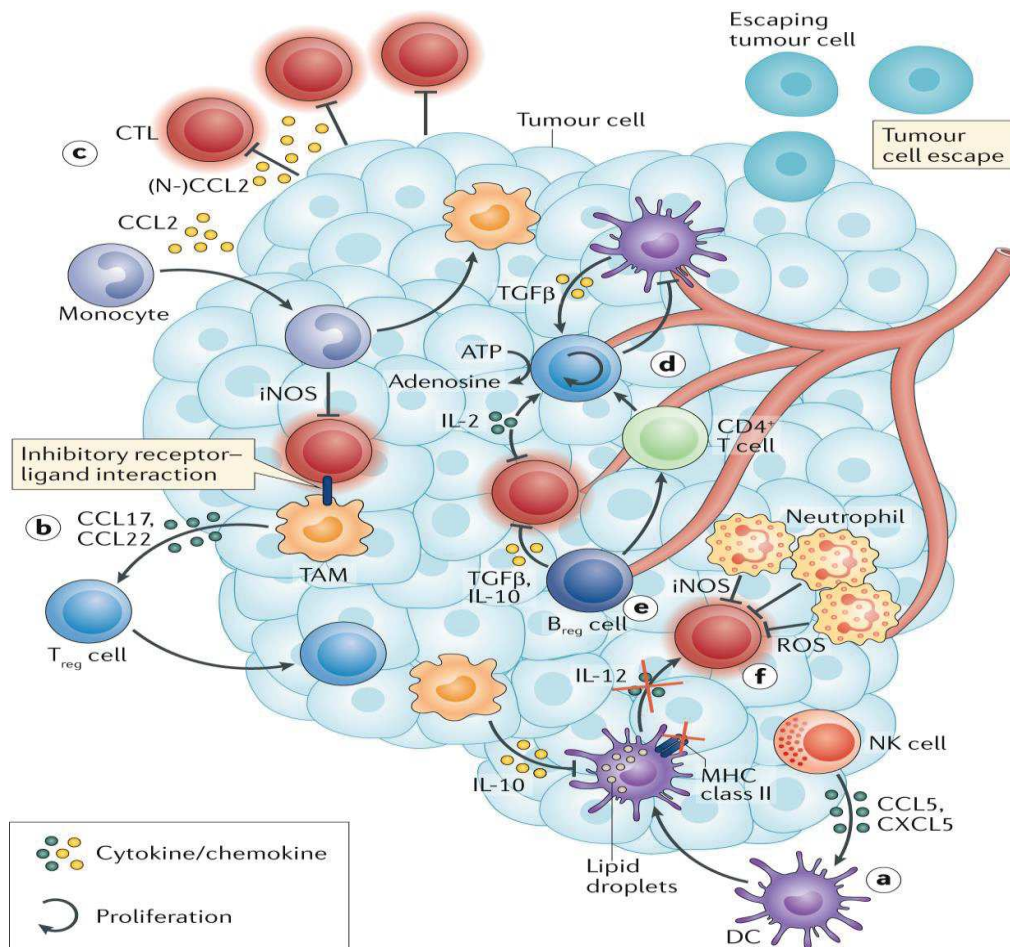


Figure 14: Microenvironnement tumoral immuno-régulateur.

La mise en place d'une réponse immunitaire efficace repose essentiellement sur la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Cette dernière requière cependant qu'un type de cellules de la réponse immunitaire innée, les cellules dendritiques (CDs), parviennent à obtenir des antigènes cancéreux pour les présenter au niveau des ganglions lymphatiques. L'ensemble de ces étapes peuvent être perturbé par les cellules cancéreuses et le passage d'un rôle anti-tumorale à pro-tumorale par les macrophages et neutrophiles. (a) Pour que les cellules dendritiques (CDs) pénètrent la tumeur, elles doivent être recrutées par la sécrétion des chémokines CCL5 et CSCL5 des Natural Killer (NK). Les CDs peuvent cependant devenir non fonctionnelles si des conditions de stress conduisent à l'accumulation de lipide au niveau de leur cytoplasme. Cette accumulation empêche la présentation des antigènes cancéreux et ne permettra donc pas l'étape de priming des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les macrophages ayant un rôle pro-tumorale et également nommé Tumor-associated Macrophage (TAM), peuvent perturber la présentation d'antigène par les CDs en sécrétant l'interleukine-10 (IL-10). (b) La production des chémokines CCL17 et CCL22 par les TAM permet le recrutement des lymphocytes T régulateur (Treg) dans le microenvironnement tumoral. De plus, les TAM sur-expriment les molécules inhibitrices des points de contrôle immunitaire (PD-L1 et CTLA5) afin de réduire l'activité cytotoxiques des CTL. (c) Les cellules cancéreuses sécrètent la chémokine CCL2 permettant à la fois de réduire l'infiltration des CTL dans la tumeur tout en stimulant le recrutement des monocytes. Cette chémokine peut être nitrifié (N-CCL2) et prévient ainsi l'infiltration des CTL dans la tumeur. En sécrétant des dérivés réactifs du nitrogène ou en se différenciant en TAM, les monocytes permettent directement ou indirectement l'inactivation de la réponse cytotoxique des CTL. (d) La production de TGF-β par les CDs stimule la prolifération des Treg dont le rôle immuno-modulateur repose sur la déplétion du microenvironnement tumorale de l'IL-2 et de l'ATP. Privé de ces deux éléments, les CTL ne parviennent à maintenir une réponse cytotoxique efficace. (e) Les lymphocytes B régulateur (Breg) inhibent directement l'activité cytotoxique des CTL par leur sécrétion l'IL-10 et TGF-β et indirectement en favorisant la conversion des lymphocytes T exprimant CD4 en Treg. (f) L'accumulation de neutrophile participe à augmenter la concentration de dérivés réactifs du nitrogène dans la tumeur et renforce l'ensemble des mécanismes où ces espèces réactives jouent un rôle immuno-modulateur. Issue de Garner, H. & Visser, K.E. *Nat, Rev, Immu*, 2020.

Il faut souligner que le phénotype anti ou pro tumoral est dépendant de facteurs qui peuvent être très localisés au sein de la tumeur (telle qu'une zone hypoxique) et que le stade de la tumeur impacte la capacité à corrompre la réponse immunitaire [432]. De plus, certaines observations contradictoires d'une étude à l'autre peuvent notamment s'expliquer par l'incroyable diversité de la population au sein même d'un type cellulaire. Les macrophages étant un parfait exemple de cette diversité puisque qu'il existe par exemple des macrophages résidents provenant du sac vitellin ou du foie à des stades embryonnaires et ce stock de macrophages résidents est maintenu par des monocytes issus de la moelle osseuse. Ces macrophages résidents ne sont pas identiques aux macrophages nouvellement générés suite à la formation d'une tumeur ou d'une infection. Bien que n'évoquant pas le cas du cancer, cette revue de Viola, M. & Boeckxstaens, G. [433] détaille l'incroyable diversité des types de macrophages présent dans l'intestin. Leurs origines diverses, leur localisation dans l'intestin ainsi que leurs marqueurs membranaires illustrent l'importance de savoir sur quelle population de macrophage on travaille et de ne pas tirer de conclusions hâtives sur l'ensemble des macrophages.

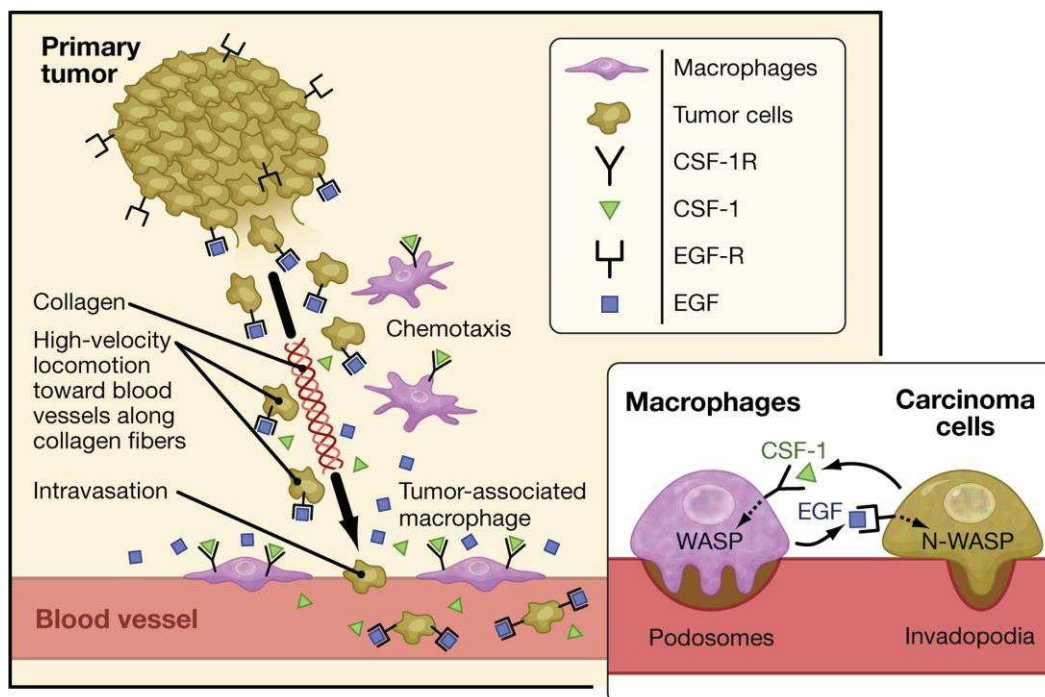


Figure 15: Partenariat des cellules cancéreuses et des macrophages dans le processus d'intravasation.

Les cellules cancéreuses utilisent les fibres de collagène afin de rejoindre la source de production de l'EGF : les macrophages recouvrant les vaisseaux sanguins. En réponse à l'EGF fixé par le récepteur EGF-R, les cellules cancéreuses sécrètent la chemokine CSF-1 attirant d'autres macrophages vers la source de CSF-1. En fixant le CSF-1 par leur récepteur CFS-1R, les macrophages augmentent la concentration d'EGF libéré à proximité des vaisseaux sanguins. Cette boucle de rétrocontrôle positif entre les deux types cellulaires conduit donc à attirer des cellules cancéreuses vers les macrophages recouvrant les vaisseaux sanguins et à attirer dans leur sillon, d'autres macrophages localisés dans le stroma. Co-localisé sur les vaisseaux sanguins, le dialogue entre les deux types cellulaires induit également la formation de podosomes par les macrophages et d'invadopodes par les cellules cancéreuses. Les podosomes permettent ainsi de dégrader la lame basale et d'augmenter de manière très localisée la perméabilité des vaisseaux sanguins, tandis que les invadopodes permettent essentiellement l'intravasation des cellules cancéreuses. Issue de Condeelis, J. & Pollard, J.W. *Cell*. 2017

### iii. Les fibroblastes, des adjudants de l'invasion tumorale

Aux vues des innombrables publications à leur sujet, les fibroblastes sont certainement le type cellulaire du microenvironnement tumoral le plus étudié. Partageant la même origine embryonnaire que les adipocytes, les chondroblastes et les ostéoblastes, les fibroblastes sont les cellules spécifiques du tissu conjonctif et chacun de ces types cellulaires dérive d'une cellule souche mésenchymateuse. Durant le développement et dans un contexte physiologique, les fibroblastes sont les producteurs principaux de la MEC des tissus conjonctifs et de plus en plus de données démontrent une adaptation de leurs propriétés au cours de la vie d'un individu [434], [435]. Les fibroblastes peuvent également promouvoir l'angiogenèse en sécrétant des cytokines tel que le VEGFA [436] et moduler la réponse immunitaire [437]. Ainsi, les fibroblastes ne sont pas seulement des producteurs de la MEC mais jouent aussi un rôle de communication avec de nombreux autres types cellulaires pour maintenir l'homéostasie d'un tissu mais aussi sa réparation [438], [439]. Des contacts physiques directs entre les cellules tumorales et les fibroblastes mais également l'augmentation de la rigidité tissulaire, certaines cytokines et signaux inflammatoires conduisent les fibroblastes à s'activer et devenir des fibroblastes associés au cancer (FAC) (Figure 16) [440]–[444].

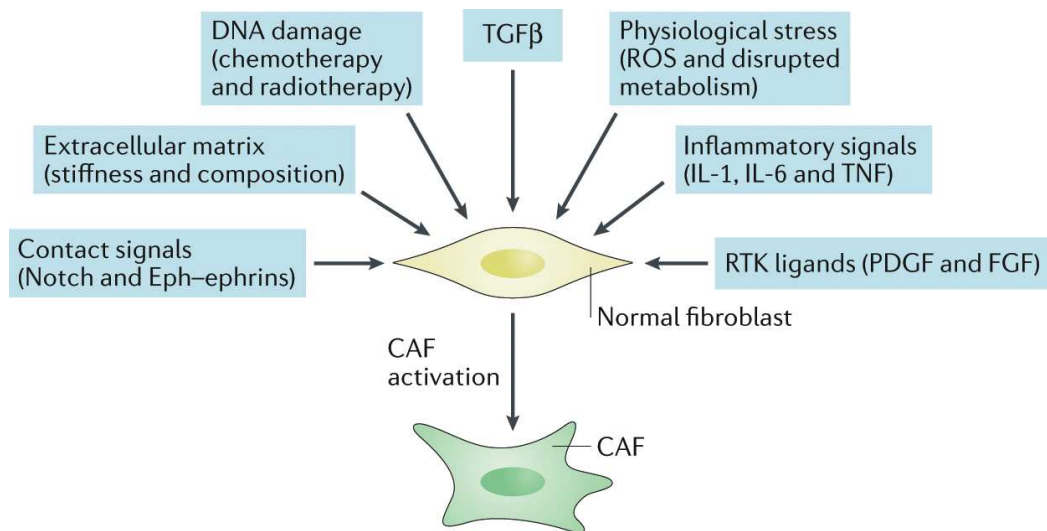


Figure 16: Schéma représentant les mécanismes impliqués dans l'activation des fibroblastes en fibroblastes associés au cancer (FACs).

Issue de Sahai, E. et al. *Nat, Rev, Can.* 2020.

Ces FAC sont une source importante de facteurs de croissance, de cytokines et d'exosomes qui stimulent la croissance tumorale et le rôle pro-tumoral du stroma (Figure 17). Les FAC modulent également la réponse aux traitements anti-cancéreux. Ces traitements peuvent contribuer à l'activation des fibroblastes, nourrissant ainsi un cercle vicieux [445]–[447].

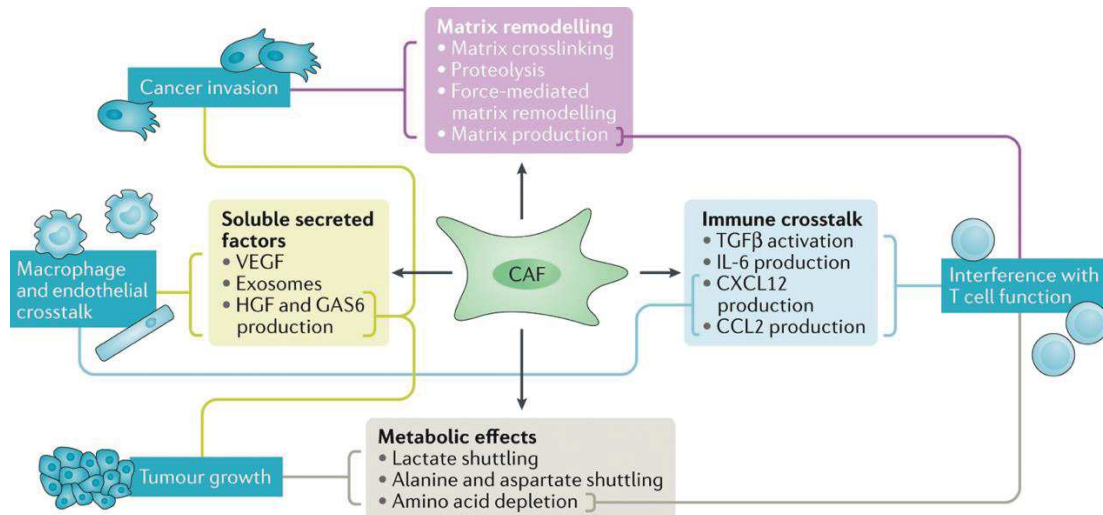


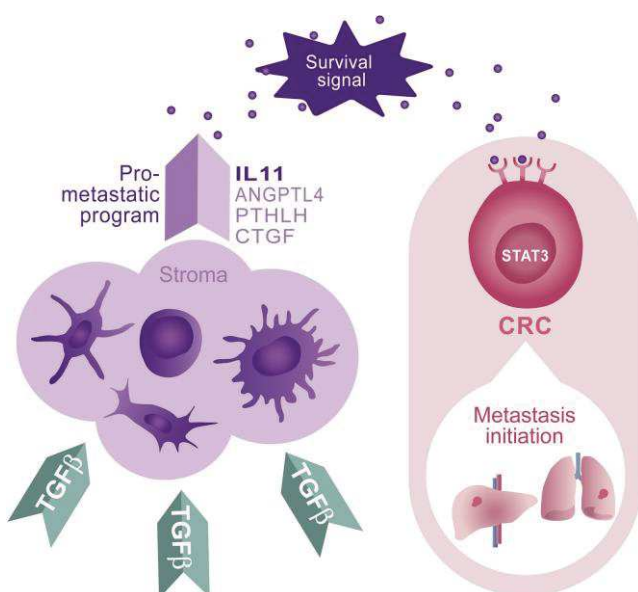
Figure 17: Schéma récapitulatif des fonctions pro-cancéreuses associées aux fibroblastes associés au cancer (FACs).

Les rectangles bleu foncé illustrent les processus biologiques régulés par les lignes de différentes couleurs. Ces lignes relient un mécanisme cellulaire ou un facteur à un processus biologique. Par exemple la production d'HGF et de GAS6 par les FACs stimulent la croissance tumorale ou la migration des cellules cancéreuses. Issue de Sahai, E. *et al. Nat, Rev, Can.* 2020.

Parmi les nombreux facteurs sécrétés, l'HGF, l'ostéopontine et le SDF-1 ont clairement été identifiés comme favorisant la dissémination des CSCs dans le CCR [159]. Cependant, parmi les cytokines les plus connues que sécrètent les fibroblastes, le TGF-β en général, n'induit ni la croissance tumorale ni l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux dans le CCR. Il conserve un rôle cytostatique sur les cellules tumorales colorectales qui est maintenu jusqu'à ce qu'une mutation sur la voie du TGF-β rende les cellules malignes insensibles. Mais c'est bien par le biais d'autres types cellulaires que le TGF-β1 peut avoir un rôle pro-tumoral. Outre son effet immunosuppresseur sur les CTL [448] largement développé dans la section précédente, l'une des sources majeures du TGF-β1 s'avère être la tumeur elle-même et cet effet pro-tumoral ne repose pas uniquement sur son effet immuno-modulateur [449]. L'équipe d'E. BATTLE a premièrement corrélé le risque de rechute des patients CCR à un stade avancé avec une signature transcriptionnelle de réponse du stroma au TGF-β, notamment les fibroblastes [413]. Afin de faciliter la suite de l'étude, ils ont manipulé des lignées de CCR humaine mutées sur le gène de *SMAD4* ou du *TGFBR1*, afin qu'elles surexpriment le TGF-β1. Lorsque ces cellules ont été injectées en sous-cutanée dans des souris immunocompétentes, l'initiation tumorale était bien plus efficace dans les lignées produisant à outrance le TGF-β1 que dans les



lignées d'origine. Puisque la croissance tumorale dans les deux conditions était comparable une fois la tumeur formée, les auteurs ont conclu que l'action indirecte du TGF- $\beta$ 1 intervenait au moment de l'établissement de la tumeur. La même observation ayant été faite suite à des injections dans des souris immuno-déficientes NOD/SCID, les auteurs exclurent l'idée que la prise tumorale n'était que le fait du rôle immunosuppresseur du TGF- $\beta$ 1. En répétant la même expérience mais par une injection intra-caecale, les auteurs constatent que la lignée surexprimant TGF- $\beta$ 1 est bien plus capable d'initier des métastases que la lignée d'origine. Cependant, une fois formées, les métastases ont une croissance similaire dans les deux conditions. Les auteurs se sont donc focalisés sur les gènes cibles surexprimés en réponse au TGF- $\beta$  dans les FAC. Des facteurs attendus et connus comme pro-métastatiques tels que l'ANGPTL-4 (angiopoietine-like 4) [450], JAG1 (jagged-1) [451], le CTGF (connective tissue growth factor) [452], la TNC (tenascin C) [453] et la POSTN (périostine) [178] ont été retrouvés mais ils identifièrent en particulier l'IL11. Cette dernière agit directement sur les cellules cancéreuses et leur confère une capacité de résistance face à des stimuli pro-apoptotiques (Figure 18). Les auteurs remarquèrent également que les CSCs isolées depuis des biopsies de patients atteints d'un CCR de stade 4 et insensibles au TGF- $\beta$ 1, étaient la source majeure de TGF- $\beta$ 1 parmi les cellules cancéreuses de la tumeur. L'ensemble de ces observations renforcent d'une nouvelle manière le rôle clé des CSCs dans l'agressivité d'un CCR et l'importance des FAC dans la progression et la dissémination tumorales. Les tumeurs primaires avec une plus forte proportion de CSCs seraient plus capables d'éduquer les cellules stromales afin de renforcer les capacités de dissémination des cellules cancéreuses tout en leur conférant une meilleure survie durant le processus de dissémination et d'initiation métastatique.



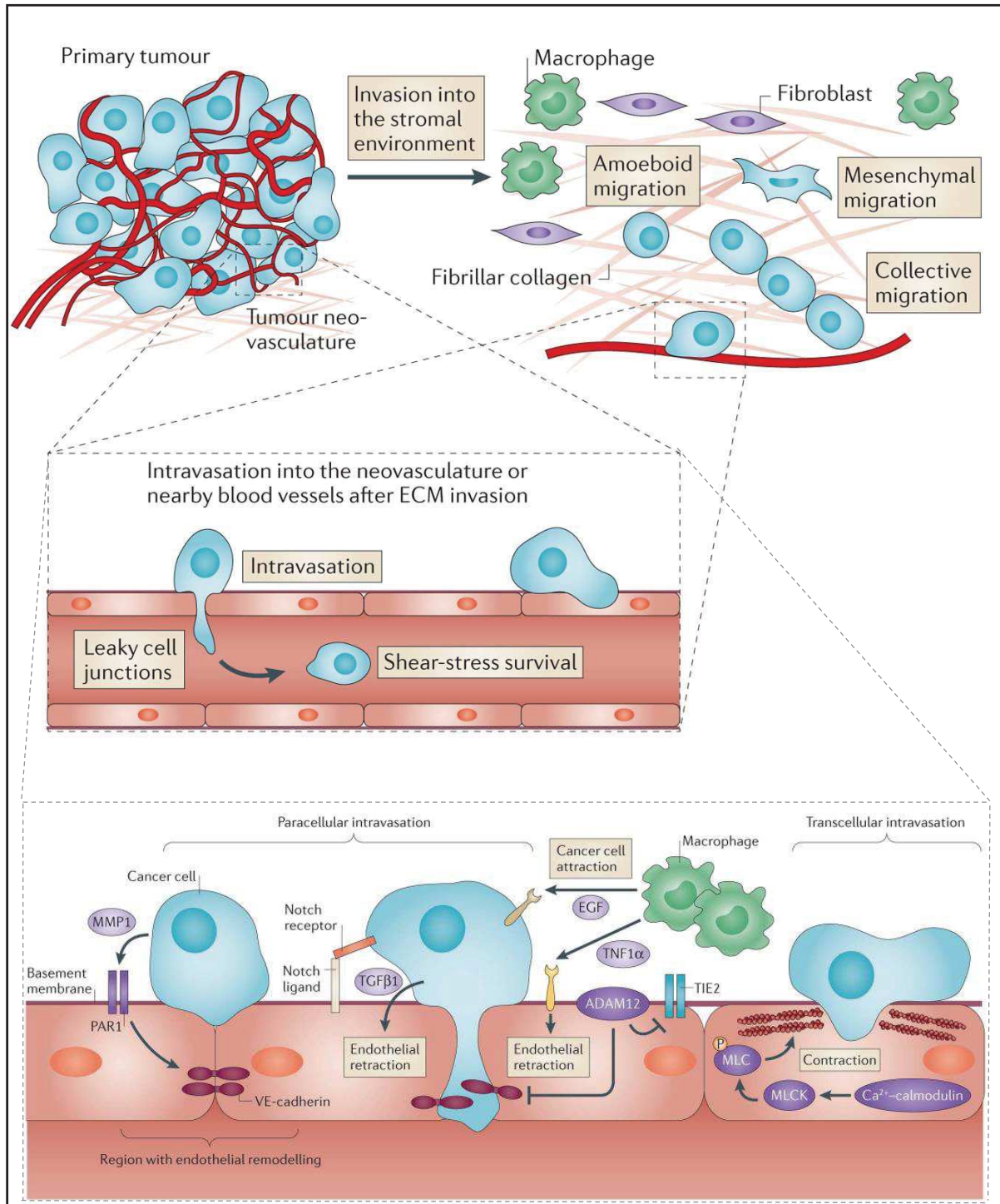
*Figure 18: : Rôle pro-tumorale indirecte du TGF- $\beta$  dans la dissémination du CCR*

*La sécrétion de TGF- $\beta$  par les cellules cancéreuses agit sur les cellules stromales et en particulier les fibroblastes. Ces derniers devenus des fibroblastes associés au cancer grâce au TGF- $\beta$ , produisent alors de nombreuses cytokines. Parmi elles, l'IL-11 stimule fortement la survie des cellules cancéreuses dont celles à distance, leur permettant de survivre dans les organes distants et d'initier des métastases. Issue de Calon, A. et al. Cancer Cell. 2012.*

#### iv. Les cellules endothéliales

Afin de soutenir la croissance tumorale, le réseau vasculaire du stroma tumoral se développe constamment pour apporter de l'oxygène et des nutriments. En réponse à un stress hypoxique, la tumeur sécrète des facteurs comme le VEGFA ou l'IL33 afin de stimuler la néo-angiogenèse tumorale. Les MAC sécrètent également des facteurs pro-angiogéniques et des protéases (uPA et la MMP9) augmentant leur bio-activité [308]. Cette angiogenèse tumorale se caractérise par une forte prolifération des cellules endothéliales, une organisation chaotique des vaisseaux car très ramifiés et une migration des vaisseaux en direction de la tumeur. Enfin, les vaisseaux deviennent plus fragiles par une moins bonne étanchéité et un plus petit nombre de péricytes [454]. Cette néoangiogenèse mais également les cytokines qui l'induisent sont de mauvais pronostic pour la survie des patients atteints d'un CCR et ils sont corrélés à une augmentation de la dissémination tumorale du CCR [455], [456]. Les cellules endothéliales peuvent également promouvoir directement le phénotype CSC dans le CCR grâce à la sécrétion du facteur soluble JAG-1 qui active la voie NOTCH [457], [458]. Enfin, après la migration du duo MAC-cellules malignes en direction des vaisseaux sanguins et la dégradation de la lame basale autour des vaisseaux, les cellules cancéreuses peuvent enfin entrer en contact direct avec les cellules endothéliales. Elles mettront en œuvre soit une stratégie visant à perméabiliser les vaisseaux sanguins (on parle d'intravasation para-cellulaire), soit une stratégie visant à induire la formation d'un tunnel à l'intérieur même de la cellule endothéliale (on parle d'intravasation trans-cellulaire) (Figure 19). Dans le premier cas, l'intravasation est permise par i) l'activation de la voie NOTCH et la sécrétion d'EGF par les MAC et ii) la désorganisation des jonctions endothéliales suite à divers stimuli [451], [459], [460]. Dans le deuxième cas, la cellule cancéreuse génère un tunnel au sein de la cellule endothéliale par une réorganisation de son cytosquelette et de sa contractilité. Cependant dans le cas du CCR, cette migration trans-cellulaire ne fût observée qu'*in vitro* et requiert donc d'être validée dans des modèles murins plus intégrés [460], [461].





**Figure 19: Intravasation paracellulaire et transcellulaire des cellules tumorales**

Suite à l'acquisition de capacité migratoire par une partie des cellules de la tumeur primaire, certaines cellules cancéreuses envahissent le stroma environnant et interagissent avec les différents types cellulaires qui le compose dont les cellules endothéliales. Les cellules cancéreuses peuvent alors opter pour deux stratégies afin de rejoindre la circulation sanguine et disséminer. Si elles réalisent une intravasation paracellulaire, les cellules vont réarranger leur cytosquelette pour générer des invadopodes et parvenir à passer entre deux cellules endothéliales. Ces dernières sont rendues plus perméables par l'action conjointe des macrophages et cellules cancéreuses afin de notamment cibler les cadhérines des cellules endothéliales. L'intravasation transcellulaire consiste pour une cellule cancéreuse à induire un très fort remodelage du cytosquelette d'une cellule endothéliale. Celle-ci génère alors un tunnel membranaire en elle, permettant à la cellule cancéreuse de passer au travers de la cellule endothéliale. Ce remodelage du cytosquelette de la cellule endothéliale dépend du complexe Calcium-calmoduline. Adaptée de Reymond, N. et al. Nat, Rev, Can. 2013.

## 2. Les cellules tumorales circulantes (CTCs)

### a) Intérêt clinique des CTCs

Que les cellules cancéreuses aient rejoint la circulation sanguine soit directement depuis la tumeur primaire, soit en passant d'abord par la circulation lymphatique, leur présence dans le sang est révélatrice de l'évolution de la maladie. La présence de cellules tumorales circulantes à des stades précoces (avant que des métastases ne soient avérées) indique clairement que l'initiation de métastase est en cours et potentiellement possible. Les CTCs sont des cellules rares, entre quelques dizaines à quelques centaines dans un tube de sang selon le type de cancer, parmi les milliards de cellules hématopoïétiques. Sur le plan clinique, une simple prise de sang permet de détecter ces cellules. C'est un geste rapide, non invasif qui peut être répété au cours du temps sans contrainte majeure pour le patient, au contraire des biopsies de la tumeur primaire et surtout des métastases le cas échéant. Les CTCs peuvent donc avoir à minima un intérêt pronostique puisque l'on peut les dénombrer mais également depuis peu avoir une idée sur leur phénotype et leur agressivité. Il est également possible de pronostiquer une récurrence si leur présence est à nouveau détectable. Elles peuvent enfin avoir un intérêt prédictif sur l'efficacité d'un traitement par exemple en comparant leur nombre avant et après une chimiothérapie [462].

Les CTCs sont détectées dans la plupart des cancers solides tels que le cancer du sein, le cancer du côlon (CCR), le cancer du poumon, de la prostate, du rein, du pancréas, du foie, le cancer de l'endomètre ainsi que le glioblastome et le mélanome. Leur nombre a pu généralement être corrélé à un pronostic de survie [463]–[470]. En 2012, les équipes de K.Pantel, J.Y.Pierga et S.Michel ont mené une vaste étude sur plusieurs années et multicentrique [471]. Elle a permis de corréler le nombre de CTCs détectées dans le sang avec la survie sans progression et la survie globale. Cette étude portait sur près de 2000 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique et a montré que le nombre de CTCs était corrélé au pronostic de survie selon un seuil de 5 CTCs détectées dans un tube contenant 7,5 ml de sang. En effet, les patientes avec plus de 5 CTCs dans un tube de sang au moment du diagnostic avaient une survie sans progression plus faible que celles qui en avaient moins de 5. Cette étude met également en évidence que le comptage des CTCs, après deux cycles de traitement, permet d'identifier les patientes avec un cancer résistant ou sensible à un traitement donné. Les auteurs indiquent que le nombre de CTCs serait un indice prédictif meilleur que les marqueurs sériques classiquement utilisés (tels que le CEA pour carcinoembryonique antigène et l'antigène cancer 15-3 pour CA 15-3 qui est un produit du clivage de la Mucine-1) [471]. De plus, dénombrer les CTCs peut également donner une indication sur le site préférentiel de métastase selon les cancers [464]. Par exemple, dans le cancer de la prostate métastatique, le nombre de CTCs s'avère être plus faible chez les patients présentant des métastases des tissus mous que chez les patients présentant des métastases osseuses. La détection

des CTCs chez ces patients pourrait donc indiquer aux oncologues de porter une attention plus importante aux compartiments osseux et traiter le plus tôt possible les métastases osseuses.

Dans le cas du cancer colorectal, le nombre de CTCs semble bien plus faible que pour des cancers comme le sein ou la prostate [472]. Bien que le nombre puisse varier selon les méthodes de comptage, il s'ajoute la problématique de la localisation du prélèvement sanguin. En effet, le nombre de CTC colorectales est supérieur dans la circulation mésentérique comparé à la circulation périphérique [473]. Le système sanguin mésentérique draine le sang en provenance du côlon et du haut rectum en direction du foie qui représente un filtre majeur. Ainsi, le décompte des CTCs lors d'une prise de sang au niveau du bras, ne reflète qu'une partie du contingent de CTCs initialement présentes dans la circulation mésentérique. Malgré le biais dû à la localisation du prélèvement, des CTCs sont détectées dans 30 à 80% des CCR métastatiques et dans environ 18 à 57% des CCR non métastatiques, selon la méthode de détection utilisée [465], [474]. L'impact pronostique des CTCs est avant tout démontré pour les formes métastatiques, avec pour le CCR, un seuil à 3 CTCs pour 7,5 ml de sang avec la méthode du CellSearch® (appareil de comptage semi-automatique des CTCs qui sera décrit ultérieurement). Le nombre de CTCs est également corrélé à la survie sans progression et à la survie globale dans le CCR métastatique avec une médiane de survie de 18,5 mois pour les patients ayant moins de 3 CTCs contre 9,4 mois pour les patients ayant plus de 3 CTCs [475], [476]. Enfin, la présence de CTCs après une résection totale de la tumeur primaire dans les CCR non métastatiques représente un mauvais pronostic pour le patient. Toutefois, l'intérêt pronostique des CTCs dans les formes non métastatiques et avec les techniques de détection actuellement utilisées reste encore très limité [465]. Pour affiner le calcul de la probabilité de survie d'un patient, les oncologues peuvent recourir à un outil graphique de calcul, un nomogramme qui prend en compte le nombre de CTCs [477]. Cependant le nombre de CTCs ne reflète pas par exemple la présence ou non d'une signature moléculaire d'agressivité ainsi que le phénotype des CTCs (épithéliales, mésenchymateuses, différenciées ou souches...). L'optimisation des outils permettant non seulement le comptage mais également la caractérisation des CTCs permettrait de renforcer l'intérêt des cellules pour adapter les décisions thérapeutiques. La section suivante décrira les quelques technologies aujourd'hui utilisées pour détecter et isoler les CTCs ainsi que leurs limites.

## **b) Méthodes de détection et d'isolement**

Les technologies développées se basent soit sur leurs propriétés biologiques (nommées immuno-sélection car basées sur l'expression de protéines discriminant les CTCs des cellules sanguines) soit sur leurs propriétés physiques (taille, densité et déformabilité). Nous allons maintenant détailler le principe des technologies de détection et d'isolement les plus utilisées dans la littérature.

### i. Méthodes basées sur l'immun sélection

De manière générale, les diverses méthodes d'immuno-sélection reposent soit sur une sélection positive (on utilise des anticorps dirigés spécifiquement contre les CTCs) soit sur une sélection négative (on utilise des anticorps dirigés spécifiquement contre les leucocytes dont on veut se débarrasser).

La sélection positive consiste à enrichir un échantillon en CTCs par une séparation de ces dernières à l'aide de billes magnétiques conjuguées à un anticorps dirigé contre des antigènes propres aux cellules tumorales. Ces mêmes anticorps couplés non pas à des billes magnétiques, mais à des fluorochromes, peuvent également servir à trier les CTCs par cytométrie en flux (FACS). Certains antigènes des CTCs peuvent être exprimés dans de multiples cancers et d'autres peuvent être plus spécifiques à un type de cancer. Idéalement, un bon antigène spécifique des CTCs est un antigène qui n'est pas exprimé par les cellules sanguines et qui est présent à la membrane des CTCs. Si la technologie utilisée pour isoler les CTCs n'implique pas une étape de fixation, il est alors possible d'utiliser du matériel vivant pour certains tests de caractérisation fonctionnels. Malheureusement, le marqueur épithélial EpCAM est pour l'heure, le seul marqueur reconnu et robuste (mais pas parfait) qui répond à ces critères de sélection positive. Il est le plus souvent complété par d'autres marqueurs propres aux adénocarcinomes telles que certaines cytokératines mais qui ont l'inconvénient d'être cytoplasmiques. Il est donc nécessaire de fixer et perméabiliser les CTCs pour que les anticorps puissent avoir accès aux cytokératines.

La sélection négative repose elle sur une déplétion des cellules sanguines grâce à des antigènes spécifiques. Auparavant, pour quelques technologies, il s'agissait d'un cocktail d'anticorps ciblant chacun un marqueur spécifique d'une population de leucocytes. Censé garantir un meilleur ciblage de tous les leucocytes, il s'est avéré que certains antigènes pouvaient être faiblement exprimés par les CTCs et elles étaient donc éliminées avec les leucocytes. Dorénavant, les technologies ont recours à un seul anticorps dirigé contre l'antigène CD45 qui est fortement spécifique des leucocytes mais pas des CTCs. Cependant, la récente découverte de clusters (groupes) de CTCs avec les cellules immunitaires, implique que les CTCs en cluster avec des leucocytes seront éliminées lors de la déplétion de ces derniers. Bien que la sélection négative ait permis initialement d'étudier les CTCs, il est impératif de trouver un moyen de prendre en compte également les CTCs en cluster avec des cellules immunitaires.

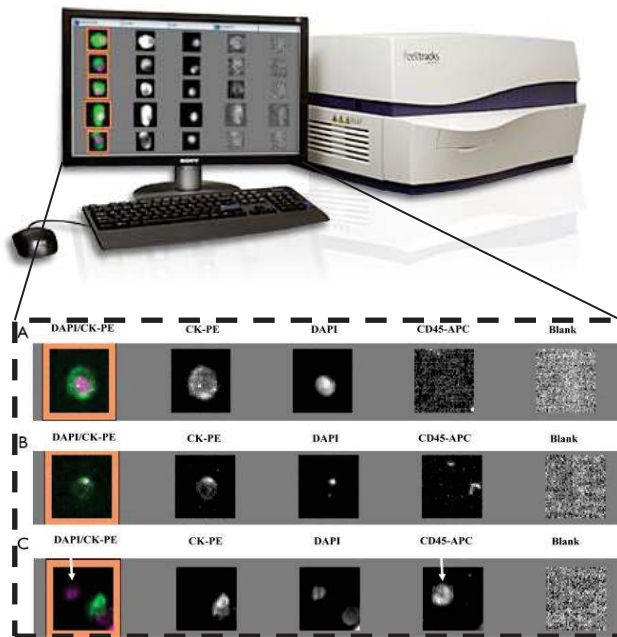
Associer en deux temps les deux types de sélection peut s'avérer être une stratégie astucieuse mais chronophage. Pour cela, il est capital de poursuivre la recherche d'autres marqueurs exprimés par les CTCs afin d'avoir une sélection positive prenant en compte l'ensemble des CTCs puis une sélection négative pour récupérer la fraction de CTCs en cluster avec des leucocytes.

**-CellSearch®** : Commercialisé aujourd’hui par Menarini-Silicon Biosystems, cette technologie automatisée reste pour l’heure, la seule autorisée par la Food and Drug Administration (FDA) comme marqueur pronostique pour le cancer du sein, le CCR et le cancer de la prostate. Il s’agit d’une méthode de comptage des CTCs ayant un phénotype épithélial. En effet, la technologie CellSearch® débute par le prélèvement du sang dans un tube spécifique afin de séparer le plasma de la fraction cellulaire par centrifugation. La fraction cellulaire est ensuite placée dans un dispositif automatisé nommé CellTracks®. Tout d’abord, le dispositif sépare magnétiquement les CTCs des cellules sanguines à l’aide de nanoparticules ferreuses couplées à un anticorps dirigé contre EpCAM. Cette fraction de CTCs est ensuite marquée par un anticorps pan-cytokératines (c’est-à-dire ciblant la cytokératine 8, 18 et 19, marqueurs spécifiques des cellules épithéliales) et également par un anticorps ciblant CD45 (marqueur spécifique des leucocytes résiduels malgré l’enrichissement magnétique). Ces anticorps dirigés contre les cytokératines et CD45 étant couplés chacun à un fluorochrome différent, un dernier marquage des noyaux par du DAPI permet ainsi au dispositif d’analyser les cellules une par une à la manière d’un cytomètre en flux. Des photos sont prises au passage de chaque potentielle CTC et une personne devra ensuite analyser l’image afin de confirmer ou non, qu’il s’agit bien d’une cellule tumorale circulante (Figure 20).

Sur le même équipement, il est également possible d’acheter un kit spécifique pour les récepteurs HER2 et EGFR et bientôt pour l’expression de la protéine de point de contrôle immunitaire PD-L1. Ces innovations permettent ainsi de ne pas seulement dénombrer les CTCs mais également d’obtenir des informations sur leur phénotype et donc identifier de potentielles cibles ou résistances thérapeutiques. Cette technologie aujourd’hui considérée comme le Gold Standard pour l’énumération des CTCs a l’avantage d’être robuste (EpCAM étant un marqueur très spécifique des cellules épithéliales et CD45 un marqueur très spécifique des leucocytes), reproductible et automatisée. Ses limites reposent premièrement sur l’étape d’analyse des images par un opérateur accoutumé à ce genre d’analyse et qui peut malgré tout présenter une variabilité significative d’un opérateur à l’autre. Deuxièmement, les cellules dans le tube de sang sont fixées dès le début, afin de permettre une perméabilisation pour le marquage cytoplasmique des cytokératines et le marquage du noyau. Il n’est donc pas possible de récupérer ces cellules pour des analyses moléculaires ou fonctionnelles. Enfin, la limite majeure de ce dispositif de comptage des CTCs est qu’il ne prend en compte que les cellules épithéliales où, ayant initié une EMT très partielle. En effet, contrairement aux cytokératines dont l’expression perdure relativement durant l’EMT, EpCAM est l’un des premiers marqueurs épithéliaux dont l’expression est perdue durant l’EMT [478]. Donc, toutes les CTCs n’exprimant plus EpCAM ne seront pas comptabilisées dès l’enrichissement magnétique, qu’elles expriment encore ou non les cytokératines.



Figure 20: Dispositif CellSearch® et exemples d'images capturées par le dispositif.



La machine CellTracks® (en haut à droite) permet d'isoler les cellules tumorales circulantes (CTCs) des cellules sanguines et de prendre en photo les CTCs une. En plus d'un marquage nucléaire (dû au DAPI), les cellules sont marquées par des anticorps dirigés contre des protéines épithéliales, (ici un anticorps pancytokératines) et un anticorps spécifique des cellules immunitaires (dirigé contre l'antigène CD45) et qui sont tous pré-couplés à un fluorochrome différent. Ces marquages permettent ainsi de distinguer les CTCs des éventuels contaminants sanguins. Les marquages épithéliaux et nucléaires sont superposés et apparaissent en couleurs sur l'image la plus à gauche de l'écran pour chaque évènement photographié. Un observateur analysera ensuite les photos prises automatiquement par l'appareil afin de ne prendre en compte que les cellules ayant un marquage nucléaire (en violet) et un marquage épithélial (en vert). Sur l'exemple (c), on peut par exemple observer qu'une cellule avec seulement un marquage nucléaire (pointée par la flèche blanche) est à proximité d'une cellule nucléaire et épithéliale et qu'il s'agit en réalité d'une cellule immunitaire car marquée par l'anticorps anti-CD45. Adaptée de Ilie, M. et al. *Ann Transl Med* 2014.

- **CellCollector®** : Commercialisé par la société Gilupi, ce dispositif permet de « fixer » les CTC *in vivo* directement dans la circulation sanguine du patient. À l'aide d'une aiguille placée dans la veine du patient durant 30 minutes, un fil d'acier inoxydable et extrêmement fin présente l'anticorps anti-EpCAM sur toute sa longueur. Près d'1 litre et demi de sang passe ainsi sur ce fil, permettant donc de collecter un très grand nombre de CTCs (Figure 21). Le fil est ensuite lavé plusieurs fois de suite avant d'être fixé pour permettre un comptage au microscope et éventuellement d'autres analyses. Ce dispositif permet donc d'avoir un comptage plus exhaustif en particulier pour les cancers où le nombre de CTCs détectées est très faible [479]. Cependant, c'est un dispositif très lourd à mettre en place et peu accepté aussi bien par le personnel soignant que par les patients. Il requiert une longue analyse microscopique par un opérateur très spécialisé de la morphologie des cellules sanguines et des CTCs. Enfin, il repose lui aussi sur le marqueur EpCAM qui implique donc un biais de sélection et une perte des cellules ayant débuté l'EMT.

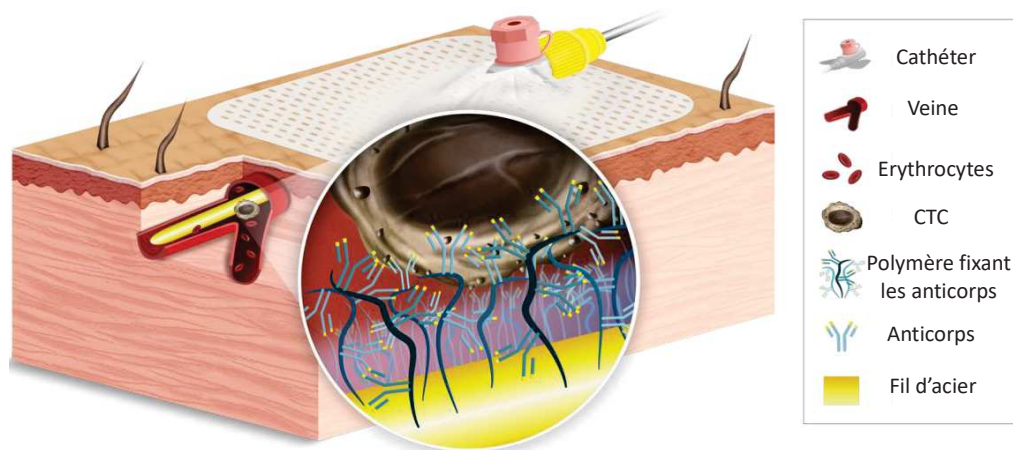


Figure 21: Schéma illustrant la capture des CTCs en intraveineuse grâce au dispositif GILUPI CellCollector®

Inséré à l'aide d'une aiguille et d'un cathéter, Une tige d'acier d'un diamètre de 0,5 mm est insérée dans une veine à l'aide d'une aiguille et d'un cathéter. Cette tige est recouverte d'une couche de polymère liant de manière covalente des anticorps dirigés contre un antigène exprimé à la surface des CTCs tel que EpCAM. Il est ainsi possible de récupérer en 30 minutes une très grande quantité de CTCs. Adaptée depuis le site internet du fabricant Gilupi.

**RosetteSep®** : Commercialisé par StemCell Technologies, c'est une méthode de sélection négative. Un cocktail d'anticorps RosetteSep® est ajouté directement dans le sang et permet de former des rosettes, sortes de toile où sont piégées les cellules hématopoïétiques. Après l'ajout d'un gradient de ficol, l'échantillon est centrifugé et les plaquettes ainsi que les rosettes forment un culot. Les CTCs restent en suspension à l'interface entre le plasma et le gradient de densité. L'avantage majeur de cette technique est que les CTCs (qu'elles soient épithéliales ou mésenchymateuses) sont toujours vivantes et qu'il est donc possible de les caractériser par des approches de biologie moléculaire ou de les amplifier pour une caractérisation fonctionnelle ultérieure. Dans quelques rares cas, des lignées de CTCs ont pu ainsi être cultivées et établies suite à l'utilisation du RosetteSep® [480], [481]. Cependant StemCell Technologies a réalisé que certains anticorps qui composent le cocktail ciblaient également les CTCs. Bien que la nouvelle formule ne cible plus que l'antigène CD45, elle exclut les CTC qui sont en clusters avec les leucocytes et qui de plus, semblent être les plus aptes à former des métastases [482]. De plus, cette méthode permet d'isoler les CTCs mais l'étape de comptage reste à faire en utilisant une autre méthode. La technique de RosetteSep® est ainsi utilisée par exemple, en préambule de la technologie EPISPOT®.

**-EPISPOT®** : Développé par le laboratoire « Cellules circulantes rares humaines » (LCCRH) du CHU de Montpellier, il s'agit d'une méthode fonctionnelle de détection indirecte des CTCs grâce à certaines protéines qu'elles sécrètent. Suite à la déplétion de la majorité des cellules sanguines par la méthode de RosetteSep®, les cellules restantes sont cultivées entre 24 et 48 heures sur une membrane recouverte d'anticorps dirigés contre des protéines sécrétées spécifiquement par les CTCs, à la manière d'un test ELISA. La révélation de la présence de ces empreintes protéiques est

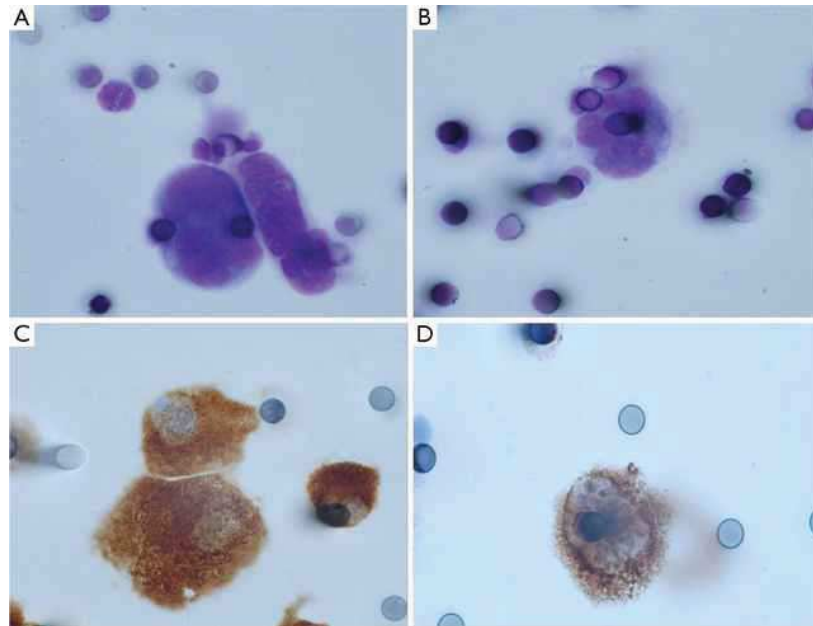


permise par l'addition d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (par exemple un anti-cytokératine19, un anti-mucine1, un anti-FGF2 ou un anti-PSA dans le cas particulier du cancer de la prostate) [483]. Le choix de la MUC-1, de CK19 et du PSA tient au fait que ces protéines sécrétées ont été déjà identifiées dans le sérum des patients (l'antigène tumoral CA-15 pour le cancer du sein et PSA pour le cancer de la prostate) [484], [485] ou observées au niveau de la tumeur primaire [486], [487]. Ces marqueurs ont de plus permis de détecter des cellules tumorales disséminées (CTDs) dans la moelle de patients via cette technologie EPISPOT [487]. FGF2 à quant à lui été choisi de par son rôle de facteur de croissance de cellules souches et permettant notamment, la culture *in vitro* de cellules issues de micro-métastases mammaires [488]. On obtient ainsi des immuno-spots (où empreintes « fossilisées » des CTCs, permettant à la fois la détection et l'énumération de manière automatisée par un microscope à fluorescence. Cette technologie à l'avantage de se faire sur des CTCs vivantes temporairement, qu'il est possible d'adapter à d'autres fluides corporels (liquide céphalorachidien ou moelle osseuse). Il n'est cependant pas possible d'aller plus loin dans la caractérisation moléculaire des CTCs car celles-ci sont éliminées lors de l'étape de révélation.

## ii. Méthodes basées sur caractéristiques physiques

Partant du postulat relativement assez intuitif que les cellules tumorales circulantes ont une taille comparable aux cellules dans la tumeur, des laboratoires ont donc cherché à distinguer les CTCs des cellules sanguines grâce à leur différence de leur taille. S'ajoute également à cela, la déformabilité moindre des cellules cancéreuses comparée à celle des cellules immunitaires. La taille plus importante des CTCs en moyenne a depuis été confirmée [489]. De nombreux dispositifs ont ainsi été développés pour détecter, dénombrer et caractériser les CTCs sans le biais des immuno-sélections.

**-ISET®** : Développé par l'équipe de Patrizia Paterlini-Bréchet puis commercialisé par Rarecells Diagnostics, il s'agit d'une technologie visant à filtrer le sang à travers des pores [490]. Le sang passe au travers d'une membrane de polycarbonate avec des pores d'un diamètre de 8  $\mu\text{m}$  (Figure 22). La membrane peut être ensuite utilisée pour des analyses histologiques et immuno-histologiques. Il est également possible de rechercher des aberrations génétiques par FISH (hybridation *in situ* fluorescente) et même d'individualiser les CTCs par microdissection laser afin de réaliser une analyse moléculaire en cellule unique. Indépendant de la présence d'un marqueur spécifique, malheureusement il est aujourd'hui démontré que certaines CTCs peuvent être plus petites que 8  $\mu\text{m}$  et ne seraient donc pas comptabilisées [491].



*Figure 22: Photographies et colorations de CTCs filtrées par le dispositif ISET*

(A&B) Photographies de CTCs colorées au May Grunwald Giemsa et observées au grossissement X1000. Cette coloration facilite la visualisation des cellules et la discrimination des CTCs par la taille et l'intensité du marquage comparé à celui des rares cellules immunitaires restantes. Ce dispositif permet également de réaliser des marquages spécifiques de protéines épithéliales ou mésenchymateuses comme photographié respectivement en (C&D) par un marquage en immunohistochimie contre des cytokératines et contre la vimentine. Issue de Ilie, M. et al. Ann Tranl Med 2014.

**-ScreenCell® :** Il s'agit également d'une méthode de filtration à travers une membrane poreuse très facile d'utilisation, cette technologie débute tout d'abord par une lyse des globules rouges. Selon le kit utilisé, la lyse peut être plus ou moins importante et combinée à une fixation des cellules. Le sang est transféré sur la membrane et à l'aide d'une pression sous vide il est aspiré et s'écoule dans le tube. La membrane peut ensuite être déposée sur un tube Eppendorf pour une extraction d'ADN ou dans un puits de plaque de culture. Il existe un kit où les CTCs filtrées sont toujours vivantes et ainsi utilisables pour de la culture cellulaire. L'autre kit où la lyse est plus forte et combinée avec une étape de fixation, permet de réaliser des analyses par immunohistochimie (Figure 23). Cette technique présente l'avantage majeur d'être simple et rapide. Le dispositif étant vendu à l'unité et indépendant d'un équipement, il est donc utilisable pour des études portant sur quelques échantillons pour un moindre coût. Mais de nouveau, les plus petites CTCs peuvent réussir à passer au travers de la membrane et surtout, ce dispositif implique l'utilisation de sang extrêmement frais car la moindre petite micro-embolie obstrue la membrane. Ce paramètre peut être limitant pour certaines études car des délais peuvent s'opérer entre la prise de sang et la récupération du tube par le chercheur.

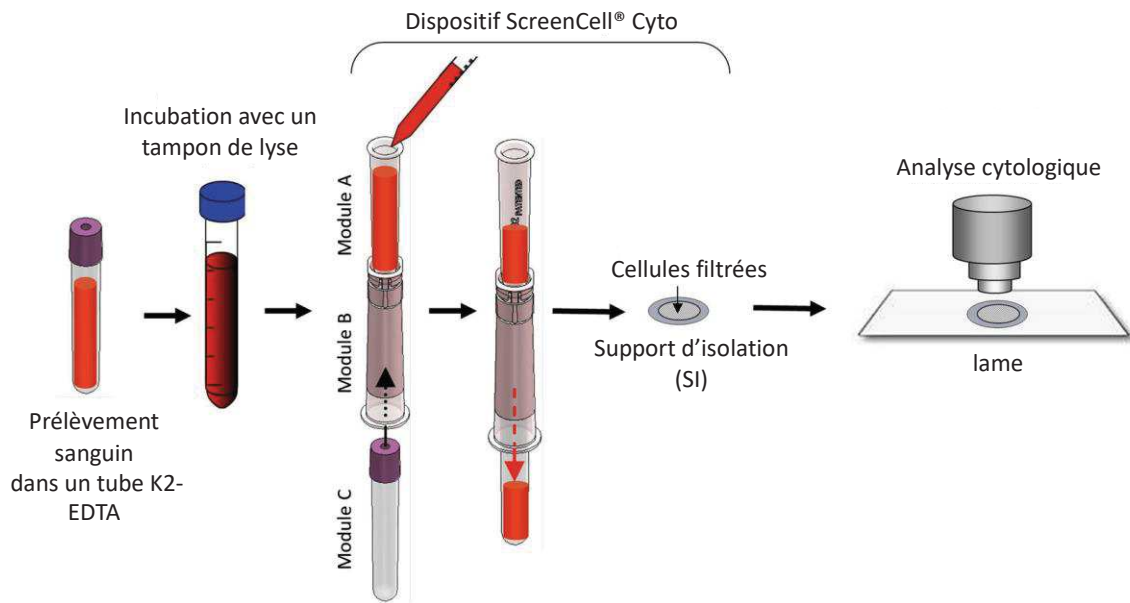


Figure 23: Schéma illustrant le dispositif ScreenCell® Cyto permettant l'analyse cytologique des CTCs

Suite à la lyse des globules rouges, le sang est filtré au travers d'un support d'isolation (SI) par aspiration d'un tube de prélèvement sanguin sous-vide placé en dessous. Le support d'isolation récupéré peut ensuite être coloré ou subir des marquages spécifiques grâce à des anticorps pour une analyse cytologique sur lame. Adaptée de Nicolazzo, C. et al. *Cancer Immun-surveillance* 2018.

**Parsortix®** : Commercialisé récemment par la société Angle, cette machine automatisée combine la micro fluidique et les caractéristiques de taille et de déformabilité des CTCs afin de les séquestrer dans une cassette à usage unique (Figure 24). Le Parsortix aspire le sang sans lyse préalable, évitant ainsi d'altérer la survie des cellules. Une CTC de plus de 6,5  $\mu\text{m}$  pourra ainsi être visualisée au microscope directement dans la cassette et un programme permet également de réaliser l'ensemble des étapes d'un marquage par immunofluorescence dans la cassette. Les CTCs vivantes peuvent également être récupérées pour une mise en culture cellulaire. Malgré un coût assez onéreux pour l'achat de la machine et celui des cassettes, le Parsortix semble être pour le moment, la technologie de micro fluidique la plus opérationnelle sur le marché. Cependant, de très nombreux laboratoires avaient et continuent de développer leur dispositif « maison » comme par exemple la startup SmartCatch à Toulouse (<https://smartcatch.fr/>). Le plus « connu », le CTC-iChip® [492], a permis notamment l'établissement des premières lignées de CTCs à partir du sang de patientes avec un cancer du sein [493]. Plus récemment, une équipe a développé un dispositif nommé Hydro-Seq® permettant de réaliser l'isolement et l'analyse transcriptomique en Single-Cell RNAseq dans le même appareil [494], réduisant ainsi au maximum les manipulations de ces cellules rares. Outre les données majeures issues de la caractérisation des CTCs que nous aborderons plus tard, ces développements technologiques sont un enjeu majeur pour pouvoir utiliser de plus en plus les CTCs comme un outil de médecine personnalisée et non pas uniquement un outil diagnostic.

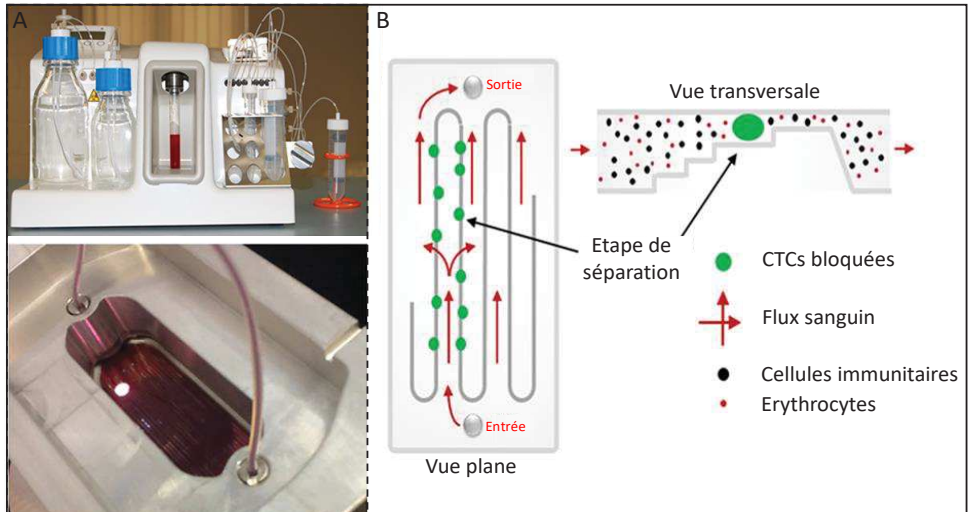


Figure 24: Photos du système Parsortix® et schéma illustrant du processus de séparation des CTCs

(A) Vue générale du système Parsortix®. Le tube de sang est placé au niveau de la partie centrale de la machine et de manière hermétique (photographie du haut). Aspiré par une canule, le sang passe par la suite dans une cassette de séparation (photographie du bas) jetable pour retenir les CTCs. (B) Schéma représente le fonctionnement de la cassette de séparation des CTCs du reste du sang. Le flux généré par la machine force le sang à traverser la cassette de séparation d'un bout à l'autre de la cassette tout en devant passer au-dessus de paliers. La vue transversale illustre comment les paliers de plus en plus haut parviennent à bloquer les CTCs trop grandes et peu déformables pour s'évacuer. Les cellules sanguines plus petites et déformables parviennent elles à sortir de la cassette. Adaptée de Xu, L. et al. Plos One 2015.

### c) Les CTCs : des cellules initiatrices de métastases (CIMs)

Nous avons émis précédemment l'hypothèse que l'hétérogénéité tumorale pouvait être expliquée par le modèle hiérarchique. Ce modèle ne serait pas strictement unidirectionnel car il intégrerait une relative plasticité cellulaire (dûe au microenvironnement et à certaines altérations génétiques et épigénétiques). Il est donc théoriquement possible de retrouver cette diversité de populations tumorales au sein des cellules tumorales circulantes (Figure 26A). Des populations particulières de CTCs pourraient ainsi avoir un avantage sélectif comparé à d'autres pour survivre dans le sang puis s'établir dans un organe distant afin de générer une métastase. Cette hypothèse implique de facto une hétérogénéité inter et intra tumorale pour les métastases. Par exemple, une CTC colorectale à l'origine d'une métastase hépatique, s'établit dans un microenvironnement différent et devient une cellule tumorale disséminée. Elle n'est donc pas la copie de la cellule colique « à l'origine du cancer », et aura une évolution différente de la tumeur primaire ou d'une métastase pulmonaire. Depuis, des modèles murins et des évidences cliniques ont en effet démontré la forte diversité de cellules tumorales au sein des métastases pour un même individu. Par exemple, dans le cancer de la prostate, une métastase pouvait provenir non pas de d'une seule CTC mais de différentes vagues de dissémination réparties dans le temps. Des CTCs provenant de la tumeur primaire à différents moments conduisait de facto à la formation de métastases poly-clonales et surtout différentes entre elles. Les auteurs ont également observé que les métastases pouvaient elles-mêmes disséminer et former de nouvelles métastases, voire une rechute au niveau du site primaire [495], [496]. Ce processus nommé homing, initialement démontré dans une très belle étude princeps [497], a été également confirmé par des analyses phylogénétiques dans le cas du CCR [498]. Les analyses par single cell RNA Sequencing (pour séquence à l'échelle de cellule unique) des CTCs et des tumeurs primaires et secondaires permettent aujourd'hui de mieux comprendre leur hétérogénéité. Dans le cas des tumeurs de la prostate, les auteurs sont en effet parvenus à identifier la présence de différents clones dans le sang, issus à la fois de la tumeur primaire et des métastases [496].

Considérées comme des cellules initiatrices de tumeur, les cellules souches cancéreuses (CSCs) parvenues à rejoindre la circulation sanguine sont les candidates idéales pour survivre à l'anoïkis (apoptose causée par la perte d'adhérence à la MEC) et pour être à l'origine d'une métastase [499]. Survivre dans le sang implique en effet que les CTCs résistent aux forces de cisaillements dues au flux sanguin, aux cellules NK et surtout elles parviennent à s'insensibiliser à la perte d'adhésion à une MEC. Une étude a démontré qu'une majorité des CTCs étaient en fait apoptotiques [500]. Une proportion finalement extrêmement faible de CTCs parvenait à survivre et s'installer dans un site distant pour y former une métastase. L'hypothèse d'une population de CSCs au sein des CTCs resta en suspens pendant longtemps car toutes les tentatives de culture pérennes de CTCs avaient échoué dans des conditions d'adhérence. Des équipes ont pu seulement démontrer que certaines populations de CTCs mammaires et pulmonaires étaient capables d'initier une tumeur et parfois

des métastases une fois injectées dans des souris immunodéprimées. Ces populations de CTCs exprimaient par exemple les marqueurs EpCAM et CD44 ou avaient une forte activité enzymatique ALDH [501]–[503]. L'établissement de lignées de CTCs mammaires puis de CTCs colorectales (par l'équipe de Daniel A. Haber et notre laboratoire respectivement) [481], [493] dans des conditions de culture de CSCs, a fortement renforcé cette hypothèse. Xéno-greffées dans des souris immunodéprimées, ces lignées de CTCs étaient capables d'initier des tumeurs hétérogènes et similaires au niveau histologique aux tumeurs primaires des patients (capacité de différenciation), validant qu'il s'agissait de cellules souches cancéreuses circulantes. Par la suite, grâce au dispositif Hydro-Seq®, il fût démontré que des CTCs exprimant des gènes épithéliaux et de CSCs étaient présentes dans le sang de patientes porteuses d'un cancer du sein [494].

Outre les CTCs ayant un phénotype de CSCs, des CTCs ayant subi une EMT partielle ou totale, ont été détectées en même temps que des CTCs épithéliales dans le cancer du poumon, du sein, de l'ovaire et du colon, [504]–[508]. Le dispositif Hydro-Seq a lui aussi permis d'isoler trois profils de CTCs selon leur signature transcriptomique : des épithéliales non souches, des CSCs et des mésenchymateuses [494]. Or l'EMT confère non seulement un avantage invasif mais également quelques propriétés communes aux CSCs comme une plus forte résistance à l'anoïkis et une capacité à initier une tumeur [509], [510]. Une population de CTCs mésenchymateuses pourrait donc représenter également une population potentiellement capable d'initier des métastases à l'instar de ce qui a été démontré à partir de tumeurs primaires et métastatiques [284], [511]–[513] (Figure 25B). Bien qu'il faille encore démontrer que les cellules tumorales mésenchymateuses dans le sang sont celles qui vont initier des métastases, on constate que les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (le cancer du sein de plus mauvais pronostic) ont plus de CTCs mésenchymateuses que les patientes atteintes d'un cancer du sein de type lobulaire où les CTCs sont largement épithéliales et qui développent moins de métastases [514]. Ce phénotype mésenchymateux était d'ailleurs plus fréquent dans le cas de CTCs groupées (en clusters) que dans les CTCs isolées. Une équipe a proposé que les plaquettes pourraient induire ou maintenir ce phénotype mésenchymateux des CTCs en clusters en les recouvrant car ces premières sont une source connue de TGF- $\beta$  [515]. Nous verrons de manière plus détaillée les conséquences biologiques des clusters CTCs-plaquettes dans les sections suivantes. L'existence de clusters de CTCs avait déjà été observée par exemple avec la technologie CellSearch® mais depuis peu, la manière dont circulent les CTCs (en solitaire ou en cluster), ainsi que le type de clusters, ont également été fortement étudiés afin de mieux comprendre la diversité des CTCs ainsi que leur potentielle capacité à initier des métastases (Figure 25A).



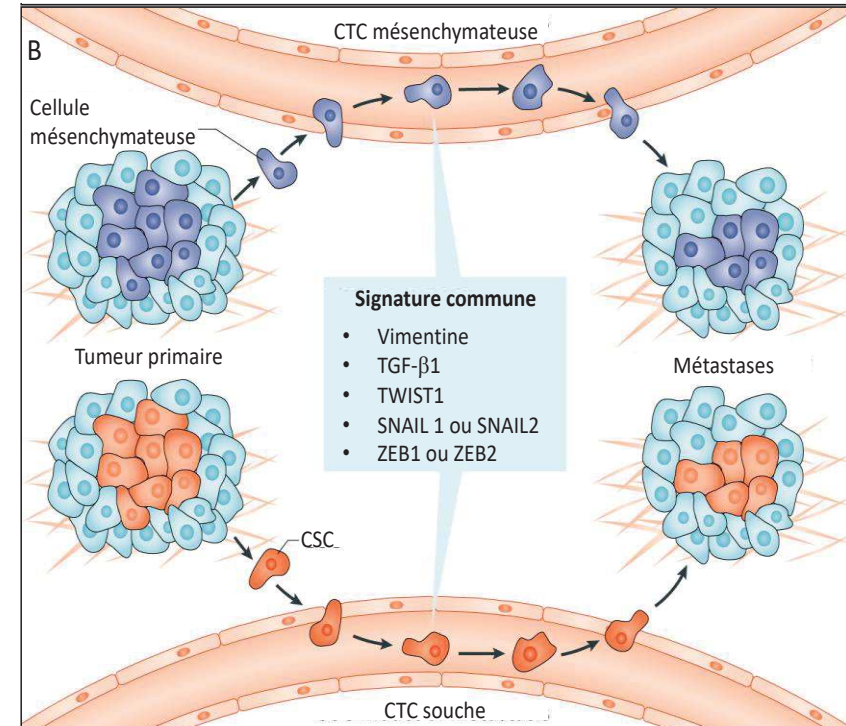
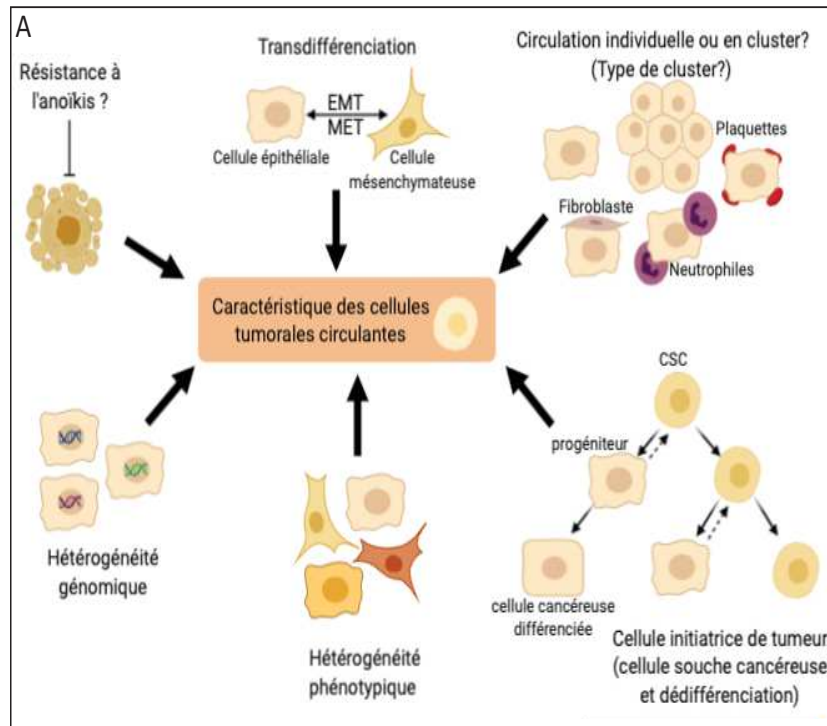


Figure 25: Diversité des cellules tumorales circulantes (CTCs) et populations initiatrices de métastases

(A) : Propriétés intrinsèques et interactions participant à l'hétérogénéité des CTCs. Le schéma récapitule les caractéristiques des CTCs retrouvées dans le sang des patients grâce aux biopsies liquides. Les CTCs voyagent au travers de la circulation sanguine sous la forme de cellules individuelles ou en groupe, également appelés cluster. Ces clusters peuvent être homotypiques ou hétérotypiques, c'est-à-dire que les cellules tumorales circulent en interaction avec des cellules sanguines ou des fibroblastes. L'hétérogénéité intra-tumorale du site primaire se reflète parmi les CTCs puisqu'il est possible de retrouver des cellules avec un profil génomique différent mais également des cellules ayant un phénotype souche plus ou moins important ainsi que des cellules à différents stade du processus d'EMT. Ces propriétés intrinsèques combinées aux différentes formes de cluster, démultiplie l'hétérogénéité phénotypiques des CTCs. Cette hétérogénéité peut être cependant réduite selon la capacité de résistance à l'anoïkis de chaque type de CTCs. (B) : Modèles de dissémination des cellules initiatrices de métastases (CIMs). Le modèle de dissémination des CIMs dépendant de l'EMT (en haut) propose que la ré-acquisition de gènes souches, reflétant une capacité à initier une tumeur, requière la perte d'un phénotype épithélial pour un phénotype mésenchymateux à minima partiel. Une cellule mésenchymateuse (en bleu foncé) quitte la tumeur afin de rejoindre la circulation systémique par intravasation. Cette dernière rejoint un site distant par extravasation et initie la formation d'une métastase contenant une sous-population de cellules plus ou moins mésenchymateuses et des cellules épithéliales différenciées (en bleu claire). Le modèle de dissémination des CIMs dépendant des cellules souches cancéreuses (CSCs) propose que seule la sous-population de cellules tumorales épithéliales avec un phénotype de CSCs (en orange) soit capable de résister à l'anoïkis dans le sang et à efficacement initier une métastase dans un site distant. Cette CSC circulante installée dans un site distant régénérer une sous-population de CSCs par division symétrique et soutenir la croissance tumorale par division asymétrique générant à terme des cellules cancéreuses épithéliales différenciées. Les deux modèles coexistent dans un même échantillon sanguin et présentent tous deux une signatures transcriptomique commune pour certains gènes dont ceux des cellules souches embryonnaires (rectangle bleu central). Adaptée de Alix-Panabière, C. & Klaus, P. Nature Reviews Cancer 2014 et de Lytle, N.K. et al. Nature Reviews Cancer 2018).

#### d) CTCs individuelles ou en clusters : impact sur la survie et propriétés agressives des CTCs

A l'image de la migration individuelle ou collective, les CTCs peuvent également être individuelle ou en groupe. Cette organisation en clusters (ou groupées) a été constaté grâce à la technologie CellSearch® puis d'autres équipes ont pu le valider avec d'autres dispositifs comme le ScreenCell® ou le Parsortix®. Ces clusters ne sont à priori pas la conséquence d'une CTC en mitose dans la circulation mais bien d'un groupe de cellules cancéreuses ayant intravasé ensemble. De plus, l'organisation groupées confère un avantage non négligeable vis-à-vis de la circulation solitaire car elle amoindrit le stress dû aux forces de cisaillement de la circulation sanguine et rendent les cellules plus résistantes à l'apoptose grâce aux interactions inter-CTCs. Les clusters de CTCs pourraient également rendre les CTCs plus résistantes à l'anoïkis. Une étude sur des cellules cancéreuses intestinales montre que la kinase TrkB inhibe l'anoïkis en induisant la formation de larges agrégats cellulaires qui survivent et prolifèrent en suspension. Injectées dans des souris, ces agrégats génèrent plus de métastases que les CTCs individuelles [516]. L'intravasation collective permettrait de garder ces jonctions cellules-cellules, si importantes pour résister à apoptose et l'anoïkis dans une moindre mesure.

En plus d'une capacité à survivre plus longtemps sous forme groupées, les CTCs ont un pouvoir tumorigène accru grâce à leur diamètre plus important. Plus facilement bloquées dans les micro-capillaires, ces cellules peuvent rapidement quitter la circulation sanguine afin de former des métastases. L'étude confirme ces observations avec une corrélation entre la présence de CTCs groupées et un mauvais pronostic de survie chez des patients atteints de cancers du sein et de la prostate [517]. Plus récemment, l'équipe du Dr Aceto a démontré que les promoteurs des gènes souches *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *SIN3A* étaient hypométhylés dans les CTCs mammaires groupées contrairement aux CTCs individuelles (Figure 26A). Analysées grâce au dispositif Parsortix®, les CTCs groupées ne sont pas le résultat d'une agrégation post intravasation de CTCs individuelles mais bien des CTCs ayant intravasé en groupe. L'hypométhylation de ces gènes confère un caractère relativement souche et une propension plus importante à proliférer, expliquant la plus grande capacité des CTCs groupées à former des métastases dans des modèles murins. L'hypométhylation de ces mêmes régions de l'ADN au niveau de leur tumeur primaire est d'ailleurs corrélé à un mauvais pronostic pour les patientes porteuses d'un cancer du sein (Figure 26B).

Les jonctions intercellulaires étaient connues comme importante dans la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC et la déstabilisation de ces jonctions sur des cellules souches embryonnaires (CSE) en ciblant l'E-Cadhérine, conduisait à une perte d'expression des gènes *OCT4*, *SOX2* et *NANOG* [518]–[520]. Partant de ces études, les auteurs ont induit pharmacologiquement la perturbation des jonctions intercellulaires afin d'individualiser les CTCs.

Les CTCs individualisées présentaient une hyperméthylation des 4 gènes embryonnaires et une moindre capacité à former des métastases. Ainsi les auteurs proposent que les jonctions intercellulaires des CTCs en clusters permettraient aux CSC circulantes de maintenir leur phénotype souche [521]. Cependant, l'organisation en clusters ne se limite pas à un cluster unique de CTCs entre elles. D'autres types cellulaires ont été identifiés comme « compagnon » de voyage dans la circulation sanguine. Nous avons déjà évoqué le cas des plaquettes, qui recouvrent les CTCs et une fois activées, leur fournissent les facteurs nécessaires à l'acquisition ou au maintien d'un phénotype mésenchymateux. Ce phénotype associé à la formation de métastases pouvait être partiellement amoindri suite à la perte d'expression du TGF- $\beta$ 1 par les plaquettes. Le contact direct entre les plaquettes et les CTCs active également la voie NF- $\kappa$ B [515]. Or l'activation concomitante de ces deux voies et l'exposition très temporaire au TGF- $\beta$  permettrait de passer d'un effet cytostatique de ce dernier sur les cellules cancéreuses à une activation du programme d'EMT [522] (Figure 28). Les plaquettes permettraient également aux CTCs d'échapper aux cellules immunitaires NK par un effet de barrière physique ou par un effet immuno-régulateur notamment grâce au TGF- $\beta$ 1 [523], [524].

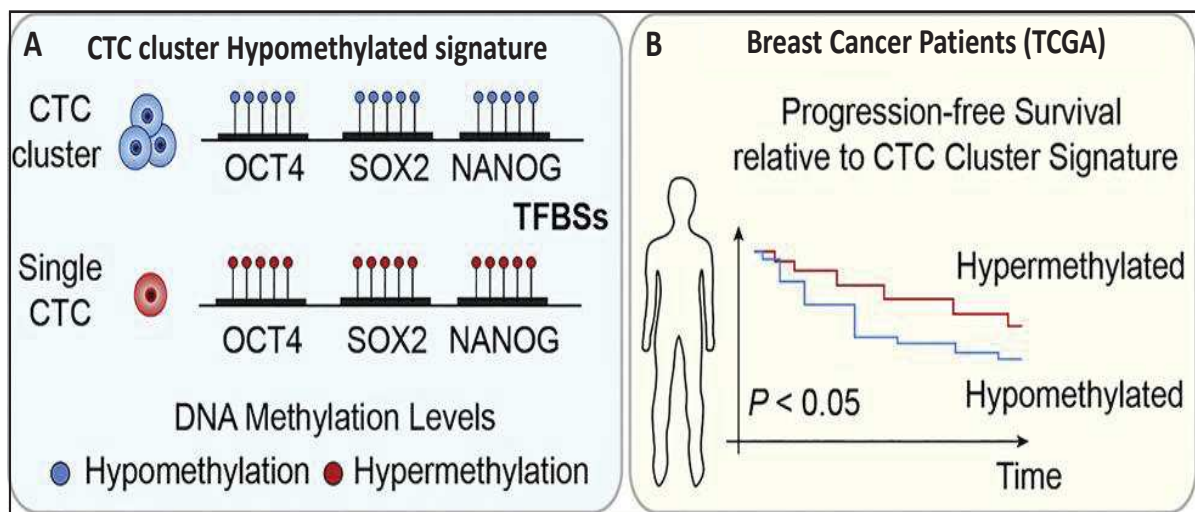


Figure 26: Les CTCs groupées (cluster) présentent un état de méthylation de l'ADN favorisant leur capacité à initier des métastases.

(A) Les CTCs groupées ont une signature transcriptionnelle comparable aux cellules souches embryonnaires. Comparées aux CTCs individuelles (single), elles présentent des sites de fixation des facteurs de transcription (TFBS pour Transcription Factor binding Sites) hypométhylés au niveau des promoteurs des gènes souches *OCT4*, *SOX2* et *NANOG* permettant l'expression de ces derniers. (B) La banque de données génomique du cancer (TCGA pour The Cancer Genome Atlas) a permis de comparer la survie sans progression de la maladie de 395 patientes atteintes d'un cancer du sein, selon que leur tumeur primaire présentait le même profil de méthylation de l'ADN que les CTCs individuelles ou groupées. Les patientes dont la tumeur primaire présente le même profil de méthylation de l'ADN que les CTCs individuelles ont survie sans progression de la maladie significativement meilleure que celle des patientes dont la tumeur a un profil de méthylation à l'ADN similaire aux CTCs groupées. *Adaptée de Gkoutela, S. et al., Cell 2019*

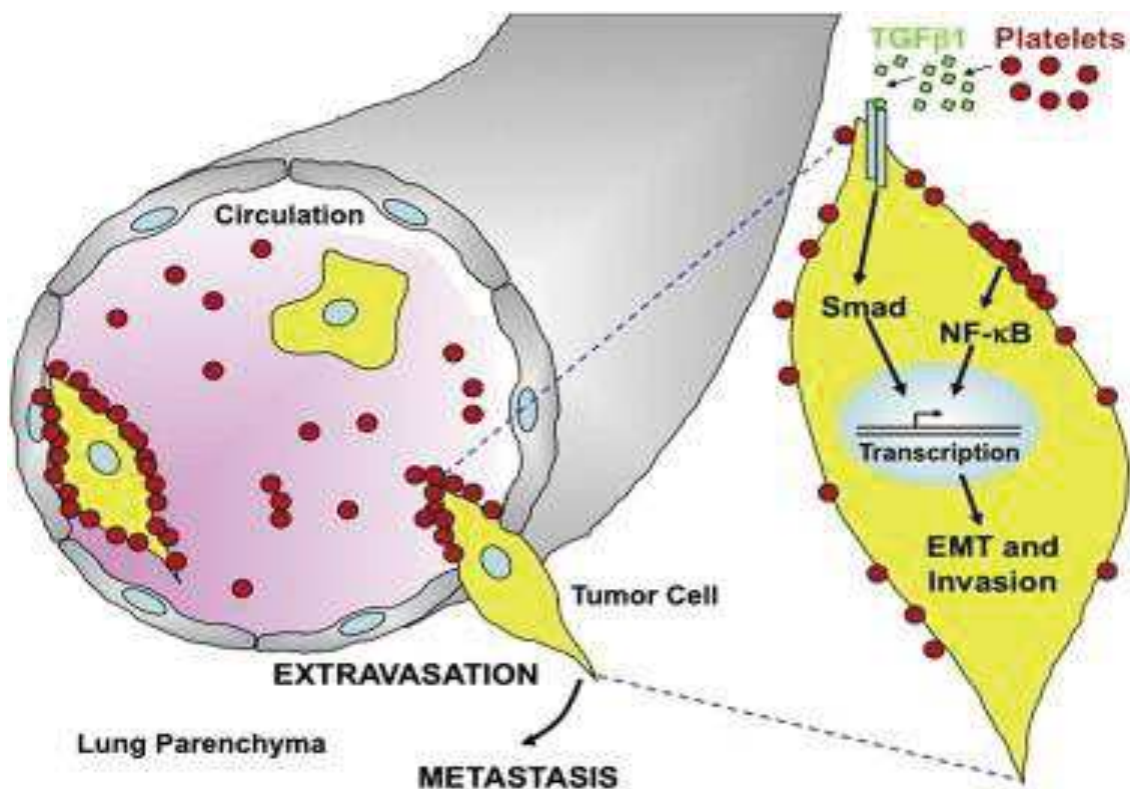


Figure 27: Maintien ou acquisition du phénotype mésenchymateux des CTCs grâce à l'interaction physique des plaquettes et leurs sécrétions de TGF- $\beta$ 1).

Les plaquettes sont une source naturelle de TGF- $\beta$ 1, activant la voie TGF- $\beta$ /Smad. Cette dernière est potentialisée grâce à l'activation concomitante de la voie NF- $\kappa$ B, induite par l'interaction physique des plaquettes à la surface des CTCs. Activées individuellement, ces deux voies ne suffisent pas à maintenir ou induire l'expression du programme de l'EMT mais ensemble, elles agissent de concert, facilitant l'extravasation et augmentant donc la probabilité de développer des métastases. Issue de Labelle, M. et al., Cancer Cell 2011

Les NK ne sont pas les seules cellules du système immunitaire à interagir avec les CTCs. Les lymphocytes, les monocytes et les neutrophiles ont également été observés en contact direct avec des CTCs [525]. Mais de la même manière que certaines cellules immunitaires protègent et stimulent l'agressivité des cellules cancéreuses dans la tumeur primaire, certaines vont avoir un rôle pro tumoral pour les CTCs. Toujours grâce au dispositif Parsortix®, l'équipe de N.Aceto a mis en lumière le cas particulier des neutrophiles que l'on retrouve en clusters avec des CTCs issues du sang de patientes atteintes d'un cancer du sein ou de modèles murins. De manière générale, la proportion de CTCs en clusters avec des neutrophiles, comparée aux CTCs individuelles ou en clusters entre elles (3,4%, 88% et 8,6% respectivement) est très faible. Mais, comme déjà observé pour le comptage des CTCs, la localisation du prélèvement impacte fortement ce taux. Les prélèvements à proximité des vaisseaux drainant la tumeur primaire sont bien plus riches en clusters (qu'ils soient entre CTCs ou avec des cellules immunitaires). Il est probable donc que la majorité des clusters soient bloqués rapidement aux niveaux des micro-capillaires les plus proches de la tumeur primaire. Malgré ce biais induit par le site de prélèvement, les clusters de CTCs-cellules immunitaires sont dans leur immense majorité composés de neutrophiles de type



N2 et la présence d'un seul de ces clusters réduit significativement le pronostic de survie de la patiente. Ce mauvais pronostic n'est étonnamment pas dû à un gain d'expression de gènes souches ou d'EMT mais à un gain d'expression des gènes favorisant l'avancée du cycle cellulaire ainsi que les gènes du programme de réplication de l'ADN. De manière plus détaillée, les neutrophiles sont une source de TNF- $\alpha$ , d'OSM (oncostatine M), d'IL1 $\beta$  et d'IL6, conférant un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses en comparaison aux mêmes cellules non exposées à ces facteurs, et en retour, les CTCs sont une source de cytokines (CSF1, G-CSF, TGF- $\beta$  et l'IL15) stimulant le phénotype N2 des neutrophiles. Enfin les auteurs ont observé que les CTCs en clusters avec des neutrophiles étaient muté en particulier sur le gène *TLE1*. La reproduction de cette mutation sur la lignée murine 4T1 avant son injection sur une souris, conduit à une plus forte proportion de clusters avec des neutrophiles en comparaison avec la lignée 4T1 non mutée. Les auteurs concluent que les cellules cancéreuses mutées sur le gène *TLE1* dans la tumeur primaire seront plus aptes à recruter des neutrophiles, les polariser en N2 puis à rejoindre la circulation ensemble afin de maintenir le phénotype prolifératif des CTCs [482].

Enfin, les fibroblastes sont le dernier type cellulaire observé en interaction avec des CTCs. Une première étude a démontré l'association de ces deux types cellulaires en 2010. Les auteurs ont émis l'hypothèse que certains clusters de CTCs contenaient des fibroblastes associés aux cancers (FACs) qui amélioreraient la capacité à initier des métastases. Cette hypothèse repose sur le fait que la majorité des cellules individuelles étaient apoptotiques tandis que celles en clusters avec des fibroblastes ne l'étaient pas [526]. La littérature sur ce sujet commence juste à approfondir cette interaction mais elle reste très compliquée à caractériser sur des échantillons humains du fait que les fibroblastes ne disposent toujours pas d'un marquage robuste et spécifique permettant de les identifier et qu'encre une fois il existe une hétérogénéité au sein de ces fibroblastes. De plus une partie des CTCs expriment des marqueurs mésenchymateux également exprimés par les fibroblastes. En utilisant une combinaison de plusieurs marqueurs, une équipe a pu récemment démontrer la présence de fibroblastes avec des CTCs dans le sang de patients atteints de CCR [527]. En attendant d'avoir un moyen plus direct pour identifier les fibroblastes en clusters avec des CTCs humaines, les techniques de traçage linéaire combinées aux marqueurs de fibroblastes sur des modèles murins restent les meilleurs outils pour étudier ce type de clusters. Mais globalement, les cellules tumorales apportent leur propre microenvironnement avec elles dans la circulation sanguine afin de toujours bénéficier des facteurs pro-tumoraux. La résistance à l'apoptose fait écho aux travaux d'E.Battle sur la production de facteurs pro-survie par les FAC [413]. Il est possible que ces mêmes facteurs continuent à être produits par les FAC circulant avec les CTCs colorectales, d'autant plus que l'IL11 est également une cytokine stimulant la mégacaryopoïèse et l'activation des plaquettes [528], [529]. Il serait intéressant de valider l'existence de ce potentiel trio (IL11/TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B) et de décrypter finement le dialogue moléculaire TGF- $\beta$ /IL11 entre ces trois types cellulaires.

Pour conclure, l'ensemble de ces études montrent de nouveau que l'interaction avec le microenvironnement tumoral permet de fortement augmenter les chances de survie des CTCs et que la diversité de ces interactions complexifie une approche thérapeutique visant à perturber ces clusters. C'est pourtant une piste qu'il ne faut pas négliger car ces clusters hétérogènes ont également un avantage sélectif pour l'étape d'extravasation.

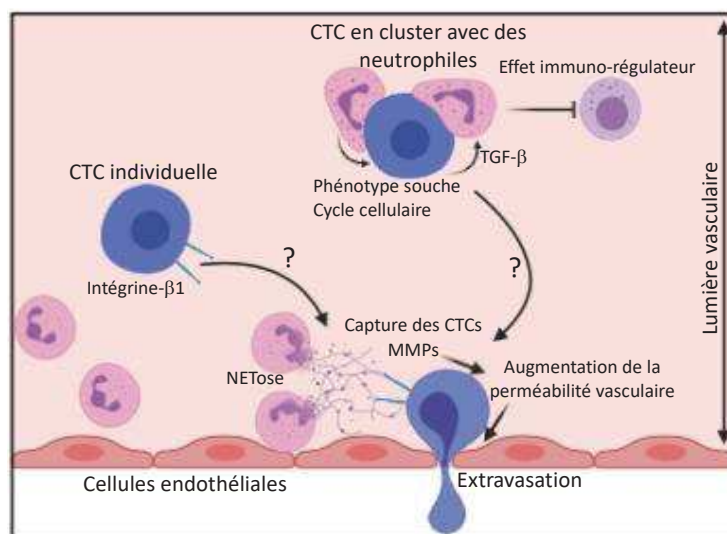
#### e) Extravasation

Avec un diamètre luminal moyen de 8  $\mu\text{m}$ , les capillaires sanguins bloquent en réalité très vite la circulation des CTCs. La majorité des CTCs sera donc filtrée par les organes les plus proches. C'est d'ailleurs cette explication qui est donnée pour la forte présence de métastases dans les os et les poumons dans le cas du cancer du sein et dans le foie puis les poumons pour le CCR [530]. Nous l'avons déjà évoqué, dans le cas du CCR, le foie est drainé directement après le colon par la veine porte. Celui-ci agit donc comme un filtre majeur des CTCs. Une étude dénombrant le nombre de CTCs colorectales au niveau de la veine porte et dans le sang périphérique a confirmé le rôle majeur de filtre du foie [531]. À l'opposé de cette dissémination passive, certaines études proposent que les CTCs ont une capacité à cibler spécifiquement certains organes grâce à l'expression de récepteurs captant des chemokines propres à un organe particulier. Ces signaux provoqueraient la formation d'adhésions spécifiques aux parois des vaisseaux traversant des organes bien définis. Par exemple, l'expression de la Metadherine par les cellules malignes mammaires facilite leur fixation aux parois des vaisseaux sanguins pulmonaires [532]. Il se pourrait que l'hypothèse la plus juste soit en réalité une combinaison d'une dissémination passive et active. Une étude portant sur des cellules colorectales et pulmonaires malignes a montré que leur rétention au niveau des micro-vaisseaux hépatiques initiait une réaction inflammatoire ressentie par les cellules de Kupffer. Ces macrophages spécifiques du foie vont, en réponse, sécréter diverses chémokines qui vont induire l'expression de récepteurs d'adhésion vasculaires par les CTCs [533]. Il ne faut cependant pas imaginer que l'extravasation est l'exact phénomène inverse à l'intravasation. Premièrement, les macrophages du site primaires qui avaient permis l'intravasation sont, a priori, différents phénotypiquement de ceux présents dans le site secondaire et il n'y a également pas de contact direct entre la cellule cancéreuse et le macrophage pour stimuler la formation d'invadopodes. De plus, la tumeur primaire avait stimulé la formation de nombreux néo-vaisseaux dont la particularité est d'être tortueux et perméables. Ce qui n'est pas encore le cas dans les organes cibles. L'extravasation des CTCs requiert donc des acteurs et/ou des mécanismes différents de ceux impliqués dans l'intravasation. Les premiers acteurs décrits comme facilitant l'extravasation des CTCs sont les plaquettes agrégées sur les CTCs. Nous l'avons évoqué, Labelle *et al* ont en effet décrit la synergie entre la voie du TGF- $\beta$  et la voie NF- $\kappa\text{B}$  dans le maintien ou l'acquisition du phénotype mésenchymateux des CTCs grâce aux plaquettes. Ils ont



également constaté un plus grand nombre de métastases lorsqu'ils injectaient de cellules cancéreuses recouvertes de plaquettes. A cause de leurs capacités de migration par des adhésions bien particulières et leur capacité à dégrader la lame basale (que nous avons précédemment détaillé), les auteurs concluent donc que la formation de métastases est la conséquence d'une extravasation plus efficace des CTCs mésenchymateuses [515] (Figure 27). Plus récemment, les neutrophiles ont émergé également comme acteurs de l'extravasation des CTCs. Une première étude avait constaté une augmentation de l'adhésion de CTCs dans les sinus hépatiques suite à une inflammation provoquée par l'injection de lipopolysaccharide (LPS), une molécule bactérienne. Connues pour leur rôle antibactérien, les auteurs se sont donc intéressés en particulier aux neutrophiles. Leur déplétion a abrogé l'adhésion des CTCs dans les sinus hépatiques ainsi que la formation de métastases [534]. Cette même adhésion des CTCs dans les micro-capillaires grâce aux neutrophiles fût constatée au niveau pulmonaire ([535]. Cette adhésion des CTCs a été comprise en 2013 par l'équipe de L.Ferri qui a constaté que la mortalité due aux métastases était plus forte chez les patients atteints d'infections suite à la résection de leur tumeur primaire colorectale [536], [537]. Les auteurs ont simulé la circulation de CTCs par l'injection intra-splénique de cellules cancéreuses pulmonaires dans des souris ayant une infection bactérienne. Ils constatent que l'adhésion des CTCs aux micro-capillaires est dépendante de la NETose des neutrophiles et que cette adhésion est également reproductible *in vitro* après traitement des neutrophiles par du LPS. L'élimination de ce réseau d'ADN des neutrophiles par injection systémique de DNase empêchait l'adhésion des CTCs et la formation de métastases [538]. Plus récemment, le même laboratoire a identifié une interaction des cellules cancéreuses avec le réseau d'ADN des neutrophiles grâce à l'expression de l'intégrine- $\beta 1$  en particulier en contexte inflammatoire [539]. Bien que réalisées dans un contexte simulant à la fois l'infection bactérienne post opératoire et simulant la présence de CTCs par injection de cellules cancéreuses, ces études permettent de mieux comprendre et de visualiser *in vivo*, la capture des cellules grâce à la NETose des neutrophiles. La dernière étude démontre également que la présence du réseau d'ADN des neutrophiles augmentait localement la perméabilité des micro-capillaires, facilitant l'extravasation tumorale. Ces travaux font également écho à la co-circulation des CTCs avec les neutrophiles démontrée par l'équipe de N.Aceto et il serait intéressant de suivre ces clusters afin de confirmer si ces mêmes neutrophiles vont entrer en NETose pour faciliter l'adhésion des CTCs aux cellules endothéliales et augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins (Figure 28). Enfin, la perméabilité endothéliale dans les sites distants peut être provoquée de manière indirecte par la tumeur primaire et son microenvironnement. De nombreux facteurs induisant une hyperperméabilité endothéliale sont sécrétés au niveau du site primaire et retrouvés dans le sang. Parmi eux, on retrouve COX-2, les MMP-1 et MMP-2 et en particulier l'Angptl4. Ces facteurs sécrétés dans le sang ont provoqué sur des modèles murins, la forte diminution de l'étanchéité endothéliales au niveau pulmonaire, facilitant grandement l'extravasation de cellules mammaires

malignes [450], [540]. Étonnement, l'Anglptl4 ne permet pas de faciliter l'extravasation de ces mêmes cellules malignes mammaires dans les os, indiquant qu'elle induit une perméabilité endothéliale spécifique du tissu pulmonaire [450]. Alors que les métastases osseuses sont fréquentes dans les cancers du sein, cette observation suggère que les mécanismes et facteurs impliqués dans la dissémination tumorale sont parfois spécifiques de l'organe cible. Enfin, ces facteurs sécrétés par la tumeur primaires détectés dans le sang induisent une hyperperméabilité pulmonaire avant même que des cellules malignes ne soient détectées dans le sang [541]–[543]. Ceci facilitant à l'avance l'extravasation des futures CTCs. Ce concept nommé niche pré-métastatique est en pleine expansion et nous l'aborderons plus tard mais il permet également de mieux comprendre comment les CTCs parviennent à extravaser.



**Figure 28: Rôle des neutrophiles pour l'arrimage des cellules tumorales circulantes (CTCs) aux cellules endothéliales et leur extravasation.**

*Les CTCs en cluster avec des neutrophiles promeuvent le phénotype pro-tumoral et immuno-régulateur (N2) de ces derniers en sécrétant du TGF-β. En retour, les neutrophiles induisent l'expression de gènes souches et facilite l'avancer du cycle cellulaire. La NETose des neutrophiles circulants et/ou en cluster avec une CTC permet à cette dernière (individuelle ou avec ses neutrophiles) de s'y fixer par l'intégrine-β1 et de stopper sa circulation. Cette NETose libère également des métalloprotéases, augmentant suffisamment la perméabilité vasculaire pour faciliter l'extravasation de la CTC. Adaptée de Heeke, S. et al. Cells 2019*

## f) Caractérisation des CTCs :

### i. Moléculaires

Grâce au dispositif CellSearch®, en plus de leur très faible nombre, nous savons que les cellules tumorales colorectales circulantes peuvent avoir un phénotype épithélial puisque certaines expriment des cytokératines et surtout EpCAM. L'expression du récepteur à l'EGF (EGFR) par les CTCs est également confirmée dans diverses études [544], [545] et l'amplification du gène codant pour ce récepteur n'était pas toujours identique à celle retrouvée dans la tumeur primaire ni identique entre les différentes CTCs [546]. Cette observation confirme qu'en plus de la diversité phénotypique (épithéliale et mésenchymateuse), on retrouve une diversité génétique entre les CTCs qu'il est important de considérer afin de mieux lutter contre les métastases. Pour prendre en compte cette diversité génétique, l'EGFR fût proposée comme un marqueur complémentaire à EpCAM afin d'isoler les CTCs puisqu'il était retrouvé sur les CTCs de 15% des patients métastatiques. Cependant ce marqueur était également présent dans le sang de 10% des individus sains étudiés en comparaison [547]. L'antigène carcino-embryonnaire (CEA) est également exprimé à la membrane des CTCs de 66% des patients atteints d'un CCR métastatique. Mais de nouveau il est détecté dans le sang d'environ 20% des individus sains [548]. Malgré les quelques adaptations que l'on peut par exemple apporter au CellSearch® pour tester la présence d'un potentiel nouveau marqueur, les technologies utilisées jusqu'à présent ne donnaient que des informations assez limitées et les cellules étaient étudiées une fois fixées (donc mortes).

Une caractérisation plus approfondie nécessite de travailler à partir d'une plus grande quantité de matériel biologique et donc de cultiver les CTC. Malheureusement, quel que soit le type de cancer, la culture de CTCs, en condition d'adhérence est inefficace. D'autant plus qu'une étude a démontré que sur les quelques CTCs colorectales présentes dans un tube de sang, une partie non négligeable était en train d'entrer en apoptose [549]. Suite à l'établissement de 6 lignées de CTCs mammaires dans les conditions classiquement de culture des CSCs, les mêmes conditions de culture ont été utilisées par notre équipe suite à une déplétion des cellules sanguine par le RosetteSep®. Après de très nombreuses tentatives avortées, une première lignée, CTC41 a été établie en suspension à partir d'un patient (que nous nommerons patient 41) ayant un nombre anormalement élevé de CTCs dénombrées par le dispositif CellSearch® (>500). L'analyse de certains transcrits et protéines de cette lignée a révélé que la lignée CTC41 était clairement épithéliale (forte expression des cytokératine, d'EpCAM et de l'E-cadhérine) et avec un forte potentiel souche (expression de l'ALDH1, CD133 et CD44). Une analyse du profil mutationnel a révélé l'absence de mutation sur le gène *Kras* et une mutation *Braf-V600E* concordante avec le profil mutationnel de la tumeur primaire et la métastase ganglionnaire. Enfin, cette lignée sécrétait une forte quantité de VEGF, d'ostéoprotégerine et de FGF2. La production en particulier de VEGF amena tout naturellement à cultiver cette lignée de CTC pendant 48h puis d'utiliser ce

milieu conditionné sur des cellules endothéliales. Comme attendu, ce milieu conditionné avait été fortement enrichi en facteur favorisant la prolifération des cellules endothéliales mais surtout cette prolifération était organisée de manière tubulaire [550]. Ce résultat met en lumière la capacité intrinsèque des CTCs à stimuler la néo-angiogenèse afin de potentiellement, faciliter leur dissémination. Deux autres nouvelles lignées ont été ensuite établies de la même manière ; CTC44 et CTC45 [481]. Les trois lignées provenaient à chaque fois de patients naïfs de tout traitement et atteints d'un CCR métastatique et toutes portent la mutation *B-RAF V600E*. Cependant, deux nouvelles lignées portent une mutation discordante avec celle retrouvée à la fois au niveau de la biopsie de la tumeur primaire et d'une des métastases hépatiques. Les lignées établies également depuis des exérèses de la tumeur primaire (pour le patient 44) et une des métastases hépatiques (pour le patient 45) n'ont pas la mutation *B-RAF V600E*. Les hypothèses expliquant cette discordance seront abordées plus tard dans la partie résultats. Cependant ces discordances mutationnelles rappellent les divergences d'expression du récepteur HER2 pour une lignée de CTCs mammaires et sa tumeur primaire [493] et démontre une fois de plus, l'intérêt des CTCs dans l'étude et le suivi de l'évolution clonale afin de comprendre l'hétérogénéité intra-tumorale. Parmi les autres similitudes observées avec CTC41, ces deux nouvelles lignées sont fortement épithéliales et souches. Des marquages par immuno-fluorescence sur des sphères ont montré que ces lignées ont également des capacités de différenciation puisqu'elles génèrent des cellules exprimant des marqueurs typiques de cellules intestinales différenciées tels que la Mucine-2, la villine et la chromogranine A. Les capacités métastatiques des CSCs colorectales étant corrélées à l'expression de CD44v6, mon équipe a quantifié l'expression des marqueurs invasif CD26 et surtout CD44v6 sur les lignées de CTCs puisque celles-ci ont un phénotype très souche et comme objectif de former des métastases. Au niveau transcriptionnel, les marqueurs de surface CD26 et CD44 (toutes les isoformes) sont plus exprimés par les 3 lignées de CTCs que par les lignées colorectales établies à partir de tumeurs primaires ou de métastases hépatiques ou encore en comparaison à la lignée commerciale de CCR, HT29. Mais au niveau protéique, et dans les mêmes conditions de culture, seule l'isoforme v6 de CD44 était très fortement et spécifiquement exprimée par les lignées de CTCs en comparaison aux autres lignées. Ce résultat indique donc qu'en plus d'exprimer de nombreux marqueurs de CSC, ces trois lignées de CTCs auraient une forte capacité à initier des métastases.

## ii. Fonctionnelles

Chacune des 3 lignées ont formé une tumeur dans des souris immunodéprimées après injection sous-cutanée. Ces tumeurs présentaient des analogies histologiques avec la tumeur primaire du patient selon les anatomopathologistes. En plus de leur pouvoir tumorigène, le potentiel métastatique suggéré par l'expression de CD44v6 et CD26 a été démontré pour la toute première

fois sur des CTCs colorectales par la formation de métastases suite à leur injection intra-splénique dans des souris immunodéprimées. Déjà démontré à partir de CTCs mammaires directement injectées après isolation dans la cavité médullaire du fémur de souris immunodéprimées [501], ce résultat confirme de nouveau la capacité des CTCs à générer des tumeurs dans des organes distants.

Les lignées de CTCs représentent également un outil précieux afin de tester la sensibilité de ces cellules à certaines molécules mais également pour tester des combinaisons de thérapies. Par exemple, dans le cas des 6 lignées de CTCs mammaires établies à partir de patientes atteintes de cancers du sein liminaux et métastatiques, toutes avaient déjà subi des traitements hormonaux (Tamoxifène, Fulvestrant, Raloxifène ou Bazedoxifène) et des chimiothérapies (Paclitaxel, Doxorubicine ou Capecitabine). La résistance de leur cancer se vérifiait parfaitement lorsque les mêmes molécules étaient appliquées sur les lignées de CTCs. L'utilisation d'un inhibiteur de la protéine mTOR ou de la protéine HSP90 combinée aux traitements hormonaux même à de faibles concentrations, sensibilisaient les CTCs à des composés pour lesquelles elles ne répondaient plus même à de hautes doses [493]. L'analyse du profil mutationnel de ces lignées permit notamment de comprendre cette re-sensibilisation. De la même manière que les CTCs mammaires, les CTCs colorectales représentent un outil pratique pour prédire la réponse à un traitement et élaborer des stratégies de combinaison thérapeutiques. D'autant plus que pour certaines chimiothérapies, les CTCs sont plus chimio-résistantes que des cellules de la tumeur primaire et que cela est au moins dû à leur meilleure réponse aux dommages de l'ADN [551]. Nous avons vu qu'une des caractéristiques des CSC étaient d'avoir une forte chimiorésistance due à divers mécanismes. Sachant qu'une partie des CTCs a un phénotype CSC et donc une chimiorésistance élevée, il est donc d'autant plus important de comprendre cette résistance pour mieux cibler les métastases et éviter les rechutes. A l'instar des CSC, les 3 lignées de CTCs colorectales sont effectivement résistantes à la combinaison de chimiothérapie FOLFIRI (5-FU et Irinotécan) la plus communément utilisée dans le traitement du CCR. Parmi les mécanismes connus pour être mis en place par les CSC afin d'échapper aux chimiothérapies, mon laboratoire a observé une forte expression des gènes codant pour les pompes à efflux telles que UGT1A et ABCG2 permettant de comprendre la résistance des CTCs. Une stratégie thérapeutique visant à inactiver ces pompes permettrait par exemple de sensibiliser les CTCs au FOLFIRI. Ces conclusions ouvrent ainsi la perspective à long terme d'utiliser les CTCs comme un nouvel outil de médecine personnalisée à disposition des oncologues, en particulier lorsque le patient est à un stade III et que l'on n'a pas encore pu détecter de métastases.

### 3. Colonisation des sites secondaires : les métastases

Les métastases représentent l'étape finale du long processus biologique nommé cascade métastatique. Cette ultime étape repose obligatoirement sur l'adaptation des cellules tumorales disséminées (CTDs) à leur nouvel environnement. Cette dernière étape est aussi difficile à surmonter que les étapes précédentes de la dissémination, démontrant que la formation de métastase est un processus très inefficace [552]–[554]. Dans l'étude qui date de 1998 par exemple, 200 000 cellules de mélanome murin radio-marquées et injectées dans la veine de souris syngéniques immunocompétentes, ne forment en moyenne que 78 micro-métastases. De plus, sur les 36% de cellules parvenues à extravaser et encore en vie, 1 sur 40 parviendra à former une micro-métastase et seulement une de ces micro-métastases sur 100 parviendra à évoluer en macro-métastase. Bien qu'il s'agisse d'un modèle simulant la dissémination et qu'il n'y a pas d'initiation tumorale du site primaire, ces données indiquent que les organes distants sont un environnement peu propice à la formation de métastases. Prises ensembles, ces données soutiennent l'hypothèse du « seed and soil » (pour graine et sol) proposé par Stephen Paget en 1889. Cette hypothèse repose sur l'analogie que les CTDs sont comme des graines qui « peuvent seulement vivre et proliférer si elles sont plantées dans le bon terreau (sol) » [555]. De plus, les données cliniques indiquent qu'un type de tumeurs va préférentiellement disséminer dans une série d'organes spécifiques tandis que d'autres organes semblent épargnés. On parle alors d'organes dont l'environnement est dit « permissif » pour le développement de micro puis de macro-métastases et à contrario, on parle d'organes dont l'environnement est « restrictif » pour le développement de métastases. Il est cependant important de préciser que la définition d'un organe permissif ou restrictif peut évoluer dans le temps et que pour un même organe, il peut se trouver des zones dites permissives et d'autres restrictives. Il faut donc ajouter au concept de « seed and soil », la notion de régulation spatio-temporelle du microenvironnement métastatique pour mieux comprendre la dissémination tumorale. La section suivante abordera tout d'abord les sites métastatiques préférentiels du CCR puis l'influence du microenvironnement de l'organe hôte sur la possibilité de développement des métastases.

#### a. Sites métastatiques du CRC

Les métastases sont diagnostiquées dans 40 à 60% des cas de CCR et une grande part (25%) sont des cas de métastases synchrones. Ce sont des patients avec une tumeur de stade IV pour qui le diagnostic du CCR est concomitant au diagnostic de métastases à distance. Les autres cas sont des patients avec des tumeurs de stade II et III pour qui on va observer la survenue de métastases dans les 5 années suivant la résection de la tumeur primaire et dans les 3 années après le traitement curatif pour 80% des cas [556]. On parle dans ce cas de métastases métachrones [557]. Deux possibilités, non exclusives, peuvent expliquer ces métastases métachrones. Premièrement,



il peut s'agir de micro-métastases trop petites pour être détectées lors du diagnostic et qui ont évolué en macro-métastases dans les années suivant la résection primaire. La deuxième possibilité est la persistance résiduelle de cellules tumorales suite à la résection primaire et dont l'acte chirurgicale peut faciliter la dissémination. La récurrence tumorale se manifestera par la formation de métastase plus que par la formation d'une nouvelle tumeur au niveau du site primaire. Dans le cas des CCR, il s'agit très largement de métastases hépatiques, de carcinomes péritonéales, parfois de métastases pulmonaires et très rarement de métastases cérébrales (incidence comprise entre 0,6 et 3,2% [558]. Les cas de métastases osseuses sont très sporadiques et leurs fréquences varient entre 1 à 7 % dans le cas de CCR avec des métastases multiviscérales et de seulement 1,1% comme site secondaire isolé [559].

Il est communément décrit que le développement de carcinomes péritonéales est l'évolution ultime de la dissémination du CCR, c'est-à-dire que l'invasion de la cavité péritonéale est postérieure aux métastases hépatiques [560],[8]. Cependant, environ 40% des patients avec une carcinome péritonéale n'ont aucun autre site métastatique [9]. Ainsi, diverses études récentes indiquent qu'il peut s'agir d'une voie alternative de dissémination du CCR dépendante de caractéristiques biologiques de la tumeur primaire bien particulières et impactant significativement la survie générale des patients (23,3 mois pour les patients avec uniquement des carcinomes péritonéales contre 29,1 pour les patients avec d'autres types de métastases). Il est proposé aujourd'hui que les carcinomes péritonéales proviennent soit directement de la tumeur primaire, soit des métastases hépatiques mais selon des processus biologiques très distincts. Pour les patients avec uniquement des carcinomes péritonéales, des cellules cancéreuses avec des propriétés bien spécifiques, ont donc pu se décrocher de la tumeur primaire, rejoindre la cavité péritonéale pour la traverser et former des métastases. Le drainage lymphatique peut également faciliter l'envahissement du péritoine mais dans les deux cas, la circulation sanguine n'est pas impliquée [560]. Parmi les particularités des patients ayant des carcinomes péritonéales, on retrouve bien plus fréquemment la présence de cellules tumorales portant la mutation *B-RAF V600E* dans la tumeur primaire (27,7% contre 7,3% chez les patients avec d'autres types de métastases). Étonnamment, alors que la présence de métastases uniquement dans le péritoine est corrélée à une plus faible survie globale, la présence de cette mutation V600E de B-Raf n'est pas corrélée à une survie globale plus faible alors qu'elle l'est dans le cas des patients avec des d'autres sites métastatiques [563]. Il a été décrit également que les patients dont la tumeur primaire contient une forte proportion de cellules cancéreuses ayant une signature souche (c'est-à-dire exprimant soit CD133, soit Oct4, soit Notch1 et l'enzyme ALDH1) ont une dissémination préférentielle dans le foie. À l'inverse, les tumeurs primaires contenant peu de cellules cancéreuses avec une signature souche ont plutôt tendance à développer des carcinomes péritonéales, ce qui peut être interprété comme le stade ultime de l'évolution d'une tumeur primaire localement agressive mais peu capable de disséminer via la circulation sanguine à cause

d'une moindre capacité à initier des tumeurs [560]. D'autres particularités biologiques de ce type de métastases commencent à émerger mais nécessitent d'être confirmées. Il serait intéressant de savoir si ces caractéristiques requises pour envahir le péritoine depuis la tumeur primaire se retrouvent également dans le cas d'une invasion péritonéales post-métastases hépatiques.

Contrairement à la carcinose péritonéale, les métastases cérébrales du CCR sont très rarement les seules métastases des patients. Pour l'essentiel des patients avec un envahissement du cerveau, il s'agit de patients avec une tumeur primaire rectale portant souvent une mutation *K-RAS*, qui sont relativement plus jeunes et avec d'abord des métastases pulmonaires [558]. Malheureusement, quel que soit le scénario de dissémination, les stratégies thérapeutiques utilisées (dont la chirurgie lorsqu'elle est possible) sont peu ou non efficaces à la fois sur ces CTDs et sur les métastases observables. En effet, en plus du problème du seuil de détection de ces métastases, seulement 25% sont accessibles à un traitement curatif [564]. Ainsi, les chimiothérapies restent pour le moment, la solution la plus efficace afin d'offrir un répit de quelques mois.

La dissémination lorsqu'elle conduit à la formation d'une métastase est donc un processus extrêmement délétère pour la survie du patient et demeure pourtant un processus extrêmement peu efficace puisqu'elle nécessite un très grand nombre de CTCs puis de CTDs pour générer quelques tumeurs. Nous avons vu en effet qu'une partie seulement des cellules cancéreuses acquerraient la capacité d'envahir les tissus sous-jacents, à extravaser, survivre dans la circulation et bien sûr, extravaser pour s'installer dans un site distant. Cette « installation » est également une étape souvent critique car la majorité des cellules tumorales échouent à acquérir (ou maintenir) la capacité à former une nouvelle tumeur à distance tout en échappant au système immunitaire. Ce faible taux de prise dans les sites distants et l'absence de mutation clairement identifiée comme permettant la formation de métastases, suggère que la génération d'une tumeur secondaire est probablement étroitement liée à un phénotype souche. Les CSCs disséminées auraient certes un avantage non négligeable pour survivre dans un nouvel environnement et initier la formation d'une tumeur secondaire mais ce seul caractère souche n'est pas une garantie parfaite pour la formation d'une métastase. Le microenvironnement du site distant doit pouvoir fournir une niche à ces CSCs pour qu'elles maintiennent ce caractère souche puis soutiennent la croissance tumorale. De plus, en réponse à un microenvironnement peu favorable, les CTDs peuvent entrer en dormance (qu'elles aient un phénotype CSCs ou non) et ainsi attendre durant de nombreuses années, le remodelage du microenvironnement en un microenvironnement pro-tumoral. Le concept de « seed and soil » intègre diverses stratégies selon les propriétés intrinsèques des CTDs mais surtout par l'état dynamique du site distant.

## b. Survie, dormance et prolifération des CTDs : rôle du microenvironnement métastatique

### i. Définition du concept de dormance

Décrit précédemment, les métastases se développent après une période de latence d'environ 5 ans et parfois bien plus. Cette latence est la conséquence de cellules disséminées restées en état dit de dormance dans les organes distants. Nous l'avons évoqué au début de l'introduction, les chimiothérapies cytotoxiques sont efficaces sur les cellules cancéreuses proliférant rapidement et bien moins sur les cellules proliférant peu (comme les CSCs). C'est également le cas pour les cellules cancéreuses en dormance car celles-ci se caractérisent, entre autres, par un arrêt du cycle cellulaire réversible en G0/G1 (contrairement à la sénescence qui elle est irrémédiable). De plus, les cellules dormantes ont une résistance particulière aux signaux provoquant l'apoptose et parviennent également à échapper aux attaques des cellules immunitaires [565]–[567]. Elles peuvent ainsi parfaitement survivre et rester indétectables de nombreuses années après le traitement de la tumeur primaire. Le concept de dormance cancéreuse a été décrit dans la plupart des cancers solides tels que le mélanome, le cancer du poumon, du sein, de la prostate, des reins et du côlon ainsi que pour les cancers liquides tels que la leucémie et le myélome [568]. La latence métastatique a pendant longtemps, assimilée deux notions très distinctes, bien souvent évoquées sous le seul terme de dormance, rendant finalement très floue à la fois la notion d'une masse tumorale dormante et l'état de dormance d'une cellule tumorale [569], [570]. Une masse tumorale dormante reflète une condition où il y a un équilibre entre la prolifération des cellules tumorale et leur mort, conduisant à des lésions micro-métastatiques sans expansion [571]. Une cellule tumorale dormante est une cellule dans un état similaire à la quiescence, c'est-à-dire que son cycle cellulaire s'est temporairement arrêté [572]–[576]. Cette similarité avec la quiescence des cellules souches va au-delà d'un simple arrêt du cycle cellulaire réversible, puisqu'environ 62% des gènes exprimés dans les cellules de follicules pileux, des cellules musculaire ou cellules souches hématopoïétiques (toutes quiescentes) sont surexprimés dans des cellules cancéreuses dormantes de tumeur des voies aéro-digestives supérieures [577], [578]. Le consensus actuel est d'utiliser le terme de quiescence pour des cellules non prolifératives dans un contexte physiologique (par exemple les cellules intestinales de la crypte en position +4) et d'utiliser le terme de dormance dans le contexte pathologique afin d'éviter d'éventuelles confusions. Certaines CTDs dormantes partagent également la même niche que les cellules souches, indiquant que cette niche régule cet état de dormance [579], [580] et que peut-être, la dormance tumorale est un état qui mime la quiescence des cellules souches. L'analyse des gènes communs avec les cellules quiescentes montre que les cellules dormantes expriment également certains gènes souches, leur conférant peut-être, une forme de capacité persistante, mais latente, à initier des tumeurs et ainsi, un avantage adaptatif et de survie pour éventuellement alimenter la formation d'une tumeur. Leur rareté, leur résistance aux chimiothérapies cytotoxiques, cet état non-

prolifératif et l'expression de gènes souches ont pu également contribuer à une confusion entre le concept des CSCs et des cellules dormantes. Il s'agit pourtant bien de deux concepts très distincts. Premièrement, il n'a jamais été démontré que les CSCs étaient en état non-prolifératif mais qu'elles incorporaient des marqueurs de l'ADN, indiquant qu'il s'agit de cellules dont le cycle cellulaire est ralenti mais pas à l'arrêt [581]. Deuxièmement, l'expression commune de gènes souches tels que *SOX2* et *NANOG* ne se vérifie que dans le cas de cellules dormantes de quelques types de cancers [582] mais pas dans d'autres [583]. Enfin, les CSCs se situent au sommet de la hiérarchie de différenciation tumorale et s'auto-renouvellent par des divisions asymétriques, tandis que l'entrée en dormance ne semble pas restreinte aux seules cellules au sommet de la hiérarchie [584].

## ii. Caractéristiques de la dormance et intérêt thérapeutique

À l'image des progrès fait dans l'étude des CSCs, le développement technologique de la cytométrie en flux, du séquençage de l'ARN à l'échelle de cellule unique et l'utilisation de modèles murins transgéniques a permis depuis 15 ans de mieux comprendre les mécanismes régulant l'entrée en dormance (et la sortie) d'une CTDs. On sait par exemple que selon le type de cancer, les CTDs dormantes se localisent dans un microenvironnement bien particulier. Dans le cas de leucémies lymphoblastiques aiguës [585], de myélomes multiples [584] et du cancer de la prostate [586], les CTDs dormantes résident à la surface endostéale des os. Les CTDs dormantes des cancers du sein et mélanomes eux résident plutôt au niveau de sites péri-vasculaires d'organe tels que les poumons, la moelle osseuse, le cerveau mais également la rate et les reins [565], [587], [588]. Provoquer l'entrée en dormance peut cependant être un processus biologique que l'on peut imaginer comme un futur outil de traitement des cancers à moyen terme. Cette idée a émergé à partir du constat que pour de nombreux types de cancers, l'incidence des CTDs dans divers organes, était bien plus grande que l'incidence de métastases dans ces mêmes organes. Certains de ces organes ne seront même jamais le lieu d'un développement métastatique alors que les CTDs persistent. Par exemple, l'incidence de CTDs dans la moelle osseuse des patients atteints d'un cancer gastrique est très forte alors que les évidences cliniques de métastases osseuses sont très rares. Ces CTDs n'ont pas de marqueurs de prolifération et malgré tout survivent très longtemps dans cet état et cet environnement [569], [575], [589]. Des modèles murins pour d'autres types de cancers ont également confirmé ces observations. C'est par exemple le cas de cette élégante étude utilisant la transplantation de moelle osseuses de souris avec des tumeurs mammaires dans des souris syngéniques saines mais préalablement irradiées. Les souris qui développent des tumeurs mammaires grâce à la surexpression spontanée du récepteur (et oncogène) HER2 n'ont jamais plus de 1000 cellules cancéreuses dans un échantillon de moelle osseuse mais ne développent jamais de métastases. Cependant, la transplantation de ces échantillons de moelle

osseuse dans une souris dont l'irradiation vient de détruire les cellules de sa moelle osseuse (les cellules hématopoïétiques), des carcinomes sur-exprimant HER2 se développent dans cette néo-moelle osseuse. La destruction de la moelle ainsi que des cellules qui compose la niche des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) a naturellement stimulé la régénération d'une néo-moelle grâce aux CSHs présentes dans la moelle injectée. Cependant, cette absence de niche a également provoqué la sortie de dormance des CTDs. La production de signaux stimulant la prolifération des CSHs peuvent également participer à ce « réveille » des CTDs [590]. Comprendre les acteurs/facteurs qui maintiennent cette dormance pourrait donc fournir une nouvelle stratégie pour forcer les CTDs en état de prolifération à entrer en état de dormance (l'autre stratégie possible étant d'induire une différenciation terminale). Ces cellules seraient certes résistantes aux chimiothérapies cytotoxiques mais ne représenteraient plus un danger pour le patient. Une fois dormantes, il s'agirait soit d'une thérapie visant à maintenir cette dormance, soit d'une thérapie ciblant les voies de signalisation permettant leur survie grâce à cet état de dormance. C'est ce que propose en particulier les équipes de J.A. Aguirre-Ghiso et M. S. Sosa après avoir profondément disséqué l'induction de la dormance des CTDs de divers cancers dans la moelle osseuse grâce à leurs travaux et ceux d'autres équipes. Brièvement, les protéines impliquées dans la quiescence des CSHs et agissant également sur les CTDs sont : la protéine GAS6, BMP7 et TGF $\beta$ 2, toutes sécrétées par les cellules stromales de la moelle [579], [586], [591], [592]. Sur les CTDs, ses facteurs induisent une inhibition de la MAPK ERK en faveur d'une activation de la MAPK p38 [593], [594]. Cette dernière va indirectement permettre l'expression de gènes codants pour l'arrêt du cycle cellulaire, des facteurs souches et également l'expression des BMP7, du TGF $\beta$ 2 [582], [595]. Ces trois dernières protéines renforcent ainsi cet état de dormance de manière autocrine (Figure 29A). Au niveau de la niche péri-vasculaire des CTDs dans les poumons, la très faible production de BMP7 est compensée par celle de BMP4 tout en induisant le même type de réponse cellulaire [596], [597]. J.A. Aguirre-Ghiso et M. S. Sosa ont développé une Start-Up visant à valider deux molécules capables de maintenir ou forcer les CTDs à entrer en dormance (Figure 29B) [598].

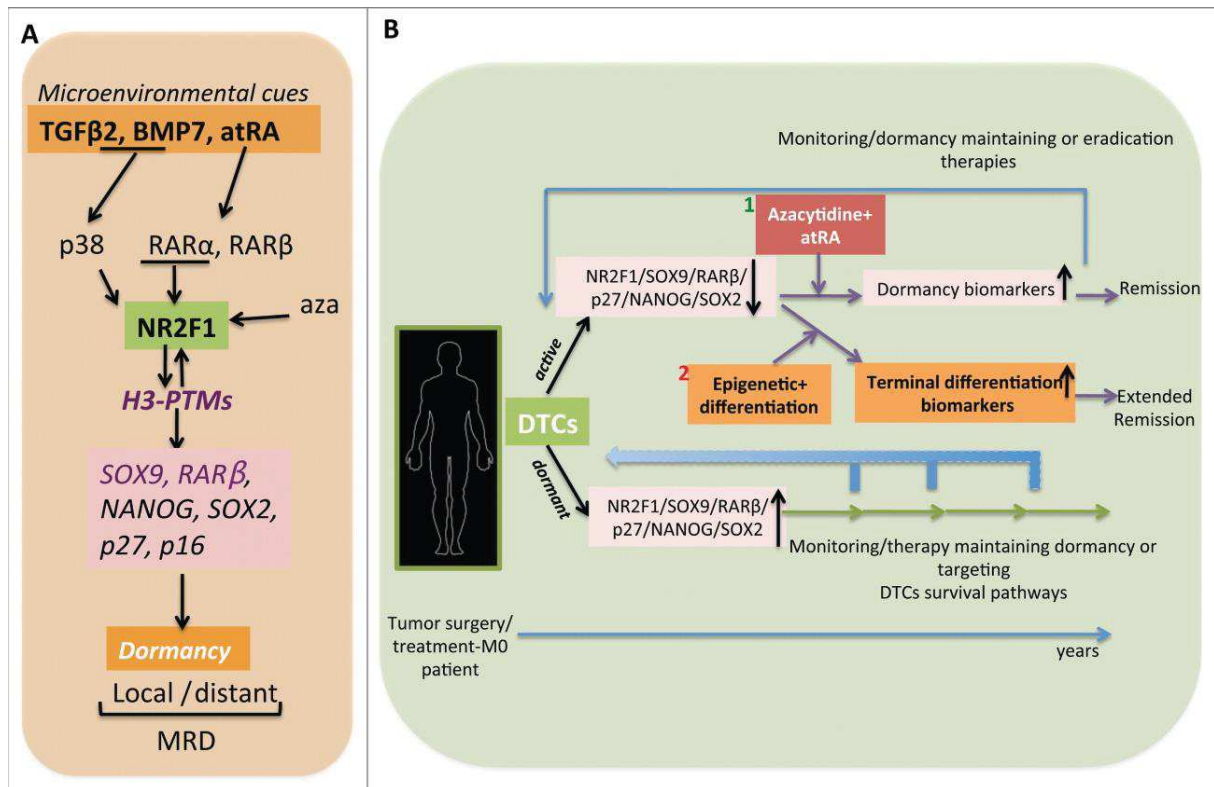


Figure 29: Les programmes de dormance et leurs potentielles cibles thérapeutiques.

(A) La production par le microenvironnement de TGF-β<sub>2</sub>, de BMP7 et d'acide rétinoïque (atRA pour all trans retinoic acid) active le récepteur rétinoïque β (RARβ) et la protéine p38. Des derniers activent le programme de dormance sous contrôle de NRF2F1 (Nuclear recettor subfamily 2, group F, member 1). Ce programme induit l'expression de gènes souches tels que SOX9 et Nanog et de protéine impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire (p27 et p16). De plus, parmi les gènes cibles de ce programme se trouve le gène de RARβ, renforçant le phénotype de dormance. L'administration d'acide rétinoïque ainsi que d'azacytidine (une molécule activant NRF2F1, permettrait de maintenir la dormance. (B) Les scénarios thérapeutiques possibles pour traités les patients sans métastases encore détectées sont soient 1) Provoquer l'entrée en dormance des cellules tumorales disséminées (CTDs) par une combinaison d'acide rétinoïque ainsi que d'azacytidine ou de provoquer leur différenciation afin qu'elles perdent leur capacité à initier une métastase, soient 2) de maintenir la dormance des CTDs. Pour définir la stratégie, le statue de dormance et de « réveil » des CTD serait défini en prélevant la moelle osseuse et analysant le phénotype des CTDs. Issue de Sosa, M. *Molecular & cellular Oncology*. 2015



### iii. Propriétés intrinsèques des CTDs et système immunitaire : régulateurs de l'entrée et sortie de dormance

Dans les organes où résident les CTDs dormantes, le système immunitaire joue un grand rôle dans la sélection des CTDs par la pression anti-cancéreuse qu'il exerce mais également dans leur sortie de cet état de dormance. Pommier, A. *et al* se sont intéressés aux mécanismes permettant aux CTDs dormantes de survivre en échappant au système immunitaire hépatique [599]. Ils ont observé que des CTDs solitaires et non prolifératives perdaient l'expression de l'E-cadhérine, un marqueur épithélial majeur, sans pour autant subir un début d'EMT. Pourtant que cette dernière est connue pour augmenter les capacités d'adaptabilité face à un environnement évoluant et confère également des capacités à initier des tumeurs. Autres modifications notables en comparaison aux macro-métastases, elles n'exprimaient plus la cytokératine19 (exprimée par les cellules pancréatiques) ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-I). Ces cellules dormantes parviennent ainsi à échapper aux lymphocytes T cytotoxiques exprimant le marqueur CD8 (CTL). Quant à la réexpression de ces marqueurs épithéliaux et du CMH-I, elle indique une sortie de dormance et une potentielle élimination par les CTL. En plus de l'arrêt de prolifération, la perte d'expression du CMH-I est induite par la mise en place d'une réponse à un stress du réticulum endoplasmique (RE). Cette expression du CMH-I est régulée par des composants de la machinerie UPR (pour unfolded protein response), une voie de signalisation pro-survie face à une toxicité due à une mauvaise conformation protéique [600].

Cependant, Pommier, A. *et al* observent que d'autres réponses induites par un stress du RE tels que l'IRES $\alpha$  (pour inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ) ne sont pas activées dans ces cellules dormantes et ils proposent donc que la dormance est une conséquence de leur incapacité à résoudre un stress du RE. Ils observent également que ces cellules incapables de résoudre un stress du RE et qui sont peu épithéliales représentent une sous population déjà présente dans la tumeur primaire et propose qu'elles soient à l'origine des CTDs dormantes et persistantes suite à l'élimination par les CTL des CTDs actives. En effet, la déplétion des CTLs ne provoque pas l'élimination des CTDs actives mais également participe de manière non négligeable au « réveil » des CTDs dormantes. Les CTL exercent donc une pression de sélection en faveur des CTDs dormantes. Les auteurs observent que parmi des cellules d'adénocarcinomes pancréatiques cultivées *in vitro*, la sous population dormante isolée régénère spontanément une population majoritaire active et une sous population dormante mais étonnement, la population non dormante est également capable de régénérer les deux populations, indiquant que ce phénotype dormant est plastique [599] (Figure 30).

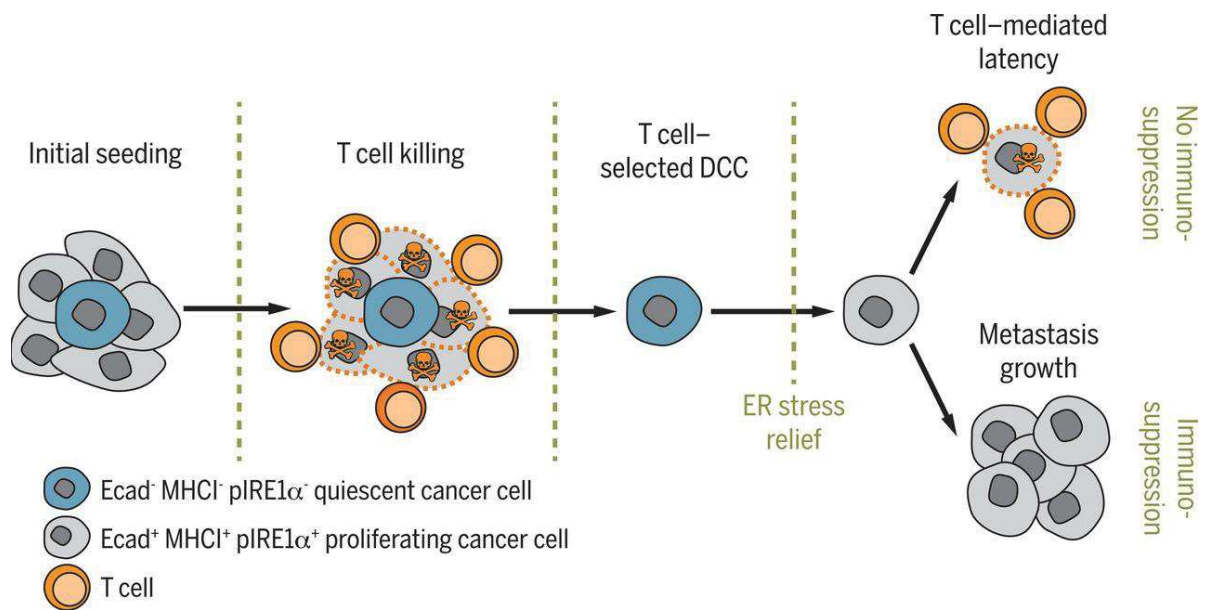


Figure 30: Pression des lymphocytes T cytotoxiques sur les CTDs dormantes.

Parmi les cellules qui composent une micro-métastase, certaines entrent en quiescence de par leur incapacité à résoudre un stress du réticulum endoplasmique. Ce stress provoque leur entrée en dormance et la perte d'expression de l'E-cadhérine, du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) et de IRES (pour inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ). Ces pertes d'expression du CMH-1 et de l'E-cadhérine permettent aux cellules dormantes de ne pas être éliminées par les attaques cytotoxiques des lymphocytes T. Si le microenvironnement est devenu immunotolérant, les CTDs dormantes parvenant à résoudre leur stress du réticulum peuvent sortir de dormance et former une métastase. Si l'environnement est toujours défavorable, les lymphocytes T élimineront ses cellules sorties de dormance à cause de leur réexpression du CMH-1. Issue de Pommier, A. *et al. Science*. 2018

Malheureusement l'étude n'explique pas pourquoi quelques rares cellules initialement capables de répondre à un stress du RE ne le sont plus (et inversement), tout comme elle n'explique pas pourquoi cette dormance se lève spontanément au court du temps dans le foie. Une étude postérieure donne quelques éléments de réponse sur les facteurs provoquant une sortie de dormance des CTDs et pourquoi, ces cellules de nouveau épithéliales et exprimant le CMH-I, parviennent cette fois-ci, à échapper au système immunitaire. La théorie la plus solide est qu'un contexte inflammatoire pouvait impacter les cellules immunitaires tout comme le reste des cellules du tissu hôte mais également directement sur les CTDs dormantes. Récemment, l'équipe de M. Egeblad a démontré qu'une inflammation causée par un composé bactérien (le LPS pour Lipopolysaccharide) ou par le tabagisme provoquait indirectement le « réveil » des CTDs suite à la NETose des neutrophiles pulmonaires. Parmi les composés sécrétés par les neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire, se trouve de nombreuses protéases connues pour dégrader la MEC et la lame basale telles que la NE (pour Neutrophil Elastase) et la MMP-9. Ces dernières vont en particulier cliver la laminin-111 qui va ainsi pouvoir se fixer à l'intégrine  $\alpha3\beta1$  des CTDs dormantes, activant la kinase FAK et provoquer leur « réveil » (Figure 31). De plus, ces protéases dégradent une protéine provoquant un arrêt de prolifération des cellules cancéreuses, la

Thrombospondine-1 (TSP-1), qui est un facteur séquestré au niveau de la lame basale des gros vaisseaux sanguins et produit par les cellules endothéliales et de la moelle osseuse [601], [602]. Cette découverte peut expliquer en partie pourquoi un tabagisme important à la fois avant et après un traitement d'un cancer du sein, augmente les risques de rechute et permet de comprendre pourquoi la niche des CTDs dormantes se situe préférentiellement dans des tissus mous ou peu rigides [603]. Cependant, les patientes non-fumeuses rechutent également, indiquant que d'autres facteurs agissent sur ce « réveil ». Parmi eux, les inflammations et fibroses sont ainsi fortement suspectées comme agissant sur le « réveil ». Le vieillissement jouerait également un rôle potentiellement très important [604]. Ces hypothèses sont d'autant plus plausibles que acteurs impliqués dans l'inflammation sont de nouveaux les cellules immunitaires (dont les neutrophiles [605], [606], les cellules endothéliales et également les fibroblastes de par leur forte capacité à modifier la rigidité d'un tissu.

#### Undetectable disseminated dormant cancer

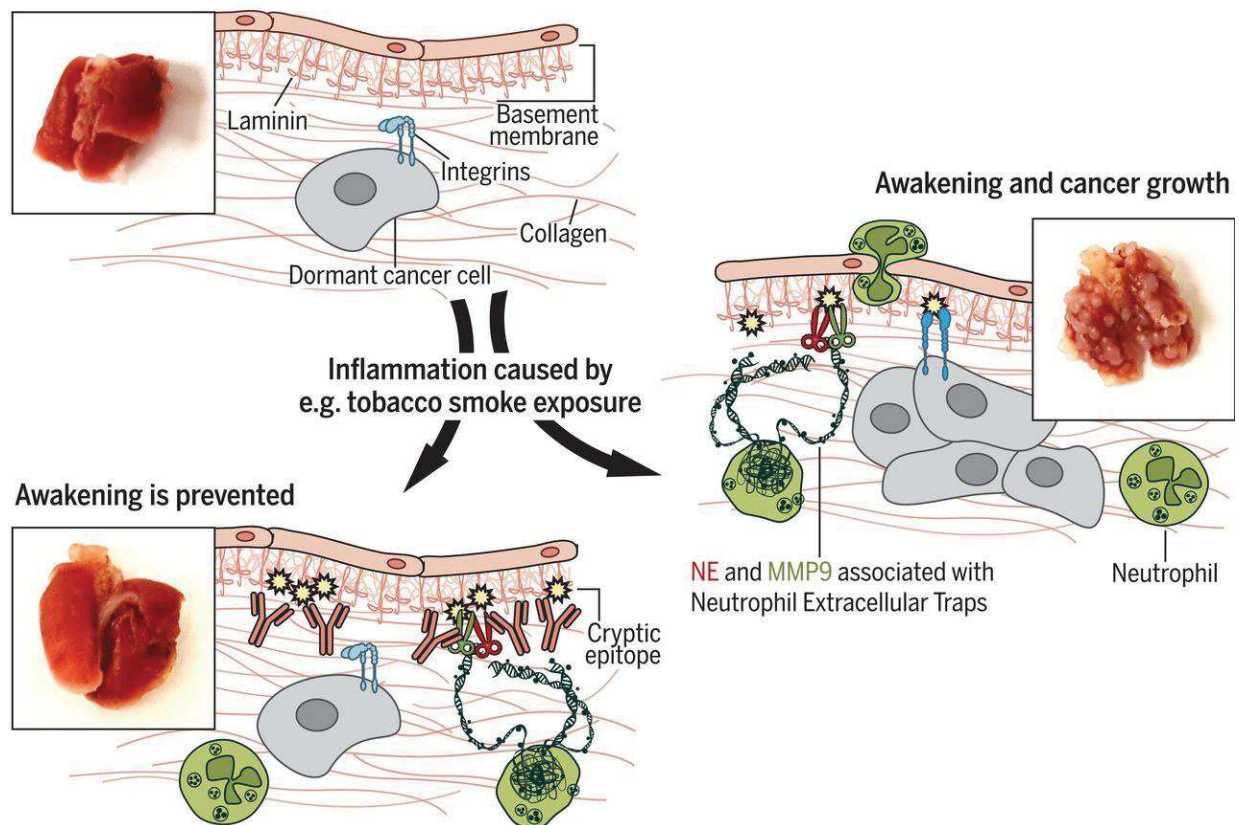


Figure 31: Réveil des CTDs dormantes suite à la NETose pulmonaire.

L'élastase des neutrophiles (NE) et la metalloprotéinase MMP9 libérées lors de la NETose des neutrophiles provoquent le clivage de la laminin111. Ce dernier peut alors se fixer aux intégrines des CTDs dormantes et provoquer leur réveil. L'inflammation due au tabagisme provoque la NETose des neutrophiles et indirectement, le réveil des CTDs dormantes. L'utilisation d'un anticorps contre les protéases libérées par la NETose permettrait d'empêcher leur réveil. Adaptée de Albregues, J. et al 2018.

#### iv. Evidence cliniques et expérimentale de la dormance du colorectal et influence du microenvironnement sur la dissémination.

Comme dans la tumeur primaire, l'augmentation de rigidité de la MEC favorise la croissance tumorale métastatique. Cela se reflète au travers d'une sortie de dormance [607], [608], la libération de cytokines sous forme active tel que le TGF $\beta$ 1 qui entre autres, génère un effet immuno-régulateur et renforce la fibrose [609], ou encore la résistance aux thérapies anti-angiogéniques dans le traitement des métastases hépatiques du CCR [610]. Cette dernière étude indique que la rigidité du microenvironnement des métastases hépatiques est supérieure à celle retrouvée au niveau de la tumeur primaire colorectale mais également à celle retrouvée au niveau des métastases pulmonaires. L'analyse transcriptomique des fibroblastes des métastases hépatiques confirme une signature de fibroblastes associés au cancer (FACs) bien plus prononcée en termes d'activation de voies de signalisation et sécrétions que celle de la tumeur primaire. En lien avec une autre étude qui démontre que les métastases pulmonaires du CCR contiennent moins de FAC que les métastases hépatiques [611], l'ensemble de ses données conforte l'hypothèse qu'en plus d'une plus grande distance avec le foie, les CTDs colorectales ont probablement de plus grande chance de sortir de dormance puis de former une macro-métastase hépatique que pulmonaire.

Des évidences cliniques et expérimentales de CTDs dormantes dans le cas du CCR existent, et l'IRES $\alpha$ , clairement impliqué dans la dormance dans certains types de cancers, s'avère également capable d'impacter la croissance tumorale colorectale [612]. Cependant, aucune étude n'a pour le moment démontré son implication dans le cas précis de la dormance colorectale. Une seule étude très récente a commencé de décrypter l'implication d'une protéine dans la dormance des cellules colorectales métastatiques. Zhu, X. *et al* [613] ont identifié que la protéine FBX8 était corrélée à certains caractères mises en évidence dans le cas de la dormance dans d'autres cancers tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'expression de gènes souches et l'expression de gènes en réponse à l'hypoxie. Ils ont identifié en particulier FBX8 (pour F-box only protein 8), un membre du complexe des E3 ubiquitines ligases. Jusqu'alors identifié comme une protéine suppresseur de métastase colorectale, cette étude permet de comprendre qu'une partie de cet effet anti-métastatique est dû à l'entrée en dormance des CTDs. En effet, FBX8 peut ubiquitiner et ainsi, induire la dégradation des protéines HIF- $\alpha$ 1, CDK4 et C-Myc, diminuant la capacité des CTDs à promouvoir l'angiogenèse et à proliférer. De plus, la surexpression de FBX8 induit indirectement, une augmentation d'expression des gènes souches (SOX2, SOX9, CD133, CD44 et OCT4), de la Caspase-3 et étonnement, de l'E-cadhérine et des cytokératines. Inversement, il induit indirectement la diminution d'expression de la Cycline-D1, de la vimentine, du VEGF, l'HIF-1 $\alpha$ , CDK4 et C-Myc. Bien que l'essentiel de l'étude soit réalisé à partir de lignées humaines de CCR injectées dans des souris immunodéprimées et donc sans impact du système immunitaire, il s'agit

de greffes intra-caecales. Elles permettent de replacer les cellules dans un environnement similaire à celui dont elles proviennent et également de simuler de manière plus biologique la dissémination colorectale. Dans un contexte où le système immunitaire est fonctionnel, l'effet anti-métastatique de FBX8 en lien avec le protéasome est tout de même confirmé par une expérience d'injection intra-caecale dans le même fond génétique murin que les cellules injectées. Ils n'ont cependant pas vérifié dans ce cas-là, l'impact de la surexpression de FBX8 ou l'inhibition du protéasome sur l'expression des gènes de dormance identifiés. Cette première étude nécessitera d'autres études confirmant ces observations qui sont dans le cas du maintien du phénotype épithélial très inattendues dans un contexte de dormance et surtout, il sera nécessaire de prendre en compte le système immunitaire dans l'entrée et sortie de dormance. La littérature concernant l'implication du système immunitaire dans la dissémination du CCR et les liens établis entre la dormance et le système immunitaire dans d'autres types de cancer nous permet de suggérer un ensemble d'hypothèses, en particulier sur le rôle des neutrophiles au niveau des sites métastatiques du CCR.

Dans une vaste étude portant sur l'agressivité des CCR grâce à différents modèles murins transgéniques, l'équipe de O.J. Sansom a identifié une série de mutations récapitulant la signature transcriptomique et la très forte agressivité des cancers colorectaux du sous-type molécule 4 [614]. Pour rappel, cette classification prend en compte la signature transcriptomique des cellules cancéreuses mais également du stroma tumoral. Ces tumeurs CMS-4 ont comme particularités de contenir de nombreuses cellules tumorales mésenchymateuses, une forte infiltration fibroblastique et de cellules immunitaires innées ainsi que des voies du TGF $\beta$ 1 et VEGF particulièrement actives. Le profil mutationnel des cellules cancéreuses ainsi que la morphologie de la tumeur indiquent que ce sont essentiellement les tumeurs séreuses (dont la mutation initiatrice concerne essentiellement *K-RAS* et parfois *B-RAF*) que l'on classifie dans le CMS-4. Les adénomes de types séreux progressent en effet très vite en carcinomes de haut grade et sont de bien moins bon pronostic que les adénomes tubulaires (dont le « gatekeeper » est APC). Malheureusement, les modèles murins transgéniques permettent d'étudier la formation et le développement des tumeurs primaires colorectales mais très peu la dissémination à la fois parce que la combinaison de gènes altérés ne confère pas une capacité de migration comparable à celle observée chez l'humain, et surtout parce que les tumeurs primaires provoquent rapidement la mort des animaux à cause d'obstructions, d'anémies et de prolapsus.

Cependant, les auteurs de cette étude sont parvenus à développer un type bien particulier de modèle murin transgénique parvenant lui de permettre la dissémination tumorale avant la mort des animaux. Connue pour contribuer à l'acquisition d'un phénotype CSC et renforcer les capacités d'invasion et de dissémination, la voie NOTCH a été démontrée comme fortement corrélée au sous type molécule de classe 4 (CMS-4) du CCR par l'équipe de O.J. Sansom. De plus, les cellules



colorectales disséminées dans le foie des patients avaient une voie Notch très active en comparaison avec les tumeurs primaires. En générant un modèle murin transgénique où ils induisent une inactivation de p53 et une activation constitutive de K-Ras et Notch1, Jackstadt, R. et al sont parvenus à développer un modèle murin permettant d'étudier efficacement la dissémination du CCR de type séreux. Bien qu'il s'agisse d'un modèle récapitulant la cascade métastatique d'un type bien spécifique de CCR, Notch1 joue un rôle capital puisqu'il permet l'expression du TGFβ2 ainsi que de nombreuses chemokines (CXCL5, le G-CSF et l'IL6) induisant une forte accumulation de neutrophiles dans le sang, la tumeur primaire et les sites métastatiques. L'inactivation de leur récepteur au TGFβ2 où la déplétion des neutrophiles montre une forte réduction du nombre et taille des métastases corrélée à une plus forte présence de CTL. Ainsi, ces cellules cancéreuses de tumeurs séreuses parviennent grâce aux facteurs sécrétés via la circulation sanguine, à stimuler la production et le recrutement des neutrophiles afin d'établir un microenvironnement métastatique favorable et d'abolir la latence tumorale observée dans les autres modèles de tumorigenèse colorectale murine [614]. L'étude ne précise malheureusement pas si ce recrutement hépatique de neutrophiles est antérieur et/ou postérieur à l'installation de CTDs.

Il est cependant tout à fait permis de penser que la tumeur primaire prépare une niche pré-métastatique par la sécrétion de facteurs solubles dans le sang ou contenus dans des exosomes. Un modèle murin et des données cliniques du cancer de l'ovaire ont démontré le recrutement de neutrophiles au niveau du site métastatique avant la dissémination et que leur NETose permettait à la fois la capture des CTCs et l'installation d'un microenvironnement favorable à la prolifération des CTDs [615]. Dans le cas du CRC, une étude récente démontre par exemple que ce sont particulièrement les CSC du site primaire qui sont à l'origine de chemokine pour attirer les neutrophiles mais aussi d'exosomes. Ces derniers contiennent de courts ARN qui vont prolonger la survie des neutrophiles depuis la moelle tout en leur conférant un phénotype N2, leur permettant de vivre suffisamment longtemps pour rejoindre la tumeur et y générer un environnement pro-tumoral [616]. Ces mêmes sécrétions solubles ou dans des exosomes pourraient cibler des organes distants afin de préparer une niche pré-métastatique. Quelques évidences en ce sens émergent, en particulier en ce qui concerne les exosomes [617]. Par exemple, Seubert, B. *et al* montrent que la tumeur primaire et son stroma libèrent dans le sang la protéine TIMP-1 (pour tissue inhibitor of metalloproteinases 1) afin de préparer une niche pré-métastatique au niveau du foie [618]. Les cellules hépatiques exposées à TIMP-1 produisent en effet plus de fibronectine, de TGFβ1, d'uPA et également de SDF-1. Ce dernier permet ainsi un recrutement hépatique important des neutrophiles pour établir un microenvironnement favorable aux futures CTDs.



Ces résultats reliés avec l'étude de Yang, L. et al, qui démontre que l'ADN libéré lors de la NETose a un effet chimio-attractant au niveau du foie et des poumons [619], on peut se demander si la tumeur primaire colorectale, via des facteurs solubles et exosomes, prépare une niche pré-métastatique. Le temps de latence pour que le microenvironnement devienne favorable peut dépendre i) du contenu des sécrétions en lien avec le CMS et ii) du remodelage naturel des organes à cause du vieillissement ou accéléré par des causes environnementales (alcool, obésité, tabagisme). Des études sur des modèles murins transgéniques immunocompétents et des données cliniques doivent permettre de relier et valider l'ensemble de ces observations faites dans d'autres cancer.

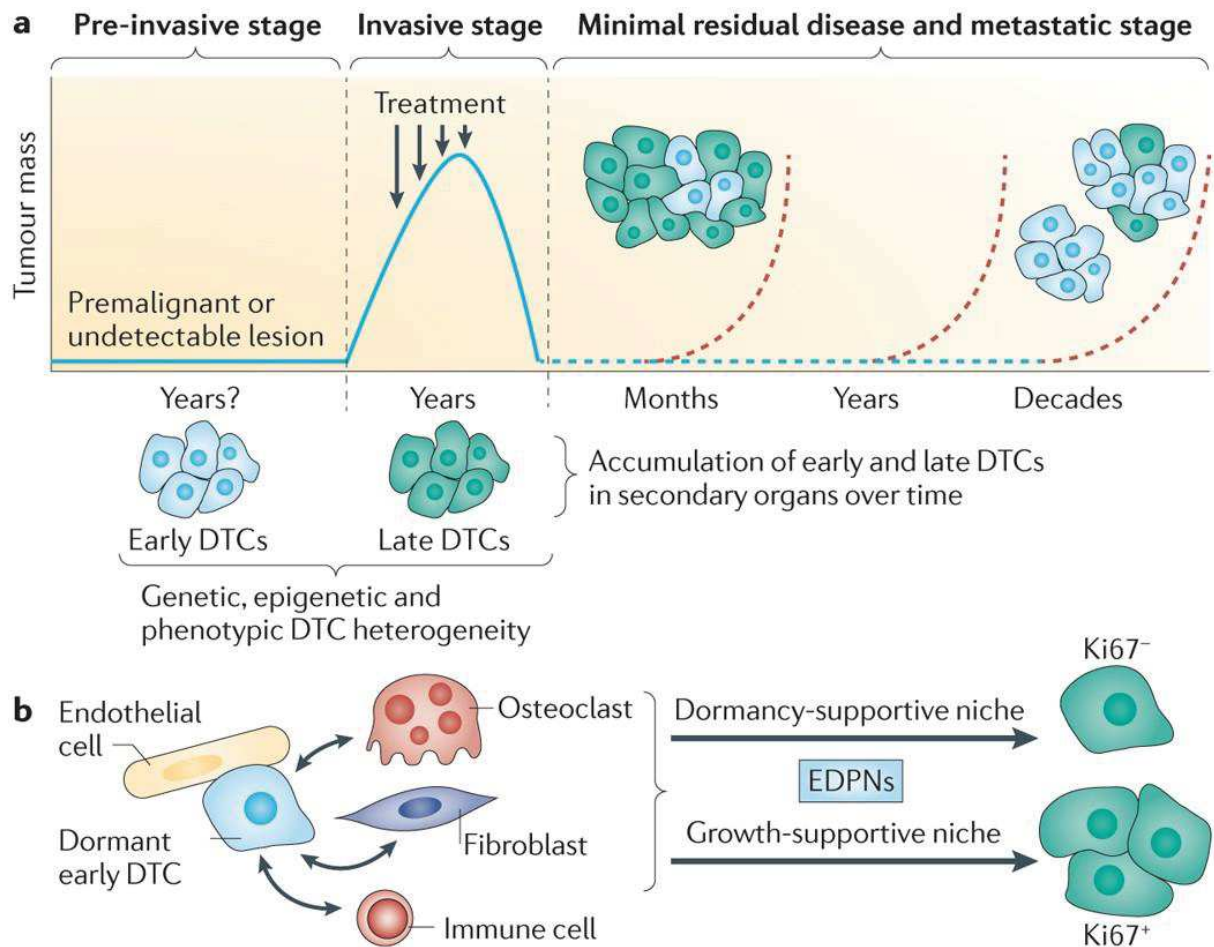
Un dernier processus, qui a émergé très récemment en étudiant la dormance, est également à prendre en compte à la fois pour étudier les acteurs impliqués dans la niche pré-métastatique mais également sur la notion de latence et de résistance des métastases aux chimiothérapies : la dissémination précoce.

### c. La dissémination tumorale : un processus uniquement tardif ?

La dormance des CTD n'est pas un mécanisme biologique exclusif des cellules métastatique provenant d'une tumeur primaire clairement établie, détectable et de stade III. Mise en évidence pour la première fois en 2008 [590], appuyée par la détection de CTD dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques en 2011 [620], [621] puis approfondie par les équipes de J.A. Aguirre-Ghiso, depuis de simple lésions précancéreuses des canaux mammaires, de rares cellules épithéliales entrent en EMT et entreprennent de disséminer notamment dans le poumon tout en étant en dormance une fois dans le site distant [622]. Cette découverte invalide ainsi le dogme que seule l'acquisition d'un phénotype agressif à des stades tardifs permet de rompre la lame basale afin de rejoindre la circulation sanguine et lymphatique au niveau du stroma pour disséminer. Ces CTDs précoces ont une importance capitale dans la lutte contre les métastases car ces cellules vont évoluer de manière différente à celles restées dans le site primaire et donc avoir des caractéristiques différentes aux CTDs tardives. L'hétérogénéité intra-tumorale des métastases devient ainsi plus importante et peut expliquer l'inefficacité de traitements qui pourtant, fonctionnent au niveau du site primaire [576], [589], [623]. De plus, d'après les résultats obtenus sur des modèles murins et des données cliniques, il semblerait que la majorité des CTDs précoces, soient en état de dormance au niveau de l'organe hôte et donc qu'elles puissent être, à elles seules, responsables d'une récurrence de nombreuses années après avoir chirurgicalement retiré la tumeur primaire (Figure 32A) [590], [623]. Enfin, il est également possible que les CTDs précoces puissent simplement être des acteurs majeurs de l'établissement d'une niche pré-métastatique favorisant l'établissement et prolifération des CTDs tardives malgré leur état de dormance ou meurent rapidement (par sénescence ou par des attaques immunitaires) (Figure 32B). Cependant, aucune

étude ne permet pour le moment, de conforter cette hypothèse. Cette préparation de la niche pré-métastatique peut cependant tout à fait être suivie d'un « réveil » et d'une participation « active » à la formation de métastase mixte, c'est-à-dire composé de CTDs précoces et tardives. De nombreux travaux sur divers types de cancer indiquent que la majorité des cellules qui composent les métastases dérivent des CTDs précoces [590], [624]–[626]. Ces études n'excluent pas la possibilité d'un rôle dans la préparation d'une niche pré-métastatique mais elles constatent une évidente participation active des CTDs précoces. Il est possible que les CTDs tardives aient un potentiel métastatique important et génèrent une tumeur plus rapidement. A l'inverse, les CTDs précoces n'ont pas encore ce potentiel métastatique ou du moins ce qui leur permettrait de rendre leur microenvironnement favorable, et qu'elles entrent en dormance pour plusieurs années voir des dizaines d'années le temps qu'un remodelage du microenvironnement s'opère. Il a en effet été démontré dans le mélanome grâce à un modèle murin que tant qu'il y avait une activité cytotoxique des CTL, les CTDs précoces restaient en dormance et il ne se développait pas de métastases [627]. La tumeur primaire quant à elle, si elle n'est pas détectée et réséquée, continue d'évoluer.

Démontrée solidement tout d'abord dans le cancer du sein [590], [622], [626], la dissémination précoce a été suspectée et validée dans d'autres cancers, par exemple suite à la détection de très rares cellules épithéliales circulantes dans le sang de patients ou de CTDs dans la moelle osseuse à des stades très précoces [274], [574], [628] et grâce à des modèles murins transgéniques du cancer du pancréas [274] ou du mélanome [627].



Nature Reviews | Cancer

Figure 32: Dormance des sous-populations de CTDs

(A) Parmi les premières cellules transformées au niveau des pré-lésion cancéreuses, certains parviennent très tôt dans l'initiation tumorale à disséminées. Elles restent en dormance tandis que la tumeur primaire évolue. À des stades plus tardifs, de nouvelles cellules parviennent à disséminer. La prise en charge du patient permet d'éliminer la tumeur et de stopper la dissémination. Les cellules tumorales disséminées parviennent après des mois ou des décennies à sortir de dormance et former des métastases soit à partir des CTDs précocement soit à partir des différentes CTDs. (B) Les interactions des CTDs précocement avec les cellules stromales peuvent générer un microenvironnement poussant les futures CTDs à entrer en dormance ou un microenvironnement stimulant leur prolifération. Issue de Sosa, M. et al. Nat. Rev. Can. 2014.

#### d. Modèles murins et observations cliniques dans les autres cancers

##### i. Observations cliniques dans le CRC

Dans le cas du cancer colorectal, une accumulation d'études cliniques suggère que le processus de dissémination précoce est possible. Tout d'abord, plusieurs équipes ont pu détecter des cellules épithéliales circulantes (CECs) dans le sang de patients à différent stades [629] et également dans le cas de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [630]. Bien que ces études ne permettent pas de confirmer qu'il s'agit de cellules cancéreuses circulantes, le nombre de CECs est significativement plus important par rapport à des patients sains et statistiquement plus élevé d'un stade à un autre. Notons que cette augmentation de CECs

présumées cancéreuses peut être biaisée par la non prise en compte des CTCs mésenchymateuses. Au niveau de la moelle osseuse, une étude portant sur plusieurs types de cancers dont le CCR, démontre qu'il est possible de détecter des CTD (solitaire, micro et macrométastases) dans la moelle osseuse de patients de tout stade et de les cultiver *in vitro*. Cette étude démontre que les CTDs colorectales parviennent à proliférer *in vitro* alors que l'incidence des métastases osseuses est très rare, supposant que la dissémination dans le compartiment osseux est fréquente mais que le microenvironnement maintient les CTDs en dormance ou que la masse tumorale est contenue. Malheureusement, par un manque d'effectif, il n'est pas possible dans l'étude de savoir si dans le cas uniquement des patients CCR, des CTDs étaient détectées puis cultivées *in vitro* car les auteurs ont comparé le nombre de CTDs dans la moelle osseuse selon le stade en regroupant l'ensemble des 4 cancers étudiés. De nouvelles études cliniques très récentes, se basant sur la cinétique d'apparition des mutations et leur comparaison entre le compartiment métastatique et la tumeur primaire, démontrent que les cellules métastatiques sont moins mutées que les cellules des tumeurs primaires à des stades tardifs et que les mutations « drivers » seraient acquises très précocement [631], [632]. Le développement d'un modèle transgénique murin reste nécessaire afin de mieux comprendre les processus biologiques permettant la dissémination précoce du CCR afin notamment de savoir dans quelle mesure cette dissémination précoce participe à la formation de métastases.

## ii. Modèles murins de dissémination tumorale dans le CRC

Au cours de cette introduction, nous avons souvent évoqué des résultats obtenus à partir de modèles murins transgéniques ou de modèles murins où des cellules cancéreuses sont injectées dans un site spécifique (sous-cutané, intraveineux, intra-caecal ou intra-splénique) selon la question biologique posées et le stade de la tumorigenèse que l'on souhaite étudier.

Le premier modèle génétique permettant une perte de fonction du gène *Apc* a été le modèle murin *Apc<sup>min</sup>*. Cette perte fonctionnelle de la protéine APC est due à une mutation SNP (pour Single Nucleotide Polymorphisme) responsable de la transversion du nucléotide T en A à la position 2549 sur un des deux allèles. Cette mutation non-sens modifie le cadre de lecture et conduit à un codon STOP en position 850, conduisant à une production de protéine APC tronquée. Ainsi, cette dernière ne peut se lier ni à la  $\beta$ -caténine ni à l'Axine 2 et les animaux développent rapidement une centaine d'adénomes intestinaux [633]. Grâce à une recombinaison homologe, un nouveau modèle murin a permis d'obtenir une délétion de l'exon 14 sur l'un des deux allèles du gène *Apc*. Ainsi, les souris nommée *Apc<sup>A14</sup>* vont spontanément perdre le deuxième allèle par instabilité chromosomique, entraînant le développement d'adénomes intestinaux. Ce modèle permet l'obtention d'un plus grand nombre d'adénomes à l'âge adulte que le modèle *Apc<sup>min</sup>* [20]. Un modèle murin a été également développé afin de mimer la mutation la plus commune retrouvé

chez l'humain sur le gène *Apc* dans les Polyposes adénomateuses familiales (PAF). Ce modèle se caractérise par une mutation en position 1309, provoquant un décalage du cadre de lecture et l'obtention d'une protéine tronquée. Contrairement au modèle *Apc<sup>min</sup>*, le modèle *Apc<sup>1322T</sup>* induit un plus grand nombre de fission des cryptes et un phénotype tumoral plus agressif. En effet, les auteurs ont observé des polypes de plus grande taille, en plus grand nombre et qui se développent plus rapidement [634].

D'autres modèles de CCR dû à une perte fonctionnelle d'*APC* existent [635], [636] mais ils ont été très peu utilisés en comparaison au modèle *Apc<sup>min</sup>* et *Apc<sup>Δ14</sup>*. Outre ces modèles constitutifs, des modèles conditionnels, c'est-à-dire inductibles, ont été développés. Grâce à l'expression d'une protéine recombinase et l'insertion de séquences *LoxP* dans un gène d'intérêt, il est possible d'étudier la perte fonctionnelle d'un gène dans un compartiment cellulaire précis et à un moment précis. Ainsi, dans le cadre du CCR, le modèle le plus utilisé est le modèle *Villin-CreERT2*. L'expression de l'enzyme recombinase CreERT2 est restreinte aux cellules épithéliales intestinales et l'administration (par voie orale ou intra-péritonéale) de tamoxifène, permet la translocation de l'enzyme dans le noyau afin de recombiner les gènes contenant des séquences *LoxP* [637]. Un autre promoteur tel que celui de *Lgr5* peut être utilisé dans le cas où l'on souhaite induire une recombinaison uniquement dans les cellules souches intestinales dans un premier temps puis à terme, dans tout l'épithélium intestinal (CSI) [62]. Combiné à des allèles conditionnels du gène *Apc*, c'est-à-dire où des séquences *LoxP* encadrent l'exon 14 et que l'on nomme *Apc<sup>LoxP</sup>* [638], on obtient après induction au tamoxifène, une perte irréversible d'un ou des deux allèles d'*APC* dans les cellules épithéliales intestinales ou seulement dans les CSI (selon que l'on utilise le modèle *Villin-CreERT2* ou *Lgr5-CreERT2* respectivement). Dans le cas des modèles inductibles, l'altération de la perte d'*APC* est cette fois sous le contrôle du type de promoteur choisi. Aucun de ces modèles n'est évidemment parfait. Dans le cas du modèle *Villin-CreERT2, Apc<sup>LoxP</sup>*, les souris développent essentiellement des polypes au niveau de l'intestin grêle et très peu au niveau du colon, alors que les patients en développent au niveau du colon. Il s'agit malheureusement d'un modèle plus semblable à la pathologie des patients atteints d'une PAF. Un modèle murin transgénique permettant une atteinte d'*APC* plus spécifique au colon et évoluant en carcinomes existe, mais ce modèle n'est cependant pas un modèle conditionnel [22]. Quant au deuxième modèle utilisant le promoteur de *Lgr5*, les auteurs ont constaté que la recombinaison était mosaïque, c'est-à-dire qu'elle ne touchait que 20% des CSI, ce qui en fait un modèle très difficile à exploiter.

Des modèles d'études de la tumorigenèse coliques (plus spécifique de la pathologie du CCR sporadique) ont été développés en utilisant des composés chimiques. Il s'agit du modèle AOM-DSS pour Azoxyméthane et Dextran Sodium Sulfate. Injecté en premier, l'AOM est un puissant agent mutagène. L'administration cyclique du DSS dans l'eau des souris induit une forte

inflammation et à terme une colite. Ainsi selon le nombre de cycle et la concentration du DSS, on peut ainsi provoquer la formation uniquement de polype et adénomes coliques ou également de carcinomes, récapitulant la pathologie humaine. Il faut par exemple savoir que la voie Wnt devient constitutivement active mais il s'agit le plus fréquemment d'une mutation de la  $\beta$ -caténine, empêchant son adressage au protéasome [639]. L'inconvénient de ce modèle est qu'il s'agit d'un protocole lourd, qui nécessite une veille quotidienne des animaux. Les animaux doivent être pris une fois adulte afin de supporter jusqu'à son terme le traitement et surtout le protocole expérimental qui suivra.

Si l'on souhaite étudier l'impact de telle ou telle mutation « driver » sur la transition d'un adénome à carcinome, il est plus judicieux de générer une nouvelle lignée de souris transgénique en croisant des souris avec des séquences *LoxP* dans le gène *TP53* ou *TGF $\beta$ RII* avec des souris *Villin-CreERT2*, *Apc<sup>LoxP</sup>* par exemple. Il existe également des souris exprimant la mutation *Kras<sup>G12V</sup>* ou *Braf<sup>V600E</sup>* de manière inductible grâce à la présence d'un codon stop entouré de séquence *LoxP*. Croisées avec une souris exprimant l'enzyme CreERT2, l'administration de tamoxifène permet de perdre le codon stop et permettre l'expression de la mutation dans un compartiment cellulaire spécifique. Jackstadt, R. *et al* utilisent ainsi diverses combinaisons de croisement pour comparer et comprendre l'impact de chaque mutation « driver » dans le processus de tumorigenèse et dissémination colorectale. Cette étude, (comme d'autres avec la mutation *Braf<sup>V600E</sup>* ajouté à la perte fonctionnelle d'*APC*) démontre bien que le problème majeur de tous ces modèles murins (transgéniques comme AOM/DSS) est qu'il ne permet pas aux animaux de vivre assez longtemps pour développer des métastases même s'ils disposent de mutations à la fois sur *APC*, *TP53* et *Kras*. Qu'il s'agisse de polypes ou de carcinomes, le temps de latence nécessaire pour que se forme des micro et macro-métastases est bien trop court. Seul le modèle KPN de Jackstadt, R. *et al* que nous avons décrit auparavant parvient à suffisamment réduire le temps de latence des CTDs pour qu'elles soient facilement détectables[614].

Des alternatives existent afin de court-circuiter la mort précoce des souris [640], [641]. On peut par exemple injecter au niveau du caecum des cellules tumorales de polypes ou carcinomes préalablement cultivées *in vitro*. Une tumeur peut ainsi se développer bien plus longtemps car le caecum s'obstrue moins rapidement et elle reste dans un microenvironnement très similaire à l'intestin ou au colon. La deuxième alternative est d'injecter directement les cellules (de nouveaux suite à une culture *in vitro*) dans la rate pour mimer l'étape de dissémination hépatique, ou dans la veine caudale pour mimer la dissémination pulmonaire. Selon les études et ce qui est étudié, la rate peut être éliminée suite à l'injection intra-splénique pour que la souris ne meure pas rapidement de métastase au niveau de la rate mais cette splénectomie enlève un organe lymphoïde secondaire important et pourrait impacter la réponse immunitaire.



## Hypothèse et objectifs

Une meilleure prise en charge des patients diagnostiqués à un stade avancé (stade III et surtout stade IV) du CCR nécessite notamment d'améliorer nos connaissances sur les cellules responsables de la formation de métastases : les CTCs. Ces cellules ont déjà un intérêt pronostique et diagnostique important mais elles peuvent également devenir un outil majeur dans l'adaptation personnalisée du traitement. Elles sont en effet un meilleur indicateur de l'hétérogénéité et de la résistance des métastases que la tumeur primaire. Identifier les faiblesses des CTCs permettrait de mieux lutter contre les métastases, en particulier pour les patients dont les métastases ne sont pas encore détectables. Cette perspective à long terme implique de continuer à améliorer nos outils de détection et d'isolement d'une part, et de parvenir plus efficacement à cultiver ces rares cellules afin de réaliser des analyses fonctionnelles et en particulier des criblages thérapeutiques.

Notre laboratoire a été le premier à établir 3 lignées de CTCs colorectales à partir de sang de patients, ouvrant non seulement la voie à de nombreuses collaborations visant à continuer leur caractérisation mais également à proposer des cibles thérapeutiques. Parmi les caractéristiques communes de ces 3 lignées de CTCs, elles ont toutes un phénotype de CSCS tout en étant très épithéliales. De plus, elles expriment fortement et spécifiquement la protéine membranaire CD44v6 contrairement à d'autres lignées colorectales établies à partir de tumeurs primaires ou métastases.

Il y a cependant une limite à utiliser les CTCs comme indicateurs fiables de l'hétérogénéité tumorale des métastases à des stades aussi tardifs. Contrairement au dogme accepté depuis longtemps, des observations cliniques et des études portant sur d'autres cancers suggèrent fortement que le processus métastatique serait initié de façon très précoce. Ainsi, les cellules disséminées précocément seraient une constituante majeure des métastases. Il est donc également très important de caractériser la tumeur primaire lors de son initiation que les CTCs à des stades avancés de la maladie. Bien que depuis le début de ma thèse, quelques études portant sur la variabilité génétique entre les métastases et la tumeur primaire associée ont validé l'existence d'une dissémination précoce dans le CCR chez les patients, il n'existe aucune étude fonctionnelle *in vivo* permettant de décrypter la dissémination à des stades précoces de la tumorigénèse intestinale.

**Ainsi, l'objectif de cette thèse a été d'approfondir l'étude de la dissémination tumorale du CCR à deux moments distincts du processus métastatique :**

**1) Au stade tardif pour poursuivre la caractérisation des CTCs.**

- En utilisant le marqueur CD44v6 comme un nouvel outil de détection et d'isolement des CTCs directement depuis le sang de patients.
- En recherchant d'autres protéines membranaires exprimées par les CTCs colorectales grâce à la technologie de phage display.
- En enrichissant le milieu de culture des CTCs pour favoriser l'établissement de lignées
- En étudiant les capacités migratoires des lignées de CTCs colorectales.

**2) Au stade précoce du CCR grâce à des modèles murins**

- En développant des modèles inductibles de tumorigénèse intestinale et coliques précoces permettant de suivre une dissémination précoce dans des organes distants.

## Resultats experimentaux

### Partie 1 : Caractérisations

#### 1. Introduction et résultats principaux

Cette partie aborde spécifiquement les résultats obtenus à partir de cellules cancéreuses humaines à un stade tardif de la maladie (stade IV). Elle comporte majoritairement des résultats spécifiques aux CTCs visant à poursuivre la caractérisation de ces cellules très rares.

Le 1<sup>er</sup> axe de cette partie consiste à découvrir de nouveaux marqueurs membranaires des CTCs, à la fois pour améliorer leur isolement depuis le sang de patient, mais également pour poursuivre la caractérisation de ces cellules. J'ai démontré dans un premier temps que CD44v6 était un nouveau marqueur permettant non seulement de détecter des CTCs de cancers du sein et du côlon n'exprimant pas EpCAM, mais également de récupérer ces cellules vivantes afin de les cultiver. Ces résultats font l'objet d'un article de recherche actuellement soumis pour publication à *Theranostics* (IF : 8.3).

Dans un deuxième temps, j'ai poursuivi un projet visant à découvrir des marqueurs membranaires spécifiques des CTCs par une approche de Phage Display adaptée aux nanobodies et appliquée sur les lignées de CTCs du laboratoire. Je disposais à mon arrivée, d'une banque de nanobodies générée par la plateforme technique du CRCM à Lumigny, dans laquelle chaque nanobody était spécifique d'une protéine exprimée à la surface des CTCs. A partir de cette banque, j'ai réalisé un criblage me permettant de conserver uniquement les candidats reconnaissant leur cible à la surface de toutes les lignées de CTCs. Un séquençage m'a permis de regrouper les candidats par groupes et d'éliminer les potentiels candidats redondants. Enfin, je suis parvenu à optimiser efficacement les étapes de production et de purification, permettant la poursuite future du projet et notamment l'étape d'identification de l'antigène cible des nanobodies candidats.

L'amélioration de nos capacités d'isolement des CTCs doit cependant également s'accompagner d'un travail sur le milieu de culture de ces cellules une fois isolées. En effet, une seule nouvelle lignée a pu être établie depuis les 3 précédentes car dans l'immense majorité des cas, les CTCs isolées ne parviennent à survivre et à proliférer de manière pérenne. Ainsi une collaboration a débuté avec Andrei Turtoi (IRCM, Montpellier) afin d'enrichir le milieu de culture des CTCs et d'optimiser leur survie.

Par ailleurs, j'ai eu la chance d'être impliqué dans un projet collaboratif avec le laboratoire de Peter Friedl, spécialiste mondial de la migration tumorale. Ce projet portait sur la caractérisation du type de migration emprunté par les lignées de CTCs. Des analyses histologiques réalisées sur des excréments chirurgicales de tumeurs primaires et de métastases hépatiques, des expériences de biologie cellulaire et des xénogreffes de cellules tumorales dans des souris suggèrent fortement

et pour la 1<sup>ère</sup> fois, que les CTC emprunteraient exclusivement un mode de migration amiboïde. Ce travail est en cours de finalisation sur toutes les lignées de CTC et devrait aboutir à la soumission d'une publication au début de l'année 2021.

## 2. CD44v6 : nouveau marqueur de CTC

Parmi les lignées cancéreuses colorectales établies au laboratoire à partir de tumeurs du côlon, de métastases hépatiques ou de sang, seules les lignées de CTCs colorectales exprimaient fortement la protéine membranaire CD44v6 [481] (Figure33), nous permettant d'émettre l'hypothèse que ce marqueur pourrait être un nouvel outil pour détecter, et potentiellement d'isoler les CTCs à partir du sang des patients.

Afin de valider notre hypothèse, nous avons établi un protocole clinique avec l'Institut de cancérologie de Montpellier (ICM) avec l'aide précieuse du Pr Emmanuelle Samalin. Ce protocole inclut des patients diagnostiqués pour un CCR de stade IV et naïfs de tout traitement. En effet, les patients avec un CCR métastatique sont ceux pour lesquels la technologie CellSearch détecte le plus grand nombre de cellules circulantes épithéliales et les trois lignées de CTCs établies précédemment provenaient du sang de patients également à un stade IV. La rareté des CTCs, en particulier dans le cas du CCR, nous a conduit à sélectionner un stade où nous aurions le plus de chances de détecter des CTC.

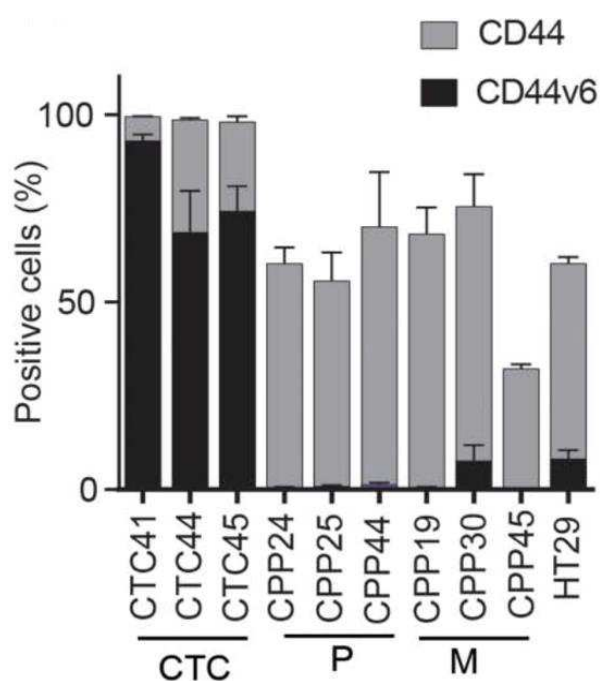


Figure 33: Expression spécifique et forte de CD44v6 à la membrane des lignées de CTCs.

Le pourcentage de cellules exprimant à leur membrane l'isoforme standard de CD44 et l'isoforme v6 apparaît en gris et noir respectivement. Le pourcentage d'expression de ces deux isoformes est comparé entre les lignées de CTCs, des lignées établies à partir de tumeurs primaires colorectales (P), des lignées établies à partir de métastases hépatiques (M) et la lignée colorectale commerciale HT29. Le numéro de chaque lignée établie réfère à un patient. Issue de Grillet, F. et al 2016.

Deux technologies ont été choisies afin de tester notre hypothèse, chacune reposant sur l'utilisation d'un anticorps pré-couplé au fluorochrome APC et spécifiquement dirigé contre CD44v6. La première est une séparation cellulaire à l'aide de colonnes magnétiques et un anticorps couplé à une microbille ferreuse et dirigé contre CD44v6. La deuxième est l'analyse et le tri par cytométrie en flux en utilisant le même outil.

Chacune de ces stratégies a été dans un premier temps, validée à partir d'échantillons de sang de patients sains dans lequel une centaine de CTC préalablement établies ont été ajoutées afin de simuler le sang des patients avec un CCR. Dans les deux cas, nous sommes parvenus à récupérer des cellules exprimant CD44v6 avec un taux de réussite supérieur à 60%.

La méthode d'isolement par les colonnes magnétiques étant validée, nous l'avons appliquée sur 19 échantillons de sang de patients avec un CCR. Dans la très grande majorité des cas, nous avons pu récupérer dans la fraction des cellules exprimant CD44v6, des cellules de grandes tailles, réfringentes et capables de survivre voire parfois, de proliférer en suspension pendant de nombreux jours. Grâce à cette technique j'ai pu établir une nouvelle lignée de CTC (CTC 31).

Pour la technologie de cytométrie en flux, nous avons d'abord exclu les cellules immunitaires à l'aide d'un anticorps dirigé contre CD45. Au préalable nous avons ainsi analysé 9 échantillons de sang provenant de donneurs sains de l'Établissement Français du Sang (EFS) afin de définir un seuil. Dans le cas des patients avec un CCR, le nombre de cellules vivantes non hématopoïétiques exprimant CD44v6 est en moyenne 5 fois supérieur à celui des 9 donneurs sains. Afin de démontrer que ces cellules sont bien des cellules cancéreuses, nous avons fait séquencer l'ADN génomique de ces cellules dans le cas des deux échantillons sanguins qui contenaient le plus de matériel biologique, dans le but de rechercher des mutations communément détectées dans le CCR. Pour les deux patients, des mutations du CCR ont été détectées et dans un des cas, la mutation *K-Ras G12V* concordait avec celle retrouvée dans l'ADN tumoral circulant du même patient. Ces résultats démontrent qu'il est possible d'utiliser CD44v6 pour détecter et isoler des CTCs colorectales.

Nous avons également démontré que l'expression de CD44v6 était exclusive de celle d'EpCAM. Ces résultats indiquent que pour améliorer la détection des CTCs colorectales et avoir une vision plus globale de la dissémination, il faudrait envisager des combinaisons de marqueurs telles que CD44v6 et EpCam.

Nous nous sommes ensuite demandé si CD44v6 pouvait être un marqueur des CTCs d'autres cancers. Nous avons décidé de collaborer avec Nicolas Aceto qui avait établi auparavant des CTC mammaires. Les deux lignées testées présentaient un niveau d'expression élevé de CD44v6 suggérant que CD44v6 n'était pas restreint au CCR. Nous avons ensuite eu la chance d'avoir accès à des échantillons sanguins de patientes avec un cancer du sein et de nouveau nous avons identifié une population qui exprimait CD44v6 et qui n'était pas des cellules sanguines.

Pour conclure, cette étude démontre que CD44v6 est un marqueur d'une sous population de CTC colorectales et mammaires et qu'il pourrait être exploité en combinaison avec d'autres marqueurs pour avoir une vision plus globale de l'hétérogénéité de ces cellules qui sont responsables des métastases chez les patients.



### 3. Identification des nouveaux marqueurs membranaires des CTCs grâce à la sélection phage display et aux nanobodies

Un nanobody est un fragment des anticorps générés naturellement par les camélidés et les requins. Ce fragment, également nommé dans la littérature VHH (pour variable fragment of heavy chain antibody), contient la partie variable de l'anticorps, permettant de reconnaître et fixer un antigène spécifique. A la différence des anticorps d'autres vertébrés classiquement utilisés, les anticorps de camélidés et de requins n'ont pas de chaîne légère. Ils sont donc composés uniquement de la chaîne lourde. Ainsi, de par leur petite taille (environ 15kDa) (Figure 34), les nanobodies se solubilisent très bien et peuvent mieux accéder à des antigènes jusqu'alors inaccessibles aux anticorps conventionnels. Leur petite taille et leur conformation relativement peu complexe permet de les faire produire par des procaryotes, organismes bien plus faciles à manipuler que les hybridomes. En résumé toutes ces caractéristiques physiques rendent les nanobodies très facilement adaptables à la sélection par phage display [642].

Le phage display est une technique de biologie moléculaire permettant d'étudier les interactions d'une protéine avec d'autres molécules et il s'agit également d'un outil permettant de développer des anticorps à des fins thérapeutiques. En quelques mots, elle repose sur la présentation d'une protéine ou d'un peptide à la surface d'un phage filamentueux. Suite à l'insertion de la séquence codante pour cette protéine ou ce peptide au sein du génome du phage, ce dernier transforme une bactérie compétente qui permet de produire rapidement et en grande quantité des phages présentant à leur surface la protéine ou le peptide d'intérêt. Cette technique est très utilisée pour identifier de nouveaux ligands ou substrats lorsque la protéine d'intérêt est une enzyme ou un récepteur, ou comme dans notre cas, d'identifier des épitopes lorsque la protéine d'intérêt est un anticorps [643].

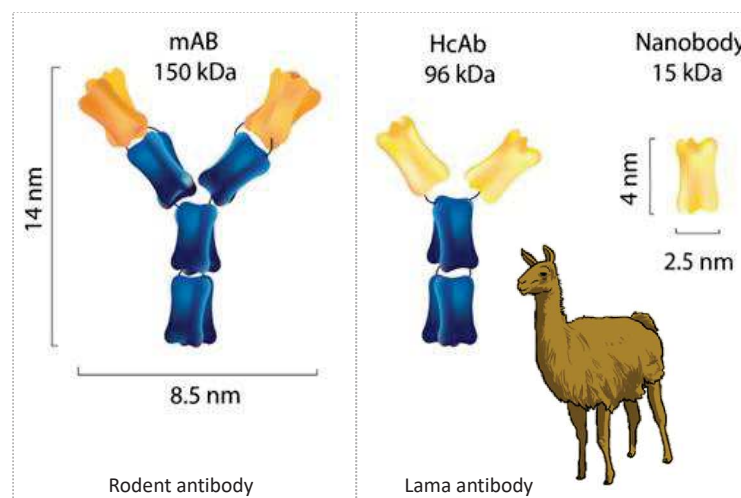


Figure 34: Schéma représentatif des différents formats d'anticorps.

Les anticorps classiques (de rongeurs, de chèvre, d'âne ou de primate) sont des anticorps monoclonaux (mAb pour Monoclonal antibody) avec une partie variable (en orange) constituée à la fois par la chaîne lourde et la chaîne légère. Les anticorps de requins et de camélidés comme le lama sont uniquement constitués d'une chaîne lourde (HcAb pour Heavy-chain antibody). Les nanobodies sont dérivés à partir de la partie variable de l'HcAb. Adaptée de Kijanka, M. et al. *Nanomedicine* 2015

L'adaptation de la technologie phage display pour produire des nanobodies permettant ainsi d'améliorer la découverte de nouveaux épitopes est un service proposé par une plateforme technologique du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) à Lumigny [644]. A la suite de l'établissement de la première lignée de CTCs, le besoin d'identifier des protéines membranaires fortement exprimées par les CTCs mais pas par les cellules immunitaires a naturellement conduit mon équipe à solliciter cette plateforme pour nous fournir une banque de nanobodies spécifiques des lignées de CTCs établies au laboratoire. Nous allons tout d'abord brièvement récapituler dans les grandes lignes les étapes permettant la génération de la banque de nanobodies. Puis nous développerons plus en détail l'étape de criblage de cette banque et enfin, les étapes de production et de purification réalisées au laboratoire

#### a) Etablissement de la banque de nanobodies candidats

La première lignée de CTC (CTC-41) a été injectée dans des lamas afin d'induire une immunisation de ces derniers. La purification des plasmocytes a permis ensuite d'extraire leurs ARNm. Une RT-PCR avec des amorces dirigées contre les séquences codantes des VHH a permis ensuite d'obtenir les ADNc codant spécifiquement pour les nanobodies. Des séquences de restrictions particulières sont ajoutées aux extrémités des ADNc pour l'étape de clonage.

En parallèle, la souche TG1 de la bactérie Escherichia Coli a été transformée par un phagémide afin de l'amplifier. Ce phagémide, vecteur viral inductible code pour l'ensemble des constituants nécessaires à la fabrication d'un phage. Il contient également un gène de résistance à l'ampicilline, une séquence codante pour une étiquette 6-His (ou Tag 6-His en anglais) qui est une répétition de 6-histidines sous contrôle d'un opéron inductible à l'IPTG. Amplifié et purifié, il servira à accueillir les inserts d'ADNc.

L'étape de clonage puis de transformation permet à la bactérie en réponse à l'IPTG de produire et libérer dans son surnageant, un nanobody fusionné à un Tag 6-His. L'ajout d'un phage Helper (ou phage assistant) à la culture bactérienne permet d'avoir une production de nanobodies fusionnés à la capsid virale du phage produit lui aussi par la bactérie. Il est alors possible de récupérer le surnageant bactérien pour réaliser l'étape de sélection négative puis positive.

L'étape de sélection négative consiste à exposer des cellules mononucléaires sanguines humaines (monocytes, macrophages et lymphocytes regroupés sous l'acronyme de PBMC). Les phages dont le nanobody fixe une cellule mononucléaire sanguine humaine seront éliminés avec elles et seul le surnageant contenant les phages libres sera conservé. Ce surnageant est alors utilisé pour une sélection positive. La lignée CTC-41 est mise en contact avec les phages et les phages dont le nanobody ne fixe pas les CTCs sont cette fois éliminés avec le surnageant. Seuls les phages fixés aux cellules grâce à leur nanobody sont conservés et une élution permet de récupérer les phages pour de nouveau infecter les bactéries TG1. On obtient alors un pool de bactéries infectées uniquement par des phages dont on sait qu'ils codent des nanobodies ne reconnaissant pas les cellules PBMC mais reconnaissant la lignée CTC-41. Ce pool est nommé Output (Figure 35).

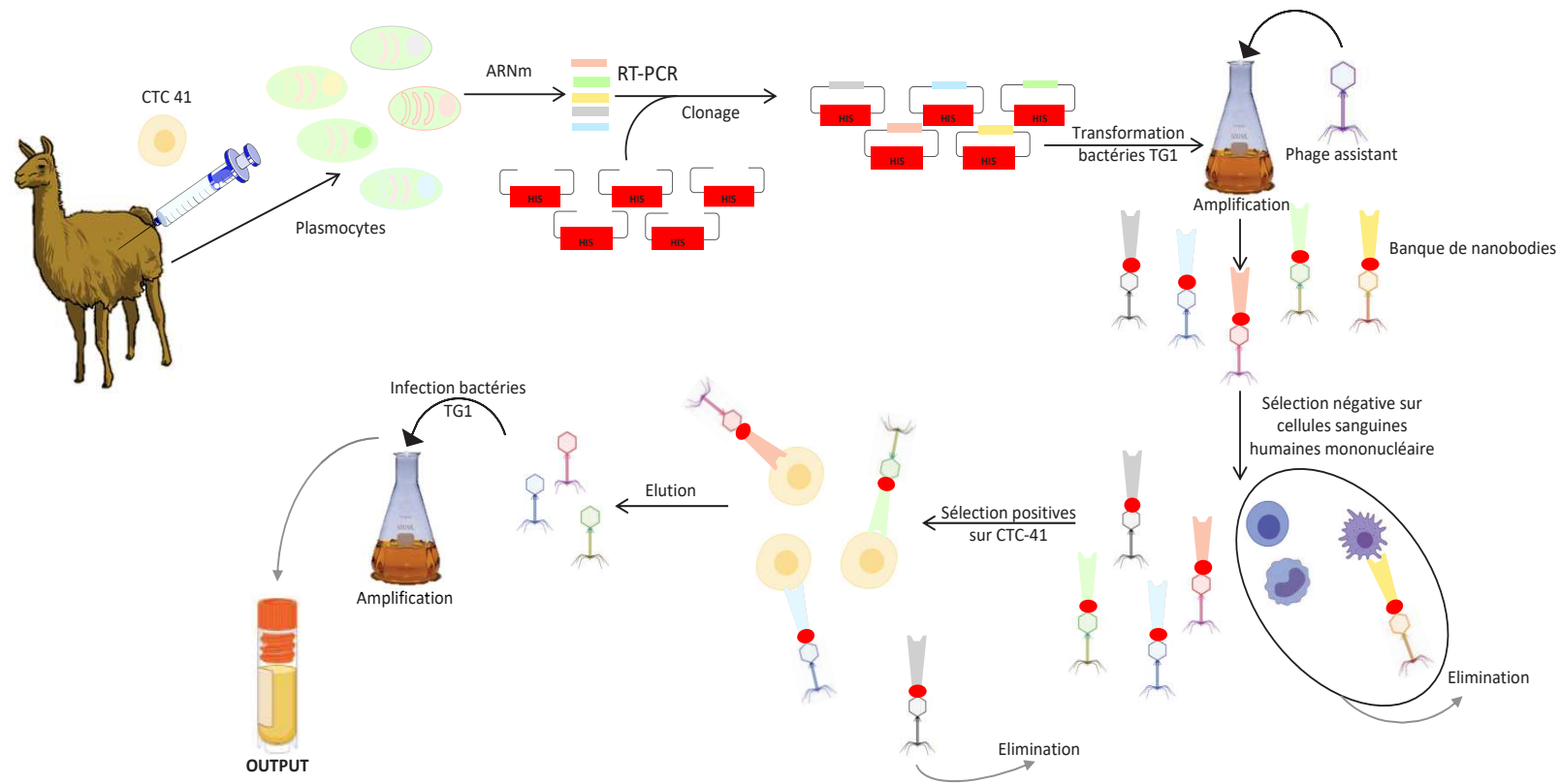


Figure 35: Schéma des étapes de production de la banque de nanobodies.

L'immunisation de lama avec la lignée CTC41 provoque la maturation de lymphocytes B en plasmocytes, producteurs d'HcAb. L'ARN messager de ces plasmocytes est récupéré afin de générer des ADN complémentaires spécifique de la séquence codante la chaîne légère des HcAb : les nanobodies. Ces séquences sont clonées dans des phagémides contenant également une séquence (rectangle rouge) codante pour l'étiquetage 6-His (ronde rouge). Les bactéries compétentes TG1 sont ensuite transformées avec ces phagémides et amplifiées en présence d'un phage assistant. Ainsi, les bactéries opèrent la production du phage dont la capside présente à sa surface le nanobody codé par le phagémide. La sélection négative permet d'éliminer les duos nanobody/phage qui reconnaissent un antigène à la surface de cellules sanguines humaines mononucléaires. Une deuxième sélection permet cette fois de conserver seulement les duos dont le nanobody reconnaît un antigène à la surface d'une lignée de CTC. Une élution permet de récupérer les phages afin d'infecter de nouveau des bactéries TG1. Cette culture de bactérie contient les séquences codantes pour la banque de nanobody et est nommée OUTPUT.

## b) Selection des meilleurs candidats : criblage et séquençage

Le criblage a pour but de sélectionner des nanobodies candidats qui reconnaissent fortement l'ensemble des lignées de CTCs puis est suivi d'une étape de séquençage pour regrouper par famille les nanobodies et pour éliminer les éventuels nanobodies redondants.

### i. Criblages

A partir de l'Output, 384 colonies ont été générées (Figure 36a) puis repiquées individuellement dans des plaques MasterPlate dites « plaques mères » de 96 puits (Figure 36b). Depuis ces MasterPlate mères, nous pouvons générer un très grand nombre de plaques filles identiques (Figure 4c) qui elles-mêmes permettront de faire des plaques de criblage.

Pour cela, les MasterPlate filles sont placées sous agitateurs à 37°C jusqu'à atteindre une phase de prolifération optimale pour l'étape de production. L'ajout de l'IPTG permet alors d'induire la production des nanobodies dans le surnageant que l'on débarrasse des bactéries pour le répartir en plaques de criblage (Figure 36e).

Pour réaliser le criblage, les 3 lignées de CTCs ont étéensemencées dans les plaques puis incubées avec un anticorps couplé à un fluorochrome et dirigé contre le tag 6-His des nanobodies (nous le nommerons anti 6-His). L'ensemble des nanobodies a été analysé par cytométrie en flux. Sur l'ensemble des nanobodies, seuls 17 ont reconnu fortement un épitope à la surface des 3 lignées de CTCs. Ces nanobodies sont alors appelés nanobodies candidats (Figure 36d).

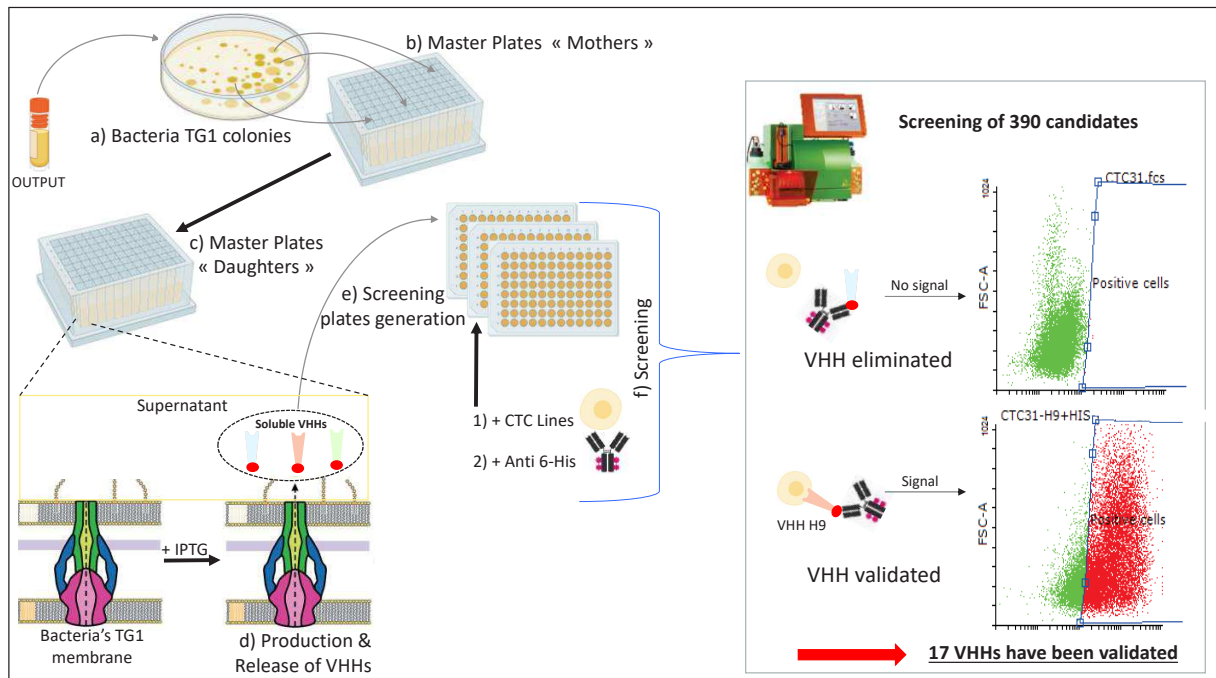


Figure 36: Schéma récapitulant les étapes de screening de la banque de nanobodies.

(a) La banque de nanobodies ensemencée sur une gélose permet d'obtenir des colonies bactériennes TG1. (b) Chacune est ensuite repiquée dans des Master Plates « mères ». (c) Des Master Plates « mères » sont générés des Master Plates 'filles' identiques pour induire la production des nanobodies par l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture. (d) Production & Release of VHHs. (e) Chaque nanobody (VHH) libéré dans le milieu de culture est récupéré avec le milieu de culture et le tout est réparti dans des plaques de screening. (f) L'ensemencement avec chaque lignée de CTCs dans ces plaques de screening est suivi de l'ajout d'un anticorps pré-couplé à un fluorochrome et dirigé contre l'étiquette 6-His (rond rouge) des nanobodies. Analysé par un cytomètre en flux, l'absence de reconnaissance d'un antigène à la surface des CTCs par un nanobody ne permettra pas de maintenir le trio CTC/nanobody/anti 6-His et ne générera pas de marquage. Au contraire, la reconnaissance d'un antigène à la surface des CTCs permet de générer un marquage.

## ii. Séquencage des 17 nanobodies candidats

Pour éliminer les potentiels nanobodies identiques, nous avons réalisé une extraction de plasmides des bactéries correspondantes aux nanobodies candidats et envoyé à séquencer. Une fois les séquences alignées, nous avons pu les regrouper par familles candidats selon la séquence CDR3. 6 familles ont été identifiées et un candidat n'a pas pu être identifié probablement due à une erreur de manipulation durant l'extraction d'ADN (Figure 37). Il est important de noter que même si plusieurs candidats se retrouvent dans la même famille selon leur séquence CDR3, ils ne sont pas forcément totalement identiques. Des petites variations sur le reste de la partie codante du nanobody peuvent impacter sa production ou l'affinité pour un épitope.

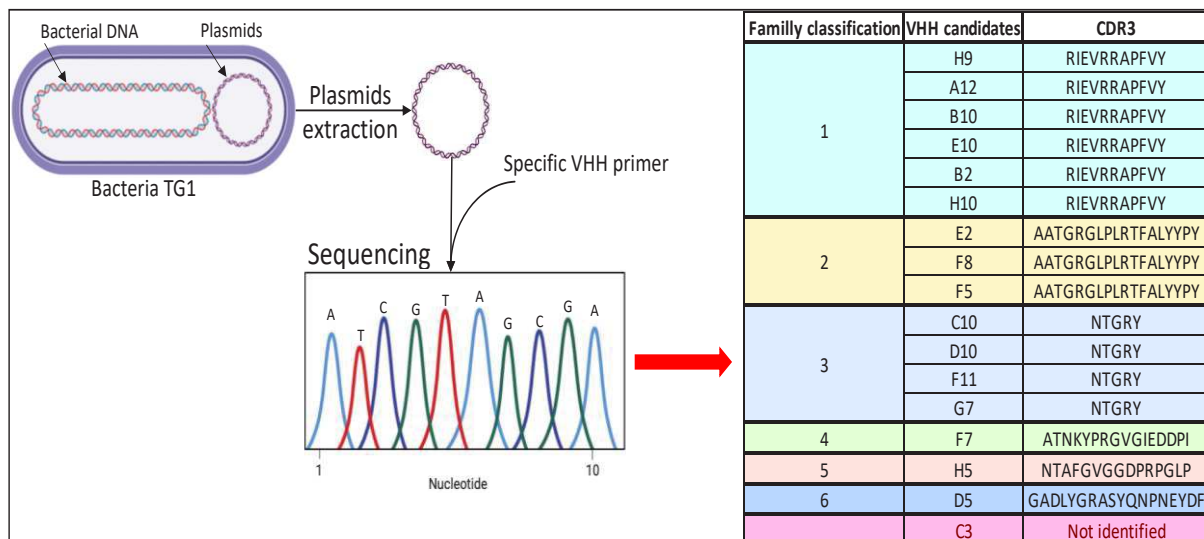


Figure 37: Séquencage des séquences codantes des VHH candidats.

Les plasmides bactériens sont extraits et un primer spécifique du phagémide permet de séquencer spécifiquement le phagémide. Une fois alignée, la conversion des codons en acide aminé permet d'identifier la séquence CDR3 et de regrouper chaque VHH candidat par famille.

## c) Optimisation de la production et purification des nanobodies

Afin de purifier l'antigène ciblé par un nanobody candidat grâce à une immuno-précipitation puis de caractériser cet antigène, nous avons besoin de quantités importantes de nanobody. Les bactéries TG1 ne sont malheureusement pas les bactéries compétentes les plus efficaces en termes de production de protéines recombinantes. Nous avons donc dû transférer le phagémide des bactéries TG1 dans des bactéries BL21 reconnues pour leur grande capacité de production de protéines, en particulier au niveau de leur périplasma. La production de chaque bactérie a été purifiée grâce à une résine de Cobalt qui se lie fortement aux étiquettes poly-histidines (tag his). Des lavages avec des tampons salins éliminent les molécules faiblement fixées puis un tampon d'imidazole, puissant analogue compétitif des motifs 6-His, permet d'éluer le nanobody. Révélé



par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti 6-His, par exemple la production parallèle du nanobody F5 dans les deux bactéries démontre clairement que la bactérie BL21 améliore d'un facteur 4 le rendement de production (de 36 µg/ml à 160 µg/ml) (Figure 38A).

Cette production est en moyenne trois à quatre fois plus importante mais n'est cependant pas encore suffisante pour réaliser une immuno-précipitation du nanobody avec son antigène. Nous pouvons constater qu'en effet, une quantité très importante du nanobody F5 (bande de 16-17 kDa) est présente dans les fractions de lavage mais également dans la fraction de protéines non-retenues. Ce résultat indiquait donc que notre protocole de purification n'était pas du tout optimal. Après d'innombrables petites modifications infructueuses visant à jouer sur le pH des tampons de lavage ou sur le nombre de lavages, nous avons porté notre attention sur la résine de Cobalt et le tampon d'élution à l'imidazole. L'utilisation d'une gamme d'imidazole répartie entre 2 mM et 400 mM nous permet de constater sur un simple gel d'agarose que des concentrations d'imidazole comprises entre 2 et 10 mM suffisent à éluer le nanobody retenu par la résine de cobalt (Figure 38B). Nous avons donc qu'il n'était pas possible d'établir de très fortes interactions entre le Cobalt et les motifs 6-His des nanobodies.

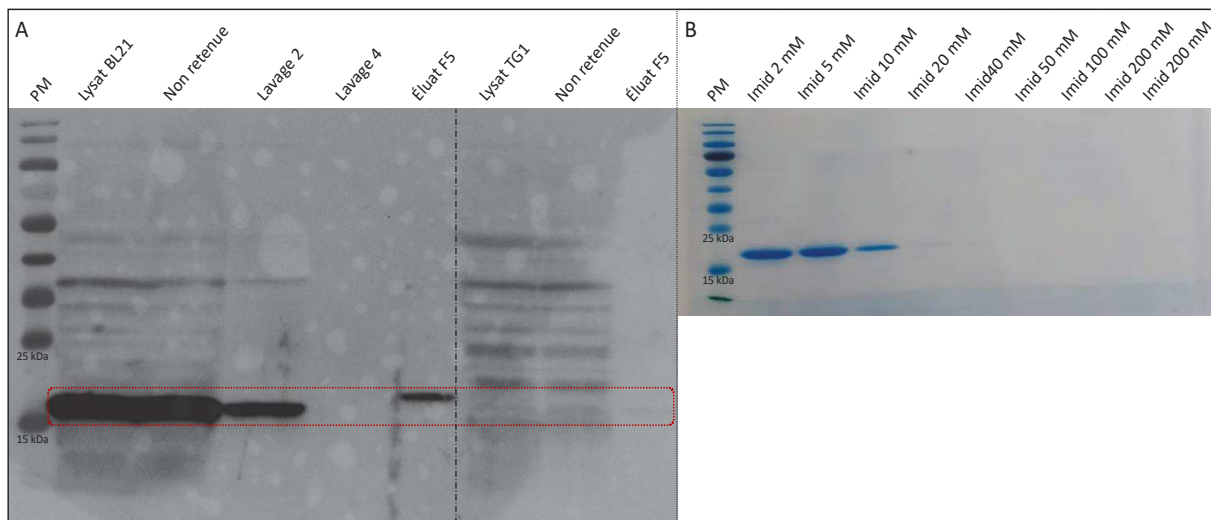


Figure 38: Optimisation de la production bactérienne et limite des résines de Cobalt pour la purification.

(A) Western Blot des différentes fractions produites durant le processus de production du nanobody F5. Le marquage de la membrane par un anticorps anti-6His couplé à l'enzyme HRP est visualisable à 17kDa (encadrement rouge pointillé). (B) Gel de migration protéique coloré par InstantBlue. La coloration permet de visualiser de l'ensemble des protéines de chaque fraction durant les étapes de purification. PM : Poids Moléculaire. Imid : Imidazole

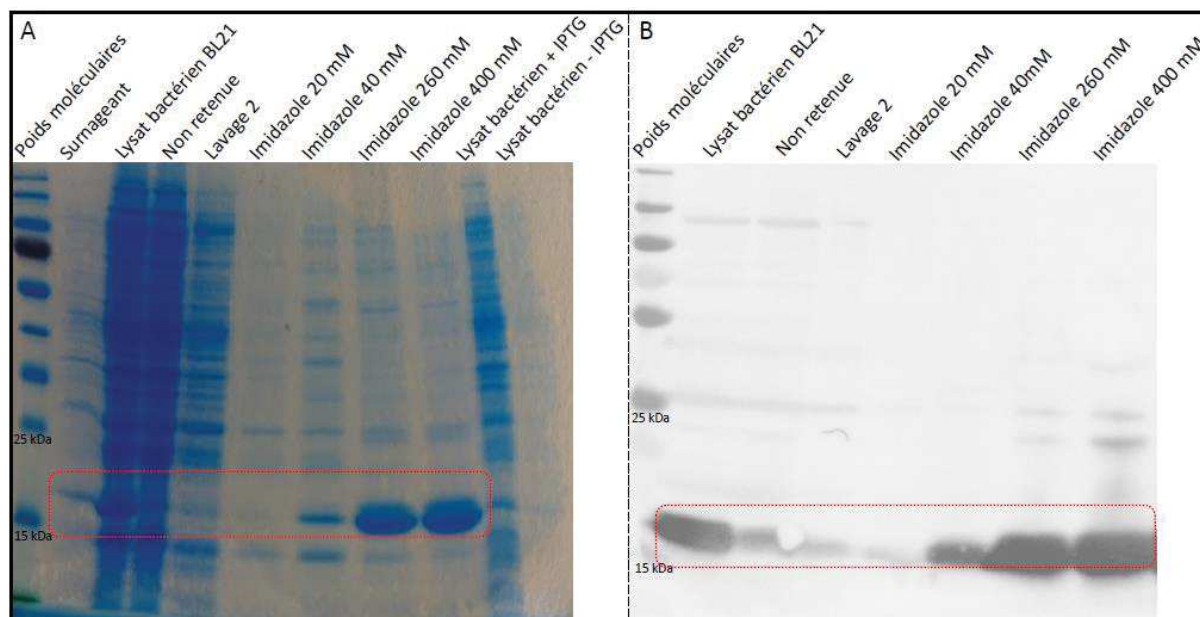


Figure 39: Optimisation de la purification des nanobodies

(A) Gel de migration protéique coloré à l'InstantBlue. La présence du nanobody est supposée grâce à la migration correspondant à une protéine d'environ 15 kDa. B WesternBlot des différentes fractions durant l'étape de purification de nanobody sur résine de nickel. La présence du nanobody est révélé sur la membrane grâce à un anticorps pré-couplé à l'enzyme HRP et dirigé contre l'étiquette 6-His. PM : Poids Moléculaire. Imid : Imidazole. LB : lysat bactérien.

Les purifications de protéines fusionnées avec un tag 6-His sont également possibles à l'aide d'un autre type d'ion métallique : le Nickel. Connue pour avoir une capacité de fixation plus importante que le Cobalt, les résines de Nickel ont cependant une moindre pureté. En adaptant notre protocole à une résine de Nickel et en ajoutant des lavages d'imidazole de faibles concentrations, nous sommes enfin parvenus à optimiser notre protocole de purification (Figure 39). Dès la concentration de 200 mM nous observons une forte élution du nanobody et une élution totale à 400 mM et la concentration protéique de ces deux éluions est de 2,44 g/l et 5,78 g/l respectivement. Enfin, la présence persistante de nanobody au niveau de la fraction non-retenue indique probablement la présence d'une quantité non négligeable de nanobody où le tag 6-His n'est pas accessible que ce soit au Cobalt et au Nickel. Cette perte devient cependant négligeable maintenant que nous sommes capables de produire des nanobodies en grande quantité. Des colonnes de dessalage puis une concentration par des tubes Vivaspinn nous ont ensuite permis d'enlever au maximum l'imidazole tout en concentrant le nanobody afin qu'il puisse être conservé à -80

#### d) Conclusion et perspectives

Le transfert du phagémide dans les bactéries compétentes BL21 nous a certes permis d'augmenter nos capacités de production de nanobodies mais nous ne pouvons pas envisager la poursuite du projet avec si peu de matériel purifié à l'aide de colonnes de Cobalt. L'utilisation de colonne de Nickel nous a cependant permis d'augmenter de manière très importante la quantité

de nanobodies purifiés et il nous ait maintenant possible d'aborder les étapes d'immuno-précipitation avec suffisamment de matériel pur pour plusieurs essais.

La purification de l'antigène ciblé par un nanobody permettra par la suite un séquençage des acides aminés par une plateforme de protéomique au sein de l'institut. Il est possible que parmi les antigènes reconnus, on retrouve la protéine membranaire EpCAM ou CD44v6, que l'on sait très exprimés dans les CTCs mais nous espérons découvrir de nouvelles protéines dont le rôle est essentiel pour la survie des CTCs et/ou leur implantation dans un organe distant. Ces outils seront ensuite puissants aussi bien pour la recherche académique que pour la clinique aussi bien en diagnostic qu'en thérapeutique.

#### 4. Enrichissement du milieu de culture des CTCs

Notre laboratoire est parvenu pour la première fois, à établir des lignées de CTCs colorectales humaines. Cependant, dans l'immense majorité des cas, que ce soit en utilisant la technique d'isolation RosetteSep [481], les colonnes de séparation magnétiques (cf article sur CD44v6 en annexe), ou la machine Parsortix (Figure 40) nous observons des cellules morphologiquement similaires aux CTCs, capables de survivre jusqu'à plusieurs semaines avant de mourir. Cette incapacité à s'établir peut-être due à la proportion importante des CTCs de type progéniteurs ou mésenchymateuses avec une capacité d'autorenouveau limitée dans nos conditions de culture. Il n'est pas non plus exclu que selon l'hétérogénéité génomique des CTCs, certaines sous populations de CSC circulantes requièrent certaines cytokines bien particulières pour conserver leur phénotype souche.

Les travaux de Todaro et de Calon démontrent le rôle majeur des FACs (fibroblastes associés au cancer) dans la progression du CCR à un stade métastatique grâce aux sécrétions de facteurs pro-survie et reprogrammant les progéniteurs en CSC. Ces cellules semblent d'autant plus importantes pour les cellules malignes que des clusters de CTC colorectales avec des fibroblastes ont été observées, suggérant que les cellules tumorales disséminent avec leur microenvironnement pro-tumoral. Nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'il serait possible de reprogrammer ces potentiels progéniteurs tumoraux circulants en CSCs circulantes ou de maintenir le phénotype mésenchymateux des CTCs grâce à l'enrichissement de notre milieu de culture M12 par des FACs.

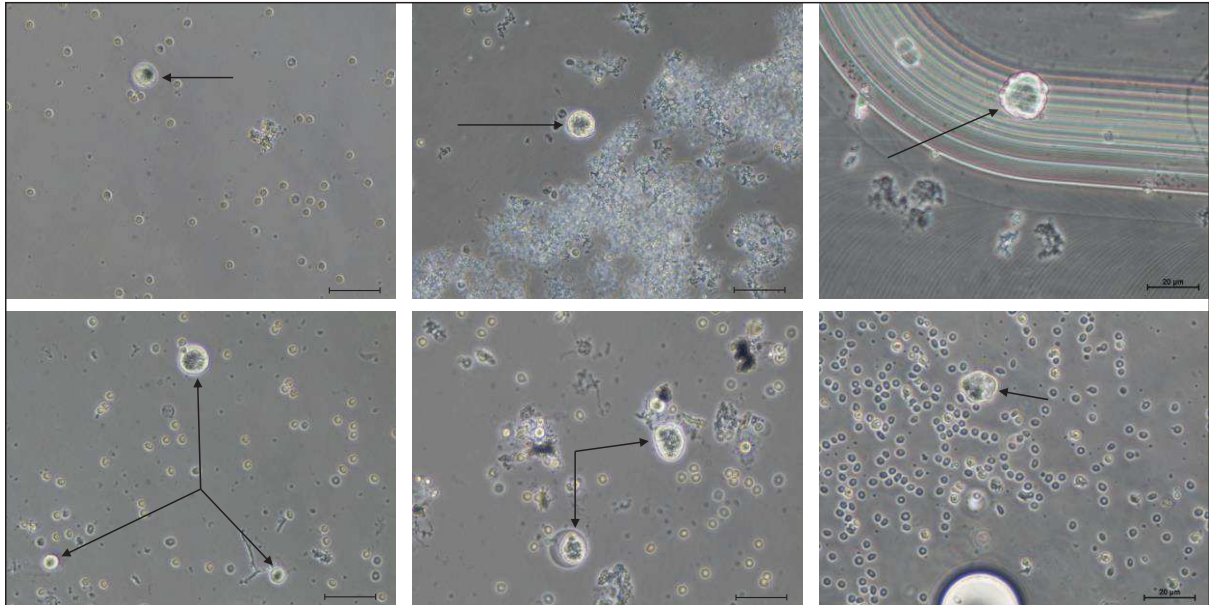


Figure 40: Photographie des CTCs individuelles ou en cluster isolées grâce au dispositif Parsortix®.

#### a) Effet des différents milieux conditionnés sur la formation des sphères des CTCs

Afin d'enrichir notre milieu de culture, nous avons généré des fibroblastes associés au cancer (FAC) grâce à une co-culture de fibroblastes avec des CTCs pendant 48H. Isolés et établis à partir de tissus humains sains, Andrei Turtoi (IRCM, Montpellier) nous a fourni une lignée de fibroblastes colique (nommés CCD18CO), et une lignée de fibroblastes hépatiques (nommé hNLF pour human Normal Liver Fibroblast). Ces types de fibroblastes nous ont semblé pertinents à tester puisqu'ils concernent le tissu d'origine et le tissu d'arrivée préférentiel des CTC. De plus, les fibroblastes de chaque organe ayant de légères différences en termes de morphologie et sécrétions, il n'était donc pas impossible que les sécrétions d'une des deux lignées soient plus efficaces pour la survie des CTCs. Chaque type cellulaire a également été cultivé individuellement 48H avec le milieu de référence des CTC (le milieu M12). Il se peut en effet que les fibroblastes à eux seuls, sans activation en FACS, parviennent à enrichir le milieu de culture. Nous avons également testé l'enrichissement du milieu M12 par les CTCs elles-mêmes afin de savoir si le potentiel effet obtenu par les co-cultures n'était seulement imputable aux CTCs.

Pour résumer nous avons donc obtenu 6 types de milieux différents à comparer ; le milieu de référence M12 utilisé en routine pour la culture des CTCs et qui avait permis d'établir les 4 lignées de CTC, le milieu conditionné par des CTCs, le milieu M12 conditionné soit par les hNLF soit les CCD18CO et enfin, les deux milieux conditionnés par la co-culture de chaque type de fibroblastes avec des CTCs (Figure 41 A).

Pour tester notre hypothèse et comparer l'efficacité de chaque condition, nous avons choisi de réaliser un test d'ensemencement en dilution limite (ELDA) sur deux des 4 lignées de CTC du laboratoire. Il permet de calculer la fréquence de cellules souches cancéreuses tout en permettant de quantifier la formation de sphères dans des conditions de culture en suspension avec un très

faible nombre de cellules, conditions comparables à celles que nous avons pour établir des lignées de CTCs. Pour avoir un test ELDA le plus précis et reproductible possible, nous avons donc réalisé l'ensemencement de 1, 10, 100 et 1000 CTCs à l'aide d'un cytomètre en flux. L'expérience a été répétée trois fois pour les deux lignées et le comptage du nombre de sphères a été réalisé après une semaine de culture (Figure 41C).

La présence d'au moins une sphère par puits (Figure xA et xA) dans chaque condition, a permis de calculer la fréquence de CSCs pour chacune des CTCs cultivées dans les 6 milieux. A l'image de ce que l'on peut constater sur les photos, l'ensemble des milieux conditionnés en présence de fibroblastes ou de FACs augmente d'environ 50% la fréquence de CSCs par rapport au milieu de référence M12. Le milieu conditionné par les CTCs n'impacte pas la fréquence de CSC de la lignée CTC44 (Figure 42B) mais permet tout de même de doubler celle de CTC45 (Figure 43B). Le comptage des sphères permet d'affiner ces observations. On constate ainsi que la formation de sphères est particulièrement améliorée grâce au milieu enrichi par les fibroblastes de colon seul ou en co-culture (Figure 42C-E et Figure 43C-E). Cette amélioration se reflète par ailleurs au niveau de l'augmentation de fréquence de CSCs ainsi que sur les photos. Il apparaît également que le milieu conditionné par la co-culture des fibroblastes de colon soit légèrement plus efficace que celui enrichi par les fibroblastes de colon seul. Le milieu conditionné des fibroblastes hépatiques améliore également la formation de sphère dans une moindre mesure que les fibroblastes du colon. Enfin, on peut noter que la taille des sphères apparaît plus importante dès lors que le milieu M12 est enrichi par des fibroblastes seuls ou en co-culture avec la lignée CTC31.



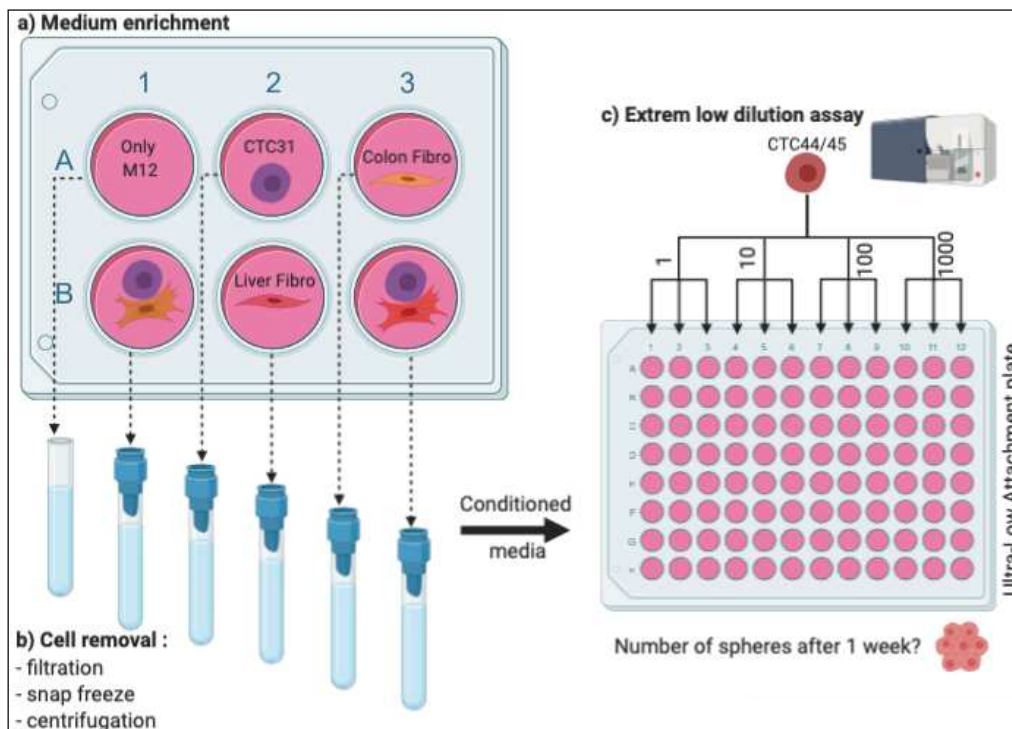


Figure 41: Production de milieux conditionnés enrichis et réalisation de test ELDA et de formation de sphère.

Chaque type cellulaire (CTC31, les fibroblastes de colon et les fibroblastes de foie) sont cultivés individuellement dans le milieu de culture de référence M12. En parallèle, chaque type de fibroblastes est co-cultivé en présence de CTC31 afin d'activer les fibroblastes en fibroblastes associés aux cancers (FACs). Les cellules et débris cellulaires sont éliminés de chaque milieu puis répartie dans des plaques de culture en suspension (ULA pour Ultra-Low Attachment plate). Un trieur cellulaire ensemence en dilution limite les lignées de CTC 44 et 45 dans les plaques ULA avant le comptage du nombre de sphère formées au bout d'une semaine.



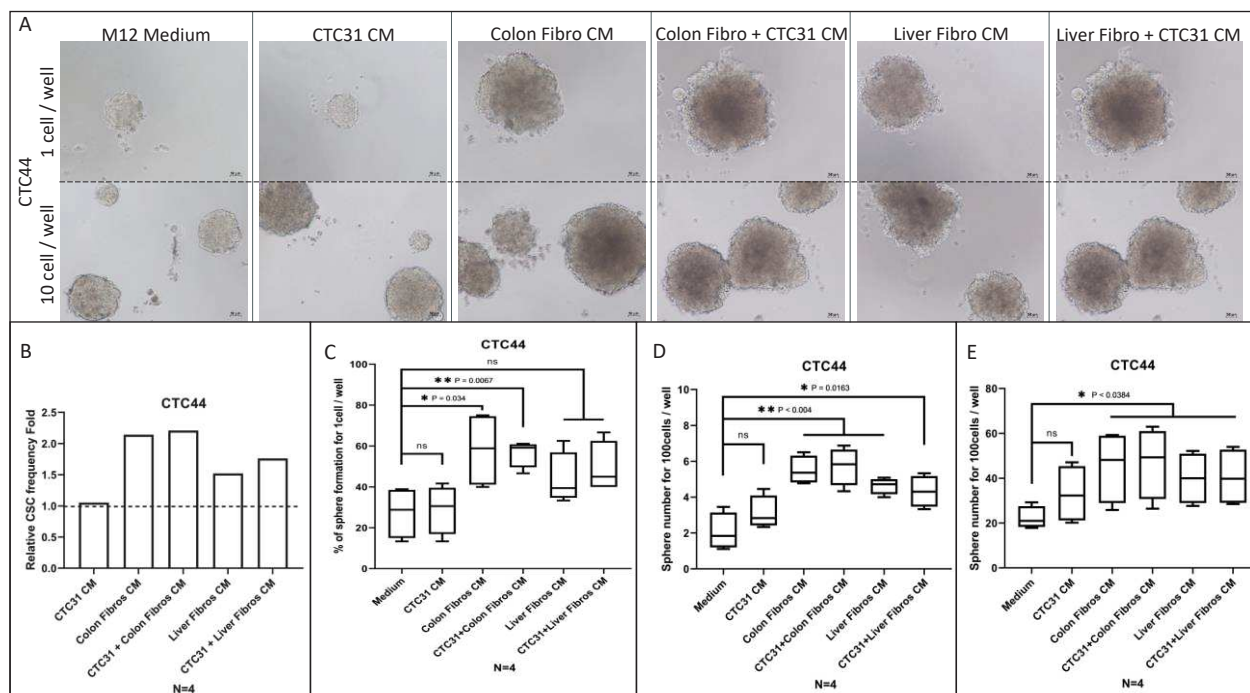


Figure 42: Enrichissement des milieux de cultures et amélioration de la capacité à former une sphère de la lignée CTC-44.

(A) photographie des sphères dans les différents milieux de culture, 7 jours après leur ensemencement à 1 et 10 cellules par puit. Barre d'échelle 20  $\mu$ m (B) Comparaison de la fréquence de cellules souches cancéreuses (CSC) selon les différents milieux conditionnés par rapport à la fréquence de CSC dans le milieu de référence. (C) Comparaison du pourcentage de puits contenant une sphère dans les milieux conditionnés par rapport au milieu de référence. La dilution d'ensemencement est d'une cellule par puit. Test Student unpaire. (D) Comparaison du nombre de sphères formées dans les milieux conditionnés par rapport au milieu de référence. La dilution d'ensemencement est de 10 cellules par puit. Test Student unpaire. Comparaison du nombre de sphères formées dans les milieux conditionnés par rapport au milieu de référence. La dilution d'ensemencement est de 100 cellules par puit. CM : milieu conditionné. Colon Fibro : fibroblastes de colon. Liver Fibro : fibroblaste hépatique. Medium : Milieu M12

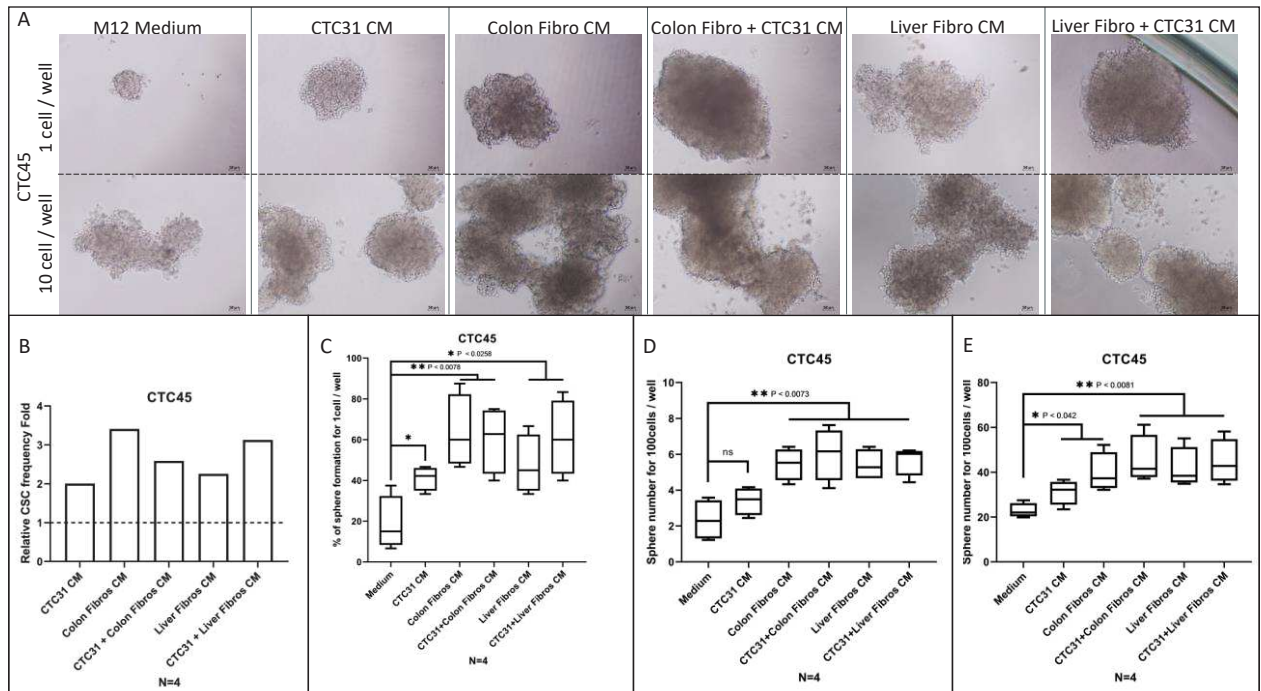


Figure 43 : Enrichissement des milieux de cultures et amélioration de la capacité à former une sphère de la lignée CTC-45.

(A) photographie des sphères dans les différents milieux de culture, 7 jours après leur ensemencement à 1 et 10 cellules par puit. Barre d'échelle 20  $\mu$ m (B) Comparaison de la fréquence de cellules souches cancéreuses (CSC) selon les différents milieux conditionnés par rapport à la fréquence de CSC dans le milieu de référence. (C) Comparaison du pourcentage de puits contenant une sphère dans les milieux conditionnés par rapport au milieu de référence. La dilution d'ensemencement est d'une cellule par puit. Test Student unpaire. (D) Comparaison du nombre de sphères formées dans les milieux conditionnés par rapport au milieu de référence. La dilution d'ensemencement est de 10 cellules par puit. Test Student unpaire. Comparaison du nombre de sphères formées dans les milieux conditionnés par rapport au milieu de référence. La dilution d'ensemencement est de 100 cellules par puit. CM : milieu conditionné. Colon Fibro : fibroblastes de colon. Liver Fibro : fibroblaste hépatique. Medium : Milieu M12.

## b) Perspectives

L'amélioration du taux de formation de sphères et de la fréquence de CSCs grâce aux milieux de cultures conditionnés par des fibroblastes de colon seul ou en co-culture avec la lignée CTC31 est un premier résultat encourageant. Il est cependant possible que le protocole expérimental ne soit pas optimal pour permettre une activation optimale des fibroblastes en FAC empêchant ainsi de voir un effet de la co-culture plus net. Il faut en effet savoir que pour permettre l'activation des fibroblastes en FAC par co-culture, nous avons préalablement cultivé les fibroblastes seuls dans du DMEM complet (avec du sérum), jusqu'à atteindre environ 80% de confluence puis, ajouté les CTCs et récupéré le milieu conditionné 48 heures plus tard. Une co-culture préalable de 24 heures dans un milieu DMEM complet avant de réaliser l'enrichissement du milieu M12 permettrait peut-être de finaliser l'activation des fibroblastes et d'augmenter la quantité de cytokines libérées par les FAC. Il n'est pas non plus impossible que les CTCs de la co-culture utilisent une partie importante des cytokines produites par les FAC. Pour affiner nos résultats, nous devons donc tenter de prolonger le temps d'activation des FAC en co-culture et tester également l'ajout de TGF- $\beta$ 1 dans le milieu DMEM afin d'activer les fibroblastes sans recourir à la co-culture avec les CTCs. Nous verrons ainsi si l'effet des co-culture est propre aux FACs ou s'il s'agit d'un effet synergique des deux types de cellules cultivées ensemble.

L'étape suivante consistera à déterminer les facteurs sécrétés dans les milieux conditionnés par une approche de protéomique et de corrélérer ces facteurs aux résultats obtenus avec le test ELDA et le test de formation de sphère. En plus des cytokines suspectées (IL-11, l'OPN, l'HGF et le SDF-1 $\alpha$  entre autres), une attention particulière sera portée à la présence des cytokines par encore identifiées dans la littérature comme facilitant la survie et prolifération des cellules tumorales disséminées (CTDs).

Les facteurs identifiés pourront par la suite être ajoutés au milieu M12. Après confirmation que ce milieu améliore significativement la formation de sphères sur les lignées de CTCs, ce milieu pourra être utilisé pour la mise en culture des CTCs isolées du sang des patients à partir des différentes stratégies optimisées dans notre laboratoire afin d'augmenter leur survie sur du long terme.

## 5. Migration amiboïde individuelles et collectives des cellules tumorales colorectales

À la suite de l'établissement des 3 premières lignées de CTCs, nous étions étonnés par leur comportement singulier comparé aux autres lignées établies à partir d'exérèses de tumeurs primaires ou de métastases (CPPs). Tout d'abord, CTC-41 parvient très difficilement à adhérer et prolifère en restant en suspension. Les lignées CTC-44 et CTC-45 sont capables d'adhérer et proliférer en formant un tapis mais il s'agit d'un tapis typique de cellules épithéliales. De plus, les

trois lignées expriment fortement EpCAM et de l'E-cadhérine à leur membrane, renforçant le constat que ces lignées de CTCs ont un phénotype épithélial et non mésenchymateux [481]. Nous nous sommes alors demandés comment ces cellules parfois incapables d'adhérer, étaient parvenues à migrer pour rejoindre la circulation sanguine et comment auraient-elles fait pour extravaser et envahir des sites distants.

#### a) Phénotypes épithéliales des lignées de CTCs colorectales

Pour définitivement exclure l'hypothèse d'une migration de type mésenchymateux par les lignées de CTCs, nous nous sommes intéressés à l'expression des marqueurs mésenchymateux au niveau transcriptomique et protéique. Les lignées de CTCs ont été comparées à des lignées dérivées des mêmes patients mais issues d'une exérèse de la tumeur primaire (CPP44) et d'une métastase hépatique (CPP45). Les lignées de CPPs sont particulièrement intéressantes car elles sont mésenchymateuses. Les résultats démontrent cependant qu'aussi bien au niveau transcriptomique (Figure 44A) qu'au niveau protéique (Figure 44B), les lignées de CTCs expriment très peu les gènes mésenchymateux et conservent une localisation membranaire de l'E-Cadhérine. A l'inverse les lignées de CPPs qui sont bien mésenchymateuses.

Suite au séquençage de l'ARN des lignées de CTC (41, 44 et 45) et d'une lignée de CCR de référence (DID-1) nous avons pu mettre en évidence que l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion était globalement sous régulée [481]. On constate par ailleurs que le transcriptome des lignées de CTCs présente une forte concordance avec une signature transcriptomique épithéliale et qu'à l'inverse leur transcriptome est inversement corrélé à une signature de cellules mésenchymateuses ou de cellules entrée en EMT en réponse au TGF- $\beta$ . Avec cette approche, nous avons ainsi pu de nouveau confirmer le phénotype très épithélial et non mésenchymateux des lignées de CTCs (Figure 44C). Le phénotype mésenchymateux des lignées de CTCs étant définitivement écarté, nous avons alors émis l'hypothèse qu'elles pouvaient avoir un phénotype amiboïde. Pour cela nous avons comparé les transcriptomes des lignées à une signature transcriptomique de macrophages [645], qui sont des cellules qui utilisent cette migration pour rejoindre des sites inflammés ou infectés. On observe que le transcriptome des 3 lignées de CTC corrèle positivement avec une migration de type amiboïde (Figure 44C).

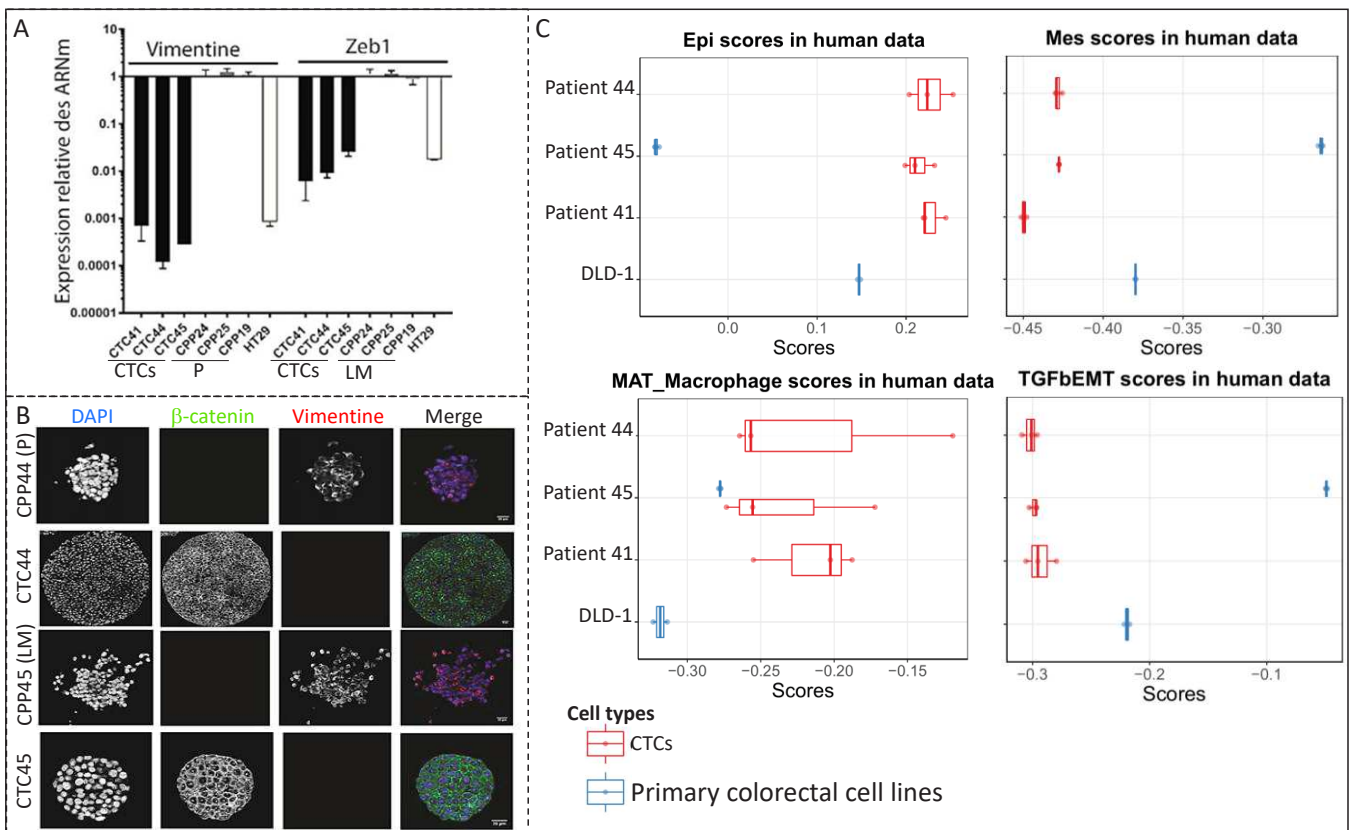


Figure 44: Marqueurs épithéiaux et mésenchymateux des CTCs et CPPs.

(A) Expression de l'ARNm des marqueurs mésenchymateux Vimentine et ZEB1 dans les CTCs comparée aux lignées de CPPs par RT-qPCR (moyenne +/- SEM, n>3). (B) Immunofluorescence sur des coupes de sphères montrant l'expression de la  $\beta$ -caténine, (en vert), de la vimentine (en rouge) et des noyaux (en bleu) sur les lignées établies à partir des patients 44 et 45. (C) Correspondance du profil transcriptomique des lignées dérivées des patients 44 et 45 ainsi que de la lignée colorectal DLD-1 avec des banques de signatures transcriptomiques propres à des cellules épithéliales, mésenchymateuses, à des macrophages et d'une entrée en EMT en réponse au TGF- $\beta$ .

## b) Observation *in vitro* d'une migration amiboïde

Afin de valider notre hypothèse nous avons entrepris des expériences de migration et invasion à l'aide de l'appareil Xcelligence. Il permet de mesurer l'impédance des cellules grâce à des électrodes fixées à une membrane et cela pendant de très nombreuses heures. Pour étudier la migration cellulaire, les cellules sontensemencées sur une membrane percée de pores, imitant le principe d'une chambre de Boyden. Pour l'étude de l'invasion, la membrane est cette fois recouverte d'une matrice extracellulaire comme du collagène ou du matrigel que les cellules doivent envahir pour rejoindre la même membrane percée. La différence d'impédance mesurée reflète donc le passage des cellules au travers de la membrane. Pour confirmer que les 3 lignées de CTC avaient une migration de type amiboïde, nous avonsensemencé les 3 lignées de CTCs en présence de l'inhibiteur Y27632, un inhibiteur de ROCK qui est une protéine fortement impliquée dans ce type de migration. Les résultats montrent qu'en moins de 2 jours on peut clairement voir une diminution de l'invasion des deux lignées lorsqu'elles sont exposées à l'inhibiteur de la voie RhoA-ROCK (Figure 45A). Cependant la voie RhoA/ROCK n'est pas totalement spécifique de la migration amiboïde. Ces résultats doivent donc être confortés en utilisant un inhibiteur des MPPs (le GM6001 par exemple) et qui ne devrait pas inhiber la migration amiboïde puisque les MPPs sont plutôt utilisées par les cellules mésenchymateuses.

Afin de visualiser la migration de type amiboïde, nous avons réalisé un test de migration sur la lignée CTC41. Les cellules individualisées ont étéensemencées dans une matrice de collagène en présence de fibroblastes. Filmée par une caméra pendant plusieurs jours, nous avons pu obtenir des photos et vidéos permettant de constater des cellules individuelles ou groupées (clusters) quittant le tumoroïde (Figure 45B). En étudiant plus précisément ces cellules quittant la masse initiale, on peut constater qu'elles ont un déplacement lent permis grâce à des structures membranaires typiques d'une migration amiboïde (le blebbing en anglais) dès le 5<sup>ème</sup> jour après l'ensemencement (Figure 45C). De plus, ces types de structure membranaires sont aussi bien observées sur les cellules individuelles (Figure 45D) que sur les clusters (Figure 45E).

Ces résultats devront également être consolidés en les reproduisant sur les lignées de CPP44 et CPP45. Des mesures de « round shape » (ou rondeur) sur les lignées de CTCs, de CPPs et sur les fibroblastes permettront également de confirmer l'aspect typique de cellules amiboïde ou mésenchymateuses.



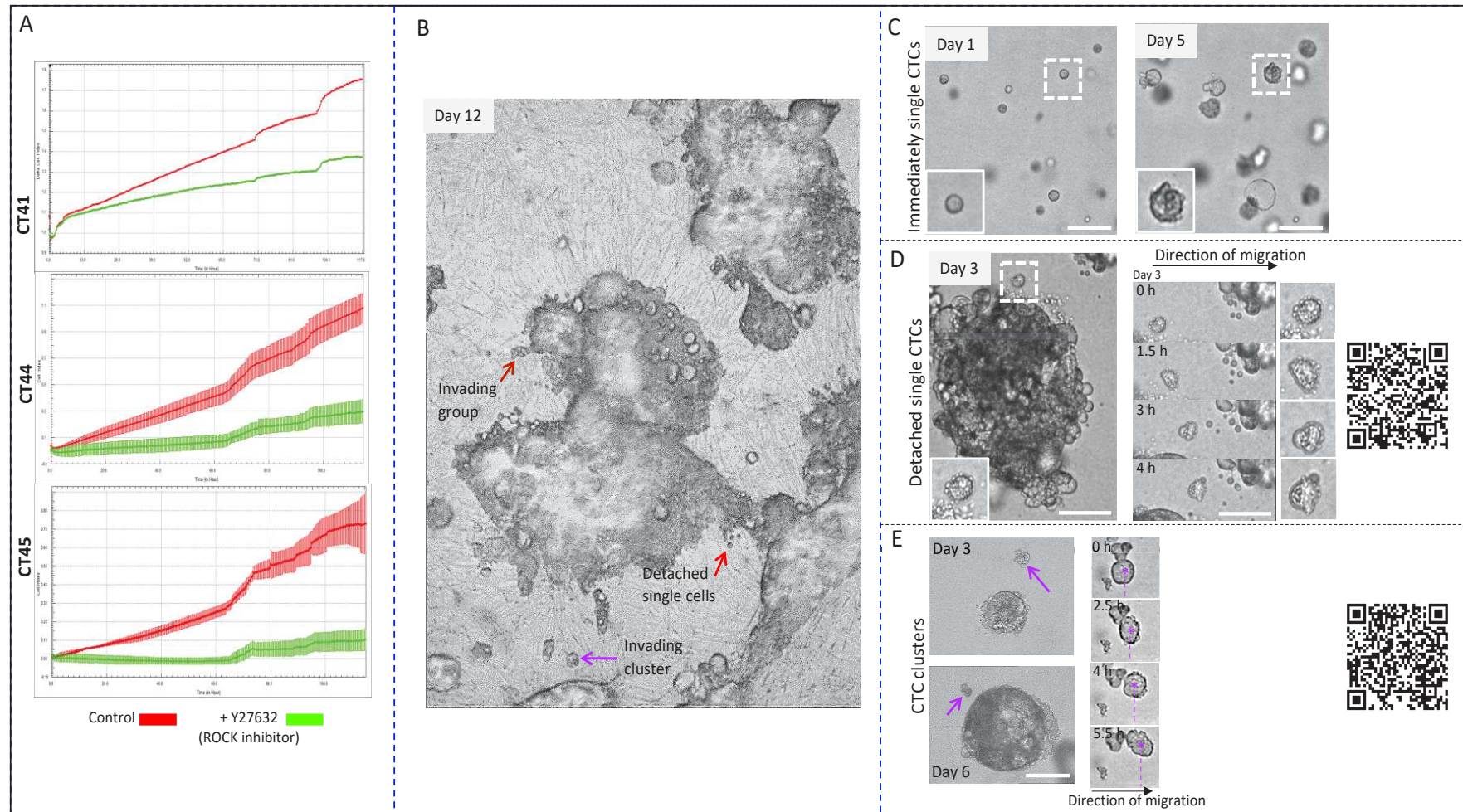


Figure 45: Migration amoiboide des CTCs

(A) Impact de l'Y27632 sur l'invasion cellulaire. Analyses réalisées par le dispositif XCelligence sur CIM-platee coatée avec du matrigel. (B) Invasion de la matrice de collagène par des CTCs individuelles ou groupées (clusters) après 12 jours de co-culture avec les fibroblastes MRC5. (C) Photographies issues de vidéos réalisées en Time laps. Les sphères de CTCs sont incluses dans une matrice de collagène de faible densité et en présence des fibroblastes MRC5. Le déplacement et les structures membranaires propres à la migration amoiboide sont visibles dès le 3<sup>ème</sup> jour. Les QR codes donnent accès à des vidéos montrant une migration amoiboide.

### c) Confirmation *in vivo*

Nous avons voulu savoir si nos observations de migration individuelle et collective avec un aspect de cellules amiboïdes étaient observables *in vivo*. Pour cela nous avons réalisé deux types de xénogreffes des lignées de CTCs. Les premières injections étaient des injections sous-cutanées, rapides et faciles mais physiologiquement moins pertinentes. Ensuite des injections intra-caecales ont ensuite été réalisées afin d'injecter les cellules dans un organe similaire à celui d'où elles proviennent et pour obtenir des métastases pulmonaires et hépatiques spontanées. L'analyse histologique de coupes des tumeurs sous-cutanées (Figure 46A), caecales et des organes envahis (poumons et foies) (Figure 46B) nous ont permis de confirmer la présence de cellules seules ou individuelles ayant quitté la masse tumorale principale, parfois à la bordure du front de migration et parfois très éloignées.

Il sera nécessaire de réaliser de nouveau cette expérience à partir des lignées issues de tumeurs primaires ou métastases hépatiques afin de visualiser si ce genre d'évasion de la tumeur primaire a lieu et quelle morphologie ont ces cellules individuelles ou en clusters. De plus, il serait intéressant de renouveler ces expériences en présence des inhibiteurs utilisés *in vitro* afin de confirmer l'impact sur la migration amiboïde des CTCs.



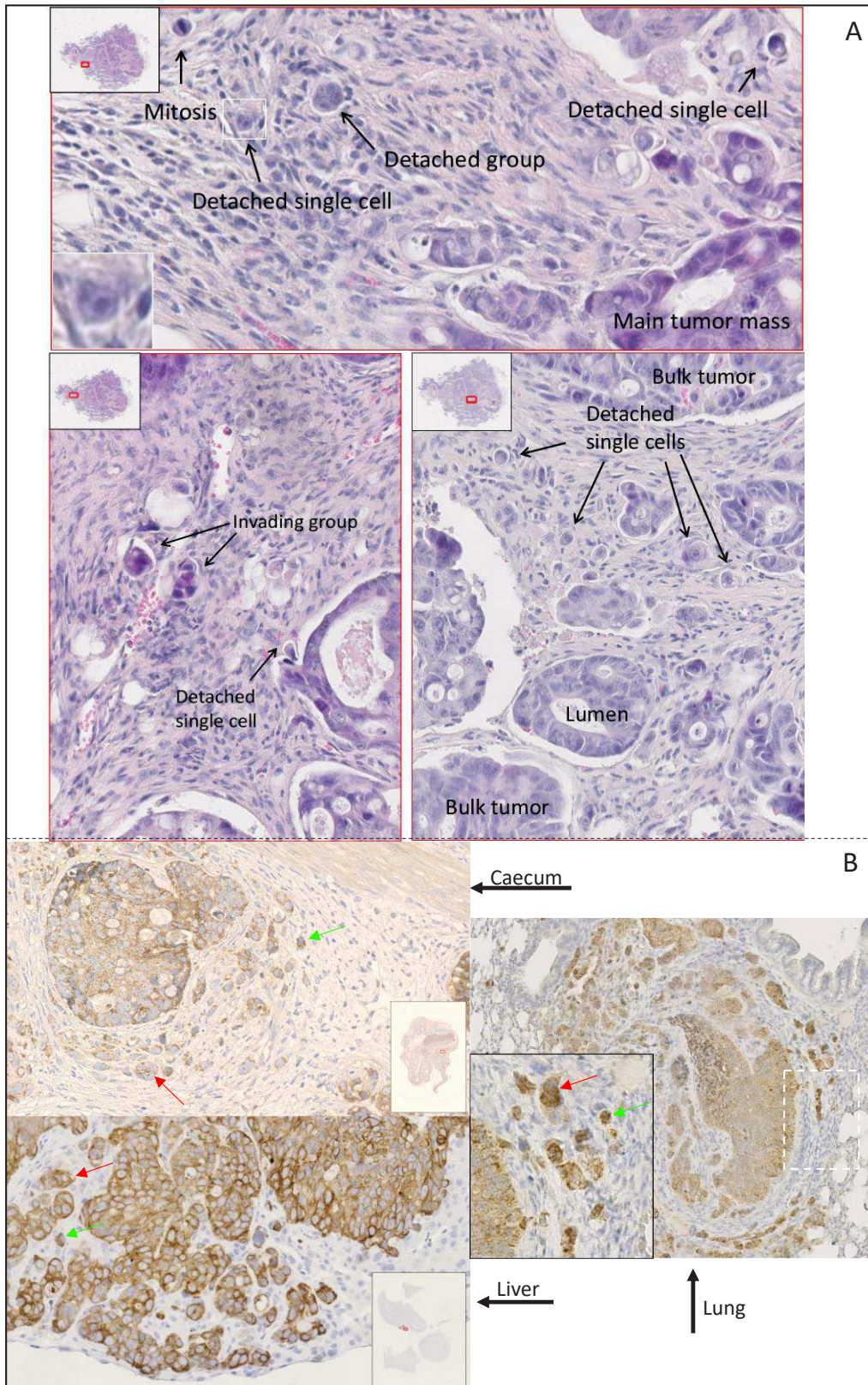


Figure 46: Détection des CTCs quittant la masse tumorale.

(A) Marquage hématoxiline eosine montrant la présence de migration collective et individuelle dans les tumeurs sous-cutanées. (B) Marquage p-Mito montrant la présence de migration collective et individuelle dans les tumeurs intra-caecales et les métastases hépatiques et pulmonaires.

#### d) Validation d'une migration de type amiboïde sur des coupes de tumeurs colorectales et métastases hépatiques humaines

À la suite de ces observations *in vitro* et *in vivo*, nous avons également voulu observer si sur des échantillons de patients, il était possible d'observer ces cellules échappées de la tumeur primaire et des métastases. L'analyse en coupe des exérèses tumorales des patients 44 et 45 nous permet d'observer de nombreuses cellules individuelles parvenues à quitter la tumeur primaire et également quelques cellules en clusters (Figure 47A). Au niveau des métastases hépatiques, nous n'avons pas pu observer de cellules en clusters mais nous pouvons observer de nombreuses cellules individuelles (Figure 47B).

#### e) Conclusion et perspectives

Nous sommes parvenus à obtenir pour la première fois de nombreuses évidences en faveur d'une migration de type amiboïde par les cellules tumorales circulantes colorectales. Les expériences réalisées sur les lignées mésenchymateuses CPP44 et CPP45 permettraient de visualiser l'aspect d'une migration de type mésenchymateux et ainsi de confirmer l'aspect et la migration particulière des lignées de CTCs. Il serait également envisageable de réaliser des expériences d'imagerie intra-vitale pour observer en temps réel, au niveau d'une tumeur sous-cutanée, le départ des cellules cancéreuses. Enfin, la validation d'un inhibiteur plus spécifique de la migration amiboïde permettrait de solidement renforcer notre hypothèse et pourrait également être une stratégie thérapeutique pour empêcher une partie du processus de dissémination tout en tentant le plus possible de ne pas impacter la migration amiboïde des cellules immunitaires.



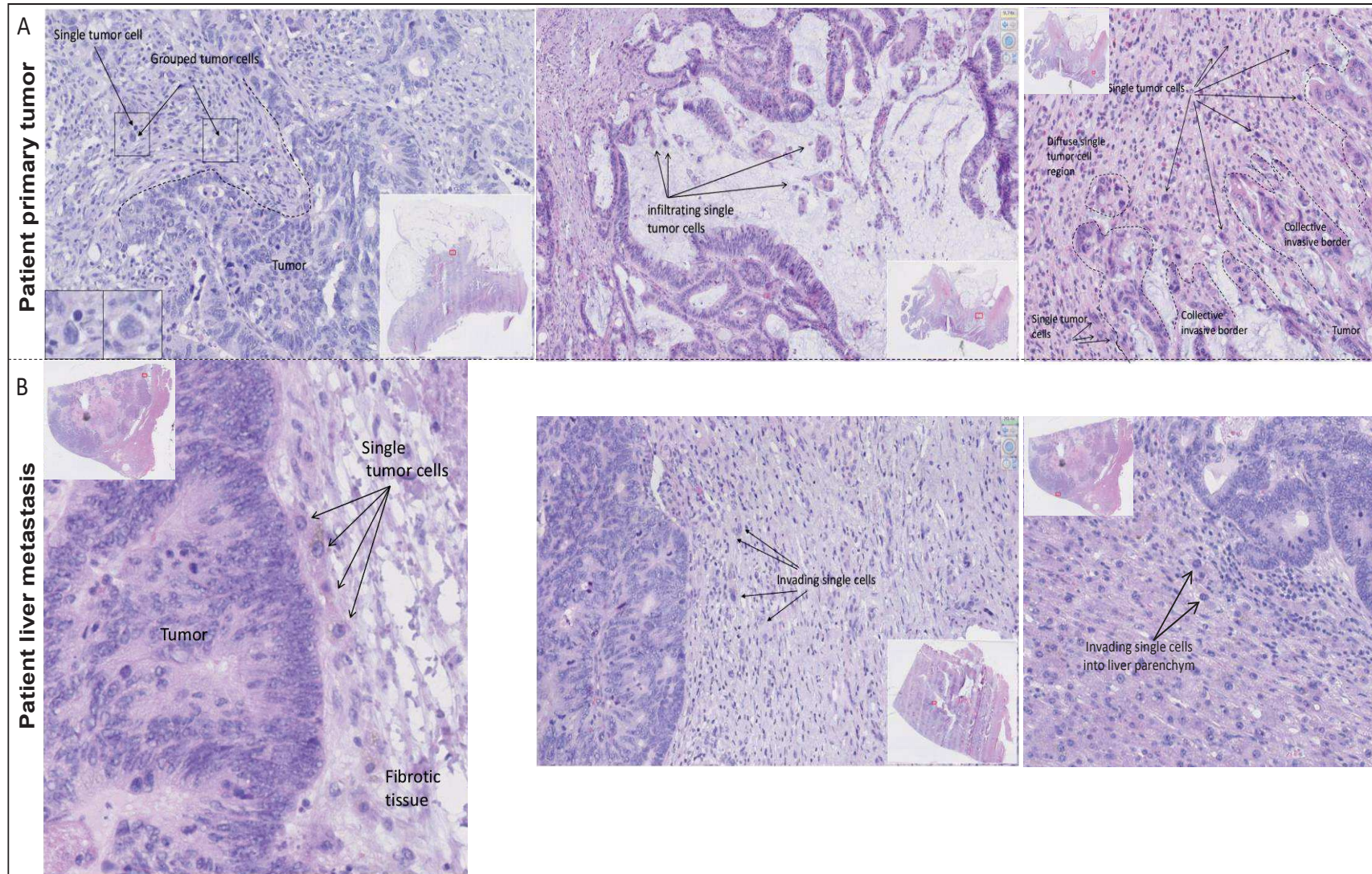


Figure 47: : Marquage hématoxiline éosine sur des coupes d'exérèses des patients 44 et 45 montrant des cellules colorectales quittant individuellement ou collectivement la masse tumorale du site primaire (A) et d'une métastase hépatique (B).

## 6. Conclusion et Discussion PARTIE 1

Le premier axe de cette partie consistait à découvrir de nouveaux marqueurs membranaires des CTCs grâce à l'approche Phage Display tout en validant un potentiel marqueur de CTCs : la protéine membranaire CD44v6. À l'issue de cette partie, je suis parvenu dans un premier temps à amplement optimiser les productions et les purifications de nanobodies pour pouvoir permettre ensuite la caractérisation des antigènes ciblés à la surface des lignées de CTCs, et dans un deuxième temps démontrer que l'on peut utiliser CD44v6 comme un outil précieux pour détecter et isoler les CTC dans deux cancers d'origine différente (le sein et le côlon). De plus, il apparaît que parmi les différentes populations de CTCs colorectales, celles qui n'expriment pas le marqueur épithélial EpCAM expriment le marqueur CD44v6. Cette complémentarité de marqueurs permettrait ainsi d'avoir une vision plus globale des cellules tumorales présentes dans le compartiment sanguin. J'ai pu également réaliser une preuve de concept que le marqueur CD44v6 ne serait pas uniquement restreint aux CTCs colorectales mais également exprimé par des CTCs de cancer du sein. Un plus grand nombre d'échantillons seraient nécessaires pour confirmer cette preuve de concept. Enfin il serait également intéressant d'élargir ces analyses à d'autres types de cancers que le sein et le côlon pour savoir si nous avons identifié un pan marqueur des CTCs.

Cependant, l'expression de CD44v6 ne semble pas *de facto*, exclure le maintien d'un phénotype épithélial. En effet, l'ensemble des lignées de CTCs établies au laboratoire sont également à la fois très épithéliales et expriment très fortement CD44v6. Il est possible que la réexpression d'EpCAM ou de CD44v6 soit due aux conditions de culture. Cependant, cette possibilité semble peu probable pour deux raisons. Tout d'abord parce que nous avons détecté de très rares CTCs exprimant les deux marqueurs dans le sang des patients. Ensuite, la lignée commerciale de CCR HT29 qui est épithéliale, exprime très peu CD44v6 en étant cultivée dans les mêmes conditions de culture que nos lignées de CTCs. Il se peut que cette population de CTCs à la fois épithéliale et exprimant CD44v6, dispose de caractéristiques bien particulières et représente la population de CSCs qui sont parvenues à rejoindre la circulation sanguine. D'autant plus que les lignées de CTCs mammaires présentent également un fort phénotype épithélial comme celles du CCR et nous savons par notre étude sur CD44v6, qu'elles expriment également très fortement cette protéine. Il serait intéressant de parvenir à isoler spécifiquement cette sous-population co-exprimant ces deux marqueurs afin de non seulement de corrélérer leur expression à un mauvais pronostic pour les patients mais également de xénotransplanter ces trois populations de CTCs (les simples positives et la double positive) pour comparer leur capacité tumorigène et surtout métastatique.

Les deux autres populations exprimant qu'un seul des deux marqueurs (CD44v6 ou EpCam) pourraient alors représenter d'une part la sous population de CTCs plus ou moins entrées en EMT,



et d'autre part, la sous-population de CTCs progéniteurs plus différenciées. Grâce au dispositif Parsortix® disponible au laboratoire, nous réaliserons des marquages par immunofluorescence pour savoir si la population exprimant CD44v6 et non EpCAM exprime des marqueurs de cellules mésenchymateuses comme la vimentine ou la N-Cadhérine. Pour résumer ces deux autres populations ne sont cependant pas à négliger. Bien au contraire puisque les cellules mésenchymateuses conservent une forte capacité à initier des tumeurs si elles parviennent à maintenir ce phénotype grâce au microenvironnement tumoral qu'elles trouveront ou induiront dans le site distant. Quant à la population qui exprime uniquement EpCAM, elle pourrait refléter les différents progéniteurs plus ou moins différenciés parvenus également à rejoindre la circulation sanguine. Ces cellules peuvent également entrer en EMT une fois parvenues au site distant si le microenvironnement local le permet, mais elles peuvent également opérer une dédifférenciation afin de se reprogrammer en CSC et finalement initier une métastase.

C'est d'autant plus plausible que cette année une étude réalisée par l'équipe de Jacco van Rheenen a été publiée dans ce sens [646]. A partir d'un élégant modèle murin permettant de différencier les cellules de CCR exprimant le marqueur membranaire souche Lgr5 des autres cellules, ils ont pu suivre par imagerie intra-vitale, la dissémination à la fois des cellules exprimant Lgr5 et celles n'exprimant pas ce marqueur souche. Ils démontrent que les cellules n'exprimant pas Lgr5 sont bien plus nombreuses à disséminer et parvenir à rejoindre le foie. Mais étonnamment, lorsque ces fréquentes CTCs parviennent à extravaser et à proliférer pour former une micro-métastase, l'évolution de cette dernière est obligatoirement dépendante de la réexpression de Lgr5 dans une des cellules qui compose la micro-métastase. Ces cellules exprimant Lgr5 expriment également d'autres marqueurs de cellules souches. Il est d'autant plus surprenant que cette ré acquisition d'expression de Lgr5 n'est pas dépendante de facteurs pro « phénotype souche » sécrétés par le microenvironnement tumoral tels que l'EGF et l'HGF. Avec ou sans ces deux facteurs, une CTC n'exprimant pas Lgr5 et mise en culture dans du matrigel, parvient à former un petit tumoroïde et très vite, une des cellules du tumoroïde re-exprime Lgr5. Cette cellule est donc essentielle pour soutenir l'apparition d'une macro-métastase. Une sous population minoritaire exprimant Lgr5 va se former par la suite au sein du tumoroïde ou de la métastase. Les cytokines du microenvironnement permettent seulement d'accélérer le processus.

Les auteurs proposent ainsi que bien qu'elles soient plus capables d'initier une métastase, les cellules exprimant Lgr5 sont bien moins nombreuses et vont ainsi statistiquement être moins à l'origine de métastase. Cependant, le grand nombre de cellules Lgr5 qui parvient à disséminer vont elles, être bien plus capables d'initier des métastases à condition qu'elles forcent l'une d'entre elles à re-exprimer Lgr5. On peut comparer ce processus à celui d'une colonie d'abeille qui a besoin de générer une reine pour maintenir la colonie. Des abeilles nourricières vont fournir

l'attention, la niche adaptée et les facteurs appropriés à une larve pour qu'elle devienne une reine. L'émergence d'une nouvelle reine est ainsi dépendante de quelques autres abeilles. Pour en revenir au cancer, cette organisation de petits groupes de cellules des micro-métastases semble donc être une condition sine qua non à la reprogrammation de l'une d'elles. Cette observation fait écho aux travaux de Nicola Aceto où les CTCs mammaires en clusters ont une signature souche plus importante que les CTCs individuelles [521]. Malheureusement, Fumagali, A. *et al* [646] ne décrivent pas s'ils ont constaté une différence d'expression de Lgr5 entre les cellules individuelles ou en clusters. Ils ont cependant pu constater que parmi les cellules qui quittaient la tumeur primaire, il y avait essentiellement des cellules individuelles et quelques clusters mais surtout, que les cellules Lgr5 migraient moins vite. Sans également décrire la morphologie de ces cellules, on peut se demander si cette moindre vitesse ne serait pas dû à un type de migration amiboïde. Nos résultats sur les lignées de CTCs qui ont un phénotype épithélial et souche très important, suggèrent fortement que les CSCs circulantes utilisent une migration de type amiboïde, ce qui n'a pour le moment jamais été démontré. En corrélant nos résultats sur la migration amiboïde des lignées de CTCs avec l'étude de Fumagali [646], nous pouvons reprendre l'hypothèse déjà suggérer que le mode de migration amiboïde est plus spécifique aux cellules souches cancéreuses et qu'elles conserveraient ce type de migration durant leur circulation dans l'organisme [647],[648].

Des cibles thérapeutiques permettraient d'éliminer ces cellules certes statistiquement peu fréquentes mais intrinsèquement les plus redoutables. On peut ainsi imaginer utiliser un inhibiteur ciblant un des acteurs moléculaires impliqués dans la migration amiboïde. Le transcriptome que l'on a réalisé sur nos lignées de CTCs devrait nous permettre d'identifier de potentielles cibles à inhiber pharmacologiquement. Il reste cependant également important de cibler la migration de type mésenchymateuse. A la fois parce qu'il n'est pas exclu que les cellules ne pouvant réaliser leur migration de type amiboïde s'adapte et opte pour une migration mésenchymateuse, mais également parce que dès le départ, une population tumorale est entrée en EMT et conserve ce phénotype durant au moins une partie du processus métastatique. L'étude en cours de révision de l'équipe de Andrei Turtoi à laquelle j'ai participé (en annexe), permet d'envisager le recours à des anticorps dirigés contre le TGFBI pour bloquer la migration d'une sous-population colorectale maligne. Cette étude démontre en effet que ces cellules malignes parvenues à quitter la tumeur primaire sont capables d'exploiter leur sécrétion autocrine de TGF- $\beta$ 1 malgré l'inactivation de la voie canonique. Elles profitent ainsi du TGF- $\beta$ 1 directement, sans passer par les sécrétions des fibroblastes activés par celui-ci comme démontré par Calon et ses collaborateurs [413]. Les sous-populations malignes dont les altérations de la voie TGF- $\beta$  ne concernent que les SMADs, peuvent activer la voie alternative p38/NF- $\kappa$ B afin de produire du TGFBI. Ce dernier agit sur les cellules cancéreuses de manière autocrine et paracrine afin d'activer

entre autres, la GTPase RAC1, impliquée particulièrement dans la migration de type mésenchymateux. Ainsi, la déplétion du TGF-BI pourrait altérer la dissémination des cellules les plus malignes et les rendre bien plus dépendantes à l'existence d'un microenvironnement pro-tumoral.

Une autre approche possible serait de cibler l'addiction des cellules en EMT vis-à-vis de certains métaux. En effet, une étude à laquelle j'ai également participé visait à comprendre le mécanisme expliquant l'effet bénéfique de la metformine sur la survenue de cancer. Connus pour altérer le cycle de Krebs et la fixation de métaux comme le cuivre, Sébastien Müller et Raphaël Rodriguez ont suggéré que la Metformine agirait sur les cellules en EMT, en ciblant leur cycle de Krebs et la fixation d'atomes de métaux tels que le cuivre. De manière brève, cette étude (en annexe) [649], démontre que les cellules requièrent du cuivre pour leurs propriétés d'oxydo-réduction au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie afin d'induire indirectement le programme d'EMT. La Metformine empêche ainsi la réduction des atomes de cuivre et par conséquent la formation d'atome de fer Fe<sup>3+</sup>. La dernière publication de l'équipe de Rodriguez à Curie [148] a permis d'approfondir cette addiction pour le cuivre par les cellules mésenchymateuses et de relier l'importance de CD44 à l'activation du programme d'EMT. Le fer est capté par l'acide hyaluronique (AH) puis absorbé par les cellules lorsque le récepteur CD44 parvient à fixer l'AH. Le fer va d'abord réagir avec le cuivre au niveau du cycle de Krebs pour permettre la synthèse d'alpha  $\alpha$ -cétoglutarate. Ce dernier va servir de co-substrat avec le fer à une déméthylase d'histones et d'ADN, permettant l'expression des gènes de l'EMT dont CD44. Il serait intéressant de vérifier si parmi les patients souffrant d'un cancer du sein ou colorectal par exemple, la prise de Metformine réduit le nombre de CTC exprimant CD44v6 puisque ce variant confère une meilleure affinité à l'AH.

Le deuxième axe de cette partie consistait à améliorer notre milieu de culture afin de prolonger de manière pérenne la mise en culture des CTCs que l'on a isolées selon les diverses stratégies dont nous disposons. En effet, une seule nouvelle lignée (CTC31) a pu être établie depuis mon arrivée au laboratoire. Les expériences d'enrichissement de notre milieu de culture (M12) sont prometteuses et permettraient potentiellement de parvenir à établir de nouvelles lignées issues d'autres types de cancer que le cancer du sein ou colorectal. Mais nous devons veiller à ce que cet enrichissement du milieu fonctionne sur des lignées de CCR présentant un large spectre d'altérations génétiques et pas seulement des lignées de CTCs avec une voie des MAPK activée à cause de la mutation BRAF. En effet, il est étonnant de constater que seules des CTCs exprimant la protéine mutée B-RAFV600E soient parvenues à s'établir. Il est possible que cette mutation particulière confère un avantage sélectif et qui agit, au niveau transcriptomique, en synergie avec

CD44v6 pour faciliter la survie des CTCs dans nos conditions de culture. Cette hypothèse fait l'objet d'un projet de thèse d'une étudiante de notre laboratoire.

Il est également très étonnant que comme CTC44 et CTC45, la lignée CTC31 ait un profil mutationnel divergent de celui de la tumeur primaire. Nous avons alors pensé que ces CTCs à l'origine de nos lignées pourraient provenir soit d'une sous-population très minoritaire au sein de la tumeur primaire soit d'un des sites métastatiques. Nous avons collaboré avec une équipe du CHU de Montpellier pour réaliser une recherche extrêmement sensible de la mutation *B-RAFV600E* par digital droplet PCR (ddPCR) sur des coupes de biopsies de la tumeur primaire et des 4 métastases hépatiques. Malheureusement il n'a pas été possible de détecter la présence de cette mutation dans l'ensemble des sites tumoraux. Indiquant que la sous-population dont provient la lignée CTC31 représentaient moins de 0,2% des cellules cancéreuses présentes sur ces coupes de tumeurs. Le patient ayant récidivé avec la formation d'une carcinose péritonéale, nous avons immédiatement pensé que cette carcinose péritonéale était probablement la conséquence de CTCs porteuses de la mutation *B-RAFV600E*. Cette mutation est en effet très corrélée aux carcinoses péritonéales. Malheureusement l'analyse de l'ADN tumoral circulant comme de la présence de CTCs porteuses de cette mutation à ce moment-là de l'évolution de la maladie n'a pas permis de détecter la présence de cette mutation. Probablement que la sous-population dont est originaire la lignée CTC31 provient d'une zone de la tumeur dont nous n'avons pas eu accès par les biopsies, ou que cette mutation est apparue dans un autre site tels que des ganglions lymphatiques envahis. L'hypothèse selon laquelle la mutation soit apparue durant la culture est peu probable puisqu'aucune des autres lignées de CPPs ne présentent cette mutation après avoir été cultivées dans les mêmes conditions que les lignées de CTCs.

L'ensemble de ces résultats démontrent l'importance d'améliorer notre capacité à isoler pour ensuite caractériser l'ensemble des populations de CTCs afin de trouver un moyen d'empêcher la formation de métastases, soit en empêchant leur départ de la tumeur primaire, soit en réduisant leur capacité à s'adapter aux microenvironnements des organes qu'elles envahissent.

## Partie 2 : Modeles murins d'etudes de la dissemination precoce du CCR

### 1. Introduction

Nous avons évoqué à la fin de l'introduction les différents modèles murins disponibles pour étudier le cancer colorectal et sa dissémination. Chacun avec ses avantages et ses limites comme tous les modèles utilisés en biologie. Il n'est cependant pas possible d'étudier la dissémination des CCR suivant la voie conventionnelle, c'est-à-dire initiée par une activité constitutive de la voie Wnt. Qu'il s'agisse de modèles transgéniques de tumorigénèse intestinale constitutive ou inducible ou encore d'une tumorigénèse colique induite par l'association AOM/DSS, les souris généreront des tumeurs mais ne survivront pas assez longtemps pour que l'on puisse détecter des métastases même dans le cas où elles développent des carcinomes invasifs. Pour une raison que l'on ignore, il est possible que ces modèles murins reproduisant le modèle conventionnel du CCR humain ne soient pas capables de disséminer. Ou alors, les cellules tumorales disséminées depuis des tumeurs dont le « gate keeper » est la mutation sur le gène *APC*, requièrent un temps de latence plus important pour développer des métastases détectables.

Si cette deuxième hypothèse est la bonne, l'évolution technologique ouvre la possibilité d'étudier et décrypter la dissémination dans le contexte du CCR, malgré la latence du développement des métastases visibles. Cette possibilité repose sur l'utilisation des gènes rapporteurs (des gènes codant pour des protéines fluorescentes) dont l'expression est inducible et spécifique d'un compartiment cellulaire [650], [651], combinée à des technologies suffisamment sensibles pour détecter les rares cellules tumorales disséminées (CTD) colorectales fluorescentes telles que la cytométrie en flux ou la transparence d'organes et d'animaux entiers visualisés ensuite par de très puissants microscopes à feuillets de lumière [652].

Constatant l'accumulation d'études détaillées sur la dissémination précoce et la dormance dans de nombreux types de cancer et ayant quelques indices cliniques publiés dans la littérature sur le CCR, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une dissémination précoce dans le CCR et par conséquent voulu valider la présence de CTDs à un stade très précoce de la tumorigénèse intestinale. Afin de pouvoir caractériser cette dissémination précoce, nous nous sommes inspirés du modèle murin utilisé par Rhim et ses collaborateurs [274] pour générer un nouveau modèle permettant le traçage des CTDs depuis des adénomes intestinaux fluorescent.

Pour cela, nous voulions un modèle murin transgénique permettant une perte fonctionnelle uniquement du « gate keeper » *APC*, afin de nous placer à un temps très précoce de l'évolution du CCR (Figure 48A). Grâce à nos collègues de l'équipe de Philippe Jay, experts dans les modèles murins nous avons pu obtenir une souris transgénique inducible *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>*, *Apc<sup>LoxP</sup>*, que nous avons croisée avec une souris transgénique *Rosa26<sup>mT/mG</sup>*. Cette dernière exprime de manière ubiquitaire grâce au promoteur *Rosa26* le gène rapporteur Tomato encadré de séquences *LoxP* et

dont l'excision inductible permet l'expression du gène rapporteur de la GFP [650]. Pour ces deux protéines fluorescentes, leur localisation sera à la membrane (*mT/mG* pour membrane Tomato et membrane GFP). À l'issue du croisement des deux souris précédentes, nous avons généré le modèle *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>LoxP</sup>, Rosa26<sup>mT/mG</sup>*. Notons que ce nouveau modèle ne dispose que d'un allèle *APC* dont l'exon 14 est encadré de séquence *LoxP*. L'hétérozygotie de ce locus permet d'augmenter la durée de vie des animaux après la recombinaison au tamoxifène. De plus, nous traitons les animaux à l'âge de 6 à 8 semaines afin d'induire la formation de polypes sur un intestin de souris adultes. Après induction au Tamoxifène, l'enzyme recombinase *Cre<sup>ERT2</sup>* présente seulement dans l'épithélium intestinal et colique va alors transloquer dans le noyau et permettre l'excision à la fois de l'exon 14 d'un allèle du gène *APC* et l'excision totale du gène de la Tomato. Ainsi, chaque cellule intestinale et colique qui a été recombinaison va exprimer la protéine fluorescente GFP et sera devenue hétérozygote pour la mutation du gène *APC*. L'instabilité génétique importante pour ce locus va permettre en très peu de temps de perdre le deuxième allèle *APC* et provoquer la formation de polypes exprimant la GFP tandis que toutes les cellules non recombinaison par l'enzyme recombinase *Cre<sup>ERT2</sup>* garderont leur expression de la Tomato. Les premiers polypes détectables à l'œil sur l'intestin seront formés environ 2 mois après la recombinaison au tamoxifène. Pour la suite de cette partie, nous nommerons ces souris porteuses de polypes : *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>f/+</sup>; mTmG* (Figure 48B).

Nous avons également généré deux types de souris contrôles. Les souris *APC<sup>f/+</sup>; mTmG* ne pouvant pas produire la recombinase *Cre<sup>ERT2</sup>*, nous pouvons ainsi vérifier que malgré l'administration de Tamoxifène, l'exon 14 d'*APC* et le gène de la Tomato ne sont pas excisés. L'intestin et le colon de ces souris exprimeront la Tomato mais ne développeront pas de polype. Le deuxième contrôle que nous avons généré sont les souris *Vil-Cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG*. En absence de séquence *LoxP* sur un allèle du gène *APC*, l'administration de Tamoxifène ne permet que d'exciser le gène de la Tomato. Les cellules intestinales et coliques recombinaison exprimeront la GFP et les cellules non recombinaison continueront d'exprimer la Tomato (Figure 1B) mais aucun polype ne se formera. Bien que les deux types de souris contrôles soient importants, les souris *Vil-Cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG* qui auront des cellules intestinales et coliques exprimant la GFP seront préférées afin d'avoir une condition physiologique comparable à la condition pathologique et de savoir si en condition normale des cellules épithéliales intestinales disséminent.

La formation de polypes « verts » dans les souris *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>f/+</sup>; mTmG* avec le reste de l'organisme est resté rouge, nous permet ainsi de pouvoir détecter si elle a lieu, la dissémination précoce de cellules cancéreuses indépendamment de l'expression ou non de marqueurs épithéliaux et /ou intestinaux.



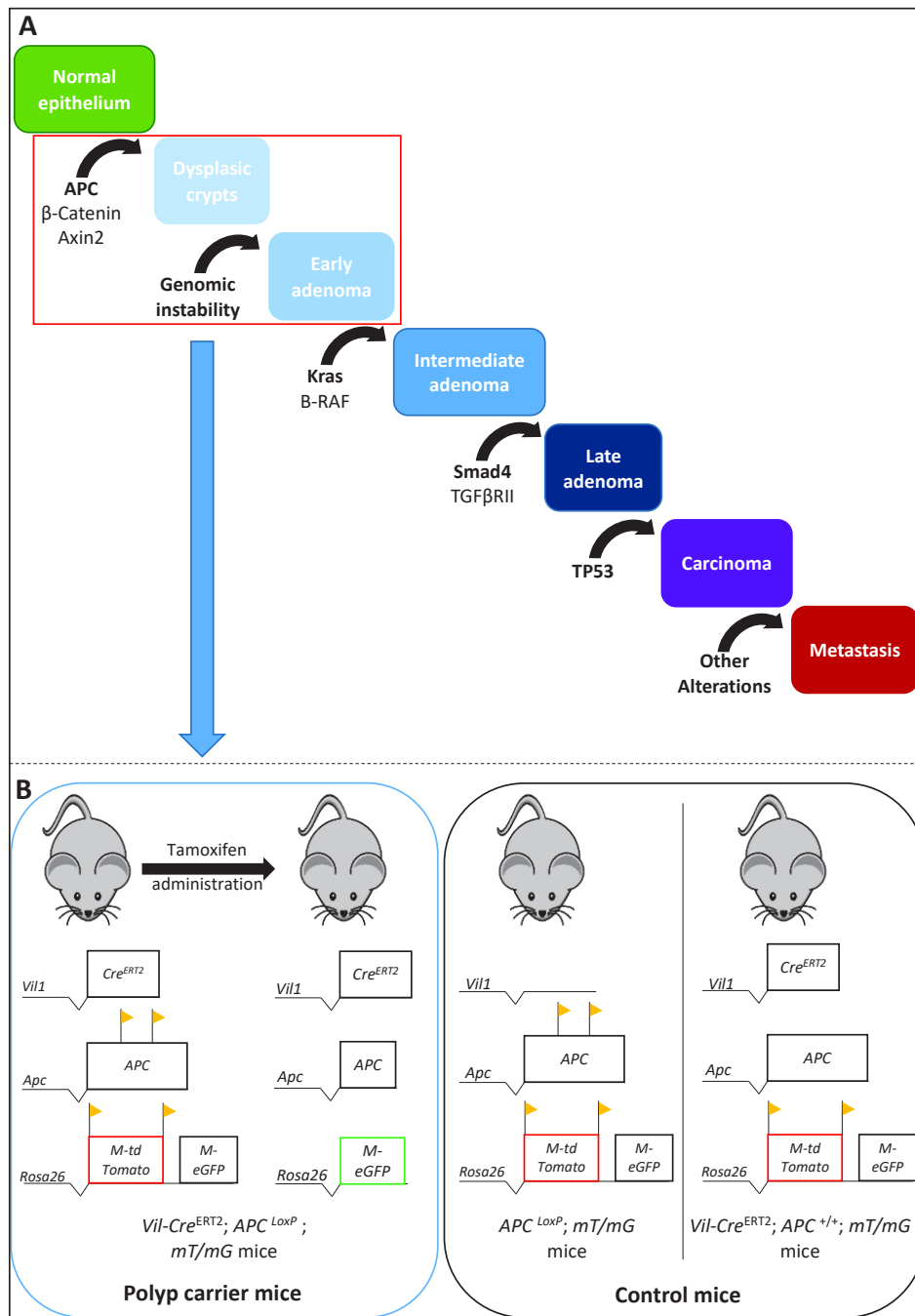


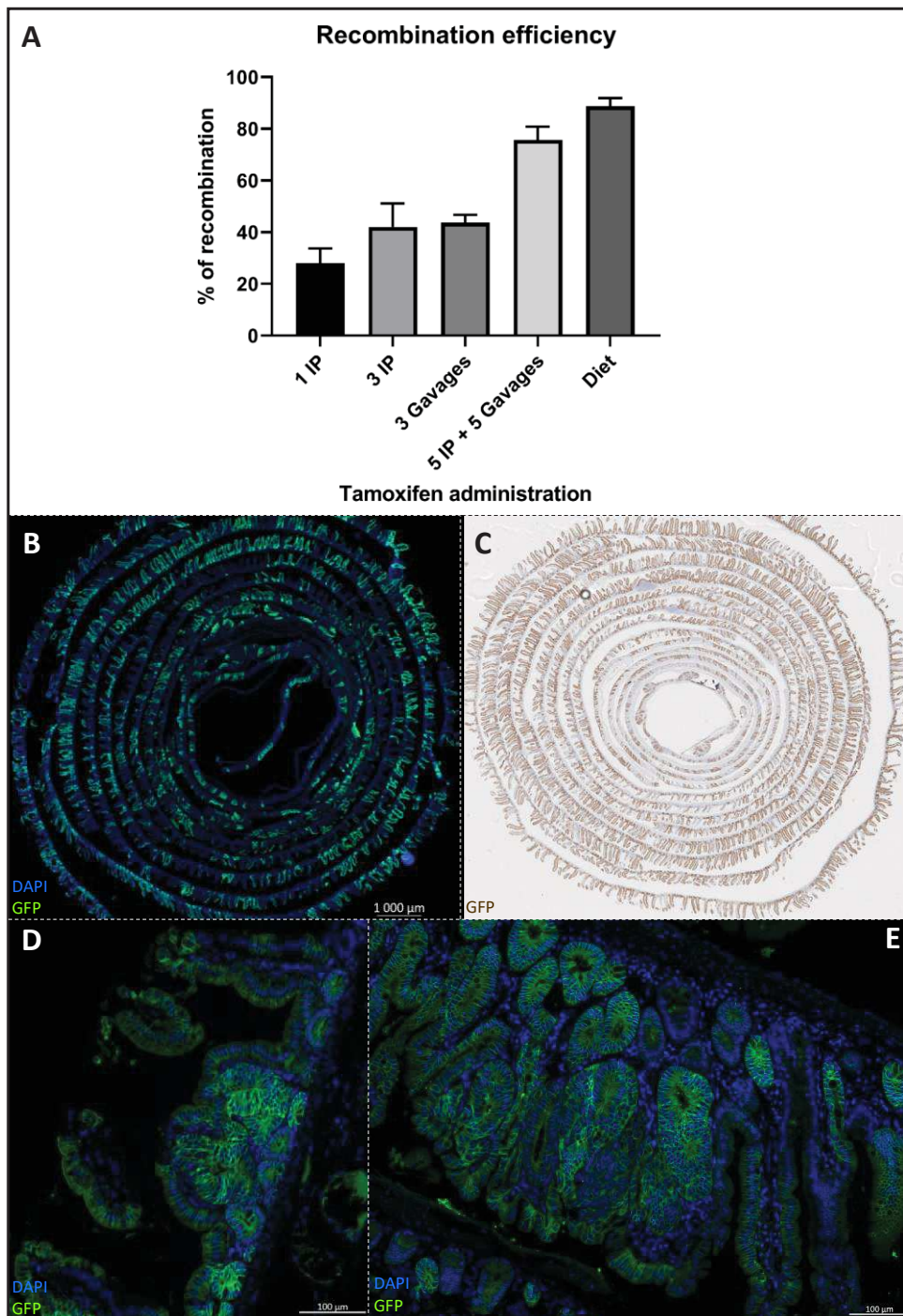
Figure 48: Schémas illustrant le modèle murin de tumorigénèse intestinale et colique précoce.

(A) Séquences d'apparitions des mutations « drivers » du cancer colorectal selon le modèle de Vogelstein et Fearon. (B) Représentation schématique du modèle murin *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG* et de ses deux contrôles. Les séquences *LoxP* sont illustrées par les drapeaux jaunes. Les gènes rapporteurs qui s'expriment sont encadrés en couleur. Après l'administration de Tamoxifène, les séquences *LoxP* sont recombinaisons si l'épithélium intestinal et colique expriment l'enzyme recombinase *Cre<sup>ERT2</sup>* (permis grâce au promoteur de la villine). Dans le cas où le gène *APC* contient des séquences *LoxP*, l'enzyme recombinase excise le codon 14 d'*APC* et le deuxième allèle d'*APC* sera altéré spontanément dans les semaines suivantes. L'excision de la cassette Tomato permet l'expression de la cassette *GFP* et le développement de polypes « verts ». En l'absence du gène de l'enzyme recombinase *Cre<sup>ERT2</sup>*, l'épithélium intestinal et colique reste « rouge » comme le reste de l'animal et ne développe pas de polype tandis que l'absence de séquences *LoxP* sur un allèle *APC* ne permet pas la formation de polype sur un épithélium intestinal et colique « vert ». *M-tdTomato* pour membrane-tandem dimeric Tomato. *M-eGFP* pour membrane-enhanced GFP.

## 2. Validation et optimisation du modèle

Nous avons d'abord vérifié l'efficacité de la recombinaison au niveau de l'allèle mT/mG en traitant des souris contrôles *Vil-Cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG* selon différentes voies d'administration du Tamoxifène et selon des durées différentes. Les Figures 49 A et C montrent que la double administration de Tamoxifène pendant 5 jours permet d'obtenir une expression de la GFP dans environ 80% de l'intestin et du colon. Cette dose importante de Tamoxifène nécessaire pour obtenir ce taux d'expression de la GFP est sans doute due à la taille du gène rapporteur Tomato qui est très importante (plus de 3000 paires de bases) et donc difficilement excisable. De plus l'expression de la villine étant légèrement moindre au niveau du colon, il est également nécessaire de traiter fortement et longtemps l'animal au Tamoxifène. Or pour augmenter les chances de détecter des CTDs « vertes », nous sommes partis du postulat qu'il était plus pertinent d'avoir un maximum de polypes « verts » et si possible également au niveau du côlon. Il est important de se rappeler que les animaux qui développeront des tumeurs deviennent réellement hétérozygotes après l'induction au Tamoxifène et par conséquent seulement une partie des cellules hétérozygotes perdront le deuxième allèle du gène *APC*. Pour réduire la manipulation et la souffrance des souris dûes aux piqûres répétées et les hautes doses de Tamoxifène pendant 5 jours, nous avons finalement opté pour l'utilisation de croquettes contenant du Tamoxifène. Comme l'illustre la Figure 49A et 49C, nous obtenons une recombinaison presque totale de l'épithélium intestinal et colique.

Nous avons par la suite induit la formation de polypes sur les souris *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>f/+</sup>; mTmG* afin de vérifier le bon fonctionnement simultané des deux allèles contenant les séquences *LoxP*. La Figure 49D et 49E nous indique que les souris sacrifiées au moins 8 semaines après la fin de l'administration du Tamoxifène, ont développé des polypes dans lesquels les cellules cancéreuses expriment la GFP. A l'inverse, lorsque que les souris contrôles *APC<sup>f/+</sup>; mTmG* mangent des croquettes qui contiennent du Tamoxifène, nous avons vérifié qu'il est impossible de recombiner leur épithélium intestinal (non montré).



*Figure 49: Validation du modèle  $Vil\text{-}cre^{ERT2}; APC^{f/+}; mTmG$ .*

Le pourcentage de recombinaison de l'épithélium intestinal et colique a été évalué par l'expression de la GFP selon différentes voies et durées d'administration du Tamoxifène sur des souris  $Vil\text{-}Cre^{ERT2}; APC^{+/+}; mTmG$  (A) en comptant le nombre d'axe crypte-villosité exprimant entièrement la GFP sur des swiss-rolls marqués par immunofluorescence (B) ou immunohistochimie (C). La formation de polypes « verts » a également été recherchée par immunofluorescence sur des swiss-rolls de souris  $Vil\text{-}cre^{ERT2}; APC^{f/+}; mTmG$  sacrifiées 4 semaines (D) et 8 semaines (E) après l'induction au Tamoxifène.

### 3. Caractérisations des polypes

Nous avons voulu par la suite caractériser les cellules cancéreuses constituant les polypes afin d'identifier de potentiels marqueurs exprimés par les CTDs et qui complèteraient l'expression de la GFP. Ainsi, comme décrit dans la littérature, la perte fonctionnelle du gène APC provoque une localisation nucléaire et cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine dans les cellules cancéreuses des polypes « verts » (Figure 50).

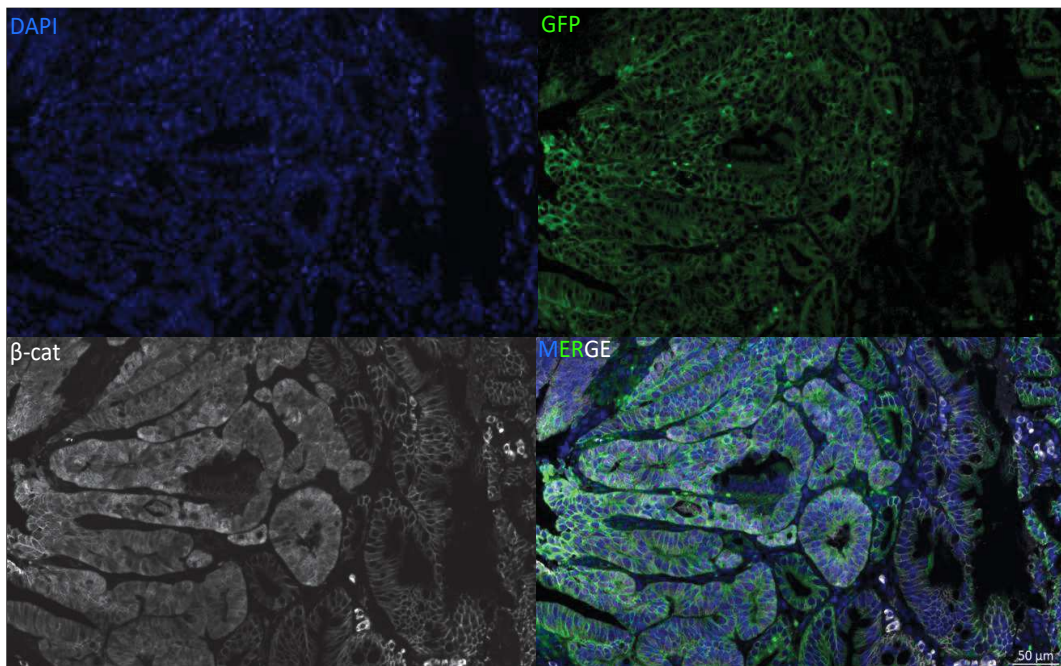


Figure 50: L'activation constitutive de la voie Wnt : permet une translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine (en blanc) au niveau des cellules exprimant de la GFP (en vert) dans les polypes.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'expression des marqueurs intestinaux tels que la villine, la cytokératine 20 (CK20) et la mucine2 (Muc2). Ne pouvant pas combiner le marquage de la GFP ou de la  $\beta$ -caténine avec le marquage de ces trois marqueurs intestinaux pour des raisons d'incompatibilités d'espèce, nous avons utilisé un anticorps ciblant la protéine Sox17 identifiée par l'équipe de Philippe Jay comme un très bon marqueur des cellules cancéreuses suite à une perte fonctionnelle du gène APC [653].

Au niveau des zones tumorales distinguables grâce à la forte expression spécifique de Sox17 dans le noyau des cellules cancéreuses, on constate une perte d'expression presque totale de la villine et une perte totale d'expression de CK20 et Muc2 comparé aux cryptes et aux villosités saines avoisinantes (Figure 51A).

Enfin nous avons voulu savoir si les cellules cancéreuses des polypes conservent un niveau d'expression et une localisation de la E-cadhérine comparable au cellules saines environnantes et si cette baisse d'expression est due à un recrutement des macrophages résidents. La baisse

d'expression de l'E-cadhérine est en effet un élément indiquant une perte de jonction intercellulaire et une potentielle entrée en EMT [654]. De plus dans le cancer du sein, cette perte d'expression de l'E-cadhérine précédant une dissémination précoce est dépendante du recrutement des macrophages résidents du stroma mammaire [655].

Nous visualisons bien une nette baisse d'expression de l'E-cadhérine sur l'ensemble des cellules cancéreuses comparé au tissu sain environnant mais il apparaît très difficile à cette échelle d'observation de distinguer la moindre interaction proche de macrophage avec une cellule cancéreuse exprimant bien moins que les autres l'E-cadhérine (Figure 51B).

L'ensemble de ces données nous indique que l'activation anormale de la voie Wnt produit comme attendu une distribution bien plus cytoplasmique et nucléaire de la  $\beta$ -caténine et par conséquent, une dédifférenciation visualisable par la perte des marqueurs intestinaux et d'au moins un marqueur épithélial. Enfin, l'expression de Sox17 semble être un très bon marqueur complémentaire de la GFP pour la détection des CTDs à l'inverse de la  $\beta$ -caténine dont la localisation diffuse est bien moins facilement visualisable sur une seule cellule ou un petit groupe de cellules disséminées.

#### 4. Évidences d'une dissémination précoce

Nous avons par la suite recherché les CTDs « vertes » dans les organes où la dissémination colorectale est la plus fréquente, c'est-à-dire dans le foie et les poumons. Cette recherche de CTDs a été réalisée par deux approches distinctes. La première est la cytométrie en flux et la deuxième est l'immuno-histochimie sur des coupes de foie et poumon des souris. Afin de pouvoir réaliser les réglages du cytomètre en flux et s'assurer que l'on ne puisse avoir des marquages non spécifiques, nous avons également analysé des échantillons provenant de souris contrôles *Vil-Cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG*. Bien que très rares, quelques cellules exprimant la GFP ont été détectées dans le foie ou le poumon de différentes souris porteuses de polypes « verts » (Figure 52B) tandis que seules des cellules exprimant la GFP ont pu être détectées uniquement au niveau de l'intestin des souris contrôles (Figure 52A). Il est intéressant de noter qu'une partie de ces très rares CTDs « vertes » ne sont pas épithéliales alors que l'immense majorité des cellules cancéreuses des polypes sont épithéliales (Figure 52B). Enfin, la rareté de ces CTDs est confirmée par la très grande difficulté à obtenir une coupe d'organe contenant au moins une cellule exprimant la GFP (Photographie Figure 52B).



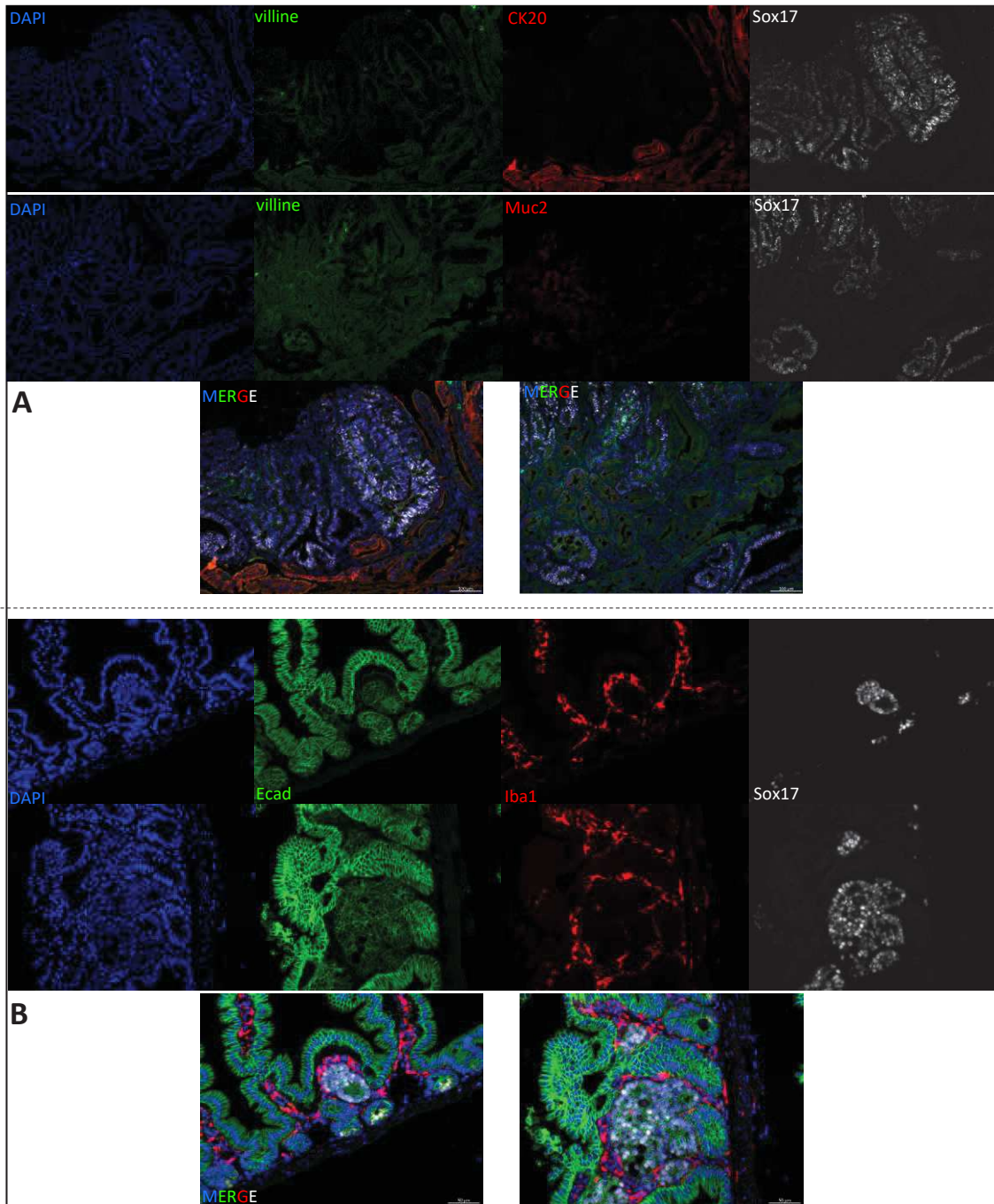


Figure 51: Caractérisation des polypes

(A) Les cellules cancéreuses identifiables par leur expression nucléaire de Sox17 (blanc) ont fortement perdu l'expression de de la villine (vert) et totalement l'expression de CK20 (image du haut en rouge) et de Muc2 (image du bas en rouge). (B) Les cellules cancéreuses identifiables par l'expression nucléaire de Sox17 (blanc) ont une localisation de l'E-cadhérine (vert) bien moins forte au niveau de la membrane et les cellules cancéreuses sont fortement entourée de macrophages détectable par leur expression d'Iba1 (rouge).



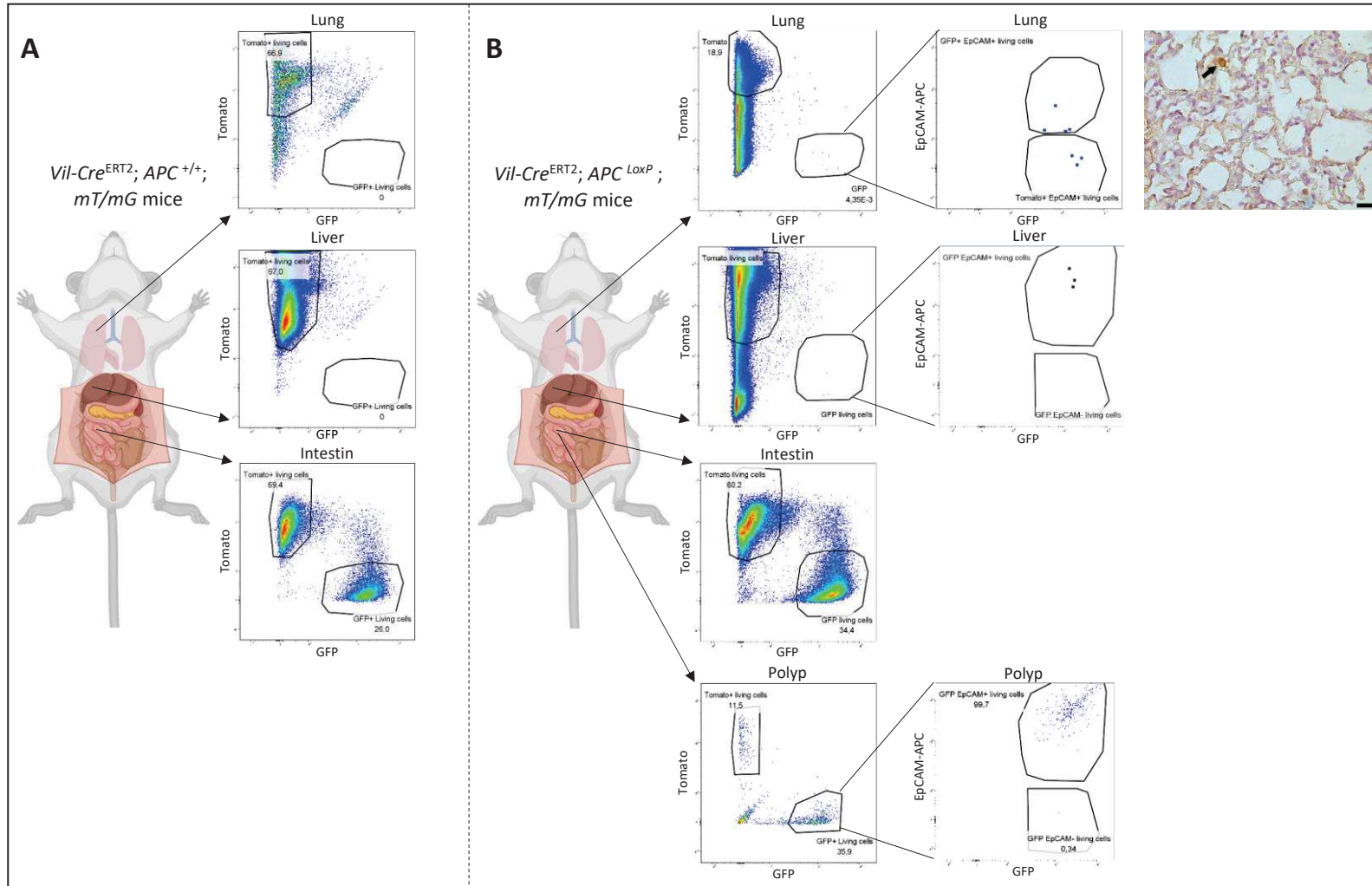


Figure 52: Fenêtres d'analyse par cytométrie en flux des cellules exprimant la Tomato, la GFP et EpCAM dans différents organes

(A) Les organes dissociés d'une souris contrôle *Vil-Cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG* contiennent uniquement des cellules exprimant la Tomato à l'exception de l'intestin qui contient bien des cellules épithéliales exprimant la GFP. (B) Un poumon et un foie dissociés provenant de différentes souris *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>f/+</sup>; mTmG* contiennent de rares cellules exprimant la GFP que l'on peut retrouver sur des coupes de poumon du même animal. Une partie des cellules disséminées dans le foie n'expriment pas EpCAM tandis que les cellules exprimant la GFP dans la tumeur expriment toutes EpCAM. Toutes les souris ont été sacrifiées 2 mois après la fin de l'administration du Tamoxifène.

Pour pallier la difficulté de détection de ces très rares CTDs par les approches conventionnelles, nous avons opté pour la recherche de CTDs dans l'ensemble de l'organe grâce à la technique de transparençation (tissue clearing). Cette technique présente l'avantage de donner une vue d'ensemble de l'organe et des CTDs mais peut également nous indiquer si ces CTDs ont une localisation préférentielle dans ces organes (proches de vaisseaux par exemple). Il est également possible d'utiliser plusieurs marquages en simultanée afin d'obtenir des informations complémentaires. Divers protocoles de transparençation existent. De nombreuses tentatives nous ont par exemple conduit à abandonner le protocole Clarity car les étapes qui consistent à éliminer les lipides membranaires provoquaient la perte de la majorité de la GFP et de la Tomato membranaires. Nous sommes finalement parvenus à valider le protocole i-Disco sur notre modèle (Figure 53A) et à transparençer les organes d'intérêts (intestin, foie et poumon) de deux souris *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>f/+</sup>; mTmG* et de deux souris contrôles *Vil-Cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG*. Aucune CTD « verte » n'a pu être détectée dans les lobes de foie et dans les poumons des souris contrôles (non montré) mais des CTDs « vertes » ont été de nouveau observées dans les lobes de foie et les poumons des souris porteuses de polypes (Figure 53B et 53C).

Enfin par une approche d'imagerie Intra-vitale proposée par la plateforme IPAM, après de nombreuses heures nous sommes parvenus, à filmer un cluster de CTCs « vertes » dans un vaisseau sanguin à proximité d'un polype (Figure 53D).

L'ensemble de ces résultats nous indique que de rares cellules « vertes » parviennent à quitter les polypes pour rejoindre la circulation sanguine et disséminer dans le foie et les poumons.



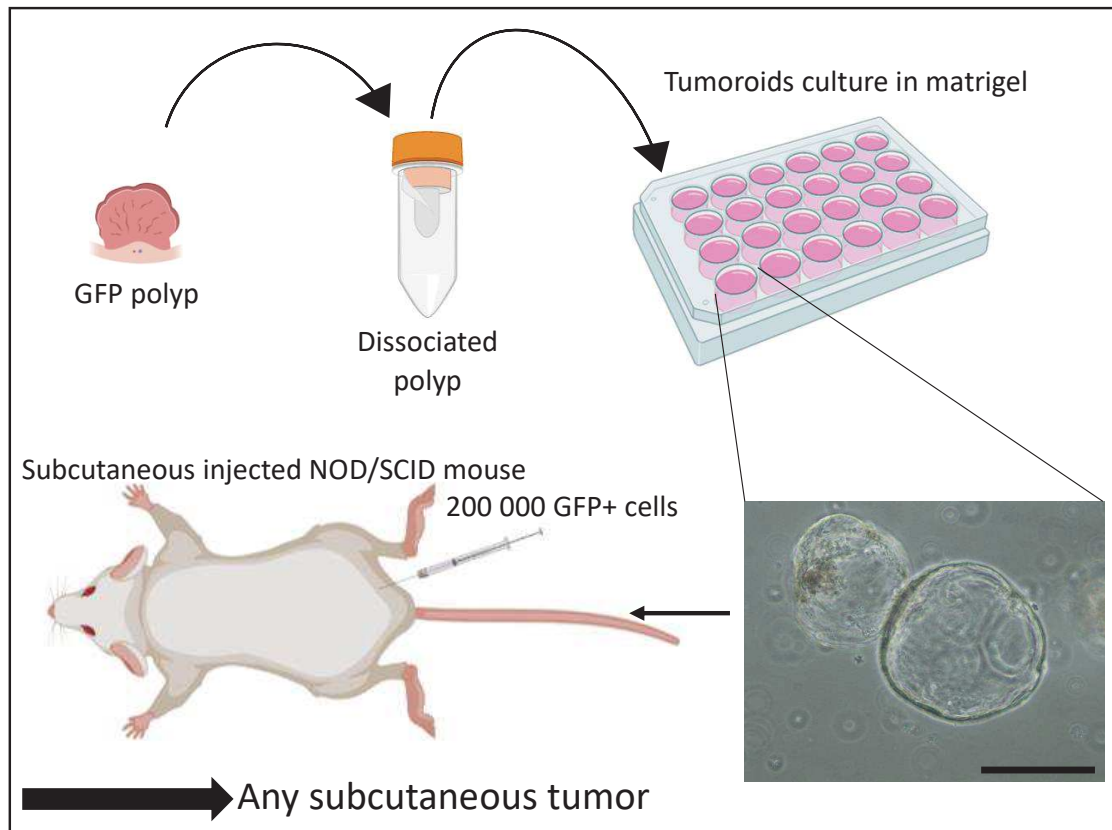


Figure 54: : Schéma récapitulatif des étapes permettant l'injection sous-cutanées de cellules cancéreuses exprimant la GFP.

Les 4 souris ont été sacrifiées après 8 semaines sans avoir développé de tumeur.

Sachant que ces cellules n'étaient a priori pas capables de former des métastases dans les organes à distance, nous nous sommes alors interrogés sur le potentiel impact des CTDs sur le leur microenvironnement. Les marquages par immunohistochimie des macrophages et des fibroblastes hépatiques nous indiquent que les souris porteuses de polypes ont un recrutement significativement plus important de macrophages et de fibroblastes associés au cancer dans le foie (FACs) (Figure 55 et 56).

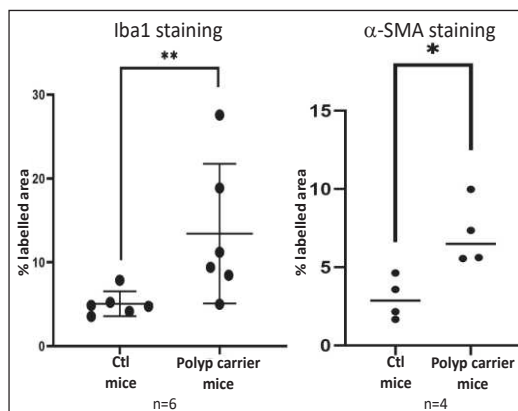


Figure 55: Comparaison du niveau d'intensité de marquage entre des foies de souris contrôles et de souris porteuses de polypes.

Le marqueur Iba1 révèle la présence de macrophages tandis que  $\alpha$ -SMA révèle la présence de fibroblastes activés. L'intensité du marquage des macrophages et fibroblastes activés est significativement plus important dans les souris porteuses de polypes (Student t-test).



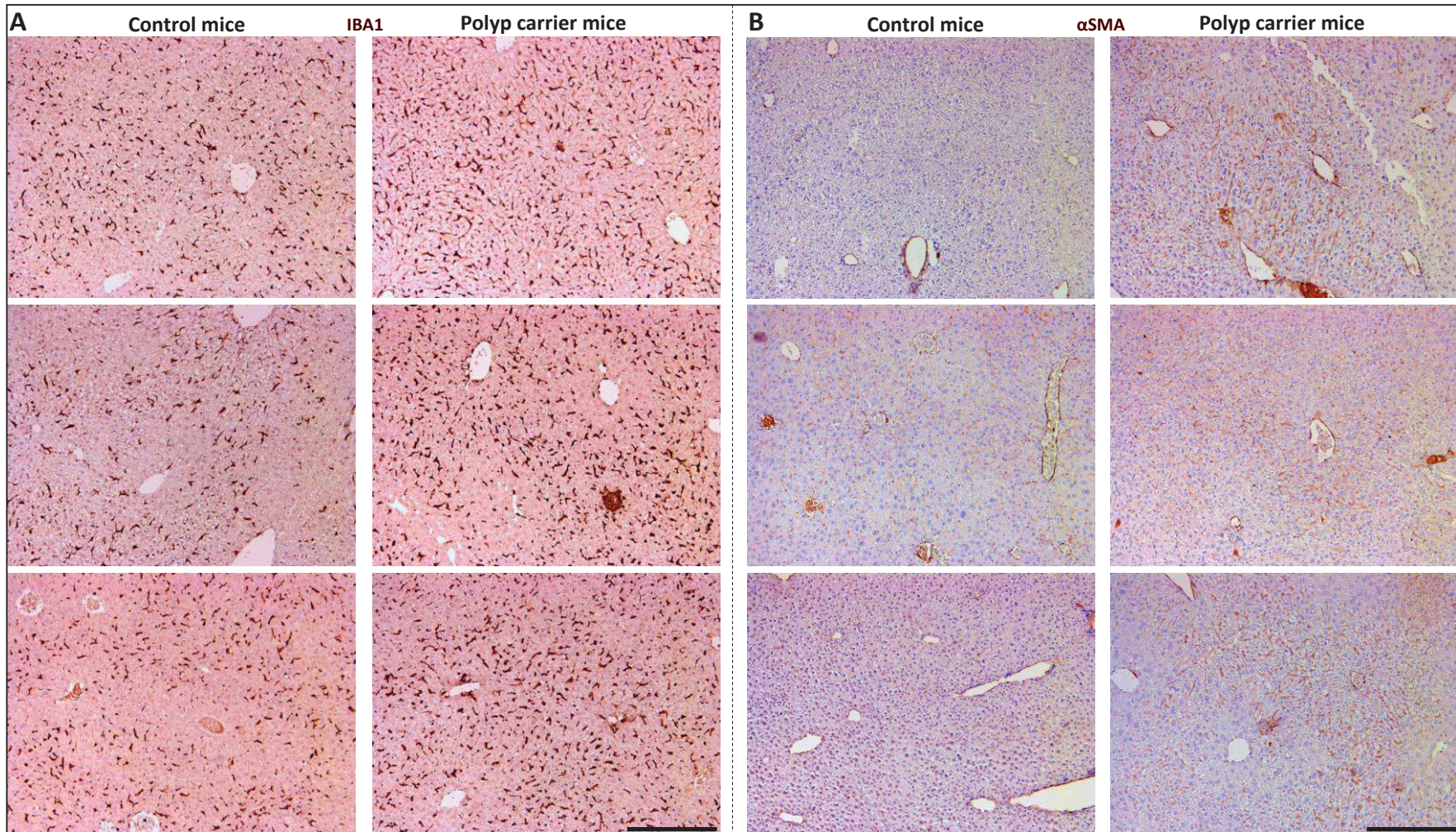


Figure 56: Photographies illustrant la plus forte présence de macrophages (Iba1) et de fibroblastes activés ( $\alpha$ -SMA) révélée par immunohistochimie sur des coupes de foie de souris contrôles et de souris porteuses de polypes. Barre d'échelle 100  $\mu$ m



## 6. Confirmation des observations sur d'autres modèles murins

Dans le but de consolider nos résultats, nous avons généré d'autres modèles murins permettant la formation de polypes avec des cellules cancéreuses qui expriment une protéine fluorescente permettant de suivre la dissémination.

Pour le premier modèle, nous avons induit une tumorigénèse colique grâce au protocole chimique AOM/DSS. Ce protocole appliqué sur les souris contrôle *Vil-Cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>+/+</sup>; mTmG* à la suite de leur recombinaison intestinale et colique permet également la formation de polypes coliques « verts » (Figure 57A). Ce modèle diverge légèrement du précédent puisqu'il s'agit essentiellement d'une atteinte de la voie Wnt par une mutation activatrice de la  $\beta$ -caténine et que la localisation des polypes correspond plutôt à un CCR sporadique et non héréditaire de type polypose adénomateuse familiale. Conformément à ce qui était attendu, les souris traitées à l'AOM/DSS développent des polypes coliques « verts » qu'il est également possible d'amplifier sous forme de tumoroides sans les facteurs de survie nécessaires à la culture des cellules intestinales et coliques saines (Figure 57B). Nous n'avons pas été en mesure de détecter de CTDS « verts » mais nous avons pu constater un recrutement important de macrophages au niveau des foies des souris ayant subi le traitement AOM/DSS (Figure 57C).

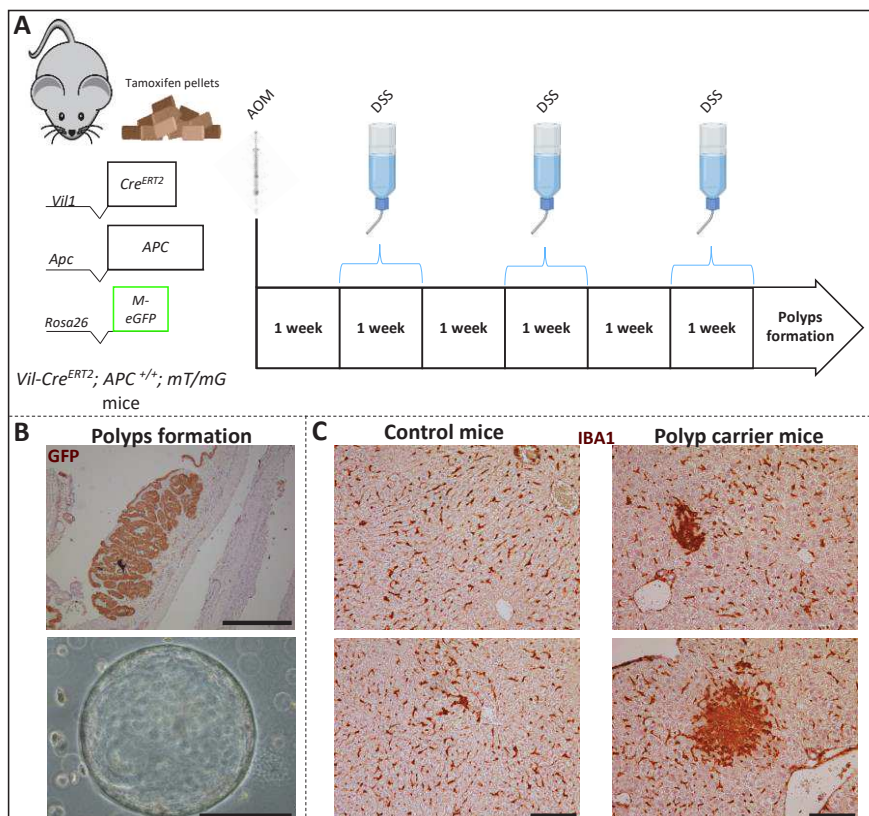


Figure 57: Schéma explicatif du modèle AOM/DSS et obtention de résultats concordants

(A) Les souris contrôles recombinées subissent une administration d'AOM par injection intra-péritonéale puis trois cycles d'administration de DSS dans l'eau de boisson durant une semaine. (B) Des polypes dont les cellules expriment la GFP se forment au niveau du colon et ces cellules exprimant la GFP sont capables de former des tumoroides dans le milieu de culture M12. Barre d'échelle 100 et 20  $\mu$ m (C) Les souris porteuses de polypes coliques ont un fort recrutement des macrophages (Iba1) au niveau du foie en comparaison du foie des souris contrôles. Barre d'échelle 50  $\mu$ m



Le deuxième modèle que nous avons généré afin de confirmer ces résultats diverge cette fois des précédents sur la construction et le type de gène rapporteur. Nous avons croisé des souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>LoxP</sup>* avec des souris *Ai<sup>14</sup>* dont l'expression de la Tomato sous le contrôle du promoteur ubiquitaire *ROSA26* est permise uniquement par excision d'un codon *STOP* placé en amont. Les souris générées par ce croisement ont cette fois un épithélium intestinal et colique qui exprime la Tomato suite à la l'administration du Tamoxifène et les cellules non recombinées n'exprimeront aucune protéine fluorescente. Quant aux souris ayant un allèle *Apc<sup>LoxP</sup>*, la recombinaison de cet allèle permet le développement de polypes « rouges » après la perte spontanée du deuxième allèle APC (souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>LoxP</sup>, Ai<sup>14</sup>*). Les souris contrôles générées ont les mêmes caractéristiques que précédemment, à savoir l'absence de recombinaison malgré l'administration de tamoxifène dans l'alimentation pour les souris *Apc<sup>LoxP</sup>, Ai<sup>14</sup>*, et l'absence de formation de polype pour les souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>+/+</sup>, Ai<sup>14</sup>* (Figure 58A). Le sacrifice de souris contrôle *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>+/+</sup>, Ai<sup>14</sup>* une semaine après l'administration du Tamoxifène par l'alimentation nous indique que nous obtenons une recombinaison presque intégrale de l'épithélium intestinal et colique (Figure 58B) et dans le cas des souris porteuses de polypes, nous constatons bien la formation de polypes à partir de cellules intestinales ou coliques « rouges » (Figure 58C).

Une fois le modèle validé, nous avons également pu obtenir de nouveau les mêmes résultats que précédemment à savoir une présence (relativement plus fréquente) de CTDs « rouges », accompagné d'un important recrutement des macrophages au niveau du foie des souris porteuses de polypes rouges. Ces observations sont également valables pour les souris contrôles *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>+/+</sup>, Ai<sup>14</sup>* traitées avec de l'AOM/DSS (Figure 59). Nous n'avons pas constaté la présence de cellules « rouges » ni une présence de macrophages aussi importante au niveau du foie des souris contrôles (non montré).

Une partie importante des résultats préliminaires obtenus dans le premier modèle murin ont ainsi été également observé dans deux modèles légèrement différents soit en termes d'altération de la voie Wnt et de localisation des polypes, soit en terme du type de gène rapporteur utilisé.

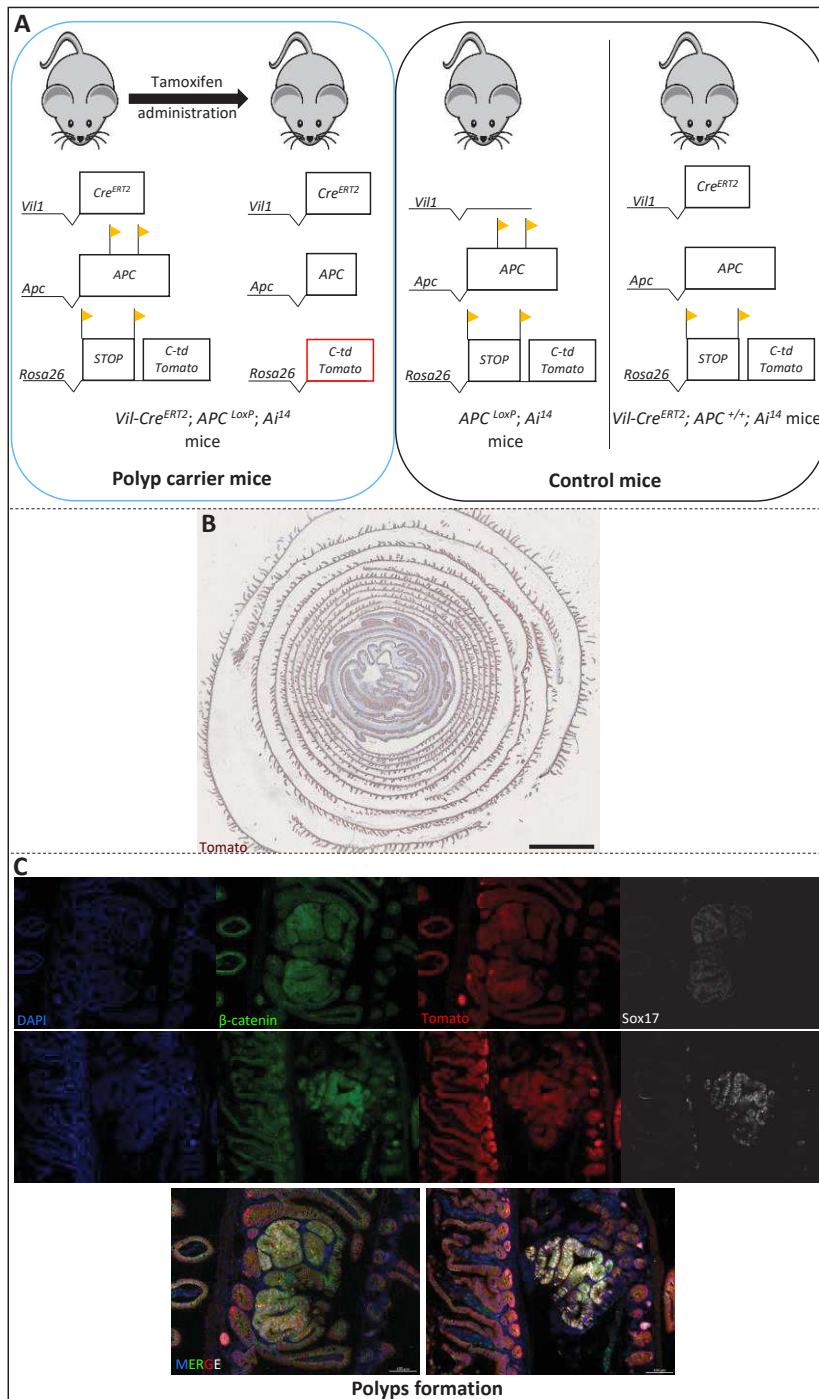


Figure 58: : Schéma explicatif du modèle Villin-CreERT2, *Apc*<sup>+/+</sup>, *Ai14* et validation du modèle. Schémas illustrant le modèle murin de tumorigénèse intestinale et colique précoce.

(A) Représentation schématique du modèle murin *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>f/+</sup>; Ai<sup>14</sup>* et de ses deux contrôles. Les séquences *LoxP* sont illustrées par les drapeaux jaunes. Les gènes rapporteurs qui s'expriment sont encadrés en couleur. Après l'administration de Tamoxifène, les séquences *LoxP* sont recombinaées si l'épithélium intestinal et colique expriment l'enzyme recombinase *Cre<sup>ERT2</sup>* (permis grâce au promoteur de la villine). Dans le cas où le gène *APC* contient des séquences *LoxP*, l'enzyme recombinase excise le codon 14 d'*APC* et le deuxième allèle d'*APC* sera altéré spontanément dans les semaines suivantes. L'excision de la cassette *STOP* permet l'expression de la cassette *Tomato* et le développement de polypes « rouges ». En l'absence du gène de l'enzyme recombinase *Cre<sup>ERT2</sup>*, l'épithélium colique reste sans fluorescence rouge comme le reste de l'animal et ne développe pas de polype tandis que l'absence de séquences *LoxP* sur un allèle *APC* ne permet pas la formation de polype sur un épithélium colique « rouge ». *C-tdTomato* pour cytoplasmic-tandem dimeric Tomato. (B) Photographie d'un swiss-rolls entier de souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>+/+</sup>, Ai<sup>14</sup>* démontrant par immunohistochimie, l'expression de la Tomato sur l'ensemble de l'épithélium intestinal et colique. Barre d'échelle 100  $\mu$ m (C) L'activation constitutive de la voie Wnt permet une translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine (en vert) et une expression de Sox17 nucléaire au niveau des cellules exprimant de la Tomato (en rouge) dans les polypes.

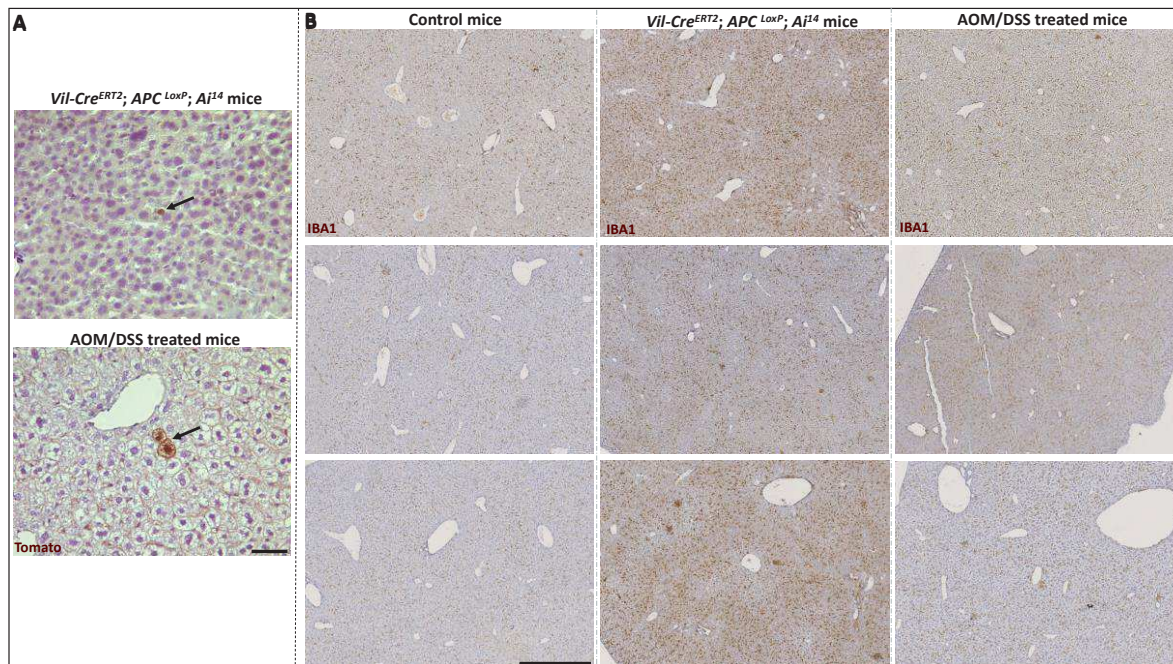


Figure 59: Dissémination de cellules exprimant la Tomato et recrutement de macrophages dans le foie de souris porteuses de tumeur.

(A) Détection de cellules disséminées exprimant la Tomato dans le foie de souris porteuses de polypes. Barre d'échelle 10  $\mu$ m (B) Augmentation de la présence de macrophages dans le foie des souris porteuses de polypes visualisable par le marquage Iba1 par immunohistochimie. Barre d'échelle 100  $\mu$ m

## 7. Le recrutement des macrophages et indépendant de la présence des polypes

Nous avons constaté avec nos différents modèles que la présence de CTD coïncidait avec une activation des fibroblastes hépatiques en FACs et un recrutement important des macrophages. Cependant nous ne pouvions pas exclure que cet effet était une conséquence d'une sécrétion systémique de facteurs par les polypes afin de provoquer un remodelage du microenvironnement hépatique. Afin de pouvoir relier la présence des CTDs avec le remodelage du microenvironnement, nous avons simulé la dissémination précoce par une injection intra-splénique dans des souris contrôles *Apc<sup>LoxP</sup>, Ai<sup>14</sup>* d'un petit nombre de cellules cancéreuses cultivées à partir de polypes « rouges ». Nous avons choisi d'utiliser ce modèle car nous avons détecté relativement plus facilement des CTDs « rouges » dans les souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>+/+</sup>, Ai<sup>14</sup>*. La rate qui est organe lymphoïde secondaire important étant enlevé suite à l'injection, nous avons également réalisé l'ablation de celle-ci sur des souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>+/+</sup>, Ai<sup>14</sup>* qui n'ont pas reçu d'injection et qui servent ainsi de contrôle pour comparer les deux conditions.

Le sacrifice d'une souris à différent temps post-injection nous indique que les cellules cancéreuses des polypes « rouges » sont parvenus jusqu'au foie et parviennent à survivre au moins quelques semaines. Cette présence de CTDs s'accompagne d'une augmentation dans le temps du recrutement des macrophages dans le foie et qui est observable dès 3 jours après l'injection (Figure 60).



Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que les CTDs précocement depuis des polypes intestinaux et coliques sont capables à eux seuls de provoquer un recrutement des macrophages et cela indépendamment d'éventuelles facteurs sécrétés par les polypes. Il n'est cependant pas exclu que les polypes participent également par la libération de cytokines solubles ou d'exosomes dans le sang.

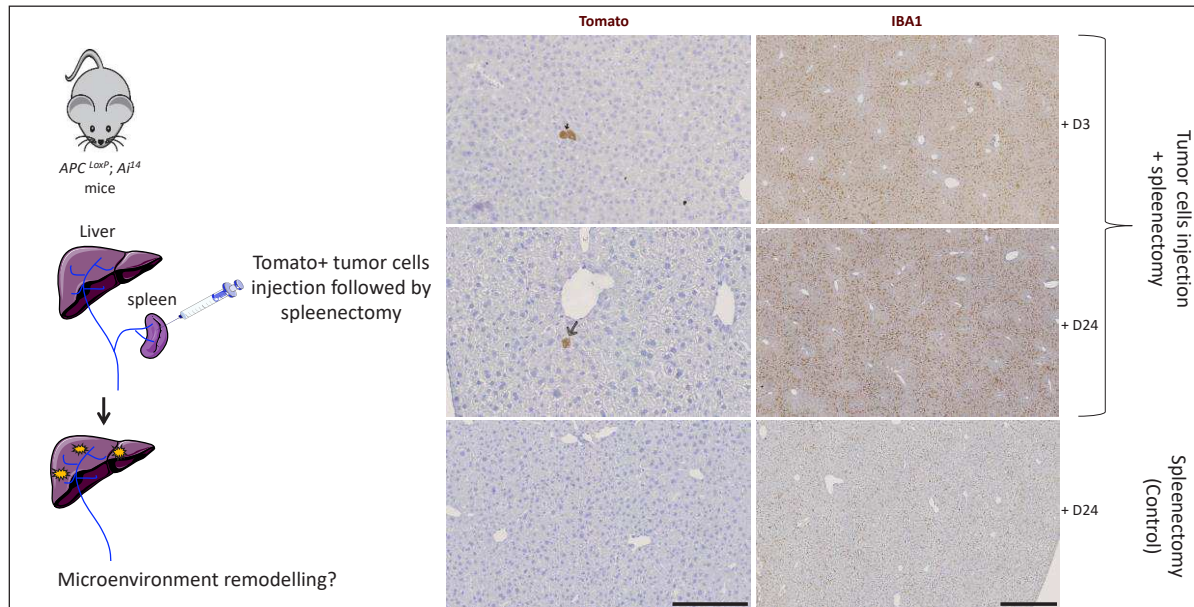


Figure 60: Schéma expérimental des injections intra-spléniques

Les cellules tumorales « rouges » ont été injectées dans la rate de souris contrôles puis la rate a été enlevée. Les foies des individus ayant reçu l'injection contiennent bien des cellules « rouges » visibles durant 3 semaines. De plus le marquage Iba1 indique que dès le troisième jour, le recrutement des macrophages à eux lieux et s'intensifie dans le temps en comparaison du foie de souris contrôles ayant simplement subi une ablation de la rate. Barre d'échelle 50 (gauche) et 100µm (droite).

## 8. Conclusion et discussion

Au moment où nous avons initié ce projet, aucune étude observationnelle clinique ou sur des modèles murins ne permettait de prouver l'existence d'une dissémination précoce dans le cancer du côlon. Notre intuition a depuis été confortée puisque des études cliniques très récentes démontrent qu'à des stades tardifs, il est possible de détecter des cellules métastatiques moins mutées que les cellules des tumeurs primaires et que les mutations « drivers » de ces cellules moins mutées sont acquises très précocement [631], [632].

De notre côté, nos résultats sur plusieurs modèles murins indiquent également qu'une dissémination précoce existe dans le cas d'un CCR initié par une altération de la voie Wnt. Malgré la présence d'un gène rapporteur, la détection de cellules tumorales disséminées (CTDs) reste un défi technologique majeur et nous limite de facto sur certains types d'expériences. Nous avons dû par exemple, utiliser les cellules issues des polypes pour tester l'hypothétique pouvoir tumorigène qu'auraient les CTDs ainsi que pour simuler leur dissémination. Or à part leur profil mutationnel, rien ne nous indique que les CTDs ont exactement le même phénotype que les cellules du polype ni même que la phase d'amplification en culture ne perturbe pas certaines de leurs capacités. Le meilleur contre-exemple est justement que certaines cellules tumorales avec des propriétés spécifiques aient pu quitter le polype et nous n'avons aujourd'hui aucun moyen pour les discriminer. Cependant, il semblerait que la fréquence de CTDs « rouges » (qui expriment la tomato) soit légèrement plus importante que dans les modèles basés sur l'expression de la GFP. L'explication pourrait résider sur l'immunogénicité de la GFP, d'autant plus qu'elle est localisée à la membrane [656]. Les CTDs « vertes » seraient ainsi plus facilement détectables par le système immunitaire des sites distants. Ainsi nous avons décidé de poursuivre le projet en utilisant le modèle *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>LoxP</sup>, Ai<sup>14</sup>*.

L'arrêt brutal de notre activité en Mars dernier à cause de la crise sanitaire ne nous a malheureusement pas permis de reproduire sur les souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>LoxP</sup>, Ai<sup>14</sup>* l'ensemble des expériences réalisées sur le modèle *Vil-cre<sup>ERT2</sup>; APC<sup>f/+</sup>; mTmG*. De nombreux individus sont en cours de génération et permettront d'avoir suffisamment de réplicats à analyser. Nous avons par ailleurs débuté une collaboration avec le laboratoire d'Ali Ertürk en Allemagne, spécialisé dans la transparenisation intégrale de souris et disposant d'un microscope à feuillets de lumière suffisamment puissant et sensible pour détecter des cellules individuelles disséminées [652]. Des optimisations sont en cours sur des individus contrôles. L'analyse des animaux transparenisés nous permettra également d'étudier la potentielle dissémination des cellules intestinales normales et vivantes. De plus, il sera ainsi possible d'identifier de nouveaux sites de dissémination telle que la moelle osseuse, le cerveau ou encore la rate. La recherche de CTDs « rouges » sera également réalisée sur des souris traitées par AOM/DSS pour éviter des conclusions hâtives qui pourraient être spécifiques des modèles avec le rapporteur mTmG.

En parallèle, nous devons réaliser de nouveaux marquages afin de quantifier et comparer le recrutement des macrophages ainsi que l'activation des fibroblastes hépatiques. Cette caractérisation du microenvironnement hépatique sera également approfondie en regardant le recrutement des neutrophiles ainsi que le niveau de vascularisation. L'activation des fibroblastes en FACs, ainsi que le profil M1/M2 des macrophages et N1/N2 des neutrophiles ou encore toute modification non suspectée des organes distants seront analysées en profondeur par un séquençage à l'échelle de la cellule unique et validées au niveau protéique grâce à l'utilisation du cytof/hypérion accessible à la communauté scientifique de Montpellier. En attendant les financements pour ces expériences coûteuses, la validation d'anticorps permettant de récupérer les fibroblastes, les macrophages et les neutrophiles sont actuellement en cours dans le but de bientôt pouvoir récupérer ces cellules par cytométrie en flux puis de pouvoir réaliser des extractions d'ARNm. L'ensemble de ces résultats permettra de démontrer pour la première fois qu'un remodelage du microenvironnement des organes à distance de la tumeur primaire à des stades très précoces de la tumorigénèse intestinale. Il demeure cependant la question de savoir si ce remodelage est causé par les quelques rares CTDs présentes et/ou si certains facteurs sécrétés par les polypes peuvent induire de telles modifications. Pour répondre à cette question des expériences préliminaires d'injections d'un très faible nombre de cellules issues de polypes ont été réalisées et ont confirmé une modification du microenvironnement du foie 3 jours seulement après l'injection. Afin de ne pas exclure l'option de l'effet systémique une quantification d'une petite cinquantaine de cytokines sera comparée sur le sang des souris contrôle et des souris *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>, Apc<sup>LoxP</sup>, Ai<sup>14</sup>*.

Ces résultats sont extrêmement importants pour comprendre pourquoi des cellules disséminent si précocement. D'autant plus que nous avons constaté que même injectées dans une souris NOD SCID, les cellules des polypes ne parviennent pas à former une tumeur. Puisqu'il n'y a presque pas de système immunitaire pouvant les éliminer, cela indique qu'elles requièrent soit d'autres mutations pour y parvenir, soit un contexte micro-environnemental bien particulier ou bien encore les deux composantes (mutationnelles et microenvironnementales). Ce résultat concorde avec ce qui est observé en clinique car les patients diagnostiqués avec des polypes sont opérés afin d'enlever l'ensemble des polypes. Il est en effet impossible sans analyse anatomopathologique, de savoir si certains de ces polypes sont bénins ou hyperplasiques. Or la survie à 5 ans des patients opérés au stade 1 (selon la classification TNM) est autour de 90% [657]. Cette observation clinique sous-entend donc que les cellules qui auraient disséminé resteraient dans un état de dormance très longtemps en attendant en attendant une deuxième vague de cellules tumorales plus mutées et donc plus tumorigènes.

Pour vérifier que les CTDs tardives profitent du remodelage opéré par les CTDs précoces, nous prévoyons de reproduire les expériences d'injections intra-spléniques de cellules de polypes



rouges pour simuler la préparation de la niche pré métastatique et ensuite afin de mimer une dissémination plus tardive en injectant dans le foie la lignée murine colorectale MC38. Les métastases provenant des cellules MC38 injectées seront comparés à un groupe de souris n'ayant pas le foie préparé par la présence des cellules « rouges » précoces. Si nous constatons une formation de métastases plus importante dans la condition où le microenvironnement a été remodelé, cela validera que les cellules issues des polypes servent à préparer une niche pré-métastatique pour de futures vagues de disséminations. Il sera également intéressant de voir si au sein des métastases, les cellules issues des polypes rouges sont un constituant majeur de la masse tumorale. Si tel était le cas, cela indiquerait que la deuxième vague de dissémination a également permis le réveil des cellules « rouges ». En lien avec ce qui est connu dans la littérature [658], il se peut que l'arrivée de cette nouvelle vague de dissémination provoque l'entrée en NETose des neutrophiles résidant dans le foie et permette ainsi le réveil des cellules « rouges » dormantes.

Enfin, un élément important devra être pris en compte dans la suite de nos expériences. Les études de Julio Aguirre-Ghiso sur la dissémination précoce dans le cancer du sein ont clairement démontré que le moment de cette dissémination est en réalité extrêmement court et survient au stade de lésions précancéreuses, avant la formation effective d'une petite masse tumorale compacte [626], [655]. Il est donc probable que l'observation des cellules cancéreuses qui quittent l'épithélium intestinal à partir de petits polypes soit déjà tardive et que ces événements soient plus fréquents au moment où se forment des foyers de cryptes aberrantes (en anglais ACF pour aberrant crypt foci). Le cluster de CTCs « vertes » que nous avons pu filmer pouvait peut-être provenir d'un de ces foyers de cryptes aberrantes en train d'évoluer en polype.

La question du « bon moment » peut se poser également pour une autre étape du processus de dissémination précoce. Sur l'ensemble des modèles murins que nous avons utilisés, nous avons toujours induit la formation de polype une fois que l'intestin avait terminé son développement, soit entre 6 à 8 semaines après la naissance des souris. Nous provoquons donc la formation de polypes au début de leur vie « d'adulte », provoquant par conséquent la mort de ces souris également très tôt dans leur vie « d'adulte ». Or en clinique, le diagnostic des patients porteurs de polypes ou d'adénocarcinomes est extrêmement rare avant 40 ans et la survenue de métastase se produit à un âge beaucoup plus avancé [5], [557]. Le vieillissement et les inflammations chroniques dues à des causes environnementales, sont des éléments connus qui modifient la composition moléculaire et cellulaire des organes ainsi que le phénotype des cellules de l'organes. Ces modifications ont d'ailleurs été démontrées comme impactant fortement le comportement des cellules cancéreuses [604]–[606], [658]. Il serait alors judicieux d'explorer l'initiation tumorale sur des souris plus âgées, afin de voir si le microenvironnement des polypes est différent et si les cellules intestinales elles-mêmes répondent différemment à la perte fonctionnelle d'APC. Mais il

serait surtout judicieux de reproduire sur des souris âgées, les expériences d'injection intraspléniques de cellules de polypes afin de voir si cette fois, les cellules « rouges » parviennent à former des métastases. De nouvelles expériences de séquençage de l'ARN à l'échelle de cellules unique sur les foies selon l'âge et selon que les foies aient ou non été envahis par des CTDs précocement, permettrait alors de décrypter très précisément l'ensemble des interactions entre chaque type cellulaire et les changements de phénotype selon les conditions.

La littérature et l'ensemble de nos observations nous amène à devoir ouvrir les champs d'études du cancer et à voir ce processus comme quelque chose d'intégré dans un environnement donné et dans le temps. Ces deux paramètres sont eux-mêmes à penser selon plusieurs échelles. L'échelle de l'individu, de l'organe et l'échelle de la cellule. Il se peut donc qu'en pensant à l'échelle du temps d'un individu, nous parvenions à mieux comprendre l'environnement et le temps nécessaire pour qu'une cellule disséminée précocement parviennent à proliférer et prendre part activement à la croissance tumorale. A terme ces avancées pourraient changer la prise en charge des patients. Administrer des thérapies visant à forcer le maintien en dormance des CTDs précocement [598] est une éventualité intéressante. Elle nécessitera toute fois d'avoir à minima un marqueur pronostique indiquant que la dissémination précoce a eu lieu et au mieux, qui indique que les CTDs sont en train de se réveiller. En ce sens, nous avons initié une collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Valjent et Federica Bertaso spécialisée en neuroscience comportementale. Le développement de métastases cérébrale est certes très rare mais il est très probable qu'il s'agisse plutôt de cellules qui ne trouvent pas un environnement favorable et reste ainsi en état de dormance durant de très nombreuses années sans jamais parvenir à se réveiller. Ceci dit il n'est pas exclu que ces cellules dormantes n'impactent pas le bon fonctionnement des cellules avoisinantes du système nerveux central et donc altère le comportement des individus. Des tests comportementaux seront prochainement lancés en attendant les résultats des transcritomique intégrale et la confirmation ou infirmation d'une possible dormance dans le cerveau. Les troubles comportementaux pourraient ainsi servir au moins d'indicateur qu'une dissémination précoce à bien eu lieu sur tel patient et qu'il devient alors pertinent d'avoir une vigilance plus importante sur le potentiel réveille à venir des CTDs.

## Matériel et méthodes

### Partie 1

#### Co-culture et migration amiboïde

##### Culture des lignées cellulaires en suspension

Les cellules sontensemencées à faible densité (5 cellules / $\mu$ l), en condition de non-adhérence dans des flasques traitées à cet effet (Corning ou coating au poly-2-hydroxyethyl methacrylate (Sigma)) et dans le milieu M12 (cf composition du M12) à 37°C. Le milieu est changé 1X par semaine après centrifugation des colosphères à 300g et elles sont dissociées avec de l'accumax (Sigma Aldrich) pendant 45 minutes à 37°C.

##### Culture des lignées de fibroblastes

Les cellules sontensemencées à forte densité (200 cellules/  $\mu$ l), en condition d'adhérences dans des flasques traitées à cet effet (Corning) dans le milieu DMEM. Le milieu est changé 2X par semaine et les passages ne sont réalisés que lorsque les cellules sont à +90% de confluence.

##### Milieux de culture

MILIEU DE CULTURE DES CELLULES ADHERENTES : Dulbecco/s Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio), 2mmol/l de L-glutamine et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine.

MILIEU M12 POUR CELLULES EN SUSPENSION : AdvancedDMEM-F12 (Gibco), 2mmol/l de L-glutamine, 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine, N2 (Gibco), 20ng/mL d'EGF (R&D), 10ng/mL de bFGF (R&D).

COMPOSANTS DU SUPPLEMENT N2 (Gibco) : Transferrine humaine (Holo), Insuline, Progesterone, Putrescine, Selenite.

Préparation des milieux conditionnés M12 : Les lignées de fibroblastes sont tout d'abord cultivées en présence du milieu DMEM jusqu'à atteindre 70 à 80% de confluence. Les flasques sont alors rincées au PBS puis le milieu M12 est ajouté en présence ou non de la lignée CTC31. Chaque lignée cellulaire (la lignée de fibroblastes hépatique hNLF, la lignée de fibroblastes colonique CCD18C0 et la lignée CTC31) sont cultivés 48H dans le milieu M12 tout comme les deux conditions de co-culture (CTC31+CCD18C0 et CTC31+hNLF). La lignée CTC31 estensemencée à 5 cellules / $\mu$ l. Les milieux conditionnés sont alors récupérés, filtrés sur tamis de 40  $\mu$ m, plongés brièvement dans de l'azote liquide puis centrifugés 10 minutes à 2 000g. Le surnageant d'environ 9 ml est alors récupéré et complété d'1 ml de M12 frais avant d'être conservé à -80°C pour de futures utilisations.

### Test ELDA (Extreme Limiting Dilution Assay) & test de formation de sphères

Pour quantifier la fréquence en CIT, les lignées CTC44 et CTC45 issues de cultures en suspension sontensemencées par cytométrie en flux à 1-10-100-1000 cellules / 100  $\mu$ l de milieu M12 ou milieu M12 conditionné. La fréquence en CIT est déterminée au bout de 7 jours en reportant le nombre de puits qui possèdent au moins une colosphère et grâce à une application disponible à cette adresse : <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>.

Le nombre de sphère est également compté au même moment.

Afin d'évaluer la mortalité cellulaire, pour chaque tri, les cellules sont reprises dans du tampon contenant du Live Dead Near-Infrared (invitrogen). Les CTCs sont triées en utilisant le FACS Aria (BD) de la plateforme MRI.

### Préparation d'échantillons biologiques pour des analyses immunohistologiques

**Sphères :** Les sphères sont récupérées dans un tube de 50mL après centrifugation à 300g, puis lavées une fois par du PBS et sont fixées pendant 15 min au PFA à 4%. Après rinçages par du PBS, les sphères sont reprises dans de l'histogel (Thermoscientific) préalablement chauffé pour le rendre liquide, puis immédiatement placé sur glace. Une fois refroidit, le gel contenant les sphères est placé dans une cassette à inclusion en paraffine. L'échantillon est déshydraté par des gradients d'éthanol suivis de xylène avant d'être inclus en paraffine. Des coupes de 7  $\mu$ m sont réalisées au microtome puis récupérées sur lames Superfrost qui sont conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

**Greffes intra-cæcales :** Greffe sur le cæcum de suspension cellulaire des lignées de CTCs: 3 000 000 cellules sont reprises dans 30 µl de PBS puis injectées dans des souris NOD SCID selon la méthode décrite (Hackl et al 2012)

**Tumeurs et organes :** Après euthanasie des souris par asphyxie gazeuse, les tumeurs et organes sont récupérées, fixées au PFA à 4%, déshydratées puis inclus en paraffine.

## Immunofluorescence et Immunohistochimie

### Coupes de tissus et sphères inclus en paraffine

Les coupes de tissus sont chauffées à 56°C une nuit puis déparaffinées par des bains de xylène et des bains d'éthanol en concentrations décroissantes. Après réhydratation dans du PBS, les lames sont plongées 20 min dans un tampon de citrate 10mM pH6 bouillant permettant le démasquage des antigènes. Les lames sont laissées à refroidir dans le tampon puis rincées au PBS. Après 1h de blocage des sites antigéniques par du tampon PBS 0.1% Tween20-5% lait, les anticorps sont dilués dans ce tampon et incubés sur le tissu une nuit à 4°C en milieu humide. Après 3 lavages de 10 minutes au PBS-Tween 20 0,1%, les tissus sont incubés 1h à température ambiante avec des anticorps secondaires fluorescents (Interchim) et le dapi (Fluoroprobe). Après 30 minutes de lavage au PBS-Tween 20 0,1% et un rinçage à l'eau, les lames sont montées avec du fluoromount G (SouthernBiotech). Les coupes sont analysées en position apotome par le Zeiss AxioImager Z1.

### Les anticorps primaires :

Anti-ECadhérine (1/500) BD Bioscience (610181) et Santa Cruz (SC-7870)

Anti-Cytokeratine20 (1/100) Novus bio (NB110-59940)

Anti Vimentine (1/500) Santa cruz (sc-5565)

Anti protéine mitochondriale humaine (p-Mito) (1/250) Millipore (MAB1273)

Anti ZEB1 (1/50) Novus Biologicals (NBP1-05987)

Anticorps secondaires: (1/500) FluoroProbe (Interchim): 488 donkey IGG anti-rabbit, 647 goat IGG anti-rabbit, 568 donkey IGG anti-goat, 647 goat IGG anti-mouse, 594goat IGG anti-mouse, 488 goat IGG anti-mouse

## Extraction ARN et RT-qPCR

Les ARNm sont extraits sur mini-colonnes (Qiagen). La transcription réverse est effectuée par la MML-V (Invitrogen). Après dilution des cDNA, nous procédons à la qPCR en temps réel en plaque 384 puits (Roche, Lightcycler 480) avec 300 nM de primers, 5ng de cDNA / puits et du sybrgreen (Roche). La méthode de quantification de l'expression des ARNm utilisée est :  $\Delta CT = (CT \text{ GAPDH} - CT \text{ Gene d'intérêt})$ , et le fold change =  $2^{(\Delta CT_{\text{lignée d'intérêt}} - \Delta CT_{\text{de référence}})}$ . Le  $\Delta CT$  de référence est établi en faisant la moyenne des  $\Delta CT$  des CPP19, CPP24, CPP25 et CPP30. Les CPP sont cultivés en suspension dans les mêmes conditions que les CTC

Primer	Séquence sens	Séquence anti-sens
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTTGCTGTAGCCAAATTGTTGT
ZEB1	TGCACTGAGTGTGAAAAGC	TGGTGATGCTGAAAGAGACG
Vimentin	TGGCCGACGCCATCAACACC	CACCTCGACGCGGGCTTTGT

## Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® 6. Les valeurs moyennes sont représentées  $\pm$  SEM et les tests statistiques utilisés sont répertoriés en-dessous des figures correspondantes. Les données statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) entre deux conditions sont repérées par une étoile (\*),  $p < 0.01$  par deux étoiles (\*\*).



## Nanobodies :

### Grandes étapes de production de la banque de nanobodies par la plateforme de à Luminy.

La première lignée de CTC (CTC-41) a été injecté dans des lamas afin d'induire une immunisation de ces derniers. La purification des plasmocytes permet ensuite d'extraire leurs ARNm. Une RT-PCR avec des amorces dirigées contre les séquences codantes des VHH permet ainsi d'obtenir les ADNc codant spécifiquement pour les nanobodies. Des séquences de restrictions particulières sont ajoutées aux extrémités des ADNc pour l'étape de clonage.

En parallèle, la transformation des bactéries compétentes E.coli TG1 par un phagémide, vecteur viral inductible et codant pour l'ensemble des constituants nécessaires à la fabrication d'un phage, permet d'amplifier la quantité de phagémide. Ce phagémide contient également un gène de résistance à l'ampicilline, une séquence codante pour une répétition de 6-histidines sous contrôle d'un opéron inductible à l'IPTG.

L'étape de clonage permet d'insérer les ADNc spécifiquement juste avant la séquence des 6-histidines afin que les nanobodies produits soient fusionnés à ce tag de 6 histidines (appelé Tag 6-His), facilitant ainsi leur future purification. Les inserts sont également clonés dans une zone codant des protéines de capsid virale importantes pour les futures étapes de sélections négative puis positive. S'en suit alors une electro-transformation des bactéries TG1. Ces bactéries ont une capacité de sécrétion dans leur surnageant sous induction à l'IPTG, permettant ainsi un futur criblage lorsqu'il s'agit d'une sécrétion de nanobody.

Pour que les bactéries produisent des phages présentant à leur surface un nanobody, il faut impérativement infecter les bactéries avec un phage dit helper ou phage assistant. Il est alors possible de récupérer le surnageant bactérien pour réaliser l'étape de sélection négative puis positive. L'étape de sélection négative consiste à exposer des cellules mononucléaire sanguines humaines (monocytes, macrophages et lymphocytes regroupé sous l'acronyme PBMC). Les phages dont le nanobody fixe une cellule mononucléaire sanguine humain seront éliminés avec elles et seul le surnageant contenant les phages libres est conservé. Ce surnageant est alors utilisé pour une sélection positive en trois tours (c'est à dire répétée trois fois). La lignée CTC-41 est mise en contact avec les phages et cette fois, les phages dont le nanobody ne fixe pas les CTC-41 sont éliminés avec le surnageant et seuls les phages fixés aux cellules grâce à leur nanobody sont conservés. Une élution permet de récupérer les phages avec leur nanobody pour de nouveau infecter les bactéries TG1. On obtient alors un pool de bactéries infectées seulement par des

phages dont on sait qu'ils codent des nanobodies ne reconnaissant pas les cellules PBMC mais reconnaissant la lignée CTC-41. Ce pool est nommé Output.

Le criblage a pour but de sélectionner les nanobodies qui reconnaissent fortement l'ensemble des lignées de CTCs puis est suivi d'une étape de séquençage pour éliminer les nanobodies redondants.

## Criblage

A partir de l'Output, un étalement sur gélose avec de l'ampicilline a été réalisé afin de générer des colonies après 24 heures d'incubation à 37°C. 384 colonies ont été repiquées individuellement dans des plaques MasterPlate dites « mères » de 96 puits, contenant du milieu de culture bactérien 2YT mélangé à de l'ampicilline 100 µg/ml, 2% de glucose et 300 µl de glycérol à 80% afin de garantir la viabilité des bactéries après congélation à -80°

Pour générer les MasterPlate filles, 50 µl de chaque puit a été repiqué dans un puit contenant 425 µl de milieu 2YT + ampicilline 100 µg/ml et 2% de glucose. Les plaques sont incubées sous agitation à 37°C jusqu'à que des puits pris aléatoirement obtiennent une densité optique comprise en 0,6 et 0,8. L'IPTG est alors ajouté dans chaque puit à une concentration finale de 1mM. Les plaques sont alors incubées sur la nuit à 28° en agitation. L'IPTG permet d'induire la production des nanobodies avec une conformation optimale. La valeur de DO est importante car une atteinte du plateau de prolifération bactérienne altère fortement la production des nanobodies. Une forte centrifugation à 8000 g permet de culoter les bactéries et de répartir le surnageant en triplica sur des plaques 96 puits pour le screening.

Pour réaliser le screening, 200 000 cellules des 3 lignées de CTCs cultivées en suspension dans le milieu M12 sont dissociées pour être individualisées. Après une brève incubation dans du PBS + 1% BSA, les cellules sontensemencées et incubées dans les plaques de screening pendant 1H à 4°C sur agitation. Après plusieurs lavages de PBS afin d'éliminer le milieu bactérien, les cellules sont incubées 30 minutes avec un anticorps anti-6His-APC. Deux tubes facs contenant 200 000 cellules servent de contrôles positif et négatif. Le contrôle positif est un marquage des cellules par l'anticorps anti-CD44v6-APC (Milteniy 130-111-238) et le contrôle négatif est l'incubation des cellules avec l'anti 6-His-APC sans incubation préalable avec un nanobody, Après 3 lavages PBS, les cellules sont re-suspendues dans 100 µl de PBS+1% BSA puis analysées par le cytomètre en flux MACS QUANT de la plateforme MRI. Afin d'évaluer la mortalité cellulaire, pour chaque analyse, les cellules sont reprises dans du tampon contenant du sytox blue (invitrogen).

## Séquençage des 17 nanobodies candidats

Pour éliminer les potentiels nanobodies identiques, une extraction des phagémides a été réalisée depuis les bactéries correspondantes aux nanobodies candidats. L'extraction a été faite grâce au kit d'extraction QIAprep SpinMiniprep et selon la fiche technique. Les plasmides extraits ont été séquencés avec le primer TACCTATTGCCTACGGCAGCC. L'identification du codon codant les acides aminés « WGQ » permet l'alignement des séquences et de regrouper par famille les candidats selon la séquence CDR3 (complementarity-determining region 3).

## Purification des nanobodies

Le culot bactérien induit à l'IPTG est congelé au moins 2H à -80°C puis un tampon de lyse est ajouté et incubé 20 minutes à température ambiante sur roue. Le surnageant est récupéré après une centrifugation à 3500 g de 20 minutes. Ce surnageant est la charge.

La résine de cobalt Talon Superflow est équilibrée avec le tampon CH<sub>3</sub>COONa 50mM, NaCl 0,1M pH 7,8 puis centrifugé à 800 g 5 minutes. La charge est appliquée sur le culot de résine pour 30 minutes à température ambiante sur roue. Après centrifugation, le surnageant devient la fraction non retenue et les billes sont gardées pour être lavées 2 fois (L1 et L2) avec le tampon CH<sub>3</sub>COONa 50mM, NaCl 1M pH 7,8. 2 autres lavages suivront avec le tampon CH<sub>3</sub>COONa 50mM, NaCl 0,1M pH 7,8. Un alicot de chaque lavage et de la fraction non-retenue est conservé pour le Western Blot. Les nanobodies sont élués par un lavage de tampon CH<sub>3</sub>COONa 50mM, NaCl 0,1M pH 7,8, imidazole 250. L'éluat est centrifugé deux fois à 800 g pour enlever toute trace de résine. Un alicot de l'éluat est conservé pour le Western Blot.

L'éluat est concentré à l'aide d'un tube VIVASPIN (Satorius/cut off 5000 kDa). Du PBS est ajouté pour atteindre un volume de 20 ml et le tube VIVASPIN est centrifugé à 4°C 4000g trois fois 1H. Après chaque heure, du PBS est ajouté pour atteindre de nouveau le volume de 20 ml. Au terme de la troisième centrifugation, il reste environ 1 ml. Un alicot est gardé et le reste est alors congelé à -20°C

## Western blot

Pour le Western Blot, les échantillons préalablement dénaturés dans du tampon Laemmli sont mis à migrer sur SDS-PAGE 10% puis transférés sur membrane par transfert semi-liquide. Les membranes sont bloquées avec du PBS 5% lait pendant 1heure puis incubée sur la nuit avec un anticorps mouse anti-6His ((Novagen 1/200). Le lendemain après trois lavages, la membrane est révélée par un anti-mouse HRP (Sigma 1/80 000)

## Partie 2 :

Les souris ont été hébergées au niveau du plateau central d'élevage et d'archivage (PCEA) en condition SOPF (Specific Opportunistic and Pathogen Free). Régulièrement, les lignées murines ont été croisées avec des souris de fond génétique C57BL/6J afin d'éviter une dérive génétique. Les procédures expérimentales ont été effectuées après autorisation du ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt.

### Modèles murins utilisés pour les croisements :

-*Rosa26-mTmG*

-*Rosa26-Ai14*

-*Villine-Cre<sup>ERT2</sup> ; APC<sup>loxP</sup>*

### Génotypage

Le génotype a été réalisé à partir de biopsies de queues de souris. Ces dernières ont été digérées par la protéinase K à 56°C durant une nuit. L'ADN génomique a été précipité à l'aide d'une solution d'isopropanol, rincé avec de l'éthanol 70 % avant d'être repris dans 50 µl d'eau pure. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de 2 µl d'ADN génomique en présence de primers spécifiques (0,5 µM) de chaque gène en utilisant le kit « My Taq Red Mix » (Bioline).

### Programme PCR utilisé :

- Cycle 1 : 94°C – 5 min
- Cycle 2 à 30 : 95°C – 30 sec, température d'hybridation – 30 sec, 72°C – 30 sec

### Primers PCR utilisés pour le génotypage :

- *mTmG* : CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT (sens 5'→3') ; CGAGGCGGATCACAAGCAATA (anti sens 1 5'→3') ; TCAATGGGCGGGGGTTCGTT (anti sens 2 5'→3')
- *Villine-Cre<sup>ERT2</sup>* : CAAGCCTGGCTCGACGGCC (sens 5'→3') ; CGCGAACATCTTCAGGTTCT (anti sens 5'→3')
- *ApcLoxp* : CTGTTCTGCAGTATGTTATCA (sens 5'→3') ; CTATGAGTCAACACAGGATTA (anti sens 5'→3')

- Ai14 : AAAGGAGCTGCAGTGGAGTA (sens 1 5'→3') ; CCGAAAATCTGTGGGAAGTC (sens 2 5'→3') ; GGCATTAAGCAGCGTATCC (anti sens 1 5'→3') ; CTGTTCCCTGTACGGCATGG (anti-sens 2 5'→3')

### Recombinaison des séquences *LoxP* induite au Tamoxifène

Le Tamoxifène (Sigma Aldrich) est dilué dans l'huile de tournesol (9 volumes) et d'éthanol (1 volume) pour atteindre la concentration de 1 mg/ souris par injection de 100 µl par gavage ou voie intra-péritonéale. Pour mesurer l'efficacité de recombinaison, différentes doses quotidiennes ont été testées ainsi que différentes durées. L'administration par l'alimentation est permise par des croquettes à 0.5g/kg de tamoxifen + 5% saccharose sur deux semaines (Safe).

### Tumorigenèse induite à l'AOM/DSS (Azoximéthane et Dextran Sulfate Sodium )

Les souris ont préalablement subi une administration de Tamoxifène par l'alimentation pendant 2 semaines. Des souris, âgées d'environ 12 semaines, ont été injectées en intra-péritonéale avec 10 mg / kg d'un agent mutagène, l'azoxyméthane (Sigma). Une semaine après, une solution de dextran sulfate de sodium 2 % (MP Biomedicals, 36 – 50 kDa) a été administrée aux souris dans de l'eau de boisson pendant trois cycles de 7 jours. Des paramètres cliniques généraux (perte de poids, signes de douleurs visibles) et spécifiques (consistance / couleur des fèces, saignements, apparition de prolapsus) ont été suivis dès le début du traitement.

### Prélèvement et préparation des intestins

Tous les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. L'intestin grêle, le côlon, les poumons et le foie ont été prélevés puis lavés de leur contenu avec du PBS 1X froid.

Pour les analyses histologiques, les intestins ont été évertés sur bâton. Les intestins et autres organes sont alors fixés dans de la formaline 10 % pendant 24h à température ambiante. Ensuite, les organes ont été lavés dans du PBS 1 X froid et les intestins ouvert longitudinalement. Les intestins ont été roulés de la partie proximale (duodénum) vers la partie distale (côlon) pour former un « swiss-roll »

Les organes ont été placés dans une cassette d'inclusion puis conservés dans une solution d'éthanol 70%. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des bains de concentrations croissantes en éthanol, puis dans des bains de xylène avant imprégnation dans deux bains successifs de paraffine. Les échantillons ont ensuite été inclus en paraffine.

## Immunohistochimie et immunofluorescence

Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des coupes de tissus de 4-5 microns d'épaisseur. Les coupes ont été déparaffinées à 55°C, passées dans des bains successifs de xylène et d'alcool 100%, puis réhydratées progressivement dans des bains d'éthanol 70% et de PBS 1X. Les coupes de tissu ont ensuite été démasquées dans un tampon de citrate de sodium 10 mM – pH 6.4 bouillant, pendant 20 min. Une fois refroidies, les lames ont été lavées dans du TBS 1X et les sites de fixation antigéniques non spécifiques ont été bloqués avec un tampon de blocage TBS 1X / Triton X100 0.1% / serum 2% (provenant de l'espèce animale dans lesquelles les anticorps secondaires sont issus), pendant minimum 30 min. Les lames ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire en chambre humide à 4°C, durant une nuit.

Liste des anticorps primaires : anti- $\beta$ caténine (1/200) BD Bioscience (32572), Anti-Villine (1/250) Millipore (MAB 1671), Anti-Mucine2 (1/100) Santa Cruz (SC-7314), Anti-Cytokeratine20 (1/100) Novus bio (NB110-59940), Anti-Iba1 (1/200) Abcam (178846), Anti- $\alpha$ -SMA (1/50) Dako (M0851), Anti-Sox17 (1/100) R&D System (AF1924), Anti-GFP (1/200) Aves lab (GFP879484) et Chromotek (pabg1), Anti-RFP (1/200) Rockland (600-401-379), Anti-Ecadherin (1/200) BD Bioscience (610181)

## Révélation en fluorescence

Les lames ont été lavées en TBS 1X / Tween 20 0.1 %, puis l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Cyanine 3 / Alexa 488 / Alexa 680) a été incubé pendant minimum 45 min, à l'obscurité, en présence de DAPI pour la détection des noyaux. Après rinçage, les lames ont été montées entre lame et lamelle, à l'aide du milieu de montage adapté pour la fluorescence.

## Révélation en visible

Les lames ont été lavées en TBS 1X / Tween 20 0.1 %, puis l'anticorps secondaire couplé HRP a été incubé pendant minimum 45 min. Après rinçage, les lames ont été révélées à l'aide d'une solution de DAB (Sigma) puis rincées à l'eau. Les noyaux cellulaires ont été contre-colorés à l'hématoxyline, puis les lames ont été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol 70 %, d'éthanol 100 %, puis de xylène. Enfin, les lames ont été montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage adapté pour la microscopie optique.

Les lames de swiss-roll marquées ont été numérisées (grossissement x20) à l'aide d'un scanner de lame : NanoZoomer 2.0-HT, Hamamatsu pour les lames en visible et Axio Scan.Z1, Zeiss pour les lames en fluorescence à l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM). Le dénombrement



des cellules positives a été effectué sous le logiciel « NDP.view 2 » (Hamamatsu) ou « Zen » (Zeiss) sur des scans de coupes d'intestins.

Le comptage des axes villosité-crypte recombinaison a été effectué en utilisant le logiciel « Definiens tissue studio » sur des scans de coupes d'intestins.

### Dissociation des organes :

Epithélium intestinal : Après sacrifice des animaux, l'intestin grêle a été éverté puis lavés avec du PBS 1 X froid. Le premier tiers proximal de l'intestin a été ouvert longitudinalement puis incubé pendant 20 min dans du HBSS 1 X (Gibco) / EDTA 30 mM (Sigma) / DTT 5 mM (Sigma) pH 7.4 à 4°C, puis 15 min dans de l'HBSS 1 X / EDTA 30 mM pH 7.4 à 37°C. L'intestin a ensuite été transféré dans du milieu DMEM (Life technologies) / 10 % SVF (Sigma). Les cellules épithéliales ont été détachées de la membrane basale par forte agitation pendant environ 2 min. Après centrifugation, les cellules ont été incubées dans 10 ml de milieu HBSS 1X contenant 200 µl de dispase (BD Bioscience) et 100 µl de DNase (Sigma), pendant 15 min à 37°C. La réaction a été stoppée par ajout de 500 µl de SVF et 100 µl de DNase. Après centrifugation, les cellules ont été passées sur tamis 70 microns et incubées 15 minutes à 4°C avec l'anticorps anti- mouse EpCAM-APC (Invitrogen) et le marqueur de viabilité Live-Dead Near-infrared (Invitrogen). Après lavages, les cellules ont été reprises dans un volume approprié de PBS + 1 % BSA. L'analyse cellulaire a été effectuée avec le cytomètre FACS Aria (Beckton Dickinson) sur la plateforme de cytométrie en flux de l'IRMB (Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy, Montpellier).

Tumeurs : Après sacrifice des animaux, l'intestin grêle a été éverté puis lavés avec du PBS 1 X froid. Les polypes sont récupérés et dissociés à l'aide du kit de dissociation mouse Tumor Dissociation Kit (Milteniy).

Foie et poumon : Après sacrifice des animaux, les organes sont lavés avec du PBS 1 X froid. Une moitié est réservée pour l'inclusion en paraffine tandis que l'autre est dissociée grâce aux kits mouse Liver dissociation kit et mouse lung dissociation kit (Milteni).

Après dissociation des tumeurs, poumons et foies par les enzymes des kits Miltenyi et le GentleMacs Octo dissociator, la réaction enzymatique est stoppée par ajout de 50 µl de SVF puis les cellules sont lavées au PBS. Une partie des tumeurs dissociées est mise de côté pour une mise en culture. Après centrifugation, les cellules ont été passées sur tamis 70 microns et incubées 15 minutes à 4°C avec l'anticorps anti-mouse EpCAM-APC (Invitrogen) et le marqueur de viabilité Live-Dead Near-infrared (Invitrogen). Après lavages, les cellules ont été reprises dans un volume approprié de PBS + 1 % BSA. L'analyse cellulaire a été effectuée avec le cytomètre FACS Aria

(Beckton Dickinson) sur la plateforme de cytométrie en flux de l'IRMB (Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy, Montpellier)

### Culture des tumoroïdes

Les cellules issues de la dissociation des polypes sont incluses dans un mélange de milieu M12 sans facteur de croissance et de matrigel (1:1). Le dome de matrigel est recouvert de milieu M12. Les tumoroïdes sont passés tous les 10 jours par dissociation à l'accumax.

### Injections intra-splénique

4 souris contrôles ont reçu une injection de 10 000 cellules « rouges » préalablement amplifiées en culture. Cette injection a été suivi d'une ablation de la rate. La rate de 4 autres souris contrôles a également été enlevée. 2 souris par groupe ont été sacrifié 72h après puis 24 jours après l'injection.

### Injections sous-cutanées

6 souris NOD/SCID ont reçu une injection de 200 000 cellules « vertes » préalablement amplifiées en culture. Les cellules étaient re-suspendu dans 50 µl d'un mélange 1:1 de PBS et matrigel.

### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® 6. Les valeurs moyennes sont représentées  $\pm$  SEM et les tests statistiques utilisés sont répertoriés en-dessous des figures correspondantes. Les données statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) entre deux conditions sont repérées par une étoile (\*),  $p < 0,01$  par deux étoiles (\*\*).

## Communications scientifiques

### ❖ Orals

2019 Ma thèse en 180 secondes: finale Languedoc-roussillon

2019 IGH PhD Student & Postdoc Meeting (talk)

2019 IGF PhD Students & Postdoc days (talk)

2019 CECED (talk award)

2018 CNIO (Madrid) (invited speaker)

2017 Cancéropôle GSO (talk)

2017 CBS2 days (flash talk award)

### ❖ Posters

2019 IGH PhD students & Postdoc Meeting

2019 SUNRiSE Meeting

2018 Doctoral school days

2017 IGF Students/post-docs days (Award)

2017 Cancéropôle GSO

2017 CRCL Symposium

2017 SUNRiSE Meeting

## Références

- [1] « L'essentiel des faits et chiffres », *Institut national du cancer*, Edition 2019. <https://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/L-Institut-publie-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-des-cancers-en-France-edition-2019>.
- [2] « Stades du cancer colorectal - Cancer du côlon ». <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Stades-du-cancer-colorectal> (consulté le juill. 07, 2020).
- [3] « Cancers colorectaux », *Institut national du cancer*. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Les-tumeurs-du-colon/Cancers-colorectaux>.
- [4] « Maladies inflammatoires », *Institut national du cancer*. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Facteurs-de-risque/Maladies-inflammatoires>.
- [5] « Cancer du côlon non métastatique », *SNFGE*, janv. 21, 2019. <https://www.snfge.org/content/3-cancer-du-colon-non-metastatique>.
- [6] M. DUCREUX, *Cancer colorectal : Savoir utile ! volume 2 (cancers du côlon et du rectum)*, MEDI-TEXT. 2006.
- [7] F. Viret et A. Gonçalves, « Cancer colorectaux métastatiques et thérapies ciblées anti-EGFR », *médecine/sciences*, vol. 25, p. 13-21, janv. 2009, doi: 10.1051/medsci/2009251s13.
- [8] L. Marisa *et al.*, « Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value », *PLoS Med.*, vol. 10, n° 5, p. e1001453, mai 2013, doi: 10.1371/journal.pmed.1001453.
- [9] H. Tian *et al.*, « A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable », *Nature*, vol. 478, n° 7368, p. 255-259, oct. 2011, doi: 10.1038/nature10408.
- [10] E. Sangiorgi et M. R. Capecchi, « Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells », *Nat. Genet.*, vol. 40, n° 7, p. 915-920, juill. 2008, doi: 10.1038/ng.165.
- [11] A. T. Mah, K. S. Yan, et C. J. Kuo, « Wnt pathway regulation of intestinal stem cells: Wnt signalling and intestinal homeostasis », *J. Physiol.*, vol. 594, n° 17, p. 4837-4847, sept. 2016, doi: 10.1113/JP271754.
- [12] R. J. Davies, R. Miller, et N. Coleman, « Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, n° 3, p. 199-209, mars 2005, doi: 10.1038/nrc1569.
- [13] « Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867415006236?token=92E3DBB091742F9B59687F400A4B7ACCA31B6D420158CFFF7980AC1ACB28E7494F77D4140D62458861ECDD7D1542686B> (consulté le août 08, 2020).
- [14] L. N. Kwong et W. F. Dove, « APC and Its Modifiers in Colon Cancer », in *APC Proteins*, vol. 656, I. S. Näthke et B. M. McCartney, Éd. New York, NY: Springer New York, 2009, p. 85-106.
- [15] P. J. Morin *et al.*, « Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC », *Science*, vol. 275, n° 5307, p. 1787-1790, mars 1997, doi: 10.1126/science.275.5307.1787.
- [16] W. Liu *et al.*, « Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating  $\beta$ -catenin/TCF signalling », *Nat. Genet.*, vol. 26, n° 2, Art. n° 2, oct. 2000, doi: 10.1038/79859.

- [17] « Tumeurs du côlon et du rectum », *Collège Français des Pathologistes (CoPath)*, 2013. [http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath\\_18/site/html/cours.pdf](http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_18/site/html/cours.pdf).
- [18] A. de la Chapelle, « Genetic predisposition to colorectal cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, n° 10, Art. n° 10, oct. 2004, doi: 10.1038/nrc1453.
- [19] S. D. Markowitz et M. M. Bertagnolli, « Molecular Basis of Colorectal Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, n° 25, p. 2449-2460, déc. 2009, doi: 10.1056/NEJMra0804588.
- [20] S. Colnot *et al.*, « Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers », *Lab. Invest.*, vol. 84, n° 12, p. 1619-1630, déc. 2004, doi: 10.1038/labinvest.3700180.
- [21] A. R. Moser, H. C. Pitot, et W. F. Dove, « A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse », *Science*, vol. 247, n° 4940, p. 322-324, janv. 1990, doi: 10.1126/science.2296722.
- [22] T. Hinoi *et al.*, « Mouse Model of Colonic Adenoma-Carcinoma Progression Based on Somatic Apc Inactivation », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 20, p. 9721-9730, oct. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2735.
- [23] T. D. Barber, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, et V. E. Velculescu, « Somatic Mutations of EGFR in Colorectal Cancers and Glioblastomas », <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200412303512724>, Massachusetts Medical Society, oct. 08, 2009.
- [24] J. R. Grandis et J. C. Sok, « Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy », *Pharmacol. Ther.*, vol. 102, n° 1, p. 37-46, avr. 2004, doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.01.002.
- [25] J. A. Engelman, « Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, n° 8, Art. n° 8, août 2009, doi: 10.1038/nrc2664.
- [26] « TGF- $\beta$  Signaling Alterations and Colon Cancer | SpringerLink ». [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-6033-7\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-6033-7_5) (consulté le août 08, 2020).
- [27] Y. Itatani, K. Kawada, et Y. Sakai, « Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n° 23, Art. n° 23, janv. 2019, doi: 10.3390/ijms20235822.
- [28] H. T. Lynch et A. de la Chapelle, « Hereditary Colorectal Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, n° 10, p. 919-932, mars 2003, doi: 10.1056/NEJMra012242.
- [29] J. Balmaña, F. Balaguer, A. Cervantes, et D. Arnold, « Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines », *Ann. Oncol.*, vol. 24, p. vi73-vi80, oct. 2013, doi: 10.1093/annonc/mdt209.
- [30] M. Aarnio, J.-P. Mecklin, L. A. Aaltonen, M. Nyström-Lahti, et H. J. Järvinen, « Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (hnpcc) syndrome », *Int. J. Cancer*, vol. 64, n° 6, p. 430-433, 1995, doi: 10.1002/ijc.2910640613.
- [31] R. Rad *et al.*, « A Genetic Progression Model of BrafV600E-Induced Intestinal Tumorigenesis Reveals Targets for Therapeutic Intervention », *Cancer Cell*, vol. 24, n° 1, p. 15-29, juill. 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.014.
- [32] J. E. G. IJspeert, L. Vermeulen, G. A. Meijer, et E. Dekker, « Serrated neoplasia—role in colorectal carcinogenesis and clinical implications », *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, n° 7, Art. n° 7, juill. 2015, doi: 10.1038/nrgastro.2015.73.
- [33] G. B. Pierce et W. C. Speers, « Tumors as Caricatures of the Process of Tissue Renewal:

Prospects for Therapy by Directing Differentiation », *Cancer Res.*, vol. 48, n° 8, p. 1996-2004, avr. 1988.

[34] T. Lapidot *et al.*, « A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice », *Nature*, vol. 367, n° 6464, Art. n° 6464, févr. 1994, doi: 10.1038/367645a0.

[35] A.-H. Muhammad, S. W. Max, B.-H. Adalberto, J. M. Sean, et F. C. Michael, « Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 8, p. 3983-3988, avr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0831001100.

[36] S. K. Singh *et al.*, « Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors », p. 9.

[37] L. Ricci-Vitiani *et al.*, « Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells », *Nature*, vol. 445, n° 7123, p. 111-115, janv. 2007, doi: 10.1038/nature05384.

[38] C. A. O'Brien, A. Pollett, S. Gallinger, et J. E. Dick, « A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice », *Nature*, vol. 445, n° 7123, Art. n° 7123, janv. 2007, doi: 10.1038/nature05372.

[39] P. Dalerba *et al.*, « Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, n° 24, p. 10158-10163, juin 2007, doi: 10.1073/pnas.0703478104.

[40] P. C. Nowell, « The clonal evolution of tumor cell populations », *Science*, vol. 194, n° 4260, p. 23-28, oct. 1976, doi: 10.1126/science.959840.

[41] R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, et C. Swanton, « The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution », *Nature*, vol. 501, n° 7467, Art. n° 7467, sept. 2013, doi: 10.1038/nature12625.

[42] A. T. Collins, P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower, et N. J. Maitland, « Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 23, p. 10946-10951, déc. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.

[43] C. Li *et al.*, « Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 3, p. 1030-1037, févr. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2030.

[44] S. Sell et H. L. Leffert, « Liver Cancer Stem Cells », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 26, n° 17, p. 2800-2805, juin 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.15.5945.

[45] X. Ma *et al.*, « Targeted Biallelic Inactivation of Pten in the Mouse Prostate Leads to Prostate Cancer Accompanied by Increased Epithelial Cell Proliferation but not by Reduced Apoptosis », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 13, p. 5730-5739, juill. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4519.

[46] H. Korsten, A. Z. der Made, X. Ma, T. van der Kwast, et J. Trapman, « Accumulating Progenitor Cells in the Luminal Epithelial Cell Layer Are Candidate Tumor Initiating Cells in a Pten Knockout Mouse Prostate Cancer Model », *PLOS ONE*, vol. 4, n° 5, p. e5662, mai 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0005662.

[47] D. J. Mulholland, L. Xin, A. Morim, D. Lawson, O. Witte, et H. Wu, « LSC Stem/Progenitors Are Tumor Initiating Cells in the Pten Null Prostate Cancer Model », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 22, p. 8555-8562, nov. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4673.

[48] D. A. Lawson, Y. Zong, S. Memarzadeh, L. Xin, J. Huang, et O. N. Witte, « Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 6, p. 2610-2615, févr. 2010, doi: 10.1073/pnas.0913873107.

[49] A. S. Goldstein, J. Huang, C. Guo, I. P. Garraway, et O. N. Witte, « Identification of a Cell of Origin for Human Prostate Cancer », *Science*, vol. 329, n° 5991, p. 568-571, juill. 2010, doi: 10.1126/science.1189992.



- [50] E. C. Holland, J. Celestino, C. Dai, L. Schaefer, R. E. Sawaya, et G. N. Fuller, « Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice », *Nat. Genet.*, vol. 25, n° 1, Art. n° 1, mai 2000, doi: 10.1038/75596.
- [51] S. Alcantara Llaguno *et al.*, « Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model », *Cancer Cell*, vol. 15, n° 1, p. 45-56, janv. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.006.
- [52] T. Marumoto *et al.*, « Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors », *Nat. Med.*, vol. 15, n° 1, Art. n° 1, janv. 2009, doi: 10.1038/nm.1863.
- [53] T. S. Jacques *et al.*, « Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes », *EMBO J.*, vol. 29, n° 1, p. 222-235, janv. 2010, doi: 10.1038/emboj.2009.327.
- [54] Y. Wang *et al.*, « Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model », *Cancer Cell*, vol. 15, n° 6, p. 514-526, juin 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.04.001.
- [55] « Bmi1 Controls Tumor Development in an Ink4a/Arf-Independent Manner in a Mouse Model for Glioma: Cancer Cell ». [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(07\)00264-4](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(07)00264-4) (consulté le août 11, 2020).
- [56] N. Lindberg, M. Kastemar, T. Olofsson, A. Smits, et L. Uhrbom, « Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma », *Oncogene*, vol. 28, n° 23, Art. n° 23, juin 2009, doi: 10.1038/onc.2009.76.
- [57] W. D. Foulkes, « BRCA1 functions as a breast stem cell regulator », *J. Med. Genet.*, vol. 41, n° 1, p. 1-5, janv. 2004, doi: 10.1136/jmg.2003.013805.
- [58] N. Turner, A. Tutt, et A. Ashworth, « Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, n° 10, Art. n° 10, oct. 2004, doi: 10.1038/nrc1457.
- [59] « BRCA1 Basal-like Breast Cancers Originate from Luminal Epithelial Progenitors and Not from Basal Stem Cells | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1934590910003462?token=605B03DE93D247FEC27FC5A985F2AB5C08B141DFF9FD52A5FAC121457FEEBF41694F19FC6D6E0117E28D48953096510C> (consulté le août 12, 2020).
- [60] E. Lim *et al.*, « Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers », *Nat. Med.*, vol. 15, n° 8, Art. n° 8, août 2009, doi: 10.1038/nm.2000.
- [61] A. Prat *et al.*, « Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer », *Breast Cancer Res.*, vol. 12, n° 5, p. R68, sept. 2010, doi: 10.1186/bcr2635.
- [62] N. Barker *et al.*, « Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 », *Nature*, vol. 449, n° 7165, p. 1003-1007, oct. 2007, doi: 10.1038/nature06196.
- [63] N. Barker *et al.*, « Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer », *Nature*, vol. 457, n° 7229, p. 608-611, janv. 2009, doi: 10.1038/nature07602.
- [64] N. Barker *et al.*, « Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro », *Cell Stem Cell*, vol. 6, n° 1, p. 25-36, janv. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2009.11.013.
- [65] L. Zhu *et al.*, « Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation », *Nature*, vol. 457, n° 7229, Art. n° 7229, janv. 2009, doi: 10.1038/nature07589.

- [66] S. Asfaha *et al.*, « Krt19(+)/Lgr5(-) cells are radioresistant cancer initiating stem cells in the colon and intestine », *Cell Stem Cell*, vol. 16, n° 6, p. 627-638, juin 2015, doi: 10.1016/j.stem.2015.04.013.
- [67] S. Jaiswal, D. Traver, T. Miyamoto, K. Akashi, E. Lagasse, et I. L. Weissman, « Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 17, p. 10002-10007, août 2003, doi: 10.1073/pnas.1633833100.
- [68] M. van der Heijden *et al.*, « Bcl-2 is a critical mediator of intestinal transformation », *Nat. Commun.*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, mars 2016, doi: 10.1038/ncomms10916.
- [69] S. Schwitalla *et al.*, « Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties », *Cell*, vol. 152, n° 1, p. 25-38, janv. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2012.12.012.
- [70] T. Jess, C. Rungoe, et L. Peyrin-Biroulet, « Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies », *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, n° 6, p. 639-645, juin 2012, doi: 10.1016/j.cgh.2012.01.010.
- [71] M. Jansen, D. Langeveld, W. W. J. De Leng, A. N. A. Milne, F. M. Giardiello, et G. J. A. Offerhaus, « LKB1 as the ghostwriter of crypt history », *Fam. Cancer*, vol. 10, n° 3, p. 437-446, sept. 2011, doi: 10.1007/s10689-011-9469-3.
- [72] « Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomatous Polyps | NEJM ».  
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa061652> (consulté le août 12, 2020).
- [73] J. Cuzick *et al.*, « Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement », *Lancet Oncol.*, vol. 10, n° 5, p. 501-507, mai 2009, doi: 10.1016/S1470-2045(09)70035-X.
- [74] « A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis | Gut ».  
<https://gut.bmj.com/content/50/6/857.abstract> (consulté le août 12, 2020).
- [75] P. M. Rothwell, F. G. R. Fowkes, J. F. Belch, H. Ogawa, C. P. Warlow, et T. W. Meade, « Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials », *The Lancet*, vol. 377, n° 9759, p. 31-41, janv. 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(10)62110-1.
- [76] D. Bonnet et J. E. Dick, « Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell », *Nat. Med.*, vol. 3, n° 7, Art. n° 7, juill. 1997, doi: 10.1038/nm0797-730.
- [77] L. Vermeulen *et al.*, « Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 36, p. 13427-13432, sept. 2008, doi: 10.1073/pnas.0805706105.
- [78] N. Uchida *et al.*, « Direct isolation of human central nervous system stem cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, n° 26, p. 14720-14725, déc. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.26.14720.
- [79] C. Sagrinati *et al.*, « Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, n° 9, p. 2443-2456, sept. 2006, doi: 10.1681/ASN.2006010089.
- [80] G. D. Richardson, « CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells », *J. Cell Sci.*, vol. 117, n° 16, p. 3539-3545, juill. 2004, doi: 10.1242/jcs.01222.
- [81] Y. Oshima, A. Suzuki, K. Kawashimo, M. Ishikawa, N. Ohkohchi, et H. Taniguchi, « Isolation of Mouse Pancreatic Ductal Progenitor Cells Expressing CD133 and c-Met by Flow

Cytometric Cell Sorting », *Gastroenterology*, vol. 132, n° 2, p. 720-732, févr. 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2006.11.027.

[82] X. Yu, Y. Lin, X. Yan, Q. Tian, L. Li, et E. H. Lin, « CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? », *Curr. Colorectal Cancer Rep.*, vol. 7, n° 4, p. 253-259, déc. 2011, doi: 10.1007/s11888-011-0106-1.

[83] E. Irollo et G. Pirozzi, « CD133: to be or not to be, is this the real question? », *Am. J. Transl. Res.*, vol. 5, n° 6, p. 563-581, sept. 2013.

[84] C. E. Meacham et S. J. Morrison, « Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity », p. 25, 2015.

[85] S. V. Shmelkov *et al.*, « CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133– metastatic colon cancer cells initiate tumors », juin 02, 2008. <https://www.jci.org/articles/view/34401/pdf> (consulté le août 12, 2020).

[86] K. Kemper *et al.*, « The AC133 Epitope, but not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation », *Cancer Res.*, vol. 70, n° 2, p. 719-729, janv. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1820.

[87] M. A. LaBarge et M. J. Bissell, « Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? », juin 02, 2008. <https://www.jci.org/articles/view/36046/pdf> (consulté le août 12, 2020).

[88] P. C. Hermann *et al.*, « Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer », *Cell Stem Cell*, vol. 1, n° 3, p. 313-323, sept. 2007, doi: 10.1016/j.stem.2007.06.002.

[89] P. Jung *et al.*, « Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 10, Art. n° 10, oct. 2011, doi: 10.1038/nm.2470.

[90] L. Vermeulen *et al.*, « Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment », *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, n° 5, p. 468-476, mai 2010, doi: 10.1038/ncb2048.

[91] C. Cortina *et al.*, « A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors », *EMBO Mol. Med.*, vol. 9, n° 7, p. 869-879, juill. 2017, doi: 10.15252/emmm.201707550.

[92] S. Denzel, D. Maetzel, B. Mack, C. Eggert, G. Bähr, et O. Gires, « Initial activation of EpCAM cleavage viacell-to-cell contact », *BMC Cancer*, vol. 9, n° 1, p. 402, nov. 2009, doi: 10.1186/1471-2407-9-402.

[93] W. A. Osta *et al.*, « EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 16, p. 5818-5824, août 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0754.

[94] S. V. Litvinov, W. van Driel, C. M. van Rhijn, H. A. M. Bakker, H. van Krieken, et G. J. Fleuren, « Expression of Ep-CAM in Cervical Squamous Epithelia Correlates with an Increased Proliferation and the Disappearance of Markers for Terminal Differentiation », vol. 148, n° 3, p. 11, 1996.

[95] S. V. Litvinov, M. P. Velders, H. A. Bakker, G. J. Fleuren, et S. O. Warnaar, « Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. », *J. Cell Biol.*, vol. 125, n° 2, p. 437-446, avr. 1994, doi: 10.1083/jcb.125.2.437.

[96] M. Balzar, M. J. Winter, C. J. de Boer, et S. V. Litvinov, « The biology of the 17–1A antigen (Ep-CAM) », *J. Mol. Med.*, vol. 77, n° 10, p. 699-712, oct. 1999, doi: 10.1007/s001099900038.

[97] S. V. Litvinov *et al.*, « Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) Modulates Cell–Cell Interactions Mediated by Classic Cadherins », *J. Cell Biol.*, vol. 139, n° 5, p. 1337-1348, déc. 1997.

- [98] O. Ohneda *et al.*, « ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development », *Blood*, vol. 98, n° 7, p. 2134-2142, oct. 2001, doi: 10.1182/blood.V98.7.2134.
- [99] K. Ikeda et T. Quertermous, « Molecular Isolation and Characterization of a Soluble Isoform of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule That Modulates Endothelial Cell Function », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 53, p. 55315-55323, déc. 2004, doi: 10.1074/jbc.M407776200.
- [100] Y. Kato, Y. Tanaka, M. Hayashi, K. Okawa, et N. Minato, « Involvement of CD166 in the Activation of Human  $\gamma\delta$ T Cells by Tumor Cells Sensitized with Nonpeptide Antigens », *J. Immunol.*, vol. 177, n° 2, p. 877-884, juill. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.2.877.
- [101] A. Jezierska, W. Matysiak, et T. Motyl, « ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy », *Med. Sci. Monit.*, vol. 12, n° 8, p. BR263-BR273, août 2006.
- [102] A. Masedunskas *et al.*, « Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration », *FEBS Lett.*, vol. 580, n° 11, p. 2637-2645, 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.013.
- [103] N. J. Hassan *et al.*, « CD6 Regulates T-Cell Responses through Activation-Dependent Recruitment of the Positive Regulator SLP-76 », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, n° 17, p. 6727-6738, sept. 2006, doi: 10.1128/MCB.00688-06.
- [104] R. W. Cho et M. F. Clarke, « Recent advances in cancer stem cells », *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 18, n° 1, p. 48-53, févr. 2008, doi: 10.1016/j.gde.2008.01.017.
- [105] T. G. Levin *et al.*, « Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract », *Gastroenterology*, vol. 139, n° 6, p. 2072-2082.e5, déc. 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.08.053.
- [106] N. R. Smith *et al.*, « Cell Adhesion Molecule CD166/ALCAM Functions Within the Crypt to Orchestrate Murine Intestinal Stem Cell Homeostasis », *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 3, n° 3, p. 389-409, mai 2017, doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.010.
- [107] W. Weichert, T. Knösel, J. Bellach, M. Dietel, et G. Kristiansen, « ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival », *J. Clin. Pathol.*, vol. 57, n° 11, p. 1160-1164, nov. 2004, doi: 10.1136/jcp.2004.016238.
- [108] E. Batlle *et al.*, «  $\beta$ -Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB », *Cell*, vol. 111, n° 2, p. 251-263, oct. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)01015-2.
- [109] D. H. Scoville, T. Sato, X. C. He, et L. Li, « Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling », *Gastroenterology*, vol. 134, n° 3, p. 849-864, mars 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.079.
- [110] A. Merlos-Suárez *et al.*, « The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse », *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 5, p. 511-524, mai 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.02.020.
- [111] C. Ginestier *et al.*, « ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome », *Cell Stem Cell*, vol. 1, n° 5, p. 555-567, nov. 2007, doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014.
- [112] R. Januchowski, K. Wojtowicz, et M. Zabel, « The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 67, n° 7, p. 669-680, sept. 2013, doi: 10.1016/j.biopha.2013.04.005.
- [113] P. Chu *et al.*, « Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties », *Int. J. Cancer*, vol. 124, n° 6, p. 1312-1321, 2009, doi: 10.1002/ijc.24061.

- [114] E. H. Huang *et al.*, « Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 8, p. 3382-3389, avr. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4418.
- [115] M. A. Thompson, K. Ohnuma, M. Abe, C. Morimoto, et N. H. Dang, « CD26/Dipeptidyl Peptidase IV as a Novel Therapeutic Target for Cancer and Immune Disorders », *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 7, n° 3, p. 253-273, mars 2007, doi: 10.2174/138955707780059853.
- [116] R. Pang *et al.*, « A Subpopulation of CD26+ Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity in Human Colorectal Cancer », *Cell Stem Cell*, vol. 6, n° 6, p. 603-615, juin 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.04.001.
- [117] A. H.-K. Cheung *et al.*, « Emergence of CD26+ Cancer Stem Cells with Metastatic Properties in Colorectal Carcinogenesis », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, n° 6, Art. n° 6, juin 2017, doi: 10.3390/ijms18061106.
- [118] H. Ponta, L. Sherman, et P. A. Herrlich, « CD44: From adhesion molecules to signalling regulators », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, n° 1, Art. n° 1, janv. 2003, doi: 10.1038/nrm1004.
- [119] V. Orian-Rousseau, « CD44, un régulateur de la croissance et de l'invasion cellulaire », *médecine/sciences*, vol. 19, n° 4, p. 405-407, avr. 2003, doi: 10.1051/medsci/2003194405.
- [120] V. J. M. Wielenga *et al.*, « Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is Related to Tumor Progression », *Cancer Res.*, vol. 53, n° 20, p. 4754-4756, oct. 1993.
- [121] J. Zeilstra *et al.*, « Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling », *Oncogene*, vol. 33, n° 5, Art. n° 5, janv. 2014, doi: 10.1038/onc.2012.611.
- [122] V. J. M. Wielenga, R. van der Neut, G. J. A. Offerhaus, et S. T. Pals, « CD44 Glycoproteins in Colorectal Cancer: Expression, Function, and Prognostic Value », in *Advances in Cancer Research*, vol. 77, Elsevier, 1999, p. 169-187.
- [123] J. Zeilstra, S. P. J. Joosten, M. Dokter, E. Verwiël, M. Spaargaren, et S. T. Pals, « Deletion of the WNT Target and Cancer Stem Cell Marker CD44 in Apc(Min/+) Mice Attenuates Intestinal Tumorigenesis », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 10, p. 3655-3661, mai 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2940.
- [124] S. P. J. Joosten *et al.*, « MET Signaling Mediates Intestinal Crypt-Villus Development, Regeneration, and Adenoma Formation and Is Promoted by Stem Cell CD44 Isoforms », *Gastroenterology*, vol. 153, n° 4, p. 1040-1053.e4, oct. 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.008.
- [125] L. Zhao, Q. Lin, J. Wei, Y. Huai, K. Wang, et H. Yan, « CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression », p. 10.
- [126] I. Zlobec *et al.*, « Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer », *Gut*, vol. 57, n° 10, p. 1413-1419, oct. 2008, doi: 10.1136/gut.2007.141192.
- [127] A. Garouniatis, A. Zizi-Sermpetzoglou, S. Rizos, A. Kostakis, N. Nikiteas, et A. G. Papavassiliou, « FAK, CD44v6, c-Met and EGFR in colorectal cancer parameters: tumour progression, metastasis, patient survival and receptor crosstalk », *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 28, n° 1, p. 9-18, janv. 2013, doi: 10.1007/s00384-012-1520-9.
- [128] M. Fang *et al.*, « CD44 and CD44v6 are Correlated with Gastric Cancer Progression and Poor Patient Prognosis: Evidence from 42 Studies », *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 40, n° 3-4, p. 567-578, 2016, doi: 10.1159/000452570.
- [129] J. Chen, J. Zhou, J. Lu, H. Xiong, X. Shi, et L. Gong, « Significance of CD44 expression in



head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis », *BMC Cancer*, vol. 14, n° 1, p. 15, déc. 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-15.

[130] J. Wang *et al.*, « CD44v6 promotes  $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$  expression, inducing aggression in ovarian cancer cells », *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, n° 5, p. 3505-3510, mai 2015, doi: 10.3892/mmr.2015.3145.

[131] H. Jiang, W. Zhao, et W. Shao, « Prognostic value of CD44 and CD44v6 expression in patients with non-small cell lung cancer: meta-analysis », *Tumor Biol.*, vol. 35, n° 8, p. 7383-7389, août 2014, doi: 10.1007/s13277-014-2150-3.

[132] B. Hu, W. Luo, R.-T. Hu, Y. Zhou, S.-Y. Qin, et H.-X. Jiang, « Meta-Analysis of Prognostic and Clinical Significance of CD44v6 in Esophageal Cancer », *Medicine (Baltimore)*, vol. 94, n° 31, p. e1238, août 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000001238.

[133] Y. Fu *et al.*, « CD44v6 expression is associated with a poor prognosis in Chinese hepatocellular carcinoma patients: A meta-analysis », *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, vol. 39, n° 6, p. 736-739, déc. 2015, doi: 10.1016/j.clinre.2015.03.001.

[134] X.-D. Li, M. Ji, J. Wu, J.-T. Jiang, et C.-P. Wu, « Clinical Significance of CD44 Variants Expression in Colorectal Cancer », *Tumori J.*, vol. 99, n° 1, p. 88-92, janv. 2013, doi: 10.1177/030089161309900115.

[135] J.-L. Wang *et al.*, « CD44v6 overexpression related to metastasis and poor prognosis of colorectal cancer: A meta-analysis », *Oncotarget*, vol. 8, n° 8, p. 12866-12876, févr. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14163.

[136] U. Günthert *et al.*, « A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells », *Cell*, vol. 65, n° 1, p. 13-24, avr. 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90403-L.

[137] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, et B. Seed, « CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate », *Cell*, vol. 61, n° 7, p. 1303-1313, juin 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90694-A.

[138] S. Misra *et al.*, « Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy », *FEBS J.*, vol. 278, n° 9, p. 1429-1443, 2011, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x.

[139] V. Orian-Rousseau, L. Chen, J. P. Sleeman, P. Herrlich, et H. Ponta, « CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling », *Genes Dev.*, vol. 16, n° 23, p. 3074-3086, janv. 2002, doi: 10.1101/gad.242602.

[140] V. Orian-Rousseau et J. Sleeman, « Chapter Nine - CD44 is a Multidomain Signaling Platform that Integrates Extracellular Matrix Cues with Growth Factor and Cytokine Signals », in *Advances in Cancer Research*, vol. 123, M. A. Simpson et P. Heldin, Éd. Academic Press, 2014, p. 231-254.

[141] S. Adamia, C. A. Maxwell, et L. M. Pilarski, « Hyaluronan and Hyaluronan Synthases: Potential Therapeutic Targets in Cancer », *Curr. Drug Targets - Cardiovasc. Hematol. Disord.*, vol. 5, n° 1, p. 3-14, févr. 2005, doi: 10.2174/1568006053005056.

[142] R. Nusse et H. Clevers, « Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities », *Cell*, vol. 169, n° 6, p. 985-999, juin 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.

[143] K. E. Milette-González *et al.*, « Identification of Function for CD44 Intracytoplasmic Domain (CD44-ICD) MODULATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE 9 (MMP-9) TRANSCRIPTION VIA NOVEL PROMOTER RESPONSE ELEMENT », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 23, p. 18995-19007, janv. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.318774.

[144] R. Zhang, X. Pan, Z. Huang, G. F. Weber, et G. Zhang, « Osteopontin Enhances the Expression and Activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 Axis in Hepatocellular Carcinoma Cell



Lines », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 8, p. e23831, août 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0023831.

[145] Q. Yu et I. Stamenkovic, « Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion », *Genes Dev.*, vol. 13, n° 1, p. 35-48, janv. 1999, doi: 10.1101/gad.13.1.35.

[146] A. Zoltan-Jones, L. Huang, S. Ghatak, et B. P. Toole, « Elevated Hyaluronan Production Induces Mesenchymal and Transformed Properties in Epithelial Cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 46, p. 45801-45810, nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M308168200.

[147] B. P. Toole, « Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, n° 7, Art. n° 7, juill. 2004, doi: 10.1038/nrc1391.

[148] S. Müller *et al.*, « CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis », *Nat. Chem.*, p. 1-10, août 2020, doi: 10.1038/s41557-020-0513-5.

[149] G. F. Weber, « The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1552, n° 2, p. 61-85, déc. 2001, doi: 10.1016/S0304-419X(01)00037-3.

[150] Y. U. Katagiri *et al.*, « CD44 Variants but not CD44s Cooperate with  $\beta$ 1-containing Integrins to Permit Cells to Bind to Osteopontin Independently of Arginine-glycine-aspartic Acid, thereby Stimulating Cell Motility and Chemotaxis », *Cancer Res.*, vol. 59, n° 1, p. 219-226, janv. 1999.

[151] Z. Mi, S. D. Bhattacharya, V. M. Kim, H. Guo, L. J. Talbot, et P. C. Kuo, « Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis », *Carcinogenesis*, vol. 32, n° 4, p. 477-487, avr. 2011, doi: 10.1093/carcin/bgr009.

[152] W.-H. Yu, « CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling », *Genes Dev.*, vol. 16, n° 3, p. 307-323, févr. 2002, doi: 10.1101/gad.925702.

[153] K. L. Bennett *et al.*, « CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. », *J. Cell Biol.*, vol. 128, n° 4, p. 687-698, févr. 1995, doi: 10.1083/jcb.128.4.687.

[154] M. Jones, L. Tussey, N. Athanasou, et D. G. Jackson, « Heparan Sulfate Proteoglycan Isoforms of the CD44 Hyaluronan Receptor Induced in Human Inflammatory Macrophages Can Function as Paracrine Regulators of Fibroblast Growth Factor Action », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 11, p. 7964-7974, mars 2000, doi: 10.1074/jbc.275.11.7964.

[155] E. Kalomiris et L. Bourguignon, « Mouse T lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin », *J. Cell Biol.*, vol. 106, n° 2, p. 319-327, févr. 1988, doi: 10.1083/jcb.106.2.319.

[156] S. Tsukita, K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, et A. Kawai, « ERM Family Members as Molecular Linkers between the Cell Surface Glycoprotein CD44 and Actin-based Cytoskeletons », p. 11.

[157] K. Fuchs, A. Hippe, A. Schmaus, B. Homey, J. P. Sleeman, et V. Orian-Rousseau, « Opposing effects of high- and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44 », *Cell Death Dis.*, vol. 4, n° 10, p. e819-e819, oct. 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.364.

[158] E. Karousou *et al.*, « Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer », *Matrix Biol.*, vol. 59, p. 3-22, mai 2017, doi: 10.1016/j.matbio.2016.10.001.

[159] M. Todaro *et al.*, « CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis », *Cell Stem Cell*, vol. 14, n° 3, p. 342-356, mars 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.01.009.

- [160] L. Patrawala, T. Calhoun, R. Schneider-Broussard, J. Zhou, K. Claypool, et D. G. Tang, « Side Population Is Enriched in Tumorigenic, Stem-Like Cancer Cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> Cancer Cells Are Similarly Tumorigenic », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 14, p. 6207-6219, juill. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0592.
- [161] T. Kondo, T. Setoguchi, et T. Taga, « Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, n° 3, p. 781-786, janv. 2004, doi: 10.1073/pnas.0307618100.
- [162] G. Dontu *et al.*, « In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells », *Genes Dev.*, vol. 17, n° 10, p. 1253-1270, mai 2003, doi: 10.1101/gad.1061803.
- [163] C. M. Fillmore et C. Kuperwasser, « Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy », *Breast Cancer Res.*, vol. 10, n° 2, p. R25, avr. 2008, doi: 10.1186/bcr1982.
- [164] Y. Hu et G. K. Smyth, « ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays », *J. Immunol. Methods*, vol. 347, n° 1, p. 70-78, août 2009, doi: 10.1016/j.jim.2009.06.008.
- [165] J. J. G. Marin *et al.*, « Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer », *Drug Metab. Rev.*, vol. 44, n° 2, p. 148-172, mai 2012, doi: 10.3109/03602532.2011.638303.
- [166] A. E. Stacy, P. J. Jansson, et D. R. Richardson, « Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in Chemoresistance », *Mol. Pharmacol.*, vol. 84, n° 5, p. 655-669, nov. 2013, doi: 10.1124/mol.113.088609.
- [167] J. Cummings *et al.*, « Glucuronidation as a Mechanism of Intrinsic Drug Resistance in Human Colon Cancer: Reversal of Resistance by Food Additives », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 23, p. 8443-8450, déc. 2003.
- [168] V. Pavillard, C. Agostini, S. Richard, V. Charasson, D. Montaudon, et J. Robert, « Determinants of the cytotoxicity of irinotecan in two human colorectal tumor cell lines », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 49, n° 4, p. 329-335, avr. 2002, doi: 10.1007/s00280-001-0416-0.
- [169] X.-G. Li *et al.*, « Involvement of amino acids 361 to 364 of human topoisomerase I in camptothecin resistance and enzyme catalysis », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 53, n° 7, p. 1019-1027, avr. 1997, doi: 10.1016/S0006-2952(96)00899-4.
- [170] A. Boonsong, S. Marsh, P. H. Rooney, D. A. J. Stevenson, J. Cassidy, et H. L. McLeod, « Characterization of the Topoisomerase I Locus in Human Colorectal Cancer », *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 121, n° 1, p. 56-60, août 2000, doi: 10.1016/S0165-4608(00)00242-9.
- [171] E. Chu et C. J. Allegra, « Regulation of Thymidylate Synthase in Human Colon Cancer Cells Treated with 5-Fluorouracil and Interferon-Gamma », in *Novel Approaches to Selective Treatments of Human Solid Tumors: Laboratory and Clinical Correlation*, Y. M. Rustum, Éd. Boston, MA: Springer US, 1993, p. 143-151.
- [172] P. G. Johnston *et al.*, « Thymidylate Synthase Gene and Protein Expression Correlate and Are Associated with Response to 5-Fluorouracil in Human Colorectal and Gastric Tumors », *Cancer Res.*, vol. 55, n° 7, p. 1407-1412, avr. 1995.
- [173] S. Marsh, J. A. McKay, J. Cassidy, et H. L. McLeod, « Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer », *Int. J. Oncol.*, vol. 19, n° 2, p. 383-386, août 2001, doi: 10.3892/ijo.19.2.383.
- [174] Q. Wu, Z. Yang, Y. Nie, Y. Shi, et D. Fan, « Multi-drug resistance in cancer

chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches », *Cancer Lett.*, vol. 347, n° 2, p. 159-166, juin 2014, doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.013.

[175] A. Petitjean *et al.*, « Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database », *Hum. Mutat.*, vol. 28, n° 6, p. 622-629, 2007, doi: 10.1002/humu.20495.

[176] E. Van Cutsem, X. Sagaert, B. Topal, K. Haustermans, et H. Prenen, « Gastric cancer », *The Lancet*, vol. 388, n° 10060, p. 2654-2664, nov. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30354-3.

[177] R. Nussinov, C.-J. Tsai, et H. Jang, « A New View of Pathway-Driven Drug Resistance in Tumor Proliferation », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 38, n° 5, p. 427-437, mai 2017, doi: 10.1016/j.tips.2017.02.001.

[178] S. Bao *et al.*, « Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response », *Nature*, vol. 444, n° 7120, Art. n° 7120, déc. 2006, doi: 10.1038/nature05236.

[179] S. Misra, S. Ghatak, et B. P. Toole, « Regulation of MDR1 Expression and Drug Resistance by a Positive Feedback Loop Involving Hyaluronan, Phosphoinositide 3-Kinase, and ErbB2 », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 21, p. 20310-20315, mai 2005, doi: 10.1074/jbc.M500737200.

[180] J. Ni *et al.*, « Cancer Stem Cells in Prostate Cancer Chemoresistance », *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 14, n° 3, p. 225-240, avr. 2014, doi: 10.2174/1568009614666140328152459.

[181] S. Godar *et al.*, « Growth-Inhibitory and Tumor- Suppressive Functions of p53 Depend on Its Repression of CD44 Expression », *Cell*, vol. 134, n° 1, p. 62-73, juill. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.006.

[182] S. S. Skandalis, I. Kozlova, U. Engström, U. Hellman, et P. Heldin, « Proteomic identification of CD44 interacting proteins », *IUBMB Life*, vol. 62, n° 11, p. 833-840, nov. 2010, doi: 10.1002/iub.392.

[183] H. S. Bell et K. M. Ryan, « iASPP Inhibition: Increased Options in Targeting the p53 Family for Cancer Therapy », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 13, p. 4959-4962, juill. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0182.

[184] J. W. Mulder *et al.*, « Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis. », *Gut*, vol. 36, n° 1, p. 76-80, janv. 1995, doi: 10.1136/gut.36.1.76.

[185] R. Dienstmann, L. Vermeulen, J. Guinney, S. Kopetz, S. Tejpar, et J. Tabernero, « Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, n° 2, Art. n° 2, févr. 2017, doi: 10.1038/nrc.2016.126.

[186] Z. Gatalica *et al.*, « Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type », *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 23, n° 12, p. 2965-2970, déc. 2014, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0654.

[187] A. Stein et G. Folprecht, « Immunotherapy of Colon Cancer », *Oncol. Res. Treat.*, vol. 41, n° 5, p. 282-285, 2018, doi: 10.1159/000488918.

[188] A. Mielgo, M. van Driel, A. Bloem, et L. Landmann, « A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms », *Cell Death Differ.*, p. 13.

[189] K. Takahashi *et al.*, « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors », *Cell*, vol. 131, n° 5, p. 861-872, nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

[190] K. Takahashi et S. Yamanaka, « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors », *Cell*, vol. 126, n° 4, p. 663-676, août 2006, doi:

10.1016/j.cell.2006.07.024.

[191] I.-H. Park *et al.*, « Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors », *Nature*, vol. 451, n° 7175, Art. n° 7175, janv. 2008, doi: 10.1038/nature06534.

[192] L. A. Boyer *et al.*, « Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells », *Cell*, vol. 122, n° 6, p. 947-956, sept. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.

[193] J. Yu *et al.*, « Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells », *Science*, vol. 318, n° 5858, p. 1917-1920, déc. 2007, doi: 10.1126/science.1151526.

[194] J. Kim *et al.*, « A Myc Network Accounts for Similarities between Embryonic Stem and Cancer Cell Transcription Programs », *Cell*, vol. 143, n° 2, p. 313-324, oct. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.09.010.

[195] R. M. Bachoo *et al.*, « Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis », *Cancer Cell*, vol. 1, n° 3, p. 269-277, avr. 2002, doi: 10.1016/s1535-6108(02)00046-6.

[196] A. Saunders *et al.*, « The SIN3A/HDAC Corepressor Complex Functionally Cooperates with NANOG to Promote Pluripotency », *Cell Rep.*, vol. 18, n° 7, p. 1713-1726, févr. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.055.

[197] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, et E. Li, « DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development », *Cell*, vol. 99, n° 3, p. 247-257, oct. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81656-6.

[198] M. G. Goll et T. H. Bestor, « Eukaryotic cytosine methyltransferases », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, p. 481-514, 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721.

[199] A. Bird, M. Taggart, M. Frommer, O. J. Miller, et D. Macleod, « A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA », *Cell*, vol. 40, n° 1, p. 91-99, janv. 1985, doi: 10.1016/0092-8674(85)90312-5.

[200] P. A. Ginno, P. L. Lott, H. C. Christensen, I. Korf, et F. Chédin, « R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters », *Mol. Cell*, vol. 45, n° 6, p. 814-825, mars 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.017.

[201] A. V. Probst, E. Dunleavy, et G. Almouzni, « Epigenetic inheritance during the cell cycle », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, n° 3, p. 192-206, mars 2009, doi: 10.1038/nrm2640.

[202] P. A. Wade, « Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression\* », *BioEssays*, vol. 23, n° 12, p. 1131-1137, 2001, doi: 10.1002/bies.10008.

[203] C. Bock *et al.*, « DNA Methylation Dynamics during In Vivo Differentiation of Blood and Skin Stem Cells », *Mol. Cell*, vol. 47, n° 4, p. 633-647, août 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.019.

[204] H. Easwaran *et al.*, « A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer », *Genome Res.*, vol. 22, n° 5, p. 837-849, janv. 2012, doi: 10.1101/gr.131169.111.

[205] G. A. Challen *et al.*, « Dnmt3a and Dnmt3b Have Overlapping and Distinct Functions in Hematopoietic Stem Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 15, n° 3, p. 350-364, sept. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.06.018.

[206] M. Ehrlich, « DNA methylation in cancer: too much, but also too little », *Oncogene*, vol. 21, n° 35, p. 5400-5413, août 2002, doi: 10.1038/sj.onc.1205651.

[207] M. Ehrlich, « DNA hypomethylation in cancer cells », *Epigenomics*, vol. 1, n° 2, p. 239-259,

déc. 2009, doi: 10.2217/epi.09.33.

- [208] A. P. Feinberg, R. Ohlsson, et S. Henikoff, « The epigenetic progenitor origin of human cancer », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, janv. 2006, doi: 10.1038/nrg1748.
- [209] M. Klutstein, D. Nejman, R. Greenfield, et H. Cedar, « DNA Methylation in Cancer and Aging », *Cancer Res.*, vol. 76, n° 12, p. 3446-3450, juin 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3278.
- [210] T. I. Lee *et al.*, « Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells », *Cell*, vol. 125, n° 2, p. 301-313, avr. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.043.
- [211] E. M. Wolff *et al.*, « Hypomethylation of a LINE-1 Promoter Activates an Alternate Transcript of the MET Oncogene in Bladders with Cancer », *PLoS Genet.*, vol. 6, n° 4, p. e1000917, avr. 2010, doi: 10.1371/journal.pgen.1000917.
- [212] M. Avissar-Whiting, D. C. Koestler, E. A. Houseman, B. C. Christensen, K. T. Kelsey, et C. J. Marsit, « Polycomb group genes are targets of aberrant DNA methylation in renal cell carcinoma », *Epigenetics*, vol. 6, n° 6, p. 703-709, juin 2011, doi: 10.4161/epi.6.6.16158.
- [213] M. Lauss *et al.*, « DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status », *Epigenetics*, vol. 7, n° 8, p. 858-867, août 2012, doi: 10.4161/epi.20837.
- [214] K. J. Kron *et al.*, « DNA methylation of HOXD3 as a marker of prostate cancer progression », *Lab. Invest.*, vol. 90, n° 7, Art. n° 7, juill. 2010, doi: 10.1038/labinvest.2010.57.
- [215] J. P. Reddington, D. Sproul, et R. R. Meehan, « DNA methylation reprogramming in cancer: Does it act by re-configuring the binding landscape of Polycomb repressive complexes? », *BioEssays*, vol. 36, n° 2, p. 134-140, 2014, doi: 10.1002/bies.201300130.
- [216] D.-S. Lee *et al.*, « An epigenomic roadmap to induced pluripotency reveals DNA methylation as a reprogramming modulator », *Nat. Commun.*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, déc. 2014, doi: 10.1038/ncomms6619.
- [217] A. P. Feinberg et B. Vogelstein, « Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts », *Nature*, vol. 301, n° 5895, Art. n° 5895, janv. 1983, doi: 10.1038/301089a0.
- [218] A. J. K. Williamson *et al.*, « Quantitative Proteomics Analysis Demonstrates Post-transcriptional Regulation of Embryonic Stem Cell Differentiation to Hematopoiesis », *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 7, n° 3, p. 459-472, mars 2008, doi: 10.1074/mcp.M700370-MCP200.
- [219] T. W. Nilsen et B. R. Graveley, « Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing », *Nature*, vol. 463, n° 7280, Art. n° 7280, janv. 2010, doi: 10.1038/nature08909.
- [220] M. Chen et J. L. Manley, « Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, n° 11, Art. n° 11, nov. 2009, doi: 10.1038/nrm2777.
- [221] K. Chen, X. Dai, et J. Wu, « Alternative splicing: An important mechanism in stem cell biology », *World J. Stem Cells*, vol. 7, n° 1, p. 1-10, janv. 2015, doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.1.
- [222] M. Cesana *et al.*, « A CLK3-HMGA2 Alternative Splicing Axis Impacts Human Hematopoietic Stem Cell Molecular Identity throughout Development », *Cell Stem Cell*, vol. 22, n° 4, p. 575-588.e7, avr. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.03.012.
- [223] L. A. Crews *et al.*, « RNA Splicing Modulation Selectively Impairs Leukemia Stem Cell Maintenance in Secondary Human AML », *Cell Stem Cell*, vol. 19, n° 5, p. 599-612, nov. 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.08.003.



- [224] Y. Lu *et al.*, « Alternative splicing of MBD2 supports self-renewal in human pluripotent stem cells », *Cell Stem Cell*, vol. 15, n° 1, p. 92-101, juill. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.04.002.
- [225] M. Gabut *et al.*, « An Alternative Splicing Switch Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Reprogramming », *Cell*, vol. 147, n° 1, p. 132-146, sept. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.08.023.
- [226] A. E. Abrahamsson *et al.*, « Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  missplicing contributes to leukemia stem cell generation », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, n° 10, p. 3925-3929, mars 2009, doi: 10.1073/pnas.0900189106.
- [227] D. J. Goff *et al.*, « A Pan-BCL2 Inhibitor Renders Bone-Marrow-Resident Human Leukemia Stem Cells Sensitive to Tyrosine Kinase Inhibition », *Cell Stem Cell*, vol. 12, n° 3, p. 316-328, mars 2013, doi: 10.1016/j.stem.2012.12.011.
- [228] F. Holm *et al.*, « Reversion to an embryonic alternative splicing program enhances leukemia stem cell self-renewal », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n° 50, p. 15444-15449, déc. 2015, doi: 10.1073/pnas.1506943112.
- [229] H. Zhang *et al.*, « CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state », *Genes Dev.*, vol. 33, n° 3-4, p. 166-179, janv. 2019, doi: 10.1101/gad.319889.118.
- [230] D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, M. Salmon-Divon, N. Amariglio, et G. Rechavi, « Transcriptome-wide mapping of N(6)-methyladenosine by m(6)A-seq based on immunocapturing and massively parallel sequencing », *Nat. Protoc.*, vol. 8, n° 1, p. 176-189, janv. 2013, doi: 10.1038/nprot.2012.148.
- [231] D. L. Balacco et M. Soller, « The m6A Writer: Rise of a Machine for Growing Tasks », *Biochemistry*, vol. 58, n° 5, p. 363-378, 05 2019, doi: 10.1021/acs.biochem.8b01166.
- [232] G. Jia *et al.*, « N6-Methyladenosine in Nuclear RNA is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, n° 12, p. 885-887, oct. 2011, doi: 10.1038/nchembio.687.
- [233] G. Zheng *et al.*, « ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility », *Mol. Cell*, vol. 49, n° 1, p. 18-29, janv. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015.
- [234] X. Wang *et al.*, « N6-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency », *Cell*, vol. 161, n° 6, p. 1388-1399, juin 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.014.
- [235] X.-L. Ping *et al.*, « Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase », *Cell Res.*, vol. 24, n° 2, Art. n° 2, févr. 2014, doi: 10.1038/cr.2014.3.
- [236] S. Geula *et al.*, « m<sup>6</sup>A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation », *Science*, vol. 347, n° 6225, p. 1002-1006, févr. 2015, doi: 10.1126/science.1261417.
- [237] P. J. Batista *et al.*, « m6A RNA Modification Controls Cell Fate Transition in Mammalian Embryonic Stem Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 15, n° 6, p. 707-719, déc. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.09.019.
- [238] C. Zhang *et al.*, « Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells », *Oncotarget*, vol. 7, n° 40, p. 64527-64542, août 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11743.
- [239] Z. Li *et al.*, « FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N6-Methyladenosine RNA Demethylase », *Cancer Cell*, vol. 31, n° 1, p. 127-141, janv. 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.017.



- [240] Y. Huang *et al.*, « Small-Molecule Targeting of Oncogenic FTO Demethylase in Acute Myeloid Leukemia », *Cancer Cell*, vol. 35, n° 4, p. 677-691.e10, avr. 2019, doi: 10.1016/j.ccell.2019.03.006.
- [241] Q. Cui *et al.*, « m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells », *Cell Rep.*, vol. 18, n° 11, p. 2622-2634, mars 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.059.
- [242] S. Relier *et al.*, « FTO-mediated cytoplasmic m6Am demethylation adjusts stem-like properties in colorectal cancer cell », *bioRxiv*, p. 2020.01.09.899724, janv. 2020, doi: 10.1101/2020.01.09.899724.
- [243] Y. Wang, R. Medvid, C. Melton, R. Jaenisch, et R. Blelloch, « DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal », *Nat. Genet.*, vol. 39, n° 3, Art. n° 3, mars 2007, doi: 10.1038/ng1969.
- [244] X.-W. Wang *et al.*, « A DGCR8-Independent Stable MicroRNA Expression Strategy Reveals Important Functions of miR-290 and miR-183–182 Families in Mouse Embryonic Stem Cells », *Stem Cell Rep.*, vol. 9, n° 5, p. 1618-1629, nov. 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.027.
- [245] C. Kanellopoulou *et al.*, « Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing », *Genes Dev.*, vol. 19, n° 4, p. 489-501, févr. 2005, doi: 10.1101/gad.1248505.
- [246] R. W. Georgantas *et al.*, « CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: A circuit diagram of differentiation control », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, n° 8, p. 2750-2755, févr. 2007, doi: 10.1073/pnas.0610983104.
- [247] G. A. Calin et C. M. Croce, « Investigation of MicroRNA Alterations in Leukemias and Lymphomas », in *Methods in Enzymology*, vol. 427, Academic Press, 2007, p. 191-213.
- [248] A. Gaur *et al.*, « Characterization of MicroRNA Expression Levels and Their Biological Correlates in Human Cancer Cell Lines », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 6, p. 2456-2468, mars 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2698.
- [249] J. Lu *et al.*, « MicroRNA expression profiles classify human cancers », *Nature*, vol. 435, n° 7043, Art. n° 7043, juin 2005, doi: 10.1038/nature03702.
- [250] Z. Asadzadeh *et al.*, « microRNAs in cancer stem cells: Biology, pathways, and therapeutic opportunities », *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, n° 7, p. 10002-10017, 2019, doi: 10.1002/jcp.27885.
- [251] W. Ma *et al.*, « Dysregulation of the miR-34a-SIRT1 axis inhibits breast cancer stemness », *Oncotarget*, vol. 6, n° 12, p. 10432-10444, mars 2015.
- [252] C. Liu *et al.*, « The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44 », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 2, Art. n° 2, févr. 2011, doi: 10.1038/nm.2284.
- [253] Z. Li, C.-S. Yang, K. Nakashima, et T. M. Rana, « Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation », *EMBO J.*, vol. 30, n° 5, p. 823-834, mars 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.2.
- [254] S.-L. Lin *et al.*, « Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state », *RNA*, vol. 14, n° 10, p. 2115-2124, janv. 2008, doi: 10.1261/rna.1162708.
- [255] F. Anokye-Danso *et al.*, « Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency », *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 4, p. 376-388, avr. 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.03.001.
- [256] N. Miyoshi *et al.*, « Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs », *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 6, p. 633-638, juin 2011, doi:

10.1016/j.stem.2011.05.001.

[257] S. Liu *et al.*, « Methylation Status of the Nanog Promoter Determines the Switch between Cancer Cells and Cancer Stem Cells », *Adv. Sci.*, vol. 7, n° 5, p. 1903035, 2020, doi: 10.1002/advs.201903035.

[258] Y. Yu *et al.*, « MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGF $\beta$ R2) in colon cancer cells », *Carcinogenesis*, vol. 33, n° 1, p. 68-76, janv. 2012, doi: 10.1093/carcin/bgr246.

[259] J. Mathieu *et al.*, « HIF Induces Human Embryonic Stem Cell Markers in Cancer Cells », *Cancer Res.*, vol. 71, n° 13, p. 4640-4652, juill. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320.

[260] R. El Helou *et al.*, « miR-600 Acts as a Bimodal Switch that Regulates Breast Cancer Stem Cell Fate through WNT Signaling », *Cell Rep.*, vol. 18, n° 9, p. 2256-2268, 28 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.016.

[261] W.-L. Lo *et al.*, « MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells », *J. Pathol.*, vol. 223, n° 4, p. 482-495, 2011, doi: 10.1002/path.2826.

[262] Q. Wu, R. Guo, M. Lin, B. Zhou, et Y. Wang, « MicroRNA-200a inhibits CD133/1+ ovarian cancer stem cells migration and invasion by targeting E-cadherin repressor ZEB2 », *Gynecol. Oncol.*, vol. 122, n° 1, p. 149-154, juill. 2011, doi: 10.1016/j.ygyno.2011.03.026.

[263] S. Floor, W. C. G. van Staveren, D. Larsimont, J. E. Dumont, et C. Maenhaut, « Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating–cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations », *Oncogene*, vol. 30, n° 46, Art. n° 46, nov. 2011, doi: 10.1038/onc.2011.184.

[264] C. Scheel et R. A. Weinberg, « Phenotypic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transitions in Cancer - and Normal Stem Cells? », *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 129, n° 10, p. 2310-2314, nov. 2011, doi: 10.1002/ijc.26311.

[265] T. R. Geiger et D. S. Peeper, « Metastasis mechanisms », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1796, n° 2, p. 293-308, déc. 2009, doi: 10.1016/j.bbcan.2009.07.006.

[266] J. P. Thiery et J. P. Sleeman, « Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, n° 2, Art. n° 2, févr. 2006, doi: 10.1038/nrm1835.

[267] J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. J. Huang, et M. A. Nieto, « Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease », *Cell*, vol. 139, n° 5, p. 871-890, nov. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.

[268] H. Acloque, M. S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser, et M. A. Nieto, « Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease », *J. Clin. Invest.*, vol. 119, n° 6, p. 1438-1449, juin 2009, doi: 10.1172/JCI38019.

[269] C. Margadant et A. Sonnenberg, « Integrin–TGF- $\beta$  crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing », *EMBO Rep.*, vol. 11, n° 2, p. 97-105, févr. 2010, doi: 10.1038/embor.2009.276.

[270] M. Iwano, D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, et E. G. Neilson, « Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis », *J. Clin. Invest.*, vol. 110, n° 3, p. 341-350, août 2002, doi: 10.1172/JCI15518.

[271] C. Xue, D. Plieth, C. Venkov, C. Xu, et E. G. Neilson, « The Gatekeeper Effect of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulates the Frequency of Breast Cancer Metastasis », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 12, p. 3386-3394, juin 2003.

- [272] G. Berx, E. Raspé, G. Christofori, J. P. Thiery, et J. P. Sleeman, « Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer », *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 24, n° 8, p. 587-597, nov. 2007, doi: 10.1007/s10585-007-9114-6.
- [273] S. Ansieau *et al.*, « Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence », *Cancer Cell*, vol. 14, n° 1, p. 79-89, juill. 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2008.06.005.
- [274] A. D. Rhim *et al.*, « EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation », *Cell*, vol. 148, n° 1-2, p. 349-361, janv. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2011.11.025.
- [275] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [276] L. Treps et J. Gavard, « [Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad] », *Med. Sci. MS*, vol. 31, n° 11, p. 989-995, nov. 2015, doi: 10.1051/medsci/20153111013.
- [277] S. Cannito *et al.*, « Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial–mesenchymal transition in cancer cells », *Carcinogenesis*, vol. 29, n° 12, p. 2267-2278, déc. 2008, doi: 10.1093/carcin/bgn216.
- [278] M.-H. Yang *et al.*, « Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis », *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, n° 3, Art. n° 3, mars 2008, doi: 10.1038/ncb1691.
- [279] T. Brabletz *et al.*, « Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and  $\beta$ -Catenin », *Cells Tissues Organs*, vol. 179, n° 1-2, p. 56-65, 2005, doi: 10.1159/000084509.
- [280] F. Fan *et al.*, « Overexpression of Snail induces epithelial–mesenchymal transition and a cancer stem cell–like phenotype in human colorectal cancer cells », *Cancer Med.*, vol. 1, n° 1, p. 5-16, 2012, doi: 10.1002/cam4.4.
- [281] A.-P. Morel, M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, et A. Puisieux, « Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition », *PLOS ONE*, vol. 3, n° 8, p. e2888, août 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002888.
- [282] D. Zhou *et al.*, « RBP2 induces stem-like cancer cells by promoting EMT and is a prognostic marker for renal cell carcinoma », *Exp. Mol. Med.*, vol. 48, n° 6, Art. n° 6, juin 2016, doi: 10.1038/emm.2016.37.
- [283] Z. A. Rasheed *et al.*, « Prognostic Significance of Tumorigenic Cells With Mesenchymal Features in Pancreatic Adenocarcinoma », *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 102, n° 5, p. 340-351, mars 2010, doi: 10.1093/jnci/djp535.
- [284] S. A. Mani *et al.*, « The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells », *Cell*, vol. 133, n° 4, p. 704-715, mai 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [285] H. Peinado, D. Olmeda, et A. Cano, « Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? », p. 15, 2007.
- [286] A. Cano *et al.*, « The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression », *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, n° 2, Art. n° 2, févr. 2000, doi: 10.1038/35000025.
- [287] T. T. Onder, P. B. Gupta, S. A. Mani, J. Yang, E. S. Lander, et R. A. Weinberg, « Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 10, p. 3645-3654, mai 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2938.
- [288] J. C. H. Hardwick *et al.*, « Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon,

mature epithelial cells in the colon », *Gastroenterology*, vol. 126, n° 1, p. 111-121, janv. 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2003.10.067.

[289] X. Li, B. B. Madison, W. Zacharias, Å. Kolterud, D. States, et D. L. Gumucio, « Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk », *Physiol. Genomics*, vol. 29, n° 3, p. 290-301, mai 2007, doi: 10.1152/physiolgenomics.00269.2006.

[290] A.-P. G. Haramis *et al.*, « De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine », *Science*, vol. 303, n° 5664, p. 1684-1686, mars 2004, doi: 10.1126/science.1093587.

[291] X. C. He *et al.*, « BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- $\beta$ -catenin signaling », *Nat. Genet.*, vol. 36, n° 10, p. 1117-1121, oct. 2004, doi: 10.1038/ng1430.

[292] C. Kosinski *et al.*, « Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 39, p. 15418-15423, sept. 2007, doi: 10.1073/pnas.0707210104.

[293] T. Sato *et al.*, « Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts », *Nature*, vol. 469, n° 7330, Art. n° 7330, janv. 2011, doi: 10.1038/nature09637.

[294] M. J. Rodríguez-Colman *et al.*, « Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function », *Nature*, vol. 543, n° 7645, p. 424-427, mars 2017, doi: 10.1038/nature21673.

[295] A. Sehgal, D. S. Donaldson, C. Pridans, K. A. Sauter, D. A. Hume, et N. A. Mabbott, « The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem-cell niche », *Nat. Commun.*, vol. 9, mars 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03638-6.

[296] A. Glentis, V. Gurchenkov, et D. M. Vignjevic, « Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes », *Cell Adhes. Migr.*, vol. 8, n° 3, p. 236-245, mai 2014, doi: 10.4161/cam.28733.

[297] P. D. Yurchenco, « Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, n° 2, févr. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004911.

[298] V. S. LeBleu, B. MacDonald, et R. Kalluri, « Structure and Function of Basement Membranes », *Exp. Biol. Med.*, vol. 232, n° 9, p. 1121-1129, oct. 2007, doi: 10.3181/0703-MR-72.

[299] L. C. Kelley, L. L. Lohmer, E. J. Hagedorn, et D. R. Sherwood, « Traversing the basement membrane in vivo: A diversity of strategies », *J. Cell Biol.*, vol. 204, n° 3, p. 291-302, févr. 2014, doi: 10.1083/jcb.201311112.

[300] K. Kessenbrock, V. Plaks, et Z. Werb, « Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment », *Cell*, vol. 141, n° 1, p. 52-67, avr. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.

[301] M. Egeblad et Z. Werb, « New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, n° 3, Art. n° 3, mars 2002, doi: 10.1038/nrc745.

[302] L. A. Liotta et E. C. Kohn, « The microenvironment of the tumour-host interface », *Nature*, vol. 411, n° 6835, Art. n° 6835, mai 2001, doi: 10.1038/35077241.

[303] M. C. W. van den Berg *et al.*, « Proteolytic and Opportunistic Breaching of the Basement Membrane Zone by Immune Cells during Tumor Initiation », *Cell Rep.*, vol. 27, n° 10, p. 2837-2846.e4, juin 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.029.

[304] T. Takeuchi et T. Gonda, « Distribution of the Pores of Epithelial Basement Membrane in the

- Rat Small Intestine », *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 66, n° 6, p. 695-700, 2004, doi: 10.1292/jvms.66.695.
- [305] M. E. McAlindon, T. Gray, A. Galvin, H. F. Sewell, D. K. Podolsky, et Y. R. Mahida, « Differential lamina propria cell migration via basement membrane pores of inflammatory bowel disease mucosa », *Gastroenterology*, vol. 115, n° 4, p. 841-848, oct. 1998, doi: 10.1016/S0016-5085(98)70255-0.
- [306] C. Spenlé *et al.*, « Dysregulation of laminins in intestinal inflammation », *Pathol. Biol.*, vol. 60, n° 1, p. 41-47, févr. 2012, doi: 10.1016/j.patbio.2011.10.005.
- [307] J. A. Joyce et J. W. Pollard, « Microenvironmental regulation of metastasis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, n° 4, Art. n° 4, avr. 2009, doi: 10.1038/nrc2618.
- [308] J. Condeelis et J. W. Pollard, « Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis », *Cell*, vol. 124, n° 2, p. 263-266, janv. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.01.007.
- [309] R. Kalluri et M. Zeisberg, « Fibroblasts in cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, n° 5, Art. n° 5, mai 2006, doi: 10.1038/nrc1877.
- [310] A. Glentis *et al.*, « Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane », *Nat. Commun.*, vol. 8, n° 1, Art. n° 1, oct. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00985-8.
- [311] N. F. Boyd *et al.*, « Evidence That Breast Tissue Stiffness Is Associated with Risk of Breast Cancer », *PLOS ONE*, vol. 9, n° 7, p. e100937, juill. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0100937.
- [312] N. F. Boyd, L. J. Martin, M. Bronskill, M. J. Yaffe, N. Duric, et S. Minkin, « Breast Tissue Composition and Susceptibility to Breast Cancer », *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 102, n° 16, p. 1224-1237, août 2010, doi: 10.1093/jnci/djq239.
- [313] N. F. Boyd, L. J. Martin, M. J. Yaffe, et S. Minkin, « Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects », *Breast Cancer Res.*, vol. 13, n° 6, p. 223, nov. 2011, doi: 10.1186/bcr2942.
- [314] U. C. Bang, T. Benfield, L. Hyldstrup, F. Bendtsen, et J. Beck Jensen, « Mortality, Cancer, and Comorbidities Associated With Chronic Pancreatitis: A Danish Nationwide Matched-Cohort Study », *Gastroenterology*, vol. 146, n° 4, p. 989-994.e1, avr. 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.033.
- [315] E. J. Duell *et al.*, « Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4) », *Ann. Oncol.*, vol. 23, n° 11, p. 2964-2970, nov. 2012, doi: 10.1093/annonc/mds140.
- [316] G. Fattovich, T. Stroffolini, I. Zagni, et F. Donato, « Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors », *Gastroenterology*, vol. 127, n° 5, Supplement 1, p. S35-S50, nov. 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2004.09.014.
- [317] N. R. Alexander *et al.*, « Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity », *Curr. Biol.*, vol. 18, n° 17, p. 1295-1299, sept. 2008, doi: 10.1016/j.cub.2008.07.090.
- [318] O. Collin *et al.*, « Self-Organized Podosomes Are Dynamic Mechanosensors », *Curr. Biol.*, vol. 18, n° 17, p. 1288-1294, sept. 2008, doi: 10.1016/j.cub.2008.07.046.
- [319] O. Destaing, M. R. Block, E. Planus, et C. Albiges-Rizo, « Invadosome regulation by adhesion signaling », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 23, n° 5, p. 597-606, oct. 2011, doi: 10.1016/j.ceb.2011.04.002.
- [320] K. van den Dries, M. Bolomini-Vittori, et A. Cambi, « Spatiotemporal organization and mechanosensory function of podosomes », *Cell Adhes. Migr.*, vol. 8, n° 3, p. 268-272, mai 2014, doi:



10.4161/cam.28182.

- [321] A. Labernadie *et al.*, « Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes », *Nat. Commun.*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, nov. 2014, doi: 10.1038/ncomms6343.
- [322] R. Peláez, A. Pariente, Á. Pérez-Sala, et I. M. Larrayoz, « Integrins: Moonlighting Proteins in Invadosome Formation », *Cancers*, vol. 11, n° 5, Art. n° 5, mai 2019, doi: 10.3390/cancers11050615.
- [323] I. Acerbi *et al.*, « Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration », *Integr. Biol.*, vol. 7, n° 10, p. 1120-1134, oct. 2015, doi: 10.1039/c5ib00040h.
- [324] H. Laklai *et al.*, « Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression », *Nat. Med.*, vol. 22, n° 5, p. 497-505, 2016, doi: 10.1038/nm.4082.
- [325] M. J. Paszek *et al.*, « Tensional homeostasis and the malignant phenotype », *Cancer Cell*, vol. 8, n° 3, p. 241-254, sept. 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.010.
- [326] F. Lagarrigue *et al.*, « Matrix Metalloproteinase-9 Is Upregulated in Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Anaplastic Lymphomas and Activated at the Cell Surface by the Chaperone Heat Shock Protein 90 to Promote Cell Invasion », *Cancer Res.*, vol. 70, n° 17, p. 6978-6987, sept. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0861.
- [327] W. G. Stetler-Stevenson, S. Aznavoorian, et L. A. Liotta, « Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis », *Annu. Rev. Cell Biol.*, vol. 9, p. 541-573, 1993, doi: 10.1146/annurev.cb.09.110193.002545.
- [328] T. Takahara, Y. Yata, L. P. Zhang, et A. Watanabe, « Chapter 18 - Gene Expression of Matrix Metalloproteinases in Acute and Chronic Liver Injuries », in *Extracellular Matrix and the Liver*, I. Oakazaki, Y. Ninomiya, S. L. Friedman, et K. Tanikawa, Éd. San Diego: Academic Press, 2003, p. 333-346.
- [329] S. Linder, « The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation », *Trends Cell Biol.*, vol. 17, n° 3, p. 107-117, mars 2007, doi: 10.1016/j.tcb.2007.01.002.
- [330] E. J. Hagedorn *et al.*, « The netrin receptor DCC focuses invadopodia-driven basement membrane transmigration in vivo », *J. Cell Biol.*, vol. 201, n° 6, p. 903-913, juin 2013, doi: 10.1083/jcb.201301091.
- [331] R. Poincloux, F. Lizarraga, et P. Chavrier, « Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia », *J. Cell Sci.*, vol. 122, n° 17, p. 3015-3024, sept. 2009, doi: 10.1242/jcs.034561.
- [332] V. V. Artym, Y. Zhang, F. Seillier-Moisewitsch, K. M. Yamada, et S. C. Mueller, « Dynamic Interactions of Cortactin and Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase at Invadopodia: Defining the Stages of Invadopodia Formation and Function », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 6, p. 3034-3043, mars 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2177.
- [333] E. I. Deryugina et J. P. Quigley, « Matrix metalloproteinases and tumor metastasis », *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 25, n° 1, p. 9-34, mars 2006, doi: 10.1007/s10555-006-7886-9.
- [334] D. Hoshino, K. M. Branch, et A. M. Weaver, « Signaling inputs to invadopodia and podosomes », *J. Cell Sci.*, vol. 126, n° 14, p. 2979-2989, juill. 2013, doi: 10.1242/jcs.079475.
- [335] C. C. Mader *et al.*, « An EGFR-Src-Arg-Cortactin Pathway Mediates Functional Maturation of Invadopodia and Breast Cancer Cell Invasion », *Cancer Res.*, vol. 71, n° 5, p. 1730-1741, mars 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1432.



- [336] H. Yamaguchi *et al.*, « Molecular mechanisms of invadopodium formation the role of the N-WASP–Arp2/3 complex pathway and cofilin », *J. Cell Biol.*, vol. 168, n° 3, p. 441-452, janv. 2005, doi: 10.1083/jcb.200407076.
- [337] S. Mandal, K. R. Johnson, et M. J. Wheelock, « TGF- $\beta$  induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways », *Exp. Cell Res.*, vol. 314, n° 19, p. 3478-3493, nov. 2008, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.013.
- [338] J. Pignatelli, D. A. Tumbarello, R. P. Schmidt, et C. E. Turner, « Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF- $\beta$ –induced epithelial–mesenchymal transition », *J. Cell Biol.*, vol. 197, n° 3, p. 421-437, avr. 2012, doi: 10.1083/jcb.201108143.
- [339] B. Díaz, A. Yuen, S. Iizuka, S. Higashiyama, et S. A. Courtneidge, « Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia », *J. Cell Biol.*, vol. 201, n° 2, p. 279-292, avr. 2013, doi: 10.1083/jcb.201209151.
- [340] K. E. Hayes, E. L. Walk, A. G. Ammer, L. C. Kelley, K. H. Martin, et S. A. Weed, « Ablason kinases negatively regulate invadopodia function and invasion in head and neck squamous cell carcinoma by inhibiting an HB-EGF autocrine loop », *Oncogene*, vol. 32, n° 40, Art. n° 40, oct. 2013, doi: 10.1038/onc.2012.513.
- [341] J. T. Lucas, B. P. Salimath, M. G. Slomiany, et S. A. Rosenzweig, « Regulation of invasive behavior by vascular endothelial growth factor is HEF1-dependent », *Oncogene*, vol. 29, n° 31, Art. n° 31, août 2010, doi: 10.1038/onc.2010.185.
- [342] C. V. Rajadurai *et al.*, « Met receptor tyrosine kinase signals through a cortactin–Gab1 scaffold complex, to mediate invadopodia », *J. Cell Sci.*, vol. 125, n° 12, p. 2940-2953, juin 2012, doi: 10.1242/jcs.100834.
- [343] A. Chabadel *et al.*, « CD44 and  $\beta$ 3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-based Domains in Osteoclasts », *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, n° 12, p. 4899-4910, déc. 2007, doi: 10.1091/mbc.E07-04-0378.
- [344] S. Linder et M. Aepfelbacher, « Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells », *Trends Cell Biol.*, vol. 13, n° 7, p. 376-385, juill. 2003, doi: 10.1016/S0962-8924(03)00128-4.
- [345] D. A. Murphy et S. A. Courtneidge, « The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, n° 7, Art. n° 7, juill. 2011, doi: 10.1038/nrm3141.
- [346] S. Linder, C. Wiesner, et M. Himmel, « Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, n° 1, p. 185-211, 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154216.
- [347] D. L. Bodor, W. Pönisch, R. G. Endres, et E. K. Paluch, « Of Cell Shapes and Motion: The Physical Basis of Animal Cell Migration », *Dev. Cell*, vol. 52, n° 5, p. 550-562, mars 2020, doi: 10.1016/j.devcel.2020.02.013.
- [348] P. Friedl et K. Wolf, « Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, n° 5, Art. n° 5, mai 2003, doi: 10.1038/nrc1075.
- [349] J. P. Thiery, « Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, n° 6, Art. n° 6, juin 2002, doi: 10.1038/nrc822.
- [350] Y. Drabsch et P. ten Dijke, « TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis », *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 31, n° 3, p. 553-568, déc. 2012, doi: 10.1007/s10555-012-9375-7.
- [351] G. Landskron, M. De la Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, et M. A. Hermoso, « Chronic

Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment », *Journal of Immunology Research*, mai 13, 2014. <https://www.hindawi.com/journals/jir/2014/149185/> (consulté le sept. 07, 2020).

[352] M. Innocenti, « New insights into the formation and the function of lamellipodia and ruffles in mesenchymal cell migration », *Cell Adhes. Migr.*, vol. 12, n° 5, p. 401-416, sept. 2018, doi: 10.1080/19336918.2018.1448352.

[353] E. K. Paluch, I. M. Aspalter, et M. Sixt, « Focal Adhesion–Independent Cell Migration », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 32, n° 1, p. 469-490, 2016, doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125341.

[354] Y.-J. Liu *et al.*, « Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells », *Cell*, vol. 160, n° 4, p. 659-672, févr. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.007.

[355] K. Paňková, D. Rösel, M. Novotný, et J. Brábek, « The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n° 1, p. 63-71, janv. 2010, doi: 10.1007/s00018-009-0132-1.

[356] J. L. Orgaz, C. Herraiz, et V. Sanz-Moreno, « Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells », *Small GTPases*, vol. 5, n° 4, p. e983867, oct. 2014, doi: 10.4161/sgtp.29019.

[357] E. Giannoni *et al.*, « EphA2-mediated mesenchymal–amoeboid transition induced by endothelial progenitor cells enhances metastatic spread due to cancer-associated fibroblasts », *J. Mol. Med.*, vol. 91, n° 1, p. 103-115, janv. 2013, doi: 10.1007/s00109-012-0941-9.

[358] P. Friedl, J. Locker, E. Sahai, et J. E. Segall, « Classifying collective cancer cell invasion », *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, n° 8, Art. n° 8, août 2012, doi: 10.1038/ncb2548.

[359] P. Friedl et D. Gilmour, « Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, n° 7, Art. n° 7, juill. 2009, doi: 10.1038/nrm2720.

[360] K. J. Cheung et A. J. Ewald, « A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters », *Science*, vol. 352, n° 6282, p. 167-169, avr. 2016, doi: 10.1126/science.aaf6546.

[361] R. Mayor et S. Etienne-Manneville, « The front and rear of collective cell migration », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, n° 2, Art. n° 2, févr. 2016, doi: 10.1038/nrm.2015.14.

[362] E. Theveneau et C. Linker, « Leaders in collective migration: are front cells really endowed with a particular set of skills? », *F1000Research*, vol. 6, oct. 2017, doi: 10.12688/f1000research.11889.1.

[363] C. Magnon *et al.*, « Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression », *Science*, vol. 341, n° 6142, juill. 2013, doi: 10.1126/science.1236361.

[364] K. Dobrenis, L. R. Gauthier, V. Barroca, et C. Magnon, « Granulocyte colony-stimulating factor off-target effect on nerve outgrowth promotes prostate cancer development », *Int. J. Cancer*, vol. 136, n° 4, p. 982-988, 2015, doi: 10.1002/ijc.29046.

[365] J. Pundavela *et al.*, « Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer », *Mol. Oncol.*, vol. 9, n° 8, p. 1626-1635, 2015, doi: 10.1016/j.molonc.2015.05.001.

[366] S. C. Peterson *et al.*, « Basal Cell Carcinoma Preferentially Arises from Stem Cells within Hair Follicle and Mechanosensory Niches », *Cell Stem Cell*, vol. 16, n° 4, p. 400-412, avr. 2015, doi: 10.1016/j.stem.2015.02.006.

[367] C.-M. Zhao *et al.*, « Denervation suppresses gastric tumorigenesis », *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, n° 250, p. 250ra115-250ra115, août 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3009569.

- [368] P. Mauffrey *et al.*, « Progenitors from the central nervous system drive neurogenesis in cancer », *Nature*, vol. 569, n° 7758, Art. n° 7758, mai 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1219-y.
- [369] Y. Hayakawa *et al.*, « Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling », *Cancer Cell*, vol. 31, n° 1, p. 21-34, janv. 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.005.
- [370] V. Secq *et al.*, « Stromal SLIT2 impacts on pancreatic cancer-associated neural remodeling », *Cell Death Dis.*, vol. 6, n° 1, p. e1592, janv. 2015, doi: 10.1038/cddis.2014.557.
- [371] S. Deborde *et al.*, « Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion », *J. Clin. Invest.*, vol. 126, n° 4, p. 1538-1554, avr. 2016, doi: 10.1172/JCI82658.
- [372] E. Duchalais *et al.*, « Colorectal Cancer Cells Adhere to and Migrate Along the Neurons of the Enteric Nervous System », *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 5, n° 1, p. 31-49, oct. 2017, doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.10.002.
- [373] H. W. Virgin, E. J. Wherry, et R. Ahmed, « Redefining Chronic Viral Infection », *Cell*, vol. 138, n° 1, p. 30-50, juill. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.06.036.
- [374] D. S. Chen et I. Mellman, « Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle », *Immunity*, vol. 39, n° 1, p. 1-10, juill. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- [375] A. K. Palucka et L. M. Coussens, « The Basis of Oncoimmunology », *Cell*, vol. 164, n° 6, p. 1233-1247, mars 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.01.049.
- [376] J. Galon *et al.*, « Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome », *Science*, vol. 313, n° 5795, p. 1960-1964, sept. 2006, doi: 10.1126/science.1129139.
- [377] F. Pagès *et al.*, « Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, n° 25, p. 2654-2666, déc. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa051424.
- [378] C. E. Lewis et J. W. Pollard, « Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 2, p. 605-612, janv. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4005.
- [379] A. Gardner et B. Ruffell, « Dendritic Cells and Cancer Immunity », *Trends Immunol.*, vol. 37, n° 12, p. 855-865, déc. 2016, doi: 10.1016/j.it.2016.09.006.
- [380] B. Almand *et al.*, « Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer », *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, n° 5, p. 1755-1766, mai 2000.
- [381] M. Tang, J. Diao, et M. S. Cattral, « Molecular mechanisms involved in dendritic cell dysfunction in cancer », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 74, n° 5, p. 761-776, 2017, doi: 10.1007/s00018-016-2317-8.
- [382] J. P. Böttcher *et al.*, « NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control », *Cell*, vol. 172, n° 5, p. 1022-1037.e14, 22 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.01.004.
- [383] D. L. Herber *et al.*, « Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer », *Nat. Med.*, vol. 16, n° 8, p. 880-886, août 2010, doi: 10.1038/nm.2172.
- [384] J. R. Cubillos-Ruiz *et al.*, « ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis », *Cell*, vol. 161, n° 7, p. 1527-1538, juin 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.025.
- [385] F. Castellino, A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, et R. N. Germain,

- « Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8 + T cells to sites of CD4 + T cell–dendritic cell interaction », *Nature*, vol. 440, n° 7086, Art. n° 7086, avr. 2006, doi: 10.1038/nature04651.
- [386] H. Nishikawa et S. Sakaguchi, « Regulatory T cells in tumor immunity », *Int. J. Cancer*, vol. 127, n° 4, p. 759-767, 2010, doi: 10.1002/ijc.25429.
- [387] T. Ahrends *et al.*, « CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness », *Immunity*, vol. 47, n° 5, p. 848-861.e5, nov. 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.009.
- [388] J. Borst, T. Ahrends, N. Bąbała, C. J. M. Melief, et W. Kastenmüller, « CD4 + T cell help in cancer immunology and immunotherapy », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, n° 10, Art. n° 10, oct. 2018, doi: 10.1038/s41577-018-0044-0.
- [389] N. V. Serbina et E. G. Pamer, « Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2 », *Nat. Immunol.*, vol. 7, n° 3, p. 311-317, mars 2006, doi: 10.1038/ni1309.
- [390] J. Bubenič, « Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy (Review) », *Oncol. Rep.*, vol. 10, n° 6, p. 2005-2008, nov. 2003, doi: 10.3892/or.10.6.2005.
- [391] H. Garner et K. E. de Visser, « Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, n° 8, p. 483-497, août 2020, doi: 10.1038/s41577-019-0271-z.
- [392] J.-I. Youn, S. Nagaraj, M. Collazo, et D. I. Gabrilovich, « Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice », *J. Immunol.*, vol. 181, n° 8, p. 5791-5802, oct. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5791.
- [393] K. Movahedi *et al.*, « Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell–suppressive activity », *Blood*, vol. 111, n° 8, p. 4233-4244, avr. 2008, doi: 10.1182/blood-2007-07-099226.
- [394] L. Dolcetti *et al.*, « Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF », *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, n° 1, p. 22-35, 2010, doi: 10.1002/eji.200939903.
- [395] R. Noy et J. W. Pollard, « Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy », *Immunity*, vol. 41, n° 1, p. 49-61, juill. 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- [396] T. J. Curiel *et al.*, « Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival », *Nat. Med.*, vol. 10, n° 9, Art. n° 9, sept. 2004, doi: 10.1038/nm1093.
- [397] B. Ruffell *et al.*, « Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells », *Cancer Cell*, vol. 26, n° 5, p. 623-637, nov. 2014, doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.006.
- [398] F. Ghiringhelli *et al.*, « CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor– $\beta$ –dependent manner », *J. Exp. Med.*, vol. 202, n° 8, p. 1075-1085, oct. 2005, doi: 10.1084/jem.20051511.
- [399] T. Chinen *et al.*, « An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function », *Nat. Immunol.*, vol. 17, n° 11, Art. n° 11, nov. 2016, doi: 10.1038/ni.3540.
- [400] B. Allard, P. A. Beavis, P. K. Darcy, et J. Stagg, « Immunosuppressive activities of adenosine in cancer », *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 29, p. 7-16, août 2016, doi: 10.1016/j.coph.2016.04.001.
- [401] S. Deaglio *et al.*, « Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on

regulatory T cells mediates immune suppression », *J. Exp. Med.*, vol. 204, n° 6, p. 1257-1265, juin 2007, doi: 10.1084/jem.20062512.

[402] C. L. Semerad, F. Liu, A. D. Gregory, K. Stumpf, et D. C. Link, « G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood », *Immunity*, vol. 17, n° 4, p. 413-423, oct. 2002, doi: 10.1016/S1074-7613(02)00424-7.

[403] M. D. Reid *et al.*, « Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia », *Mod. Pathol.*, vol. 24, n° 12, Art. n° 12, déc. 2011, doi: 10.1038/modpathol.2011.113.

[404] S. B. Coffelt, M. D. Wellenstein, et K. E. de Visser, « Neutrophils in cancer: neutral no more », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, n° 7, Art. n° 7, juill. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.52.

[405] Á. Teijeira *et al.*, « CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity », *Immunity*, vol. 52, n° 5, p. 856-871.e8, mai 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.001.

[406] R. Mizuno, K. Kawada, Y. Itatani, R. Ogawa, Y. Kiyasu, et Y. Sakai, « The Role of Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n° 3, Art. n° 3, janv. 2019, doi: 10.3390/ijms20030529.

[407] E. Y. Lin, A. V. Nguyen, R. G. Russell, et J. W. Pollard, « Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy », *J. Exp. Med.*, vol. 193, n° 6, p. 727-740, mars 2001.

[408] T. Chao, E. E. Furth, et R. H. Vonderheide, « CXCR2-Dependent Accumulation of Tumor-Associated Neutrophils Regulates T-cell Immunity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Cancer Immunol. Res.*, vol. 4, n° 11, p. 968-982, nov. 2016, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0188.

[409] Y. Itatani *et al.*, « The Role of Chemokines in Promoting Colorectal Cancer Invasion/Metastasis », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, n° 5, Art. n° 5, mai 2016, doi: 10.3390/ijms17050643.

[410] S. Inamoto *et al.*, « Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells through the CCL15–CCR1 Chemokine Axis », *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, n° 2, p. 492-501, janv. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0726.

[411] E. Chun *et al.*, « CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function », *Cell Rep.*, vol. 12, n° 2, p. 244-257, juill. 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.024.

[412] Z. G. Fridlender *et al.*, « Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN », *Cancer Cell*, vol. 16, n° 3, p. 183-194, sept. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.

[413] A. Calon *et al.*, « Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- $\beta$ -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation », *Cancer Cell*, vol. 22, n° 5, p. 571-584, nov. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013.

[414] F. Shojaei, C. Zhong, X. Wu, L. Yu, et N. Ferrara, « Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth », *Trends Cell Biol.*, vol. 18, n° 8, p. 372-378, août 2008, doi: 10.1016/j.tcb.2008.06.003.

[415] L. Yang *et al.*, « Expansion of myeloid immune suppressor Gr<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis », *Cancer Cell*, vol. 6, n° 4, p. 409-421, oct. 2004, doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.031.

[416] E. I. Deryugina, E. Zajac, A. Juncker-Jensen, T. A. Kupriyanova, L. Welter, et J. P. Quigley, « Tissue-Infiltrating Neutrophils Constitute the Major In Vivo Source of Angiogenesis-Inducing MMP-9 in the Tumor Microenvironment », *Neoplasia*, vol. 16, n° 10, p. 771-788, oct. 2014, doi:



10.1016/j.neo.2014.08.013.

- [417] N. Güngör *et al.*, « Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid », *Mutagenesis*, vol. 25, n° 2, p. 149-154, mars 2010, doi: 10.1093/mutage/geb053.
- [418] A. M. Houghton *et al.*, « Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth », *Nat. Med.*, vol. 16, n° 2, Art. n° 2, févr. 2010, doi: 10.1038/nm.2084.
- [419] T. Große-Steffen *et al.*, « Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Pancreatic Tumor Cell Lines: The Role of Neutrophils and Neutrophil-Derived Elastase », *Clinical and Developmental Immunology*, nov. 20, 2012.  
<https://www.hindawi.com/journals/jir/2012/720768/> (consulté le sept. 07, 2020).
- [420] F. Balkwill, K. A. Charles, et A. Mantovani, « Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease », *Cancer Cell*, vol. 7, n° 3, p. 211-217, mars 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.013.
- [421] F. Balkwill et A. Mantovani, « Inflammation and cancer: back to Virchow? », *The Lancet*, vol. 357, n° 9255, p. 539-545, févr. 2001, doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
- [422] B.-Z. Qian et J. W. Pollard, « Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis », *Cell*, vol. 141, n° 1, p. 39-51, avr. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
- [423] L. Bingle, N. J. Brown, et C. E. Lewis, « The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies », *J. Pathol.*, vol. 196, n° 3, p. 254-265, 2002, doi: 10.1002/path.1027.
- [424] P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, et A. Mantovani, « The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 66, n° 1, p. 1-9, avr. 2008, doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.07.004.
- [425] M. De Palma, D. Biziato, et T. V. Petrova, « Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, n° 8, p. 457-474, 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.51.
- [426] R. D. Leek et A. L. Harris, « Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer », *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 7, n° 2, p. 177-189, avr. 2002, doi: 10.1023/A:1020304003704.
- [427] J. Condeelis et J. E. Segall, « Intravital imaging of cell movement in tumours », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, n° 12, Art. n° 12, déc. 2003, doi: 10.1038/nrc1231.
- [428] W. Wang, S. Goswami, E. Sahai, J. B. Wyckoff, J. E. Segall, et J. S. Condeelis, « Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility », *Trends Cell Biol.*, vol. 15, n° 3, p. 138-145, mars 2005, doi: 10.1016/j.tcb.2005.01.003.
- [429] S. Goswami *et al.*, « Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 12, p. 5278-5283, juin 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1853.
- [430] J. Wyckoff *et al.*, « A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 19, p. 7022-7029, oct. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1449.
- [431] L. Borriello *et al.*, « The role of the tumor microenvironment in tumor cell intravasation and dissemination », *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 99, n° 6, p. 151098, août 2020, doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151098.
- [432] E. B. Eruslanov *et al.*, « Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer », *J. Clin. Invest.*, vol. 124, n° 12, p. 5466-5480, déc. 2014, doi: 10.1172/JCI77053.



- [433] M. F. Viola et G. Boeckstaens, « Intestinal resident macrophages: Multitaskers of the gut », *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 32, n° 8, p. e13843, 2020, doi: 10.1111/nmo.13843.
- [434] B. L. Ecker *et al.*, « Age-Related Changes in HAPLN1 Increase Lymphatic Permeability and Affect Routes of Melanoma Metastasis », *Cancer Discov.*, vol. 9, n° 1, p. 82-95, janv. 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0168.
- [435] A. Kaur *et al.*, « sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance », *Nature*, vol. 532, n° 7598, Art. n° 7598, avr. 2016, doi: 10.1038/nature17392.
- [436] D. Fukumura *et al.*, « Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells », *Cell*, vol. 94, n° 6, p. 715-725, sept. 1998, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81731-6.
- [437] M. B. Buechler et S. J. Turley, « A short field guide to fibroblast function in immunity », *Semin. Immunol.*, vol. 35, p. 48-58, févr. 2018, doi: 10.1016/j.smim.2017.11.001.
- [438] M. F. Brizzi, G. Tarone, et P. Defilippi, « Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, n° 5, p. 645-651, oct. 2012, doi: 10.1016/j.ceb.2012.07.001.
- [439] G. Gabbiani, « The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases », *J. Pathol.*, vol. 200, n° 4, p. 500-503, 2003, doi: 10.1002/path.1427.
- [440] F. Calvo *et al.*, « Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts », *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, n° 6, Art. n° 6, juin 2013, doi: 10.1038/ncb2756.
- [441] C. T. Foster, F. Gualdrini, et R. Treisman, « Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics », *Genes Dev.*, vol. 31, n° 23-24, p. 2361-2375, 01 2017, doi: 10.1101/gad.304501.117.
- [442] C. Strell *et al.*, « Impact of Epithelial–Stromal Interactions on Peritumoral Fibroblasts in Ductal Carcinoma in Situ », *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 111, n° 9, p. 983-995, sept. 2019, doi: 10.1093/jnci/djy234.
- [443] N. Erez, M. Truitt, P. Olson, S. T. Arron, et D. Hanahan, « Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner », *Cancer Cell*, vol. 17, n° 2, p. 135-147, févr. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041.
- [444] V. Sanz-Moreno *et al.*, « ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma », *Cancer Cell*, vol. 20, n° 2, p. 229-245, août 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.018.
- [445] E. Hirata *et al.*, « Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin  $\beta$ 1/FAK Signaling », *Cancer Cell*, vol. 27, n° 4, p. 574-588, avr. 2015, doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.008.
- [446] Y. Sun *et al.*, « Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B », *Nat. Med.*, vol. 18, n° 9, p. 1359-1368, sept. 2012, doi: 10.1038/nm.2890.
- [447] J. M. Straub, J. New, C. D. Hamilton, C. Lominska, Y. Shnayder, et S. M. Thomas, « Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy », *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 141, n° 11, p. 1985-1994, nov. 2015, doi: 10.1007/s00432-015-1974-6.
- [448] R. A. Flavell, S. Sanjabi, S. H. Wrzesinski, et P. Licona-Limón, « The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF $\beta$  », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, n° 8, Art. n° 8, août 2010, doi: 10.1038/nri2808.

- [449] N. M. Muñoz *et al.*, « Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Type II Inactivation Induces the Malignant Transformation of Intestinal Neoplasms Initiated by Apc Mutation », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 20, p. 9837-9844, oct. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0890.
- [450] D. Padua *et al.*, « TGF $\beta$  Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4 », *Cell*, vol. 133, n° 1, p. 66-77, avr. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.046.
- [451] M. Sonoshita *et al.*, « Suppression of Colon Cancer Metastasis by Aes through Inhibition of Notch Signaling », *Cancer Cell*, vol. 19, n° 1, p. 125-137, janv. 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.008.
- [452] Y. Kang *et al.*, « A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone », *Cancer Cell*, vol. 3, n° 6, p. 537-549, juin 2003, doi: 10.1016/S1535-6108(03)00132-6.
- [453] T. Oskarsson *et al.*, « Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 7, Art. n° 7, juill. 2011, doi: 10.1038/nm.2379.
- [454] A. C. Dudley, E. W. Cloer, et J. M. Melero-Martin, « The Role of Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Tumor Growth and Angiogenesis », in *Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 8: Therapeutic Applications in Disease and Injury*, M. A. Hayat, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, p. 45-54.
- [455] Y. Yonenaga *et al.*, « Absence of Smooth Muscle Actin-Positive Pericyte Coverage of Tumor Vessels Correlates with Hematogenous Metastasis and Prognosis of Colorectal Cancer Patients », *Oncology*, vol. 69, n° 2, p. 159-166, 2005, doi: 10.1159/000087840.
- [456] Y. Zheng *et al.*, « Angiomin like-1 is a novel component of the N-cadherin complex affecting endothelial/pericyte interaction in normal and tumor angiogenesis », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, juill. 2016, doi: 10.1038/srep30622.
- [457] J. M. Butler *et al.*, « Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 6, n° 3, p. 251-264, mars 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.02.001.
- [458] J. Lu *et al.*, « Endothelial Cells Promote the Colorectal Cancer Stem Cell Phenotype through a Soluble Form of Jagged-1 », *Cancer Cell*, vol. 23, n° 2, p. 171-185, févr. 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2012.12.021.
- [459] M. Sonoshita *et al.*, « Promotion of colorectal cancer invasion and metastasis through activation of NOTCH–DAB1–ABL–RHOGEF protein TRIO », *Cancer Discov.*, vol. 5, n° 2, p. 198-211, 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0595.
- [460] N. Reymond, B. B. d'Água, et A. J. Ridley, « Crossing the endothelial barrier during metastasis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, n° 12, p. 858-870, déc. 2013, doi: 10.1038/nrc3628.
- [461] P.-L. Tremblay, J. Huot, et F. A. Auger, « Mechanisms by which E-Selectin Regulates Diapedesis of Colon Cancer Cells under Flow Conditions », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 13, p. 5167-5176, juill. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1229.
- [462] M. Cristofanilli, « Circulating tumour cells: telling the truth about metastasis », *Lancet Oncol.*, vol. 15, n° 4, p. 365-366, avr. 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70091-9.
- [463] E. Dotan, S. J. Cohen, K. R. Alpaugh, et N. J. Meropol, « Circulating Tumor Cells: Evolving Evidence and Future Challenges », *The Oncologist*, vol. 14, n° 11, p. 1070-1082, nov. 2009, doi: 10.1634/theoncologist.2009-0094.
- [464] D. C. Danila *et al.*, « Circulating Tumor Cell Number and Prognosis in Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer », *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, n° 23, p. 7053-7058, déc. 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1506.

- [465] F. Torino *et al.*, « Circulating tumor cells in colorectal cancer patients », *Cancer Treat. Rev.*, vol. 39, n° 7, p. 759-772, nov. 2013, doi: 10.1016/j.ctrv.2012.12.007.
- [466] M. Santoni *et al.*, « Circulating Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma: Recent Findings and Future Challenges », *Front. Oncol.*, vol. 9, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00228.
- [467] B. Kulemann *et al.*, « Pancreatic cancer: Circulating Tumor Cells and Primary Tumors show Heterogeneous KRAS Mutations », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, juill. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-04601-z.
- [468] G. Vona *et al.*, « Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer », *Hepatology*, vol. 39, n° 3, p. 792-797, 2004, doi: 10.1002/hep.20091.
- [469] A. Truini *et al.*, « Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System », *Front. Oncol.*, vol. 4, 2014, doi: 10.3389/fonc.2014.00242.
- [470] F. Gao *et al.*, « Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system », *Oncotarget*, vol. 7, n° 44, p. 71330-71340, nov. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11114.
- [471] F.-C. Bidard *et al.*, « Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data », *Lancet Oncol.*, vol. 15, n° 4, p. 406-414, avr. 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70069-5.
- [472] F. C. Bidard *et al.*, « Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 82, n° 2, p. 103-115, mai 2012, doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.05.008.
- [473] N. N. Rahbari *et al.*, « Compartmental Differences of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer », *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 19, n° 7, p. 2195-2202, juill. 2012, doi: 10.1245/s10434-011-2178-1.
- [474] K. Hiraiwa *et al.*, « Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Blood from Patients with Gastrointestinal Cancers », *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 15, n° 11, p. 3092, sept. 2008, doi: 10.1245/s10434-008-0122-9.
- [475] S. J. Cohen *et al.*, « Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer », *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, n° 19, p. 3213-3221, juill. 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.15.8923.
- [476] S. J. Cohen *et al.*, « Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 20, n° 7, p. 1223-1229, juill. 2009, doi: 10.1093/annonc/mdn786.
- [477] A. Giordano *et al.*, « Establishment and Validation of Circulating Tumor Cell-Based Prognostic Nomograms in First-Line Metastatic Breast Cancer Patients », *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, n° 6, p. 1596-1602, mars 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3137.
- [478] K.-A. Hyun *et al.*, « Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer », *Oncotarget*, vol. 7, n° 17, p. 24677-24687, mars 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8250.
- [479] N. Saucedo-Zeni *et al.*, « A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire », *Int. J. Oncol.*, vol. 41, n° 4, p. 1241-1250, oct. 2012, doi: 10.3892/ijo.2012.1557.
- [480] D. Gao *et al.*, « Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer », *Cell*, vol. 159, n° 1, p. 176-187, sept. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.08.016.
- [481] F. Grillet *et al.*, « Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture », *Gut*, vol. 66, n° 10, p. 1802-1810, oct. 2017, doi:

10.1136/gutjnl-2016-311447.

[482] B. M. Szczerba *et al.*, « Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression », *Nature*, vol. 566, n° 7745, Art. n° 7745, févr. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-0915-y.

[483] C. Alix-Panabières, « EPISPOT Assay: Detection of Viable DTCs/CTCs in Solid Tumor Patients », in *Minimal Residual Disease and Circulating Tumor Cells in Breast Cancer*, M. Ignatiadis, C. Sotiriou, et K. Pantel, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012, p. 69-76.

[484] S. Parry, H. S. Silverman, K. McDermott, A. Willis, M. A. Hollingsworth, et A. Harris, « Identification of MUC1 Proteolytic Cleavage Sites in Vivo », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 283, n° 3, p. 715-720, mai 2001, doi: 10.1006/bbrc.2001.4775.

[485] J. Doyen *et al.*, « Circulating tumor cells in prostate cancer: A potential surrogate marker of survival », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 81, n° 3, p. 241-256, mars 2012, doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.05.004.

[486] P. G. Chu et L. M. Weiss, « Keratin expression in human tissues and neoplasms », *Histopathology*, vol. 40, n° 5, p. 403-439, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x.

[487] C. Alix-Panabières *et al.*, « Detection and Characterization of Putative Metastatic Precursor Cells in Cancer Patients », *Clin. Chem.*, vol. 53, n° 3, p. 537-539, mars 2007, doi: 10.1373/clinchem.2006.079509.

[488] O. Solakoglu *et al.*, « Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n° 4, p. 2246-2251, févr. 2002, doi: 10.1073/pnas.042372199.

[489] « Circulating Tumor Cell Enrichment Based on Physical Properties - Ramdane A. Harouaka, Merisa Nisic, Si-Yang Zheng, 2013 ». <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068213494391> (consulté le sept. 10, 2020).

[490] G. Vona *et al.*, « Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells: A New Method for the Immunomorphological and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells », *Am. J. Pathol.*, vol. 156, n° 1, p. 57-63, janv. 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64706-2.

[491] Z. Ao et X. Liu, « Fiber-Optic Array Scanning Technology (FAST) for Detection and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells », in *Circulating Tumor Cells: Methods and Protocols*, M. J. M. Magbanua et J. W. Park, Éd. New York, NY: Springer, 2017, p. 235-246.

[492] E. Ozkumur *et al.*, « Inertial Focusing for Tumor Antigen–Dependent and –Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells », *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, n° 179, p. 179ra47, avr. 2013, doi: 10.1126/scitranslmed.3005616.

[493] M. Yu *et al.*, « Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility », *Science*, vol. 345, n° 6193, p. 216-220, juill. 2014, doi: 10.1126/science.1253533.

[494] Y.-H. Cheng *et al.*, « Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA-sequencing for circulating tumor cells », *Nat. Commun.*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, mai 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10122-2.

[495] G. Gundem *et al.*, « The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer », *Nature*, vol. 520, n° 7547, Art. n° 7547, avr. 2015, doi: 10.1038/nature14347.

[496] M. K. H. Hong *et al.*, « Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer », *Nat. Commun.*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, avr. 2015, doi: 10.1038/ncomms7605.

[497] M.-Y. Kim *et al.*, « Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells », *Cell*, vol. 139, n° 7, p.

1315-1326, déc. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.025.

[498] J. M. Alves, S. Prado-López, J. M. Cameselle-Teijeiro, et D. Posada, « Rapid evolution and biogeographic spread in a colorectal cancer », *Nat. Commun.*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, nov. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12926-8.

[499] A. Amadori, E. Rossi, R. Zamarchi, P. Carli, D. Pastorelli, et A. Jirillo, « Circulating and Disseminated Tumor Cells in the Clinical Management of Breast Cancer Patients: Unanswered Questions », *Oncology*, vol. 76, n° 6, p. 375-386, 2009, doi: 10.1159/000215581.

[500] J. E. Allen *et al.*, « Apoptotic circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of metastatic colorectal cancer patients are associated with liver metastasis but not CTCs », *Oncotarget*, vol. 5, n° 7, p. 1753-1760, oct. 2013.

[501] I. Baccelli *et al.*, « Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay », *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, n° 6, p. 539-544, juin 2013, doi: 10.1038/nbt.2576.

[502] L. Zhang *et al.*, « The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis », *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, n° 180, p. 180ra48-180ra48, avr. 2013, doi: 10.1126/scitranslmed.3005109.

[503] C. L. Hodgkinson *et al.*, « Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer », *Nat. Med.*, vol. 20, n° 8, Art. n° 8, août 2014, doi: 10.1038/nm.3600.

[504] A. Lecharpentier, P. Vielh, P. Perez-Moreno, D. Planchard, J. C. Soria, et F. Farace, « Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 105, n° 9, Art. n° 9, oct. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.405.

[505] C. V. Pecot *et al.*, « A Novel Platform for Detection of CK+ and CK- CTCs », *Cancer Discov.*, vol. 1, n° 7, p. 580-586, déc. 2011, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0215.

[506] A. A. Powell *et al.*, « Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 5, p. e33788, mai 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033788.

[507] D. T. Ting *et al.*, « Single-Cell RNA Sequencing Identifies Extracellular Matrix Gene Expression by Pancreatic Circulating Tumor Cells », *Cell Rep.*, vol. 8, n° 6, p. 1905-1918, sept. 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.029.

[508] A. Lopresti *et al.*, « Sensitive and easy screening for circulating tumor cells by flow cytometry », *JCI Insight*, vol. 4, n° 14, doi: 10.1172/jci.insight.128180.

[509] S. M. Frisch, M. Schaller, et B. Cieply, « Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis », *J. Cell Sci.*, vol. 126, n° 1, p. 21-29, janv. 2013, doi: 10.1242/jcs.120907.

[510] M. Cordenonsi *et al.*, « The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells », *Cell*, vol. 147, n° 4, p. 759-772, nov. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.09.048.

[511] K. Polyak et R. A. Weinberg, « Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, n° 4, Art. n° 4, avr. 2009, doi: 10.1038/nrc2620.

[512] M. Saxena, M. A. Stephens, H. Pathak, et A. Rangarajan, « Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters », *Cell Death Dis.*, vol. 2, n° 7, Art. n° 7, juill. 2011, doi: 10.1038/cddis.2011.61.



- [513] M. Ruscetti, B. Quach, E. L. Dadashian, D. J. Mulholland, et H. Wu, « Tracking and Functional Characterization of Epithelial–Mesenchymal Transition and Mesenchymal Tumor Cells during Prostate Cancer Metastasis », *Cancer Res.*, vol. 75, n° 13, p. 2749-2759, juill. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3476.
- [514] M. Yu *et al.*, « Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition », *Science*, vol. 339, n° 6119, p. 580-584, févr. 2013, doi: 10.1126/science.1228522.
- [515] M. Labelle, S. Begum, et R. O. Hynes, « Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis », *Cancer Cell*, vol. 20, n° 5, p. 576-590, nov. 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.009.
- [516] S. Douma, T. van Laar, J. Zevenhoven, R. Meuwissen, E. van Garderen, et D. S. Peeper, « Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB », *Nature*, vol. 430, n° 7003, Art. n° 7003, août 2004, doi: 10.1038/nature02765.
- [517] N. Aceto *et al.*, « Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis », *Cell*, vol. 158, n° 5, p. 1110-1122, août 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013.
- [518] D. Li *et al.*, « Integrated biochemical and mechanical signals regulate multifaceted human embryonic stem cell functions », *J. Cell Biol.*, vol. 191, n° 3, p. 631-644, nov. 2010, doi: 10.1083/jcb.201006094.
- [519] L. Li *et al.*, « A unique interplay between Rap1 and E-cadherin in the endocytic pathway regulates self-renewal of human embryonic stem cells », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 28, n° 2, p. 247-257, févr. 2010, doi: 10.1002/stem.289.
- [520] T. Pieters et F. van Roy, « Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology », *J. Cell Sci.*, vol. 127, n° 12, p. 2603-2613, juin 2014, doi: 10.1242/jcs.146720.
- [521] S. Gkountela *et al.*, « Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding », *Cell*, vol. 176, n° 1-2, p. 98-112.e14, janv. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2018.11.046.
- [522] J. R. Neil et W. P. Schiemann, « Altered TAB1:IkB Kinase Interaction Promotes Transforming Growth Factor  $\beta$ -Mediated Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation during Breast Cancer Progression », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 5, p. 1462-1470, mars 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3094.
- [523] J. S. Palumbo *et al.*, « Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells », *Blood*, vol. 105, n° 1, p. 178-185, janv. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-06-2272.
- [524] H.-G. Kopp, T. Placke, et H. R. Salih, « Platelet-Derived Transforming Growth Factor- $\beta$  Down-Regulates NKG2D Thereby Inhibiting Natural Killer Cell Antitumor Reactivity », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 19, p. 7775-7783, oct. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2123.
- [525] S. L. Stott *et al.*, « Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 43, p. 18392-18397, oct. 2010, doi: 10.1073/pnas.1012539107.
- [526] D. G. Duda *et al.*, « Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 50, p. 21677-21682, déc. 2010, doi: 10.1073/pnas.1016234107.
- [527] Z. Ao *et al.*, « Identification of Cancer-Associated Fibroblasts in Circulating Blood from Patients with Metastatic Breast Cancer », *Cancer Res.*, vol. 75, n° 22, p. 4681-4687, nov. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1633.



- [528] M. Musashi, Y. C. Yang, S. R. Paul, S. C. Clark, T. Sudo, et M. Ogawa, « Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 88, n° 3, p. 765-769, févr. 1991, doi: 10.1073/pnas.88.3.765.
- [529] M. Teramura, S. Kobayashi, S. Hoshino, K. Oshimi, et H. Mizoguchi, « Interleukin-11 Enhances Human Megakaryocytopoiesis In Vitro », p. 6.
- [530] I. J. Fidler, « The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, n° 6, Art. n° 6, juin 2003, doi: 10.1038/nrc1098.
- [531] E. Denève *et al.*, « Capture of Viable Circulating Tumor Cells in the Liver of Colorectal Cancer Patients », *Clin. Chem.*, vol. 59, n° 9, p. 1384-1392, sept. 2013, doi: 10.1373/clinchem.2013.202846.
- [532] D. M. Brown et E. Ruoslahti, « Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis », *Cancer Cell*, vol. 5, n° 4, p. 365-374, avr. 2004, doi: 10.1016/S1535-6108(04)00079-0.
- [533] P. Auguste, L. Fallavollita, N. Wang, J. Burnier, A. Bikfalvi, et P. Brodt, « The Host Inflammatory Response Promotes Liver Metastasis by Increasing Tumor Cell Arrest and Extravasation », *Am. J. Pathol.*, vol. 170, n° 5, p. 1781-1792, mai 2007, doi: 10.2353/ajpath.2007.060886.
- [534] B. McDonald, J. Spicer, B. Giannais, L. Fallavollita, P. Brodt, et L. E. Ferri, « Systemic inflammation increases cancer cell adhesion to hepatic sinusoids by neutrophil mediated mechanisms », *Int. J. Cancer*, vol. 125, n° 6, p. 1298-1305, 2009, doi: 10.1002/ijc.24409.
- [535] J. D. Spicer *et al.*, « Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells », *Cancer Res.*, vol. 72, n° 16, p. 3919-3927, août 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2393.
- [536] J.-K. Lin *et al.*, « The influence of fecal diversion and anastomotic leakage on survival after resection of rectal cancer », *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract.*, vol. 15, n° 12, p. 2251-2261, déc. 2011, doi: 10.1007/s11605-011-1721-5.
- [537] S. G. Farid *et al.*, « Correlation Between Postoperative Infective Complications and Long-Term Outcomes After Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastasis », *Ann. Surg.*, vol. 251, n° 1, p. 91-100, janv. 2010, doi: 10.1097/SLA.0b013e3181bfda3c.
- [538] J. Cools-Lartigue *et al.*, « Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis », *J. Clin. Invest.*, vol. 123, n° 8, p. 3446-3458, août 2013, doi: 10.1172/JCI67484.
- [539] S. Najmeh *et al.*, « Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via  $\beta$ 1-integrin mediated interactions », *Int. J. Cancer*, vol. 140, n° 10, p. 2321-2330, 2017, doi: 10.1002/ijc.30635.
- [540] G. P. Gupta *et al.*, « Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis », *Nature*, vol. 446, n° 7137, Art. n° 7137, avr. 2007, doi: 10.1038/nature05760.
- [541] S. M. Weis et D. A. Cheresh, « Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability », *Nature*, vol. 437, n° 7058, Art. n° 7058, sept. 2005, doi: 10.1038/nature03987.
- [542] Y. Huang *et al.*, « Pulmonary Vascular Destabilization in the Premetastatic Phase Facilitates Lung Metastasis », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 19, p. 7529-7537, oct. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4382.
- [543] S. Hiratsuka *et al.*, « Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 9, p. 3725-3730, mars 2011, doi: 10.1073/pnas.1100446108.

- [544] S. J. Cohen *et al.*, « Isolation and Characterization of Circulating Tumor Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer », *Clin. Colorectal Cancer*, vol. 6, n° 2, p. 125-132, juill. 2006, doi: 10.3816/CCC.2006.n.029.
- [545] S. Maheswaran *et al.*, « Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells », *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, n° 4, p. 366-377, juill. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0800668.
- [546] C. Gasch *et al.*, « Heterogeneity of Epidermal Growth Factor Receptor Status and Mutations of KRAS/PIK3CA in Circulating Tumor Cells of Patients with Colorectal Cancer », *Clin. Chem.*, vol. 59, n° 1, p. 252-260, janv. 2013, doi: 10.1373/clinchem.2012.188557.
- [547] S. Lankiewicz, S. Zimmermann, C. Hollmann, T. Hillemann, et T. F. Greten, « Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer », *Mol. Oncol.*, vol. 2, n° 4, p. 349-355, déc. 2008, doi: 10.1016/j.molonc.2008.09.001.
- [548] V. Zieglschmid *et al.*, « Tumor-associated gene expression in disseminated tumor cells correlates with disease progression and tumor stage in colorectal cancer », *Anticancer Res.*, vol. 27, n° 4A, p. 1823-1832, août 2007.
- [549] E. Rossi *et al.*, « M30 Neopeptide Expression in Epithelial Cancer: Quantification of Apoptosis in Circulating Tumor Cells by CellSearch Analysis », *Clin. Cancer Res.*, 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1449.
- [550] L. Cayrefourcq *et al.*, « Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells », *Cancer Res.*, vol. 75, n° 5, p. 892-901, mars 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2613.
- [551] C. Gong *et al.*, « Potentiated DNA Damage Response in Circulating Breast Tumor Cells Confers Resistance to Chemotherapy », *J. Biol. Chem.*, vol. 290, n° 24, p. 14811-14825, déc. 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.652628.
- [552] L. Weiss, « Metastatic Inefficiency », in *Advances in Cancer Research*, vol. 54, G. F. Vande Woude et G. Klein, Éd. Academic Press, 1990, p. 159-211.
- [553] I. J. Fidler, « Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine », *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 45, n° 4, p. 773-782, oct. 1970, doi: 10.1093/jnci/45.4.773.
- [554] K. J. Luzzi *et al.*, « Multistep Nature of Metastatic Inefficiency: Dormancy of Solitary Cells after Successful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases », *Am. J. Pathol.*, vol. 153, n° 3, p. 865-873, sept. 1998, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3.
- [555] S. Paget, « THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. », *The Lancet*, vol. 133, n° 3421, p. 571-573, mars 1889, doi: 10.1016/S0140-6736(00)49915-0.
- [556] S. Manfredi, A. M. Bouvier, C. Lepage, C. Hatem, V. Dancourt, et J. Faivre, « Incidence and patterns of recurrence after resection for cure of colonic cancer in a well defined population », *Br. J. Surg.*, vol. 93, n° 9, p. 1115-1122, sept. 2006, doi: 10.1002/bjs.5349.
- [557] « Cancer colorectal métastatique », *Société Nationale Française de Gastro-Entérologie*, mars 05, 2020. <https://www.snfge.org/content/4-cancer-colorectal-metastatique>.
- [558] T. D. Christensen, K.-L. G. Spindler, J. A. Palshof, et D. L. Nielsen, « Systematic review: brain metastases from colorectal cancer—Incidence and patient characteristics », *BMC Cancer*, vol. 16, n° 1, p. 260, déc. 2016, doi: 10.1186/s12885-016-2290-5.
- [559] E. Houda *et al.*, « Métastase osseuse isolée du radius métachrone d'un cancer rectal », *Pan*

*Afr. Med. J.*, vol. 14, 2013, doi: 10.11604/pamj.2013.14.161.1938.

[560] E. Pretzsch *et al.*, « Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread », *Journal of Oncology*, sept. 19, 2019. <https://www.hindawi.com/journals/jo/2019/7407190/> (consulté le sept. 15, 2020).

[561] Y. R. B. M. van Gestel *et al.*, « Metachronous peritoneal carcinomatosis after curative treatment of colorectal cancer », *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO*, vol. 40, n° 8, p. 963-969, août 2014, doi: 10.1016/j.ejso.2013.10.001.

[562] I. Thomassen, Y. R. van Gestel, V. E. Lemmens, et I. H. de Hingh, « Incidence, prognosis, and treatment options for patients with synchronous peritoneal carcinomatosis and liver metastases from colorectal origin », *Dis. Colon Rectum*, vol. 56, n° 12, p. 1373-1380, déc. 2013, doi: 10.1097/DCR.0b013e3182a62d9d.

[563] Y. Sasaki *et al.*, « Value of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations and Survival Benefit from Systemic Chemotherapy in Colorectal Peritoneal Carcinomatosis », *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 17, n° 2, p. 539-543, mars 2016, doi: 10.7314/APJCP.2016.17.2.539.

[564] « Time trends in the treatment and survival of recurrences from colorectal cancer - Annals of Oncology ». [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)50509-9/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)50509-9/fulltext) (consulté le sept. 16, 2020).

[565] C. M. Ghajar, « Metastasis prevention by targeting the dormant niche », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 15, n° 4, Art. n° 4, avr. 2015, doi: 10.1038/nrc3910.

[566] S. Malladi *et al.*, « Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT », *Cell*, vol. 165, n° 1, p. 45-60, mars 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.02.025.

[567] J. Massagué et A. C. Obenauf, « Metastatic colonization by circulating tumour cells », *Nature*, vol. 529, n° 7586, Art. n° 7586, janv. 2016, doi: 10.1038/nature17038.

[568] « Cancer Metastases: Early Dissemination and Late Recurrences - Sten Friberg, Andreas Nystrom, 2015 ». <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.4137/CGM.S31244> (consulté le sept. 15, 2020).

[569] J. A. Aguirre-Ghiso, « Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, n° 11, Art. n° 11, nov. 2007, doi: 10.1038/nrc2256.

[570] J. L. Townson et A. F. Chambers, « Dormancy of Solitary Metastatic Cells », *Cell Cycle*, vol. 5, n° 16, p. 1744-1750, août 2006, doi: 10.4161/cc.5.16.2864.

[571] L. Holmgren, M. S. O'Reilly, et J. Folkman, « Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression », *Nat. Med.*, vol. 1, n° 2, Art. n° 2, févr. 1995, doi: 10.1038/nm0295-149.

[572] H. A. Collier, L. Sang, et J. M. Roberts, « A New Description of Cellular Quiescence », *PLOS Biol.*, vol. 4, n° 3, p. e83, mars 2006, doi: 10.1371/journal.pbio.0040083.

[573] H. A. Collier, « Cell biology. The essence of quiescence », *Science*, vol. 334, n° 6059, p. 1074-1075, nov. 2011, doi: 10.1126/science.1216242.

[574] K. Pantel et R. H. Brakenhoff, « Dissecting the metastatic cascade », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, n° 6, Art. n° 6, juin 2004, doi: 10.1038/nrc1370.

[575] K. Pantel, C. Alix-Panabières, et S. Riethdorf, « Cancer micrometastases », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 6, n° 6, Art. n° 6, juin 2009, doi: 10.1038/nrclinonc.2009.44.

[576] C. A. Klein, « Parallel progression of primary tumours and metastases », *Nat. Rev. Cancer*,

vol. 9, n° 4, Art. n° 4, avr. 2009, doi: 10.1038/nrc2627.

[577] T. H. Cheung et T. A. Rando, « Molecular regulation of stem cell quiescence », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, n° 6, Art. n° 6, juin 2013, doi: 10.1038/nrm3591.

[578] A. P. Adam *et al.*, « Computational Identification of a p38SAPK-Regulated Transcription Factor Network Required for Tumor Cell Quiescence », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 14, p. 5664-5672, juill. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3820.

[579] A. Kobayashi *et al.*, « Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone », *J. Exp. Med.*, vol. 208, n° 13, p. 2641-2655, déc. 2011, doi: 10.1084/jem.20110840.

[580] R. N. Kaplan *et al.*, « VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche », *Nature*, vol. 438, n° 7069, p. 820-827, déc. 2005, doi: 10.1038/nature04186.

[581] H. Clevers, « The cancer stem cell: premises, promises and challenges », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 3, Art. n° 3, mars 2011, doi: 10.1038/nm.2304.

[582] M. S. Sosa *et al.*, « NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR $\beta$ -driven quiescence programmes », *Nat. Commun.*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, janv. 2015, doi: 10.1038/ncomms7170.

[583] W. H. Khoo *et al.*, « A niche-dependent myeloid transcriptome signature defines dormant myeloma cells », *Blood*, vol. 134, n° 1, p. 30-43, juill. 2019, doi: 10.1182/blood.2018880930.

[584] M. A. Lawson *et al.*, « Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche », *Nat. Commun.*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, déc. 2015, doi: 10.1038/ncomms9983.

[585] B. Boyerinas, M. Zafrir, A. E. Yesilkanal, T. T. Price, E. M. Hyjek, et D. A. Sipkins, « Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy », *Blood*, vol. 121, n° 24, p. 4821-4831, juin 2013, doi: 10.1182/blood-2012-12-475483.

[586] Y. Shiozawa, K. J. Pienta, et R. S. Taichman, « Hematopoietic stem cell niche is a potential therapeutic target for bone metastatic tumors », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 17, n° 17, p. 5553-5558, sept. 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2505.

[587] Y. Kienast *et al.*, « Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation », *Nat. Med.*, vol. 16, n° 1, p. 116-122, janv. 2010, doi: 10.1038/nm.2072.

[588] X. Li *et al.*, « Disseminated Melanoma Cells Transdifferentiate into Endothelial Cells in Intravascular Niches at Metastatic Sites », *Cell Rep.*, vol. 31, n° 11, p. 107765, juin 2020, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107765.

[589] C. A. Klein, « Tumour cell dissemination and growth of metastasis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, n° 2, Art. n° 2, févr. 2010, doi: 10.1038/nrc2627-c2.

[590] Y. Hüsemann *et al.*, « Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer », *Cancer Cell*, vol. 13, n° 1, p. 58-68, janv. 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.003.

[591] P. Bragado *et al.*, « TGF- $\beta$ 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- $\beta$ -RIII and p38 $\alpha$ / $\beta$  signalling », *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, n° 11, Art. n° 11, nov. 2013, doi: 10.1038/ncb2861.

[592] Y. Shiozawa, A. M. Havens, K. J. Pienta, et R. S. Taichman, « The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites », *Leukemia*, vol. 22, n° 5, Art. n° 5, mai 2008, doi: 10.1038/leu.2008.48.

- [593] J. A. Aguirre-Ghiso, Y. Estrada, D. Liu, et L. Ossowski, « ERKMAPK Activity as a Determinant of Tumor Growth and Dormancy; Regulation by p38SAPK », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 7, p. 1684-1695, avr. 2003.
- [594] J. A. Aguirre-Ghiso, L. Ossowski, et S. K. Rosenbaum, « Green Fluorescent Protein Tagging of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Pathways Reveals Novel Dynamics of Pathway Activation during Primary and Metastatic Growth », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 20, p. 7336-7345, oct. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0113.
- [595] L. Chéry *et al.*, « Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways », *Oncotarget*, vol. 5, n° 20, p. 9939-9951, sept. 2014.
- [596] J. E. Talmadge et I. J. Fidler, « AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective », *Cancer Res.*, vol. 70, n° 14, p. 5649-5669, juill. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040.
- [597] H. Gao *et al.*, « The BMP Inhibitor Coco Reactivates Breast Cancer Cells at Lung Metastatic Sites », *Cell*, vol. 150, n° 4, p. 764-779, août 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.035.
- [598] M. S. Sosa, « Dormancy programs as emerging antimetastasis therapeutic alternatives », *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 3, n° 1, p. e1029062, janv. 2016, doi: 10.1080/23723556.2015.1029062.
- [599] A. Pommier *et al.*, « Unresolved endoplasmic reticulum stress engenders immune-resistant, latent pancreatic cancer metastases », *Science*, vol. 360, n° 6394, juin 2018, doi: 10.1126/science.aao4908.
- [600] C. Hetz et F. R. Papa, « The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control », *Mol. Cell*, vol. 69, n° 2, p. 169-181, 18 2018, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
- [601] C. M. Ghajar *et al.*, « The perivascular niche regulates breast tumour dormancy », *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, n° 7, Art. n° 7, juill. 2013, doi: 10.1038/ncb2767.
- [602] R. Catena *et al.*, « Bone Marrow-Derived Gr1+ Cells Can Generate a Metastasis-Resistant Microenvironment Via Induced Secretion of Thrombospondin-1 », *Cancer Discov.*, vol. 3, n° 5, p. 578-589, mai 2013, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0476.
- [603] K. Pantel et C. Alix-Panabières, « Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients », *BoneKEy Rep.*, vol. 3, nov. 2014, doi: 10.1038/bonekey.2014.79.
- [604] M. Fane et A. T. Weeraratna, « How the ageing microenvironment influences tumour progression », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 20, n° 2, p. 89-106, févr. 2020, doi: 10.1038/s41568-019-0222-9.
- [605] V. Delgado-Rizo, M. A. Martínez-Guzmán, L. Iñiguez-Gutierrez, A. García-Orozco, A. Alvarado-Navarro, et M. Fafutis-Morris, « Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview », *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 81, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00081.
- [606] D. F. Quail *et al.*, « Obesity alters the lung myeloid cell landscape to enhance breast cancer metastasis through IL5 and GM-CSF », *Nat. Cell Biol.*, vol. 19, n° 8, Art. n° 8, août 2017, doi: 10.1038/ncb3578.
- [607] D. Barkan *et al.*, « Inhibition of Metastatic Outgrowth from Single Dormant Tumor Cells by Targeting the Cytoskeleton », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 15, p. 6241-6250, août 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6849.
- [608] J. Schrader *et al.*, « Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells », *Hepatology*, vol. 53, n° 4, p. 1192-1205, 2011, doi: 10.1002/hep.24108.



- [609] D. Barkan, J. E. Green, et A. F. Chambers, « Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth », *Eur. J. Cancer*, vol. 46, n° 7, p. 1181-1188, mai 2010, doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.027.
- [610] Y. Shen *et al.*, « Reduction of Liver Metastasis Stiffness Improves Response to Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer », *Cancer Cell*, vol. 37, n° 6, p. 800-817.e7, juin 2020, doi: 10.1016/j.ccell.2020.05.005.
- [611] J. Tommelein, L. Verset, T. Boterberg, P. Demetter, M. Bracke, et O. De Wever, « Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer », *Front. Oncol.*, vol. 5, p. 63, 2015, doi: 10.3389/fonc.2015.00063.
- [612] X.-X. Li *et al.*, « Knockdown of IRE1 $\alpha$  inhibits colonic tumorigenesis through decreasing  $\beta$ -catenin and IRE1 $\alpha$  targeting suppresses colon cancer cells », *Oncogene*, vol. 36, n° 48, Art. n° 48, nov. 2017, doi: 10.1038/onc.2017.284.
- [613] X. Zhu *et al.*, « FBX8 promotes metastatic dormancy of colorectal cancer in liver », *Cell Death Dis.*, vol. 11, n° 8, Art. n° 8, août 2020, doi: 10.1038/s41419-020-02870-7.
- [614] R. Jackstadt *et al.*, « Epithelial NOTCH Signaling Rewires the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer to Drive Poor-Prognosis Subtypes and Metastasis », *Cancer Cell*, vol. 36, n° 3, p. 319-336.e7, sept. 2019, doi: 10.1016/j.ccell.2019.08.003.
- [615] W. Lee, S. Y. Ko, M. S. Mohamed, H. A. Kenny, E. Lengyel, et H. Naora, « Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum », *J. Exp. Med.*, vol. 216, n° 1, p. 176-194, janv. 2019, doi: 10.1084/jem.20181170.
- [616] W.-L. Hwang, H.-Y. Lan, W.-C. Cheng, S.-C. Huang, et M.-H. Yang, « Tumor stem-like cell-derived exosomal RNAs prime neutrophils for facilitating tumorigenesis of colon cancer », *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 12, n° 1, p. 10, déc. 2019, doi: 10.1186/s13045-019-0699-4.
- [617] M. Lafitte, C. Lecointre, et S. Roche, « Roles of exosomes in metastatic colorectal cancer », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 317, n° 5, p. C869-C880, 01 2019, doi: 10.1152/ajpcell.00218.2019.
- [618] B. Seubert *et al.*, « Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice », *Hepatology*, vol. 61, n° 1, p. 238-248, 2015, doi: 10.1002/hep.27378.
- [619] L. Yang *et al.*, « DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25 », *Nature*, vol. 583, n° 7814, Art. n° 7814, juill. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2394-6.
- [620] M. Banys *et al.*, « Hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination may be detected in patients diagnosed with ductal carcinoma in situ of the breast », *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 131, n° 3, p. 801-808, févr. 2012, doi: 10.1007/s10549-011-1478-2.
- [621] N. Sanger *et al.*, « Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ », *Int. J. Cancer*, vol. 129, n° 10, p. 2522-2526, 2011, doi: 10.1002/ijc.25895.
- [622] K. L. Harper *et al.*, « Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2 + mammary cancer », *Nature*, vol. 540, n° 7634, Art. n° 7634, d c. 2016, doi: 10.1038/nature20609.
- [623] J. A. Schardt *et al.*, « Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer », *Cancer Cell*, vol. 8, n° 3, p. 227-239, sept. 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.003.
- [624] S. Friberg et A. Nystrom, « Cancer Metastases: Early Dissemination and Late Recurrences », *Cancer Growth Metastasis*, vol. 8, p. CGM.S31244, janv. 2015, doi: 10.4137/CGM.S31244.
- [625] G. Riethm ller et C. A. Klein, « Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse:



clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients », *Semin. Cancer Biol.*, vol. 11, n° 4, p. 307-311, août 2001, doi: 10.1006/scbi.2001.0386.

[626] H. Hosseini *et al.*, « Early dissemination seeds metastasis in breast cancer », *Nature*, vol. 540, n° 7634, p. 552-558, déc. 2016, doi: 10.1038/nature20785.

[627] J. Eyles *et al.*, « Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma », juin 01, 2010.  
<https://www.jci.org/articles/view/42002/pdf> (consulté le sept. 17, 2020).

[628] H. Wikman, R. Vessella, et K. Pantel, « Cancer micrometastasis and tumour dormancy », *APMIS*, vol. 116, n° 7-8, p. 754-770, 2008, doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.01033.x.

[629] W.-S. Tsai *et al.*, « Novel Circulating Tumor Cell Assay for Detection of Colorectal Adenomas and Cancer », *Clin. Transl. Gastroenterol.*, vol. 10, n° 10, oct. 2019, doi: 10.14309/ctg.0000000000000088.

[630] C. Alix-Panabières, H. Schwarzenbach, et K. Pantel, « Circulating tumor cells and circulating tumor DNA », *Annu. Rev. Med.*, vol. 63, p. 199-215, 2012, doi: 10.1146/annurev-med-062310-094219.

[631] M. J. Williams *et al.*, « Quantification of subclonal selection in cancer from bulk sequencing data », *Nat. Genet.*, vol. 50, n° 6, Art. n° 6, juin 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0128-6.

[632] Z. Hu *et al.*, « Quantitative evidence for early metastatic seeding in colorectal cancer », *Nat. Genet.*, vol. 51, n° 7, Art. n° 7, juill. 2019, doi: 10.1038/s41588-019-0423-x.

[633] L. K. Su *et al.*, « Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene », *Science*, vol. 256, n° 5057, p. 668-670, mai 1992, doi: 10.1126/science.1350108.

[634] P. Pollard *et al.*, « The Apc1322T Mouse Develops Severe Polyposis Associated With Submaximal Nuclear  $\beta$ -Catenin Expression », *Gastroenterology*, vol. 136, n° 7, p. 2204-2213.e13, juin 2009, doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.058.

[635] T. P. Pretlow, W. Edelmann, R. Kucherlapati, T. G. Pretlow, et L. H. Augenlicht, « Spontaneous Aberrant Crypt Foci in Apc1638N Mice with a Mutant Apc Allele », *Am. J. Pathol.*, vol. 163, n° 5, p. 1757-1763, nov. 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63535-3.

[636] M. Oshima, H. Oshima, K. Kitagawa, M. Kobayashi, C. Itakura, et M. Taketo, « Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, n° 10, p. 4482-4486, mai 1995, doi: 10.1073/pnas.92.10.4482.

[637] F. E. Marjou *et al.*, « Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium », *genesis*, vol. 39, n° 3, p. 186-193, 2004, doi: 10.1002/gene.20042.

[638] S. Colnot *et al.*, « Liver-targeted disruption of Apc in mice activates  $\beta$ -catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n° 49, p. 17216-17221, déc. 2004, doi: 10.1073/pnas.0404761101.

[639] M. De Robertis *et al.*, « The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies », *J. Carcinog.*, vol. 10, p. 9, mars 2011, doi: 10.4103/1477-3163.78279.

[640] G. Romano, S. Chagani, et L. N. Kwong, « The path to metastatic mouse models of colorectal cancer », *Oncogene*, vol. 37, n° 19, Art. n° 19, mai 2018, doi: 10.1038/s41388-018-0155-x.

[641] D. V. F. Tauriello *et al.*, « TGF $\beta$  drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis », *Nature*, vol. 554, n° 7693, p. 538-543, 22 2018, doi: 10.1038/nature25492.

- [642] M. Kijanka, B. Dorresteijn, S. Oliveira, et P. M. van Bergen en Henegouwen, « Nanobody-based cancer therapy of solid tumors », *Nanomed.*, vol. 10, n° 1, p. 161-174, janv. 2015, doi: 10.2217/nnm.14.178.
- [643] C. Souriau, T. D. Hua, M. P. Lefranc, et M. Weill, « Présentation a la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. », *MS Médecine Sci. Rev. Pap. ISSN 0767-0974 1998 Vol 14 N° 3 P300-9*, 1998, doi: 10.4267/10608/1033.
- [644] P. Chames, « Nanobodies | CRCM », *Nanobodies*, déc. 17, 2018. <https://www.crcm-marseille.fr/equipes/plateformestecnologiques/nanobodies/> (consulté le sept. 13, 2020).
- [645] V. Čermák *et al.*, « RNA-seq of macrophages of amoeboid or mesenchymal migratory phenotype due to specific structure of environment », *Sci. Data*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, oct. 2018, doi: 10.1038/sdata.2018.198.
- [646] A. Fumagalli *et al.*, « Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer », *Cell Stem Cell*, vol. 26, n° 4, p. 569-578.e7, avr. 2020, doi: 10.1016/j.stem.2020.02.008.
- [647] A. S. Chikina, S. N. Rubtsova, M. E. Lomakina, D. M. Potashnikova, I. A. Vorobjev, et A. Y. Alexandrova, « Transition from mesenchymal to bleb-based motility is predominantly exhibited by CD133-positive subpopulation of fibrosarcoma cells », *Biol. Cell*, vol. 111, n° 10, p. 245-261, 2019, doi: 10.1111/boc.201800078.
- [648] « Evaluation of Cancer Stem Cell Migration Using Compartmentalizing Microfluidic Devices and Live Cell Imaging », *Nikon Instruments Inc.* [https://www.microscope.healthcare.nikon.com/fr\\_AMS/learn/video-articles/evaluation-of-cancer-stem-cell-migration-using-compartmentalizing-microfluidic-devices-and-live-cell-imaging](https://www.microscope.healthcare.nikon.com/fr_AMS/learn/video-articles/evaluation-of-cancer-stem-cell-migration-using-compartmentalizing-microfluidic-devices-and-live-cell-imaging) (consulté le sept. 18, 2020).
- [649] S. Müller *et al.*, « Metformin reveals a mitochondrial copper addiction of mesenchymal cancer cells », *PLoS ONE*, vol. 13, n° 11, nov. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0206764.
- [650] C. S. Snyder *et al.*, « A Dual-Color Genetically Engineered Mouse Model for Multispectral Imaging of the Pancreatic Microenvironment », *Pancreas*, vol. 42, n° 6, p. 952-958, août 2013, doi: 10.1097/MPA.0b013e31828643df.
- [651] L. Madisen *et al.*, « A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain », *Nat. Neurosci.*, vol. 13, n° 1, p. 133-140, janv. 2010, doi: 10.1038/nn.2467.
- [652] C. Pan *et al.*, « Deep Learning Reveals Cancer Metastasis and Therapeutic Antibody Targeting in the Entire Body », *Cell*, vol. 179, n° 7, p. 1661-1676.e19, déc. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.11.013.
- [653] M. Bruschi *et al.*, « Loss of Apc Rapidly Impairs DNA Methylation Programs and Cell Fate Decisions in Lgr5+ Intestinal Stem Cells », *Cancer Res.*, vol. 80, n° 11, p. 2101-2113, juin 2020, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2104.
- [654] Loh *et al.*, « The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges », *Cells*, vol. 8, n° 10, p. 1118, sept. 2019, doi: 10.3390/cells8101118.
- [655] N. Linde *et al.*, « Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis », *Nat. Commun.*, vol. 9, n° 1, p. 21, déc. 2018, doi: 10.1038/s41467-017-02481-5.
- [656] A. M. Ansari *et al.*, « Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments », *Stem Cell Rev.*, vol. 12, n° 5, p. 553-559, 2016, doi: 10.1007/s12015-016-9670-8.

[657] « Statistiques de survie pour le cancer colorectal - Société canadienne », *www.cancer.ca*.  
<https://www.cancer.ca:443/fr-ca/cancer-information/cancer-type/colorectal/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=on> (consulté le sept. 16, 2020).

[658] J. Albrengues *et al.*, « Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice », *Science*, vol. 361, n° 6409, 28 2018, doi: 10.1126/science.aao4227.

## Publications

## Identification of CD44v6 as a new circulating tumor cell marker for colorectal and breast cancers

*Guillaume Belthier<sup>1</sup>, Fanny Grillet<sup>1</sup>, Christophe Duperray<sup>2</sup>, Julie Vendrell<sup>3</sup>, Ilona Krol<sup>4</sup>, Sophie Bravo<sup>5</sup>, Jean-Christophe Boyer<sup>5</sup>, Olivia Villeronce<sup>1</sup>, Jihane Vitre-Boubaker<sup>1</sup>, Diana Heaugwane<sup>1</sup>, Françoise Macari-Fine<sup>1</sup>, Jai Smith<sup>6,7</sup>, Matthieu Merlot<sup>8</sup>, Gérard Lossaint<sup>8</sup>, Thibault Mazard<sup>8</sup>, Fabienne Portales<sup>8</sup>, Jérôme Solasso<sup>3</sup>, Marc Ychou<sup>8</sup>, Nicola Aceto<sup>4</sup>, Emilie Mamessier<sup>9</sup>, François Bertucci<sup>9</sup>, Jean-Marc Pascussi<sup>1</sup>, Emmanuelle Samalin<sup>8</sup>, Frédéric Hollande<sup>6,7</sup> and Julie Pannequin<sup>1#</sup>*

<sup>1</sup>IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

<sup>2</sup>Cytometry IRMB, Montpellier Rio Imaging, Montpellier, France.

<sup>3</sup> Department of Pathology and onco-biology, CHU Montpellier, Montpellier, France

<sup>4</sup> Department of Biomedicine, Cancer Metastasis Laboratory, University of Basel and University Hospital Basel, CH-4058, Basel, Switzerland.

<sup>5</sup>Laboratoire de Biochimie, CHU Carémeau, Nîmes, France

<sup>6</sup> Department of Clinical Pathology, the University of Melbourne, Australia

<sup>7</sup> University of Melbourne Centre for Cancer Research, Victorian Comprehensive Cancer Centre, Melbourne, Australia

<sup>8</sup> Department of Oncology, ICM-Val d'Aurelle Cancer Center, Montpellier, France

<sup>9</sup> Predictive Oncology Laboratory, Cancer Research Center of Marseille (CRCM), Inserm U1068, CNRS UMR7258, Institut Paoli-Calmettes, Aix Marseille Université, Marseille, France.



## **ABSTRACT**

### **Background**

Circulating tumor cells (CTCs) are promising diagnostic and prognostic tools for clinical use. In several cancers, including colorectal and breast, the CTC load has been associated with therapeutic response, progression-free survival and overall survival. However, enumeration and isolation techniques remain sub-optimal and identification of CTC-specific markers is therefore urgently needed. Here, we determined the validity of the CD44 variable alternative exon 6 (CD44v6) as a marker to detect and purify CTCs in colorectal and breast cancers.

### **Methods**

We used immune detection coupled to magnetic beads or fluorescence-activated cell sorting to optimize the purification of CTC from blood samples of colorectal and breast cancer patients, exploiting the high expression of CD44v6 at the surface of CTCs.

### **Results**

We found that high expression of CD44v6 strongly distinguished CTCs from hematopoietic cells in colorectal and breast cancer blood samples and can be used as a marker to enable the isolation of CTCs from colorectal cancer patient blood samples.

### **Conclusion**

Overall these results strongly suggest that CD44v6 could be useful to count and purify CTCs from cancers of different origins.

### **Fundings**

Grant “INCa-DGOS-Inserm 6045”, region Languedoc Roussillon for the “chercheur d’avenir” grant and “la ligue contre le cancer” for funding GB PhD thesis

### **KEY WORDS**

Circulating tumor cells, colorectal cancer, breast cancer, biomarker, patient blood samples

## Introduction

According to recent data, 9.6 million people die each year from cancer and the vast majority of these deaths are due to metastasis to distant organs [1]. Development of distant metastases is a challenging multi-step process for tumor cells, starting with their ability to disseminate from the primary tumor and concluding with the colonization of distant organs and the formation of metastatic lesions. To reach metastatic sites, tumor cells usually transit through the bloodstream, where they are called circulating tumor cells (CTC). Clearly, greater knowledge about CTCs would be precious to combatting cancer mortality. CTCs have been proposed for a number of years as a promising biomarker. Their detection and quantification was proven clinically useful in the diagnostic and prognostic settings, as well as to monitor treatment-response and predict tumor-recurrence [2], [3].

To date, the CellSearch™ platform remains the clinical gold standard and the only FDA-approved method to enumerate CTCs in blood samples. The platform is used for multiple cancers, including colorectal (CRC) and breast cancers, and is based on the detection of epithelial markers such as EpCAM and cytokeratin combined with the lack of CD45 detection in nucleated circulating cells. Several alternative approaches have been suggested to isolate CTCs from cancer patient blood samples, such as the ISET technique which is based on the larger size of CTCs compared to hematopoietic cells [4]. Microfluidic CTC capture platforms have also been engineered to sort rare CTCs from whole blood, such as the iChip which enables the isolation of CTCs by strategies that are either dependent or independent of tumor markers, and thus theoretically applicable to all cancers [5]. Similarly, Angle Company has developed an epitope-independent technology enabling isolation of CTC thanks to their different size and deformability. This latter technology has allowed the key discovery of both CTC clusters and CTC-neutrophil clusters [6], [7]. Nevertheless, concerns remain as to the robustness of CTC-isolation methods, as there is often little overlap regarding cytomorphology and immunelabelling with anti-cytokeratin between sorted CTC populations using different methods [8]. Identification of transmembrane CTC markers is thus urgently needed.

Using various approaches CTCs have been enriched and sometimes grown from several types of cancers [9]–[12]. In colorectal cancer, where CTCs are particularly difficult to capture due to their scarcity in the peripheral blood [13], we were first to establish and bank several CTC lines from patient blood samples [14]. We showed that these CTC contain cancer stem cells and, notably, quantification of stem-like cell markers highlighted the enriched expression of an alternative epitope of the CD44 protein, coming from the splicing of alternative variable exon 6 (v6).

Because CD44 is a transmembrane protein, we investigated the possibility of using v6 as a bait to purify CTCs from patient blood samples. The data presented here demonstrate for the first time that CD44v6 is a promising marker to isolate CTC from blood samples of patients with CRC. Finally, CD44v6 is also highly expressed in CTC from patients with breast cancer and thus may have a broader clinical value.

## Results

### CD44v6 efficiently discriminates tumor cells from hematopoietic cells

First, CD44v6 was tested as a cell surface marker that could be used to isolate circulating tumor cells (CTCs) from blood samples by magnetic bead approach (figure 1A). The first step was to spike blood samples from healthy individuals with one of the CTC lines, the CTC45 line, established previously in our lab [14]. 100 CTCs from this cell line were spiked into 6 ml of blood of healthy individuals (3 times), to approximate the ratio of CTCs to hematopoietic cells in the blood of CRC patients. Following elution, CD44v6 expression was assessed by cytometry and the recovery rate of  $63.3 \pm 3.7\%$  was obtained (data not shown). In parallel, blood samples from 19 colorectal cancer patients were processed. For both conditions (healthy and CRC patient blood samples), this approach proved to be successful in isolating live cells that we were able to grow and amplify for several days (live cells are shown in figure 1B). For one of these samples, a novel CTC line has been established and tumor was formed following CTC injection in the flank of nude mice confirming their tumor origin (data not shown).

After performing red blood cells lysis to remove erythrocytes, the second strategy was to stain the CTC45 previously mentioned with an APC-conjugated CD44v6 antibody to detect CTCs and a PE-conjugated CD45 antibody to exclude white blood cells (figure 2A). A cell death marker was also added to remove dead cells. The CD44V6<sup>high</sup>/CD45-negative live cells were then purified by FACS and grown. For this strategy, the patient derived CTC45 were GFP-labelled to facilitate their tracking during the whole process. CTC45 cells were successfully purified from blood samples of healthy patients and maintained in culture and expressed GFP, confirming their origin and purity (figure 2B).

Protocols for these two approaches are detailed in the Material and Methods section.

After spiking 100 CTC in the blood of healthy patient blood samples, CD44v6 expression was assessed by flow cytometry following cell sorting and the recovery rate of  $65.7 \pm 1.19\%$  was obtained (supplementary figure 1). The latter strategy was preferred to magnetic beads for following cell isolation because an obvious contamination of CD45-positive cells was visually detected with the magnetic beads and could be deleterious for remaining cell survival.

### Validation of the use of CD44v6 as a bait to purify CTC from CRC patient blood samples

To prove that CD44v6 allows the isolation of CTCs, we quantified the number of CD44V6<sup>high</sup>/CD45-negative cells by flow cytometry analysis in CRC patient blood samples. We performed

this experiment on blood samples from eight treatment-naïve patients with late stage CRC (table 1). We were able to detect CTC candidates (CD45-negative and CD44v6 highly positive cells) in each sample and the number was significantly higher in CRC patient blood samples than in healthy ones ( $p=0.0022$ ; figure 3A).

Importantly for four CRC patients, CD44v6 and EpCam co-staining was performed and cells mostly express only one of these markers (supplementary figure 2); suggesting that they should be used together to get a better overview of the tumor cell heterogeneity present in the blood of CRC.

To validate that CD44V6<sup>high</sup>/CD45-negative cells are indeed CTCs, these cells were sorted in a small number of patient samples and analyzed for their mutational status (figure 3B). Knowing that one of the patient primary tumor bore a *KRAS* mutation, droplet digital PCR was used on DNA from the very small candidate CTC population of this patient to specifically search this mutation (exon 2, G12V). This highly sensitive technique enabled us to detect two copies of mutated *KRAS*, which was the same as that found in the matching primary tumor, further validating the colorectal tumor origin of isolated cells (figure 3C). Importantly, CTCs that were wild-type for this gene were also found, suggesting that this approach could give us an idea of tumor heterogeneity for each patient. Similarly, from another CRC patient blood sample, 97 CTCs were sorted and DNA was extracted to annotate mutations by next generation sequencing (NGS) and the frequently found *FGFR1* and *ERBB4* mutations in CRC were detected (table 2). This latter result confirmed once again that the purified cells had a tumor origin.

#### *CD44v6 is also expressed in CTC from breast cancer*

Next, the expression of CD44v6 was assessed by flow cytometry on two breast cancer CTC lines Br16 and Brx50 established by our collaborators [12]. The vast majority of the cells of both lines expressed CD44v6 (73.8% and 72.1% for the cell lines Br16 and Brx50 respectively), indicating that this marker is not only expressed by colorectal CTCs but also strongly expressed in CTC lines from a different cancer type (figure 4A). Finally, to exclude the possibility that CD44v6 high expression on breast CTC was the consequence of a culture bias, blood samples from three breast cancer patients were tested for the presence of CD44V6<sup>high</sup>/CD45-negative population. Figure 4B shows that CTCs (CD45-negative and CD44v6 highly positive cells) were found in the blood of three patients and their number were significantly higher than in healthy subjects ( $p=0.0045$ ; Supplementary figure 3).

Overall the data presented here strongly suggest that CD44v6 is a robust transmembrane protein candidate to specifically quantitate and isolate CTCs from the blood of patients with colorectal and breast cancers.



## Discussion

Counting CTCs in patient blood samples is widely accepted in clinical practice and the focus has now moved on to isolating these CTCs to elucidate mechanisms of tumor dissemination and metastases. Moreover, the idea of isolating CTCs and performing drug screening to thereafter select the most adapted therapy and personalize the patient's treatment is enticing and has been previously suggested by Yu and colleagues in breast cancer [12]. A major obstacle to reach this goal is the scarcity of CTCs in the circulation, as very few of them can usually be detected amongst millions of hematopoietic cells. This scarcity is particularly acute in the peripheral blood samples of patients with colorectal cancer (CRC) in which CTC number is extremely low [13]. The second obstacle is to efficiently purify CTCs from patient blood samples notably thanks to the reliability of selection markers.

By depleting blood cells from patient samples and culturing remaining cells in suspension, we were the first to isolate and culture several CTC lines from CRC patient blood samples [14]. During that work, we showed by flow cytometry that CD44v6 was highly expressed in almost all cells of our cultures. In the intestine, CD44 is one of the multiple target genes of the Tcf-4/ $\beta$ -catenin pathway, constitutively activated in almost 80% of CRC. But specific isoforms of this gene could be also detected in CRC. In 2014, Stassi and his team demonstrated that CD44v6 marked reprogrammed cancer stem cells that drive colon cancer metastasis [15]. Similarly CD44v6 was described to be related to poor outcome of patients with colorectal cancer *via* upregulation of the mesenchymal phenotype [16]. From these previous studies emerged the idea to use CD44v6 as a biomarker to isolate specifically CTCs from the blood of patients with CRC. This idea was proposed in a review published in 2019 [17], but to our knowledge has never been validated. Importantly, the *CD44v6* gene is also expressed in normal human peripheral blood [18], which strengthened the importance of enumerating/isolating CD44V6<sup>high</sup> cells in the CD45-negative cell subpopulation. In addition, in 2000 a study highlighted the limitations of CD44v6 amplification for the detection of tumor cells in the blood of CRC patients [19], but this work only considered CD44v6 expression at the mRNA level which could considerably differ from protein expression. Here, we demonstrate that in all CRC patient blood samples CD44V6<sup>high</sup> /CD45-negative cells were detected regardless of a specific mutational profile of the primary tumor (table 1), suggesting that this antigen could be a precious diagnostic/prognostic marker as well as research tool for further investigations.

Similarly for several solid cancers, the CD44v6-positive cell percentage within the tumor inversely correlates with overall survival [20]; Wu et al. 2015; Qiao et al. 2018; Saito et al. 2013). An important meta-analysis confirmed these data and added the association of CD44v6

expression in the primary tumor with the presence of distant metastasis [21]. Loss and gain of function experiments demonstrated long time ago that v6 isoform was key for the ability to develop metastasis [22]. In the present work, we demonstrate that CD44v6 can be successfully used to detect and isolate CTC candidates from the blood of not only colorectal cancer but also breast cancer patients, suggesting that this marker could be expressed by CTCs from multiple origins. In addition, CD44v6 has been described in pancreatic cancer as one of the markers expressed on migrating cancer-initiating cells [23] and is expressed notably in prostate and gastric cancers (Xu et al. 2017; Wu et al. 2015; Peng et al. 2017). Results could thus be extended to CTC in other cancers and potentially become a pan transmembrane CTC marker.

The gold-standard technique to enumerate CTCs in the blood of patients with cancer has been the CellSearch, FDA-approved as a prognostic platform in several metastatic cancers such as breast, prostate and colorectal. This technique is based on the expression of allegedly cancer type-specific markers expressed by CTCs. For most carcinomas, the main positive marker is EpCAM, which is expressed at the membrane of epithelial cells. Yet, several publications have shown that cancer cells could undergo epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) when they leave the primary tumors, leading to the loss of EpCAM expression and consequently to the underestimation of CTCs when using this technique [24], [25]. Here, we demonstrate that CTCs expressing both EpCam and CD44v6 were rare since only five could be detected in the blood of four CRC patients, confirming the importance of combining markers to encompass CTC heterogeneity. In addition, the CellSearch approach necessitates fixation of cells, thus precluding their subsequent maintenance in culture.

Other specific common markers for CTCs have been suggested in the literature these last years. In colorectal cancer, Plastin-3 has been proposed but has not yet been validated as a robust marker [26]. EGFR has also been proposed as a promising candidate that is expressed on CTCs of 15% of metastatic CRC patients. However this marker was also found in 10% of healthy individuals, which undermines its specificity [27]. More convincingly, carcinoembryonic antigen (CEA) is expressed by CTCs in 66% of patients with metastatic CRC, although CEA is also detected in the blood of almost 20% of healthy patients [28]. Recently, VAR2CSA, another transmembrane marker has been suggested to isolate CTC [29].

Finally, Lu et al used an approach similar to ours by combining magnetic and FACS approaches and by spiking the CRC line, HCT116, in the blood of patients [30]. We think that our approach is more relevant since after spiking CTCs from patient blood samples in the blood, we are able to isolate CTCs from CRC patient blood samples.

Overall, our work is the first demonstration that CTCs from the blood of patients with various cancers can be purified by exploiting their high expression of CD44v6.

## Material and Methods

**Blood samples:** Blood samples from healthy donors were obtained from the EFS bloodbank (Etablissement Français du Sang) under agreement n°21PLER2016-0013. Blood samples from metastatic colorectal patients were obtained from the Montpellier Cancer Institute ICM (Institut du Cancer de Montpellier) with patients' signed consent under ethics agreement #2016-A00080-51. Blood samples from metastatic breast cancer patients were obtained from Paoli-Calmettes Institute (Marseille, France) with patients' signed consent within the PERMED-01 trial (NCT02342158).

**Red blood cell lysis:** One volume of Red Blood Cell Lysis Solution (10X) (130-094-183, Miltenyi Biotech) was diluted in double distilled water (ddH<sub>2</sub>O). One volume of blood was then diluted in 10 volumes of 1X Red Blood Cell Lysis Solution and vortexed for 5 seconds. After a 10-minute incubation at room temperature, the sample was centrifuged at 300g for 10 minutes (this speed and timing of centrifugation were the same for the following experiments). The supernatant was finally removed and the cell pellet was suspended with the blocking buffer.

**Blocking Buffer:** This buffer contains the auto MACS rinsing solution (130-091-222, Miltenyi Biotech) with 1% of BSA (130-091-376, Miltenyi Biotech).

**Magnetic bead-based enrichment:** First, the cells were counted and centrifuged and the pellet was suspended to reach the concentration of  $10^7$  cells in 70  $\mu$ L of blocking buffer. Then, 20  $\mu$ L of Human FcR Blocking Reagent (130-059-901, Miltenyi Biotech) were added and incubated on ice for 10 minutes. Cells were washed with the blocking buffer and then centrifuged to perform the antibody staining. As recommended, 10  $\mu$ L of APC-conjugated antibody (130-111-425, Miltenyi Biotech) for up to  $10^7$  cells were added for a final volume of 100  $\mu$ L. Samples were incubated 10 minutes on ice and then washed twice with 1 ml of blocking buffer. After another centrifugation step, the pellet was suspended at the following concentration:  $10^7$  cells in 80  $\mu$ L of blocking buffer. Then, 20  $\mu$ L of anti-APC microbeads (130-090-855, Miltenyi Biotech) were added and incubated on ice for 15 minutes and then washed twice with 1 ml of blocking buffer. After another centrifugation step at 300 g, the cell pellet was suspended in 500  $\mu$ L of blocking buffer for up to  $10^8$  cells. Cells were placed on LS columns (130-042-401, Miltenyi Biotech) previously introduced into the QuadroMACS Separator (130-090-976, Miltenyi Biotech) and equilibrated with 500  $\mu$ L of blocking buffer. The LS Column was then washed 3 times and removed from the separator to be placed on a new collection tube. Cells of interest were eluted with 2 mL of PBS.

**Staining for flow cytometry (LD-NIR dead cell staining and CD44v6, EpCAM, CD45 antibodies):** First, the cells were counted and centrifuged. The pellet was suspended to reach the concentration of  $10^7$  cells in 80  $\mu$ l of blocking buffer. Then, 20  $\mu$ l of Human FcR Blocking Reagent (130-059-901, Miltenyi Biotek) were added and incubated on ice for 10 minutes. Cells were washed with blocking buffer and then centrifuged to process to antibody staining. The recommended dilution for APC-conjugated CD44v6 antibody (130-111-425, Miltenyi Biotek) and Vio Bright B515-conjugated EpCAM antibody (130-111-007) is 1:50 for up to  $10^6$  cells in a final volume of 100  $\mu$ L of blocking buffer. The recommended dilution for PE-conjugated CD45 antibody (FAB1430P-100, R&D SYSTEMS) is 10  $\mu$ L for  $10^6$  cells. The Live/Dead Fixable Near-IR Dead Cell Stain kit (L34976, Invitrogen) dilution is 1  $\mu$ L for  $10^6$  cells. Samples were incubated 15 minutes on ice and then washed twice with 1 ml of blocking buffer. Cells were suspended with 200  $\mu$ L of blocking buffer for  $10^6$  cells. Cells of interest were sorted into a microtube containing 3  $\mu$ l alkaline lysis buffer (200 mM KOH, 50 mM DTT). Cells were lysed by incubation at 65°C for 10 min, then stored at -20°C until NGS or ddPCR was performed.

For CD44v6 staining on Breast CTC lines, patient derived cell lines were used as negative and positive controls. Breast CTC lines were stained with APC-conjugated CD44v6 antibody (130-111-425, Miltenyi Biotek) and then analysed. CD44v6 staining was compared to the unstained condition. Dead cells were excluded with DAPI staining. All cell lines were cultured with the same condition and dissociated as describe below.

**Cell culture and sphere dissociation:** Cells were seeded in M12 medium (1 mL/well) in ultralow attachment flasks (Corning), enables spheroid formation. M12 medium contains advanced DMEM-F12 (Gibco), 2 mmol/L of L-glutamine, 100 Unit/mL of penicillin and streptomycin, N2 supplement (Gibco), 20 ng/mL of epidermal growth factor (R&D) and 10 ng/mL of fibroblast growth factor-basic (R&D). Spheres were centrifuged at 300 g for 5 minutes and the supernatant removed. Pellets were suspended with an equal volume of Accumax (A7089-100ML Sigma-Aldrich). Spheres were then gently mixed and incubated for 30 to 45 minutes according to the sphere size at 37°C. For Accumax inactivation, 3ml of blocking buffer was added and finally passed through a 40  $\mu$ m Falcon Cell Strainer before counting and staining.

**NGS:** DNA concentration was determined by fluorimetric quantitation using a Qubit 2.0 Fluorimeter and a Qubit® dsDNA HS assay kit (Life Technologies). Library preparation was carried out automatically using the IonChef system (Life Technologies). Ten ng of DNA were amplified using the OncoPrint cancer panel (Ampliseq™, Life Technologies) to sequence 1825 hotspot mutations in 22 genes (90 amplicons), including *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *CTNNB1*, *DDR2*,

*EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH1, NRAS, PIK3CA, PTEN, SMAD4, STK11* and *TP53*. Sequencing was performed on a S5™ sequencer (Life Technologies). The raw data were analyzed, first with Nextgene software (V2.4.2, SoftGenetics) and then with the Torrent suite (v5.0 - Life Technologies). Mutations were detected using the Variant Caller plug-in (v5.0, Life Technologies). We considered a variant as authentic if its coverage was over 20× and its frequency was over 2%. Mutation detection sensitivity was controlled for by including a HD200 Reference Standard (Horizon Discovery, Cambridge, UK) in each run. The method used (including DNA extraction, sequencing and data analysis) is ISO15189-certified

**ddPCR:** The presence of the *KRAS* G12V mutation was assessed using QX200 ddPCR System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Forward and reverse gene-specific primers and fluorescent hydrolysis probes specific for either the mutant (FAM) or wild-type (HEX) were obtained from Bio-Rad. Briefly, DNA extracted from FFPE tumor sample and CTC sample from the same patient was used per ddPCR reaction with ddPCR supermix (Bio-Rad). The reactions were then emulsified using a QX200 AutoDG droplet generator, transferred to 96-well plates and amplified using the following cycling conditions: 95°C for 10 min; 40 cycles of 94°C for 30 sec, and 55°C for 1 min; and 98°C for 10 min. After amplification, plates were read and fluorescence signal of individual sample droplets were analyzed with a QX200 droplet reader. The mutant allele frequency relative to that of wild-type was determined using QuantaSoft V.1.7.4 software by applying a correction based on the Poisson distribution to the number of droplets positive for either mutant or wild-type DNA.

**Statistics.** All graphs and statistical analysis were performed with GraphPad Prism software. Statistics, for CD44v6 expression, were expressed as mean ( $\pm$  standard deviation). The number of living CD45 negative/CD44v6 high cells in the different groups, was compared using the nonparametric unpaired Mann–Whitney U test (2-tailed, confidence interval of 95%).



## References

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2019," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, Jan. 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [2] S. J. Cohen *et al.*, "Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 19, pp. 3213–3221, Jul. 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.15.8923.
- [3] G. J. Morrison and A. Goldkorn, "Development and Application of Liquid Biopsies in Metastatic Prostate Cancer," *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 20, no. 4, p. 35, Mar. 2018, doi: 10.1007/s11912-018-0683-0.
- [4] G. Vona *et al.*, "Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 156, no. 1, pp. 57–63, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64706-2.
- [5] E. Ozkumur *et al.*, "Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells," *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 179, p. 179ra47, Apr. 2013, doi: 10.1126/scitranslmed.3005616.
- [6] B. Szczerba *et al.*, "Neutrophils Escort Circulating Tumour Cells to Enable Cell Cycle Progression," *Nature*, Feb. 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30728496/> (accessed Jul. 06, 2020).
- [7] N. Aceto *et al.*, "Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis," *Cell*, Aug. 28, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25171411/> (accessed Jul. 06, 2020).
- [8] F. Farace *et al.*, "A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas," *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 6, pp. 847–853, Sep. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.294.
- [9] V. Bobek, R. Gurlich, P. Eliasova, and K. Kolostova, "Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: enrichment and cultivation," *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 45, pp. 17163–17170, Dec. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i45.17163.
- [10] M. Cegan *et al.*, "In vitro culturing of viable circulating tumor cells of urinary bladder cancer," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 10, pp. 7164–7171, 2014.
- [11] C. L. Hodgkinson *et al.*, "Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 8, pp. 897–903, Aug. 2014, doi: 10.1038/nm.3600.
- [12] M. Yu *et al.*, "Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility," *Science*, vol. 345, no. 6193, pp. 216–220, Jul. 2014, doi: 10.1126/science.1253533.
- [13] F. C. Bidard *et al.*, "Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 82, no. 2, pp. 103–115, May 2012, doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.05.008.
- [14] F. Grillet *et al.*, "Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture," *Gut*, vol. 66, no. 10, pp. 1802–1810, 2017, doi: 10.1136/gutjnl-2016-311447.
- [15] M. Todaro *et al.*, "CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis," *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 342–356, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.01.009.
- [16] S. Saito *et al.*, "CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 29, no. 4, pp. 1570–1578, Apr. 2013, doi: 10.3892/or.2013.2273.
- [17] L. Ma, L. Dong, and P. Chang, "CD44v6 engages in colorectal cancer progression," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 1, p. 30, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41419-018-1265-7.
- [18] J. Song, Z. Ds, and Z. J, "Expression of CD44v6 Gene in Normal Human Peripheral Blood," *World journal of gastroenterology*, Jun. 21, 2005. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15962382/?from\\_single\\_result=jian+song+CD44v6](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15962382/?from_single_result=jian+song+CD44v6) (accessed Jul. 06, 2020).
- [19] D. Masson, M. G. Denis, and P. Lustenberger, "Limitations of CD44v6 amplification for the detection of tumour cells in the blood of colorectal cancer patients," *Br. J. Cancer*, vol. 82, no. 7, pp. 1283–1289, Apr. 2000, doi: 10.1054/bjoc.1999.1092.
- [20] H. Jiang, Z. W, and S. W, "Prognostic Value of CD44 and CD44v6 Expression in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer: Meta-Analysis," *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, Aug. 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24913707/> (accessed Jul. 06, 2020).



- [21] J. Wang *et al.*, "CD44v6 Overexpression Related to Metastasis and Poor Prognosis of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis," *Oncotarget*, Feb. 21, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28030817/> (accessed Jul. 06, 2020).
- [22] M. Fang *et al.*, "CD44 and CD44v6 Are Correlated With Gastric Cancer Progression and Poor Patient Prognosis: Evidence From 42 Studies," *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27889771/> (accessed Jul. 06, 2020).
- [23] H. Wang, S. Rana, N. Giese, M. W. Büchler, and M. Zöller, "Tspan8, CD44v6 and alpha6beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells," *Int. J. Cancer*, vol. 133, no. 2, pp. 416–426, Jul. 2013, doi: 10.1002/ijc.28044.
- [24] X.-X. Jie, X.-Y. Zhang, and C.-J. Xu, "Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications," *Oncotarget*, vol. 8, no. 46, pp. 81558–81571, Oct. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.18277.
- [25] M.-E. Francart *et al.*, "Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: Travel companions to metastases," *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, vol. 247, no. 3, pp. 432–450, 2018, doi: 10.1002/dvdy.24506.
- [26] H. Ueo *et al.*, "Circulating tumour cell-derived plastin3 is a novel marker for predicting long-term prognosis in patients with breast cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 9, pp. 1519–1526, Apr. 2015, doi: 10.1038/bjc.2015.132.
- [27] S. Lankiewicz, E. Rother, S. Zimmermann, C. Hollmann, F. Korangy, and T. F. Greten, "Tumour-associated transcripts and EGFR deletion variants in colorectal cancer in primary tumour, metastases and circulating tumour cells," *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.*, vol. 30, no. 6, pp. 463–471, 2008.
- [28] V. Zieglschmid, C. Hollmann, B. Gutierrez, A. Krehan, S. Kaul, and O. Böcher, "Heterogeneous expression of tumor-associated genes in disseminated breast cancer cells," *Anticancer Res.*, vol. 27, no. 4A, pp. 1769–1776, Aug. 2007.
- [29] M. Ø. Agerbæk *et al.*, "The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 3279, 16 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05793-2.
- [30] Y. Lu *et al.*, "Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry," *Cancer*, vol. 121, no. 17, pp. 3036–3045, Sep. 2015, doi: 10.1002/cncr.29444.

## Figure Legends

**Figure 1. CD44v6<sup>high</sup> cells can be purified with magnetic beads in CRC patient blood samples** (A) Schematic flowchart summarizing the strategy used to purify CTCs from blood using magnetic beads. (B) Photos of live CTCs cultured after purification with magnetic beads and antibody directed against CD44v6 from CRC patient blood samples. Black arrow heads show single cells and white arrow heads show spheres. Scale bars represent 50  $\mu$ m.

**Figure 2. CD44v6<sup>high</sup> and CD45-negative cells can be purified with FACS in CRC patient blood samples** (A) Flowchart summarizing the strategy used to purify CTC in patient blood sample by fluorescent-activating cell sorting (FACS). Detailed protocol is described in the material and methods section (B). Photos of live GFP-positive CTCs cultured after cell sorting following staining with an antibody directed against CD44v6. Scale bars represent 50  $\mu$ m.

**Figure 3. CD44v6<sup>high</sup> and CD45-negative cells can be detected and sorted from the blood of patients with late stage CRC.** (A) Histogram representing the significantly higher number of CD45-negative /CD44v6-highly positive cells in the blood of CRC patients (n=8) than in the blood of healthy subjects (n=9). The number of CD45-negative / CD44v6 highly positive cells in the different groups, was compared using the nonparametric unpaired Mann–Whitney U test (2-tailed, confidence interval of 95%). (B) Representative plot demonstrating the presence of alive CD45-negative and CD44v6<sup>high</sup> cells in the blood of patients with metastatic CRC. (C) Scatter plot of ddPCR result showing fluorescent detection of individual droplets. Green (x-axis) and blue (y-axis) dots represent droplets with KRAS WT and KRAS G12V (surrounded in blue) genotypes, respectively.

**Figure 4. CD44v6 is also expressed by breast CTCs.** (A) Plots demonstrating the high expression of CD44v6 in two breast CTC lines Br16 and Brx50 [12]. (B) FACS plots demonstrating the presence of CD45-negative and CD44v6-positive cells in the blood of patients with breast cancer (n=3).

**Supplementary Figure 1. Isolation of CTC by FACS is efficient.** Representative FACS plot quantifying the percentage of CD44v6<sup>high</sup>/ CD45-negative cells following cell sorting.

**Supplementary Figure 2. CTC expressing both CD44v6 and EpCam are rare.** FACS plots quantifying CD44v6 and EpCam expression in the CD45-negative cells from CRC patient blood samples.

**Supplementary Figure 3. More CD44v6<sup>high</sup>/CD45-negative cells are detected in breast cancer than in healthy individual blood samples.** Histogram representing the significantly

higher number of CD45-negative /CD44v6-positive cells in the blood of breast cancer patients (n=3) than in the blood of healthy subjects (n=9). The number of CD45- / CD44v6 highly positive cells in the different groups, was compared using the nonparametric unpaired Mann–Whitney U test (2-tailed, confidence interval of 95%).

## **Acknowledgements**

Authors would like to thank SIRIC: Grant “INCa-DGOS-Inserm 6045”, MRI (Montpellier Rio Imaging), region Languedoc Roussillon for the “chercheur d’avenir” grant and la ligue contre le cancer for funding GB PhD thesis. Authors acknowledge Muriel Asari for figures and Julian Venables/Science Sense for editing.

## **Contributions**

JP designed the research; GB, FH, JP and JMP discussed results and commented on the manuscript FG and JMP designed part of the research; GB, FG, SB, FMF, SB, OV, JVB, JV, IK and DH performed the experiments; CD and NA provide precious help and tools, GB, FH, JP and JMP analyzed the data; MM, FP, TM, GL, JS, JCB, MY, EM, FB and ES contributed to clinical part; FH and JP wrote the manuscript.

Figure 1 Belthier et al., 2020

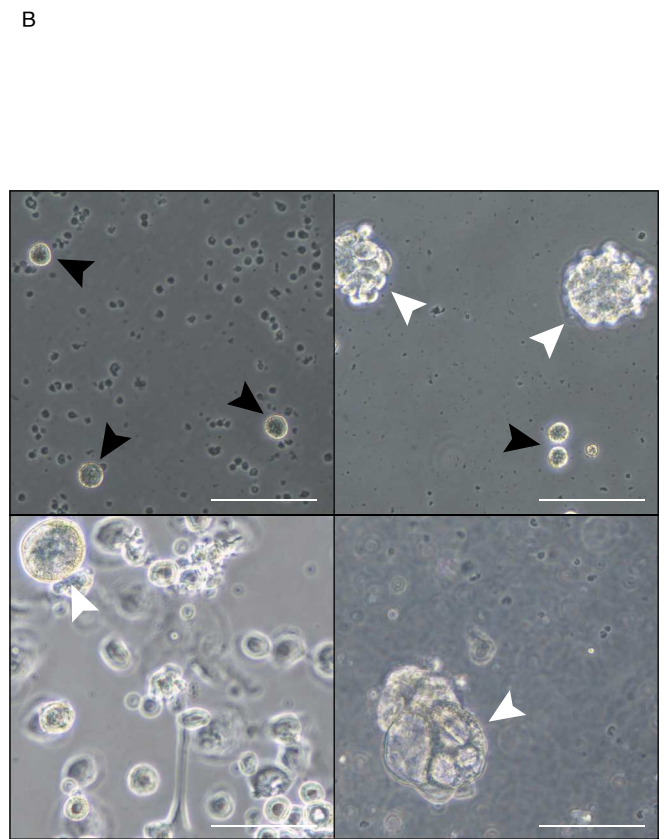
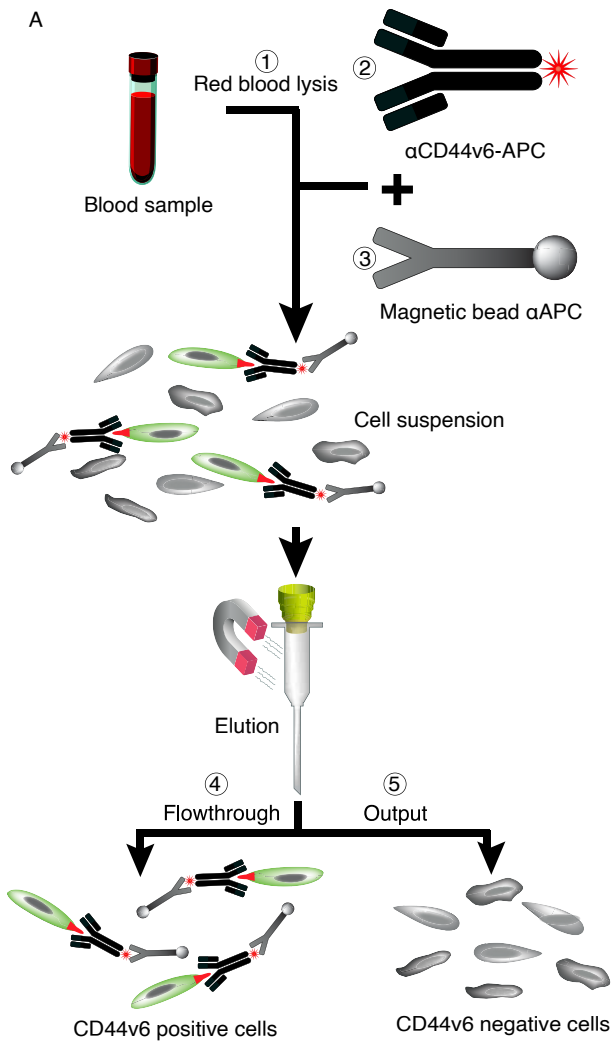


Figure 2 Belthier et al., 2020

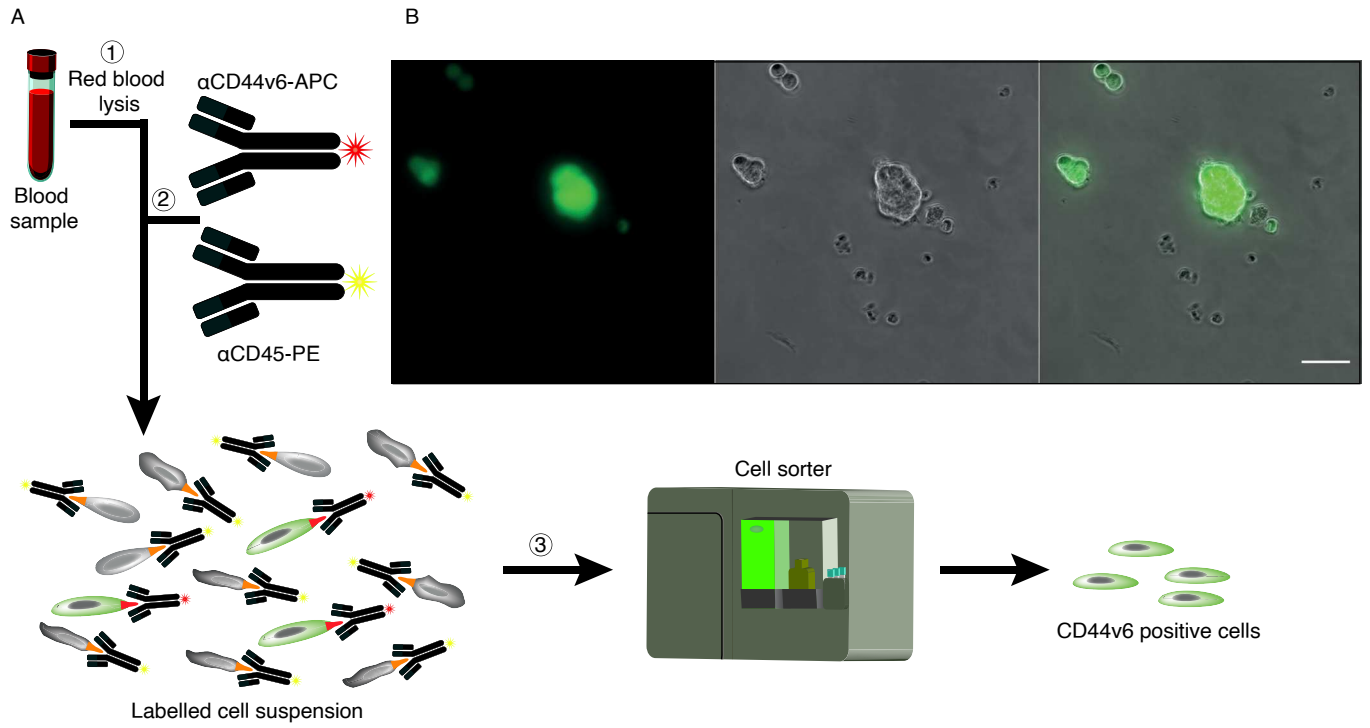




Figure 3 Belthier et al., 2020

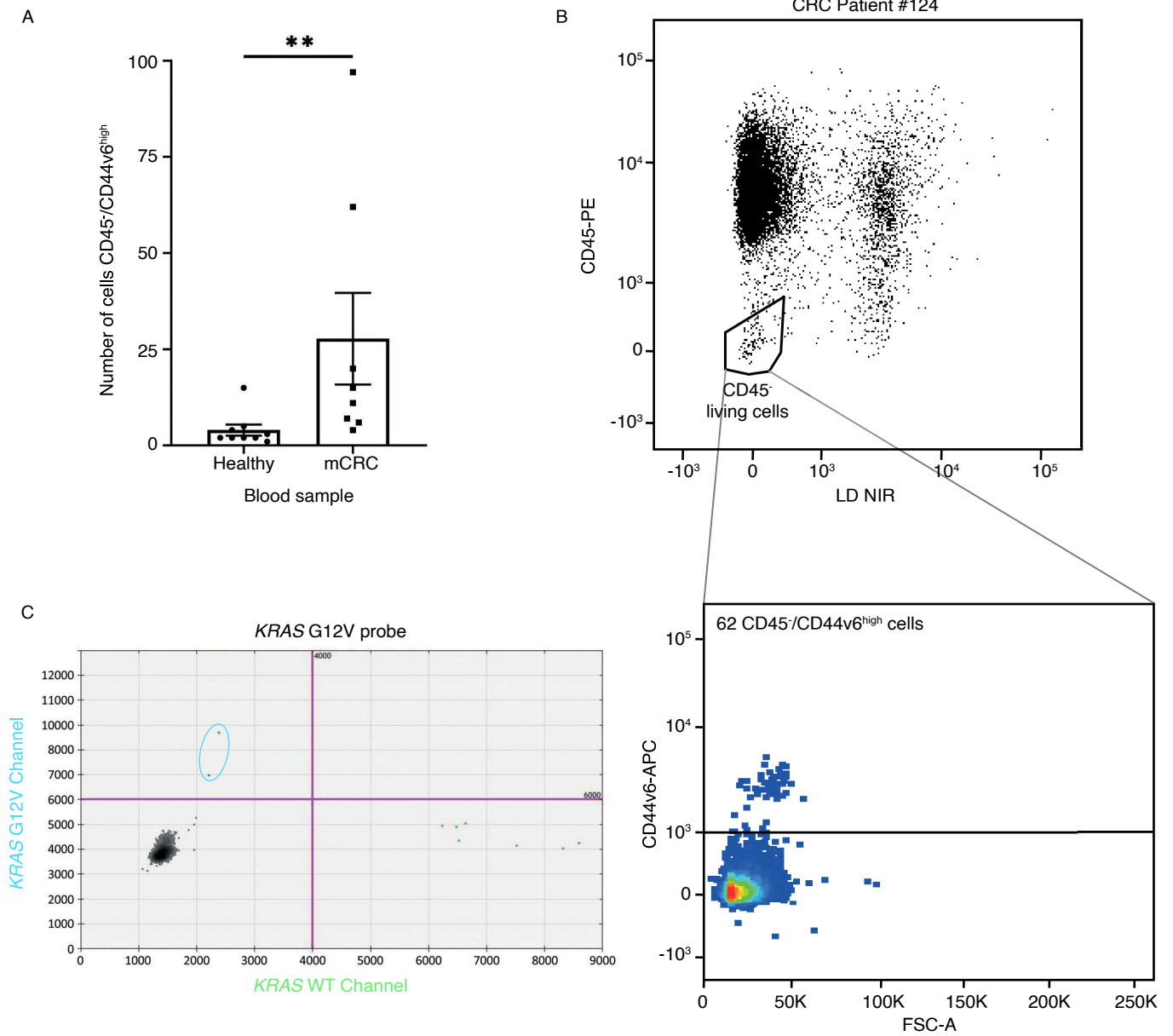
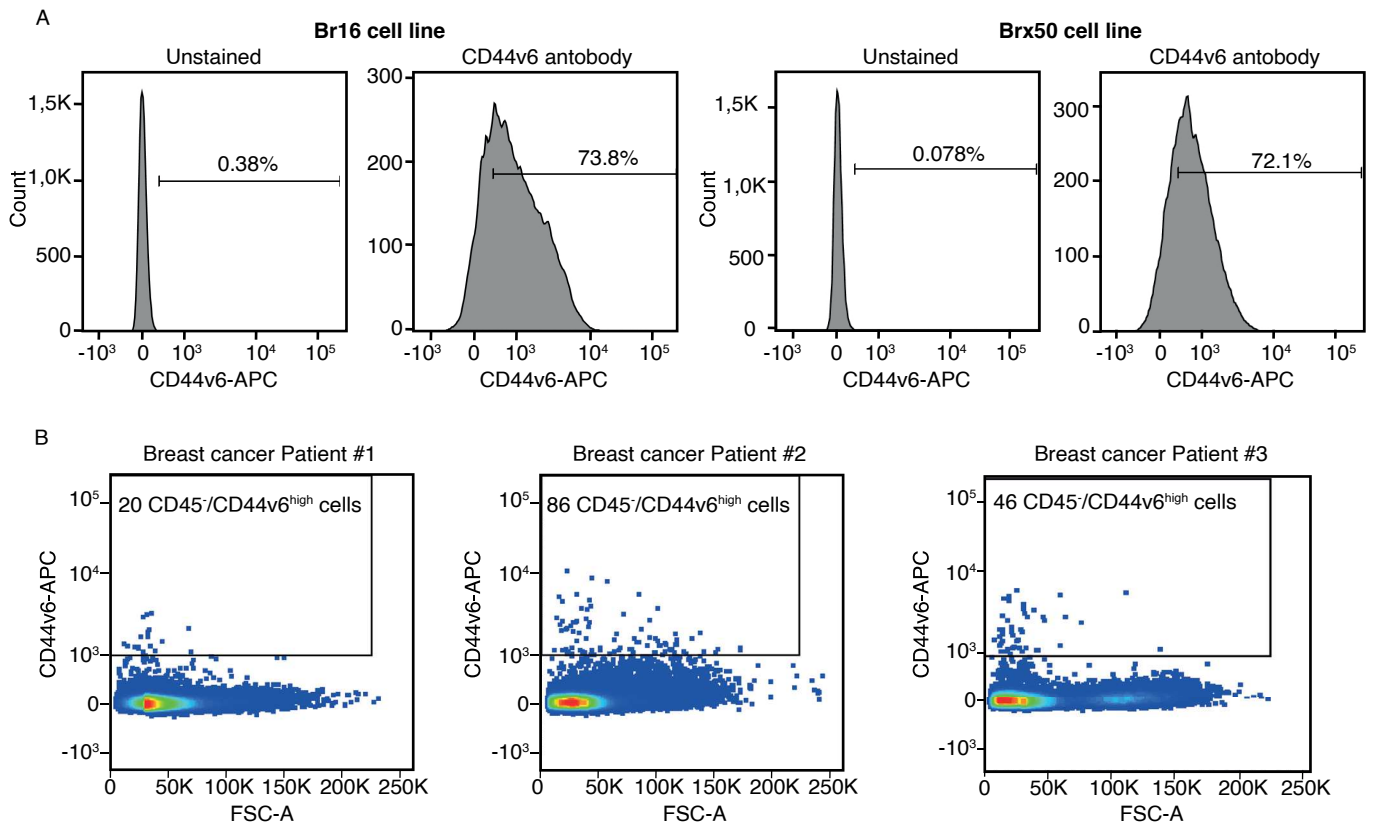
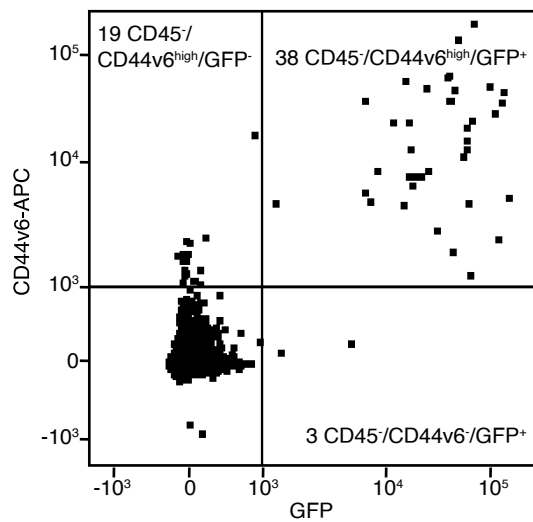


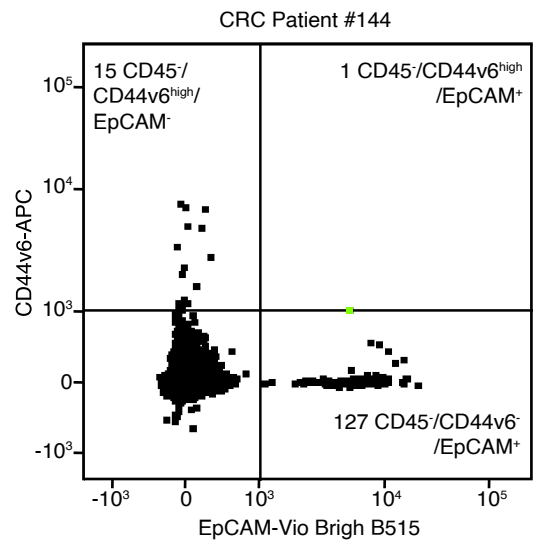
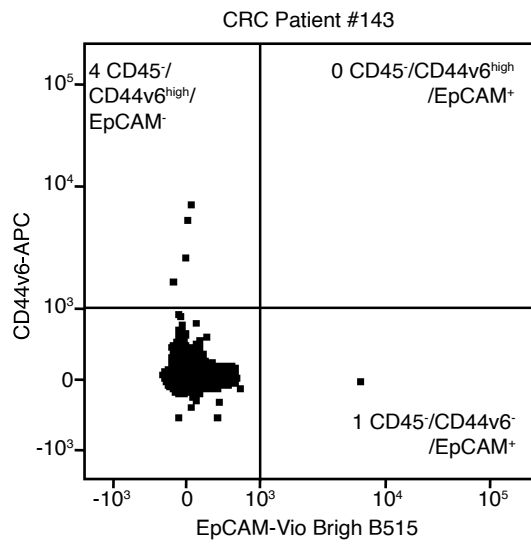
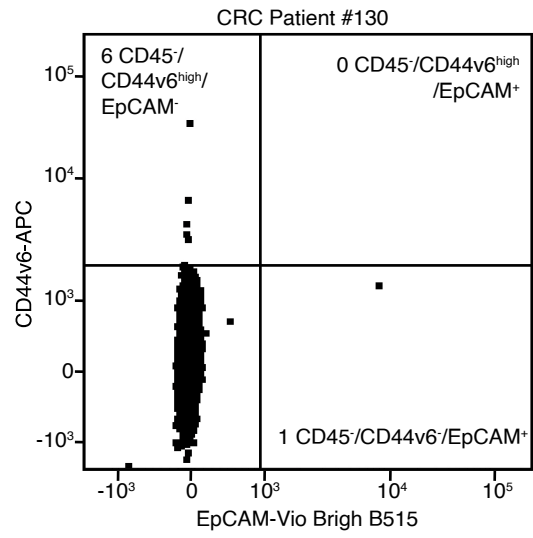
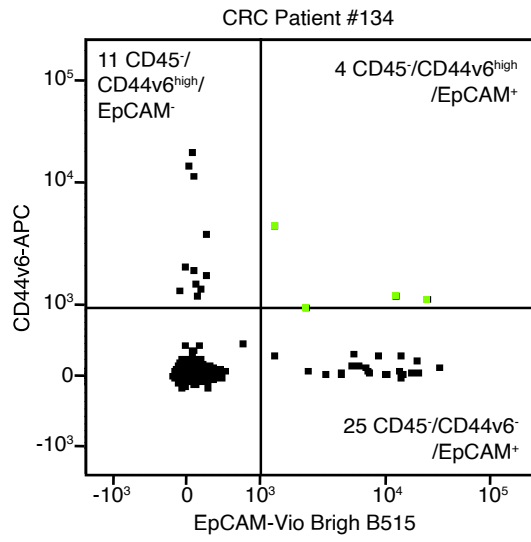
Figure 4 Belthier et al., 2020

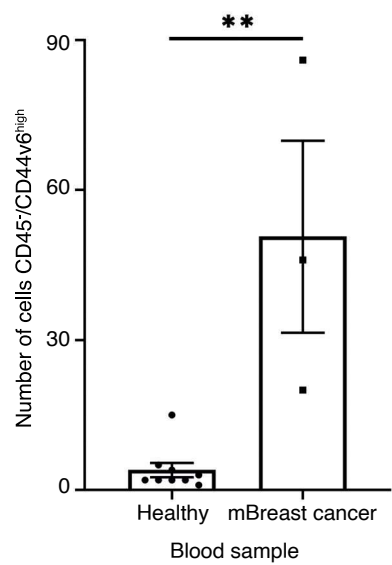


Supplementary figure 1 Belthier et al., 2020



Supplementary figure 2 Belthier et al., 2020





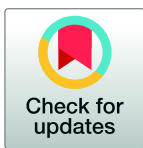
RESEARCH ARTICLE

# Metformin reveals a mitochondrial copper addiction of mesenchymal cancer cells

Sebastian Müller<sup>1</sup>, Antoine Versini<sup>1</sup>, Fabien Sindikubwabo<sup>1</sup>, Guillaume Belthier<sup>2</sup>, Supaporn Niyomchon<sup>1</sup>, Julie Pannequin<sup>2</sup>, Laurence Grimaud<sup>3</sup>, Tatiana Cañeque<sup>1\*</sup>, Raphaël Rodriguez<sup>1\*</sup>

**1** Chemical Biology of Cancer Team, Labellisée Ligue Contre le Cancer, PSL Research University, CNRS UMR3666–INSERM U1143, Institut Curie, Paris, France, **2** IGF, University of Montpellier, CNRS–INSERM, Montpellier, France, **3** Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, PSL Research University, CNRS UMR8640. Ecole Normale Supérieure, Paris, France

\* [tatiana.caneque-cobo@curie.fr](mailto:tatiana.caneque-cobo@curie.fr) (TC); [raphael.rodriguez@curie.fr](mailto:raphael.rodriguez@curie.fr) (RR)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Müller S, Versini A, Sindikubwabo F, Belthier G, Niyomchon S, Pannequin J, et al. (2018) Metformin reveals a mitochondrial copper addiction of mesenchymal cancer cells. PLoS ONE 13(11): e0206764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206764>

**Editor:** Rajeev Samant, University of Alabama at Birmingham, UNITED STATES

**Received:** August 1, 2018

**Accepted:** October 18, 2018

**Published:** November 6, 2018

**Copyright:** © 2018 Müller et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** Results incorporated in this article have received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement No [647973]), Emergence Ville de Paris, and Ligue Contre le Cancer (Equipe Labellisée). We thank the ICP-MS platform at the Institut de Physique du Globe de Paris, which is

## Abstract

The clinically approved drug metformin has been shown to selectively kill persister cancer cells through mechanisms that are not fully understood. To provide further mechanistic insights, we developed a drug surrogate that phenocopies metformin and can be labeled *in situ* by means of click chemistry. Firstly, we found this molecule to be more potent than metformin in several cancer cell models. Secondly, this technology enabled us to provide visual evidence of mitochondrial targeting with this class of drugs. A combination of fluorescence microscopy and cyclic voltammetry indicated that metformin targets mitochondrial copper, inducing the production of reactive oxygen species in this organelle, mitochondrial dysfunction and apoptosis. Importantly, this study revealed that mitochondrial copper is required for the maintenance of a mesenchymal state of human cancer cells, and that metformin can block the epithelial-to-mesenchymal transition, a biological process that normally accounts for the genesis of persister cancer cells, through direct copper targeting.

## Introduction

Metformin is a clinically approved biguanide drug used in the management of type 2 diabetes [1]. The observation that treatments with metformin reduced risks of cancers in diabetic patients has prompted the search for mechanisms through which this molecule operates in cancer cells [2, 3]. Metformin has been proposed to decrease glucose levels by activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in hepatocytes resulting in a reduced activity of acetyl-CoA carboxylase and an induction of fatty acid oxidation [4]. Furthermore, it was shown that biguanides decrease the Krebs cycle [5] and inhibit complex I of the electron transport chain (ETC) as well as ATP synthase in cancer cells and in isolated mitochondria [6, 7]. Furthermore, inhibition of complex I of the ETC by metformin was shown to reduce tumorigenesis [8]. Although it has been proposed that metformin acts on mitochondria and alters metabolism in cancer cells [9], there is of yet no direct visual evidence that biguanides physically accumulate in mitochondria. Importantly, metformin and the structural variant phenformin selectively target persister



supported by IPGP multidisciplinary program PARI, and by Paris–IdF region SESAME Grant no. 12015908.

**Competing interests:** RR, SM and TC have filed provisional patent applications related to metformin derivatives, used as therapeutics and diagnostic tools. All other authors declare no competing interests.

cancer cells [5] and synergize with conventional chemotherapy [10, 11], through mechanisms that remain poorly understood. Cancer cells can undergo phenotypic alterations reminiscent of that observed during normal embryogenic development by going through epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), to acquire physical properties allowing these cells to detach from primary sites and give rise to distal secondary tumors. Cells able to adopt such a metastable state have been shown to be refractory to conventional chemotherapies and these persist cancer cells have thus been associated to cancer relapse. In light of their activity in cancer, it is conceivable that biguanides directly alter EMT. Furthermore, biguanides interact with metals *in vitro* including copper [12, 13], hinting towards a hypothesis whereby formation of metal complexes in cells could directly affect biological processes reliant on these metals, putative mechanistic targets of biguanides.

To investigate the subcellular localization of metformin in an unbiased manner, we designed a surrogate drug that could be labeled with a fluorophore in cells using click chemistry. A similar strategy was instrumental in identifying lysosomal iron as a mechanistic target of salinomycin in models of mesenchymal breast cancer cells, thereby illuminating a role of iron in the maintenance of these cells [14]. Using this approach, we identified mitochondria as a targeted organelle of metformin, providing unprecedented visual evidence of the accumulation of biguanides in this cellular compartment. Furthermore, we found that metformin directly impacts on mitochondrial copper levels in cancer cells, leading to mitochondrial stress and apoptosis. Importantly, we observed that mesenchymal cancer cells are addicted to copper and that metformin inhibits EMT in these cells. Taken together, our findings reveal mitochondrial copper as a druggable target in cancer cells that can be exploited to prevent the genesis of mesenchymal cancer cells.

## Materials and methods

### Reagents

Copper chloride (CuCl<sub>2</sub>, 459097, Sigma Aldrich), Ferrostatin-1 (Fer-1, SML0583, Sigma Aldrich, 10 μM for 72 h), human epidermal growth factor (EGF, 130-093-825, Miltenyi Biotech, 100 ng/mL for 72 h), carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, 50 μM), Metformin (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride, J63361, Alfa Aesar, 12 mM unless stated otherwise), Metforminyn (Met, in-house drug, 2 mM unless stated otherwise), Necrostatin-1 (N9037, Sigma Aldrich, 20 μM for 72 h), Oncostatin M (OSM, 295-OM-010, R&D, 100 ng/ml for 72 h), TGF-β (TGF-β, D1183, Selleckchem, 15 ng/ml for 72 h), DyLight 488 Phalloidin (12935S, Cell Signaling Technology, IF 1:40), Trypan blue solution 0.4% (EVE Cell Counting Slides, NanoEn-Tek kit, #E1020), Turn-off Cu<sup>2+</sup> probe [24] (10 μM for 1 h for FACS and IF experiments), Turn-on Cu<sup>+</sup> probe [25] (1 μM for 30 min for FACS experiments), Turn-off Fe<sup>2+</sup> probe [26] (1 μM for 1h for FACS experiments), Z-VAD-FMK (550377, BD Biosciences, 50 μM for 72 h).

### Antibodies

5' AMP-activated protein kinase subunit α (AMPKα, 2532, Cell Signaling, WB 1:1000), AMPKα phosphorylated Thr172 (phospho-AMPKα-Thr172, 2535, Cell Signaling, WB 1:1000), Caspase 3 (9665S, Cell Signaling Technology, WB 1:500), CD133-PE (130-090-853, MACS Myltenyi Biotec, FC 1:100), CD24-APC (2155590, Sony Biotechnology Inc., FC 1:100), CD44-Alexa-Fluor-647 (NB500-481AF647, Novus Biologicals, FC 1:1000), CD44-PE (FAB4948P, R&D Systems, FC 1:100), Copper uptake protein 1 (Ctr1, ab129067, Abcam, WB 1:1000 or FC 1:100), Cytochrome c (12963, Cell Signaling Technology, IF 1:500), Cytochrome c oxidase subunit 4 (Cox4, ab16056, Abcam, WB 1:2000), E-cadherin (20023195, Cell Signaling Technology, WB 1:1000), E-cadherin (610181, BD Biosciences, IF 1:200), Fibronectin (F0791,

Sigma Aldrich, WB 1:1000), Glucose transporter 1 (GLUT1, 07–1401, Upstate Millipore, WB 1:1000), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 2118, Cell Signalling Technologies, WB 1:1000), Slug (9585S, Cell Signaling Technology, WB 1:500), Insulin-like growth factor 1 phosphorylated Tyr1131/Tyr1146 (IGF-1-P, 3021, Cell Signaling Technologies, WB 1:1000), Snail (3895, Cell Signaling Technology, WB 1:500), Superoxide dismutase 1 (SOD1, ab13498, Abcam, WB 1:1000),  $\gamma$ -Tubulin (T5326, Sigma Aldrich, WB 1:2000), Twist (sc-81417, Santa Cruz, WB 1:200), Vimentin (3932, Cell Signaling Technology, WB 1:500, 5741S, Cell Signaling Technology, WB 1:500), Zeb1 (sc-81428, Santa Cruz Biotechnology, WB 1:500), Zeb2 (sc-271984, Santa Cruz, WB 1:200). Secondary antibodies for WB: HRP anti-Mouse (A90-116P, Bethyl Laboratories, WB 1:30000) and HRP anti-Rabbit (A120-108P, Bethyl Laboratories, 1:30000). Secondary antibodies for IF and FC: Alexa Fluor 488 conjugate (A-11017 Mouse, A-11008 Rabbit, Life Technologies, IF 1:500), Alexa Fluor 594 conjugate (A-11032 Mouse, A-11072 Rabbit, Life Technologies, IF 1:500), Alexa Fluor 647 conjugate (A-20991 Rabbit, A-20990 Mouse, Life Technologies, IF 1:500). All antibodies were diluted in blocking solution (2 or 5% BSA, 0.1% Tween-20/TBS).

### General information of chemical synthesis

All starting materials were purchased from commercial sources and used without further purification, or purified according to *Purification of Laboratory Chemicals* (Armarego, W.L.F., Chai, C.L.L. 5<sup>th</sup> edition). Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using TLC silica gel coated aluminum plates 60F-254 (Merck). Metforminyn was purified using a Combiflash RF+ Teledyne Isco system. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 300 MHz and <sup>13</sup>C NMR at 75 MHz at 298 K. Chemical shifts were reported as  $\delta$  values are expressed in ppm using the residual non-deuterated solvent as internal standard and coupling constants (*J*) in Hz. The following abbreviations are used: s, singlet; t, triplet; td, triplet doublet. UPLC trace and electrospray mass spectrum were obtained from a Waters Acquity SQD2 UPLC-MS system. HRMS was measured with a Bruker maXis LC-QTOF.

### Synthesis of metforminyn (Met)

In a sealed tube, commercially available dicyandiamide (169 mg, 2.0 mmol) and *N*-methylbut-3-yn-1-amine (200 mg, 2.4 mmol) were suspended in 20 mL of xylene, then 2.5 mL of a 1 M aq. HCl solution were added. The tube was closed and heated at 140°C for 5 h. After this time, the reaction was cooled to RT and MeOH was added, then the solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified by chromatography using a combiflash apparatus (DCM/MeOH, 10 to 20%) to afford Met as a white solid (97 mg, 24%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD)  $\delta$  3.60 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.09 (3H, s), 2.50 (2H, td, *J* = 7.0, 3.0 Hz), 2.36 (1H, t, *J* = 3.0 Hz). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD)  $\delta$  160.8, 160.5, 81.9, 71.4, 50.3, 36.7, 18.3. HRMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 168.1244, found 168.1246.

### Cell lines

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (14190–094, 500 mL, Gibco), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (31331–028, 500 mL, Gibco), DMEM GlutaMAX (61965059, Thermo Fisher Scientific), Fetal Bovine Serum (FBS, 10270–106, Gibco), Hydrocortisone (H0888, Sigma Aldrich), Insulin (I0516 or I9278, Sigma Aldrich), PEN-STREP (DE17-602E, BioWhittaker, Lonza), Puromycin dihydrochloride (A11138-02, Life Technologies). MCF-7 (ATCC, HTB-22), MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26), MDA-MB-468 (ATCC, HTB-132), DU-145 (HTB-81) and circulating tumor cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL) and incubated at 37°C with 5%

CO<sub>2</sub>. To induce EMT, cells were treated with epidermal growth factor EGF (100 ng/mL) (Miltenyi Biotec) for 72 h. The human mammary epithelial cell line infected with a retrovirus carrying hTERT, SV40 and the oncogenic allele *HrasV12*, named HMLER cells were a generous gift from A. Puisieux. HMLER cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, 10 µg/mL insulin, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 10 ng/mL hEGF, and 0.5 µg/mL puromycin. A mycoplasma test was performed using PCR mycoplasma detection kit (G238, Applied Biological Materials).

### Cell viability

Cell viability was carried out by plating 1000 cells/well in 96-well plates using CellTiter-Blue viability assay according to the manufacturer's protocol. Cells were treated as indicated for 72 h. CellTiter-Blue reagent (G8081, Promega) was added after 72 h treatment and cells were incubated for 1–2 h before recording fluorescence intensities (ex. 560/20 nm; em. 590/10 nm) using a Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader. Trypan blue exclusion and cell viability measurements were performed using an EVE Automated Cell Counter (NanoEnTek, #E1000) and EVE Cell Counting Slides. 10 µL of cell suspension were mixed with 10 µL of 0.4% Trypan solution and a final volume of 10 µL of this mixture used to count cells and assess viability according to the manufacturer's protocol.

### Cell imaging

For immunofluorescence, cells were blocked with 2% BSA, 0.2% Tween-20/PBS (blocking buffer) for 20 min at RT. Cover-slips were incubated with 50 to 100 µL of diluted primary antibodies in blocking buffer 1 h at RT. Cover-slips were then washed three times with blocking buffer and incubated as described above with the appropriate secondary antibodies for 1 h. Cover-slips were washed three times with PBS and mounted using Vectashield Mounting Medium with DAPI (H-1200, VECTOR Laboratories). Fluorescence images were acquired using a Deltavision real-time microscope (Applied Precision). 60×/1.4NA and 100×/1.4NA objectives were used for 2D and 3D acquisitions that were deconvoluted with SoftWorx (Ratio conservative—15 iterations, Applied Precision) and processed with ImageJ.

### Chemical labeling of Met in cells

Cells were cultured at ~80% confluence and were treated with 0.3 mM Met for 3h. Cell were fixed with formaldehyde (2% in PBS, 12 min) prior to permeabilization (Triton X-100, 0.1% in PBS, 5 to 10 min) and washed three times with 1% BSA/PBS. The click reaction cocktail was prepared from Click-iT EdU Imaging kits (C10337, Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Briefly, mixing 430 µL of 1× Click-iT reaction buffer with 20 µL of CuSO<sub>4</sub> solution, 1.2 µL Alexa Fluor azide, 50 µL reaction buffer additive (sodium ascorbate) to reach a final volume of ~500 µL. Cover-slips were incubated with the click reaction cocktail in the dark at RT for 30 min, then washed three times with PBS. Immunofluorescence was then performed as indicated.

### Western blotting

Cells were treated as indicated and then washed with PBS. Proteins were solubilized in Laemmli buffer containing benzonase (70664–3, VWR, 1:100) added. Extracts were incubated at 37°C for 1 h. Proteins were resolved using pre-cast protein gels (Biorad, Mini-PROTEAN TGX, 4–20%, Cat# 456–1095), a Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad, Cat# 1704150) and Trans-Blot Turbo transfer buffer (20% EtOH). Membranes were incubated with primary antibodies

overnight in 5% BSA in PBS, 0.1% Tween-20. Primary antibodies were detected using horse-radish-peroxidase (HRP) conjugated secondary antibodies (Jackson Laboratories) and the Super Signal enhanced chemiluminescent detection kit (Thermo Scientific, Super Signal West Pico PLUS, Cat# 34580). Signals were revealed using a Fusion Solo S Imaging System (Vilber).

### Flow cytometry

Metal-specific probes were synthesized as previously described. Cells were treated as indicated in the figures. For mitochondrial copper and iron probes, cells were incubated with the relevant probe prior to being analyzed by flow cytometry. Cells were trypsinized (TrypLE Express Enzyme, Life Technologies, 12605010) and washed twice with ice cold PBS. For antibodies, cells were suspended in ice cold PBS containing 2% FBS and 1 mM EDTA (incubation buffer) and incubated for 20 min at 4°C with the relevant antibody. Cells were then washed twice with ice cold PBS and suspended in incubation buffer prior to being analyzed by flow cytometry. For each condition, at least 100,000 cells were counted. Data were recorded on a BD Accuri C6 (BD Biosciences) and processed using Cell Quest (BD Biosciences) and FlowJo (FLOWJO, LLC) software.

### Cellular levels of copper and iron

Cells were incubated with the relevant probes as described in Reagents section. Cells were then analyzed either by fluorescence microscopy or flow cytometry as described in Cell Imaging and Flow Cytometry sections.

### Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry experiments were performed with a three-electrode cell under argon. Saturated Calomel Electrode (SCE) was used as reference, a steady Glassy Carbon (GC) electrode of diameter 3 mm was selected as working electrode and a Platinum wire as counter-electrode. All cyclic voltammograms were recorded at RT with a  $\mu$ -autolab III from Metrohm using Nova software with a scan rate of 2 V/s. MeCN was used as a degassed HPLC grade from Carlo Erba. Water was mQ H<sub>2</sub>O. Solutions with copper were prepared with 0.3 M *n*Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> (180 mg) in MeCN (1.8 mL) and 200  $\mu$ L of a 20 mM Cu(MeCN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> stock solution in MeCN (7.4 mg/mL). Then 20  $\mu$ L of a 400 mM metformin or Met stock solution in mQ H<sub>2</sub>O (or PBS) (66.2 mg/mL or 112.0 mg/mL respectively) was added. Other MeCN solutions were prepared with 0.3 M *n*Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> (200 mg) in MeCN (2 mL) and 20  $\mu$ L of a 200 mM Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> stock solution in mQ H<sub>2</sub>O (48.4 mg/mL), or/and 20  $\mu$ L of a 400 mM metformin or Met stock solution in mQ H<sub>2</sub>O (66.2 mg/mL or 112.0 mg/mL respectively). All aqueous solutions were prepared with 0.3 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (85.2 mg) in mQ H<sub>2</sub>O (2 mL) and 20  $\mu$ L of 200 mM Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> stock solution in mQ H<sub>2</sub>O (48.4 mg/mL), or/and 20  $\mu$ L of a 400 mM metformin stock solution in mQ H<sub>2</sub>O (66.2 mg/mL).

### ROS levels

Mitochondrial ROS was measured using MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator (M36008, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. In brief, cells were treated for the indicated time with the red fluorescent dye, trypsinized, washed and resuspended in ice cold PBS containing 2% FBS and 1 mM EDTA prior to being analyzed by flow cytometry.

### Mitochondrial membrane potential

Measurements were performed using the MitoProbe JC-1 assay kit (M34152, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. In brief, cells were treated with 2  $\mu$ M JC-1

or CCCP (*m*-chlorophenylhydrazone) control for the indicated time. Cells were then trypsinized, washed and resuspended in ice cold PBS containing 2% FBS and 1 mM EDTA prior to being analyzed by flow cytometry.

### Cell death

Cells were treated as indicated in the figures. After treatment, cell death was quantified using Annexin V-FITC (A)/Propidium Iodide (PI) assay according to the manufacturer's protocol (Annexin V-FITC apoptosis detection kit II, 556570, BD Pharmingen). Data were analyzed by a LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and processed using Cell Quest (BD Biosciences) and FlowJo (FLOWJO, LLC) software.

### ICP-MS analyses

Glass vials equipped with Teflon septa were cleaned with nitric acid 65% (VWR, Suprapur, 1.00441.0250), washed with ultrapure water (Sigma Aldrich, 000000001012620500) and dried. Cells were treated as indicated and harvested using trypsinization (TrypLE Express Enzyme, Life Technologies, 12605010) followed by two washes with DPBS (Life Technologies, 14190169). Cells were then transferred to the cleaned vials and this material was lyophilized. Samples were subsequently digested using nitric acid 65% (VWR, Suprapur, 1.00441.0250) overnight followed by heating to 80°C for 2 h. Samples were diluted with ultrapure water (Sigma Aldrich, 000000001012620500) to a total concentration of 0.475N nitric acid and transferred to metal-free centrifuge vials (VWR, 89049–172) for subsequent ICP-MS analyses. Cu concentrations were measured using an Agilent 7900 ICP-QMS in low-resolution mode. Sample introduction was achieved with a micro-nebulizer (Micro-Mist, 0.2ml/min) through a Scott spray chamber. Cu was measured using a collision-reaction interface with helium gas (5mL/min) to remove polyatomic interferences. Scandium and indium internal standards were injected after inline mixing with the samples to verify the absence of signal drift and matrix effects. A mix of certified standards was measured at concentrations spanning those of the samples to convert count measurements to concentrations in the solution. Uncertainties on sample concentrations are calculated using algebraic propagation of ICP-MS blank and sample counts uncertainties. Results were normalized by dry weight and cell number.

### Quantification and statistical analyses

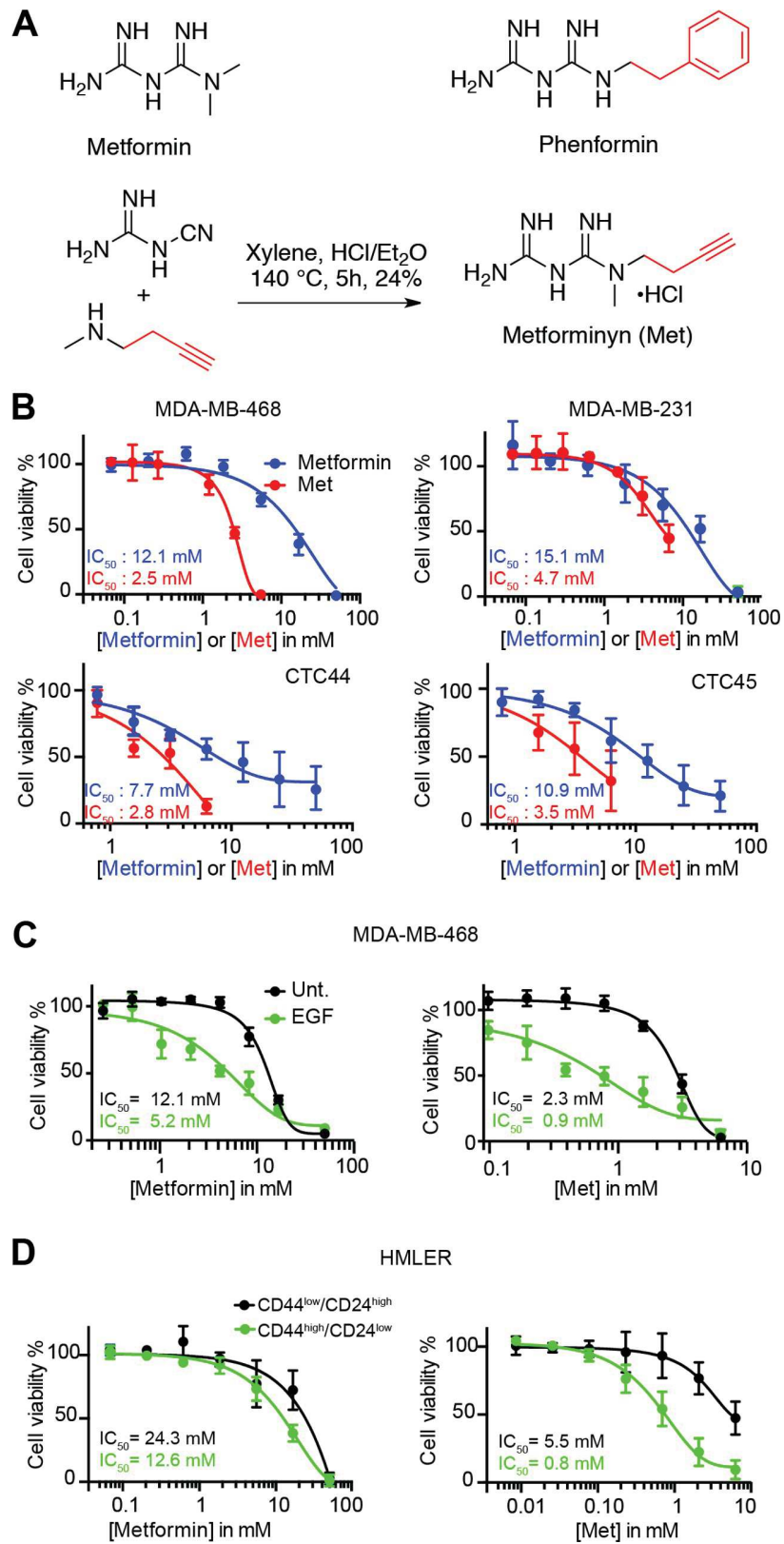
All results are presented as means with their standard deviation (SD), unless stated otherwise. Data are representative of at least three independent biological replicates, unless stated otherwise. Unpaired *t*-tests were used to calculate significance unless stated otherwise. P values are defined as: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

## Results and discussion

### Development of a potent clickable metformin surrogate

We set out to develop a surrogate of metformin that would allow for direct visualization of the subcellular sites of action of biguanide drugs. To this end, we synthesized an alkyne-containing analogue we named metforminyn (Met) (Figs 1 and S1, S2, S3 and S4). This analogue was designed after metformin and phenformin, where distal methyl/benzyl substituents have been replaced by a terminal alkyne suitable for labeling in cells by means of click chemistry [15–19]. We anticipated that introducing a functional group at this position would lead to a small molecule probe that retains its activity against cancer cells. A comparative evaluation of metformin







**Fig 1. Metformin and more potent surrogate Met preferentially alter the proliferation of cancer cells in a mesenchymal state.** (A) Molecular structures of metformin, phenformin and synthesis of Met. (B) Dose response viability curves of cancer cells treated as indicated for 72 h. (C) Dose response viability curves of cells in epithelial (dark) and mesenchymal (green) states of MDA-MB-468 cells treated as indicated for 72 h. (D) Dose response viability curves of HMLER cells in epithelial (dark) and mesenchymal (green) states treated as indicated for 72 h. Data points and error bars, mean values and SD of three independent biological replicates. Cells were treated at the  $IC_{50}$  concentration at 72 h of Metformin or Metforminyn respectively, unless stated otherwise. See also [S1](#), [S2](#), [S3](#), [S4](#) and [S5](#) Figs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206764.g001>

and Met against two triple negative human breast cancer cell lines, and circulating tumor cells (CTC) from patients with colorectal cancer [20], showed that the synthetic analogue exhibited a higher potency compared to metformin (Fig 1).

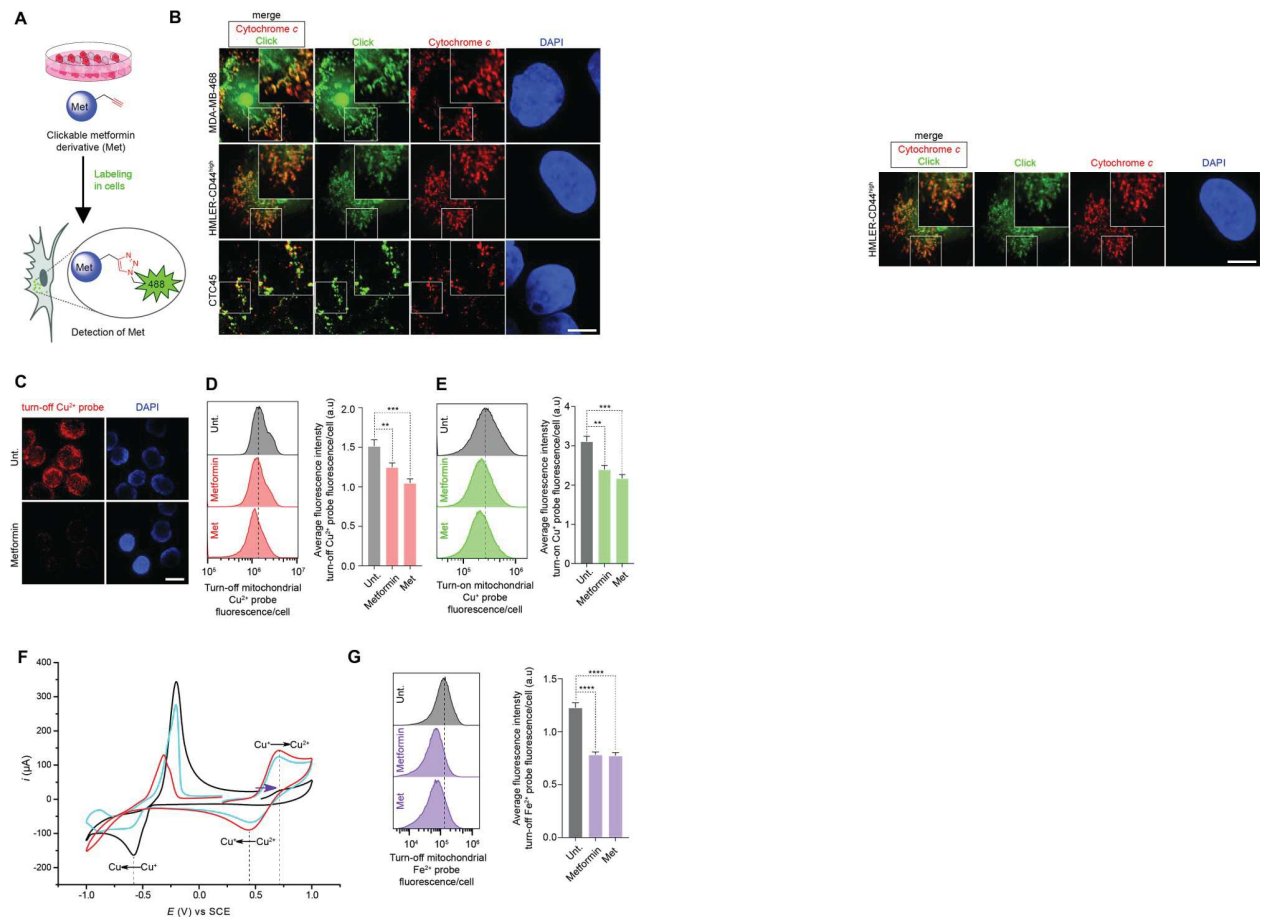
We then set out to investigate the effect of metformin and Met on cancer cells undergoing EMT. This process of EMT can be artificially induced from normal epithelial mammary cells or triple negative breast cancer cells, leading to cells with a pronounced mesenchymal phenotype [21, 22]. Importantly, we found that Met was more potent compared to metformin in these models, exhibiting a higher toxicity against MDA-MB-468 triple negative breast cancer cells transiently induced into a mesenchymal state using epidermal growth factor (EGF) [23] (Fig 1). A similar trend was observed for HMLER CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> mesenchymal cells compared to their HMLER CD44<sup>low</sup>/CD24<sup>high</sup> [21] epithelial counterpart (Fig 1).

To further investigate whether Met induced similar phenotypic alteration compared to metformin, we comparatively evaluated the effect of these molecules on levels of protein previously shown to be altered by metformin. Notably, we observed that metformin and Met increased levels of phosphorylated AMPK $\alpha$ -Thr172 and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) whereas it decreased levels of GLUT1 (Glucose transporter 1) and the phosphorylated form of insulin-like growth factor 1 (IGF1 receptor-P) receptor (S5 Fig). Taken together, these data indicate that Met functionally phenocopied metformin in several models including mesenchymal cancer cells making it a suitable surrogate for subsequent cell imaging studies.

### Metformin targets mitochondrial copper

Cancer cells treated with Met were subjected to labeling in cells by means of click chemistry [14] to identify putative mechanistic sites of action of biguanides (Fig 2). In breast cancer cells, labeled Met co-localized with cytochrome *c*, a cellular component that uniquely characterizes mitochondria, along with weaker nuclear staining and larger *foci* that resembled that observed for nucleolar proteins (Figs 2 and S6). In contrast, labeled Met could not be detected in the nucleus of CTC that responded to treatment (Fig 2), consistent with the idea that mitochondria are functional target organelles of biguanides. Remarkably, labeling of Met in cells, a chemical reaction that is normally catalyzed by  $Cu^{+}$ , could be performed *in situ* without the need to incubate cells with additional copper catalyst (S6 Fig). Thus, the natural mitochondrial abundance of endogenous copper was sufficient to promote labeling of Met in native conditions. This provided further evidence that Met chemically interacted with copper in this organelle, in agreement with the previously reported capacity of metformin to form complexes with copper *in vitro* [12, 13]. Moreover, in agreement with metformin directly targeting mitochondria, fluorescence of labeled Met was significantly reduced upon co-treatment with excess metformin competitor (S7 Fig).

This finding encouraged us to investigate the effect of metformin and Met on the mitochondrial levels of  $Cu^{2+}$  using a selective turn-off fluorescent probe [24]. Metformin and Met induced a reduction in fluorescence of this turn-off probe in MDA-MB-468 cells, as defined by microscopy and fluorescence activated cell sorting (FACS), indicating increased levels of



**Fig 2. Biguanides directly target mitochondria and promote copper oxidation.** (A) Schematic illustration of the labeling of Met in cells using click chemistry. (B) Fluorescence microscopy images of labeled Met (green). Cells were treated with Met and subjected to click-labeling as described in **Methods**. Mitochondria were detected using cytochrome *c* immunostaining (red) and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stains nuclear DNA (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. (C) Fluorescence microscopy detection of  $\text{Cu}^{2+}$  in cancer cells treated as indicated for 48 h. Scale bar, 10  $\mu$ m. (D) Flow cytometry analysis of mitochondrial  $\text{Cu}^{2+}$  in cancer cells treated as indicated for 48 h. Bar chart represents an average of three independent experiments. (E) Flow cytometry analysis of mitochondrial  $\text{Cu}^+$  in cancer cells treated as indicated for 48 h. Bar chart represents an average of three independent experiments. (F) Cyclic voltammetry measurements towards oxidation potentials (purple arrow) of a  $\text{Cu}^+$  solution. Data recorded in the absence (black) and presence of 2 mol equiv. metformin (blue) or 2 mol equiv. Met (red). Redox peak potentials are marked with dashed lines. (G) Flow cytometry analysis of  $\text{Fe}^{2+}$  in cancer cells treated as indicated for 48 h. MDA-MB-468 cells were used in **Fig 2C, 2D, 2E and 2G** and were treated as described in **Methods**. Cells were treated at the  $\text{IC}_{50}$  concentration at 72 h of Metformin or Metforminyn respectively, unless stated otherwise. See also **S6, S7, S8, S9, S10 and S11** Figs. Bar chart represents an average of three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206764.g002>

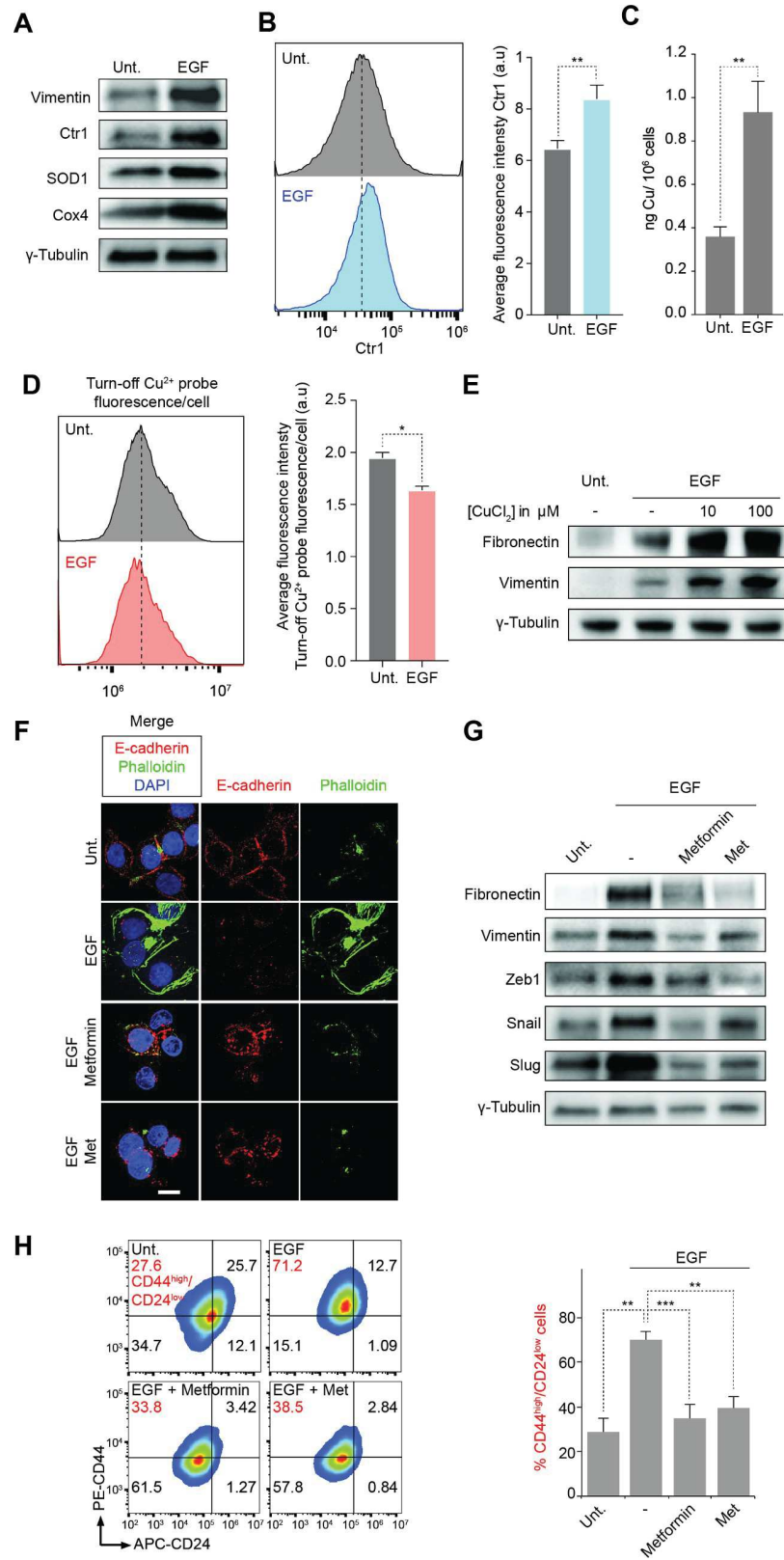
$\text{Cu}^{2+}$  (**Fig 2**). Furthermore, we found that metformin and Met decreased mitochondrial  $\text{Cu}^+$  levels using a selective turn-on fluorescent probe [25] (**Fig 2**). Importantly, metformin altered the redox properties of copper as defined by the occurrence of cyclic voltammetry peaks characteristic of quasi-reversible couples (**Fig 2**), and treatment with metformin or Met led to reduced protein level of the copper uptake protein 1 (Ctr1) in these cells (**S8 Fig**). These data indicated that increased levels of mitochondrial  $\text{Cu}^{2+}$  occurred as a result of biguanides directly interacting with, and promoting oxidation of  $\text{Cu}^+$  in this organelle, rather than by increasing cellular uptake of copper. For instance, Met was more effective at promoting oxidation of  $\text{Cu}^+$  and preventing reduction of  $\text{Cu}^+$  compared to metformin. This indicated that Met is more effective in stabilizing copper ions compared to metformin, which was in line with the higher potency of this analogue in cell based assays compared to the parent molecule. It is

noteworthy that metformin and Met also increased levels of mitochondrial  $\text{Fe}^{2+}$  as defined by flow cytometry using a selective turn-off probe (Fig 2) [26], and cyclic voltammetry showed that metformin and Met altered the redox properties of this metal, with metformin being more effective than Met (S9 Fig). These data supported a model whereby biguanides can inhibit complex I by hijacking iron from Fe-S clusters. Alternatively,  $\text{Fe}^{3+}$  may also be consumed, acting as an electron scavenger of  $\text{Cu}^+$  oxidation upon treatment with metformin. Consistent with metformin acting as a pro-oxidant of copper in mitochondria and altering the ionic balance of copper and iron, treatment of MDA-MB-468 cells with metformin or Met led to increased levels of reactive oxygen species (ROS) in this organelle accompanied by the reduction of mitochondrial membrane potentials and an alteration of mitochondrial morphology (S10 Fig). Furthermore, cell death induced by metformin or Met was rescued by the caspase 3 inhibitor Z-VAD-FMK but not the ferroptosis and necrosis inhibitors ferrostatin-1 and necrostatin-1 [27], respectively, which was in line with apoptotic cell death taking place as a result of mitochondrial dysfunction (S11 Fig) [28].

### Copper is an essential component of the epithelial-to-mesenchymal transition

The pronounced effect of Met against mesenchymal cancer cells, accumulation of this biguanide in mitochondria and its effect on copper homeostasis in this organelle led us to investigate a putative dependency of mesenchymal cancer cells on mitochondrial copper. Western blot analysis revealed that EGF-induced EMT led to a significant increase of copper-containing proteins including superoxide dismutase 1 (SOD1) and cytochrome *c* oxidase subunit 4 (Cox4), along with increased levels of copper transporter 1 (Ctr1) (Fig 3). We also observed an increase of mitochondrial copper and total copper levels in EGF-treated samples using a combination of FACS and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), respectively (Fig 3). Consistent with previous findings showing that mitochondrial load is higher in persister cancer cells [29, 30], these data suggested that this cell state requires higher needs for energy production, a biological process that heavily relies on metalloproteins and metal co-factors essential to the mitochondrial ETC [31]. Importantly, addition of copper synergized with EGF treatments to shift MDA-MB-468 cancer cells toward a mesenchymal phenotype as defined by increased levels of mesenchymal markers (e.g. Vimentin, Fibronectin) and the proportion of cells harboring a  $\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}$  cell surface marker pattern (Figs 3 and S12). Importantly, we also observed that copper synergized with TGF- $\beta$  treatment to shift HMLER  $\text{CD44}^{\text{low}}/\text{CD24}^{\text{high}}$  cells and DU-145 prostate cancer cells toward a mesenchymal phenotype as defined by increased ratios of cells with a  $\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}$  or  $\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD133}^{\text{high}}$  cell surface marker pattern, respectively, demonstrating a general role of copper in the regulation of EMT in different systems (S12 Fig).

Finally, induction of EMT in MDA-MB-468 cells using EGF was prevented by metformin and Met as defined by the subcellular localization of E-cadherin and phalloidin staining, levels of mesenchymal markers fibronectin, vimentin and EMT-transcription factors (TF) Zeb1, Snail and Slug as well as the proportion of cells harboring a  $\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}$  cell surface marker pattern (Figs 3 and S13). Similarly, this effect of metformin was also observed in MCF-7 breast cancer and in DU-145 prostate cancer cells (S13 Fig). Alternatively, this data may also reflect a preferential cell killing of Met when cells are in a mesenchymal state. Taken together, these data reveal a dependency of mesenchymal cancer cells on mitochondrial copper, providing a rationale for the heightened sensitivity of these cells to biguanides.



**Fig 3. Copper is required to maintain a mesenchymal state of cancer cells.** (A) Western blot analysis of levels of a mesenchymal marker (Vimentin), Ctr1 and copper-containing mitochondrial proteins (SOD1, Cox4) in cell treated with EGF for 72 h. (B) Flow cytometry analysis of Ctr1 protein level in cells treated with EGF for 72 h. (C) ICP-MS analysis of Cu content of cells treated with EGF for 72 h. Error bars represent the standard deviation of four independent analyses. (D) Flow cytometry analysis of  $\text{Cu}^{2+}$  in cells treated with EGF for 72 h. Bar chart represents an average of three independent experiments. (E) Western blot analysis of mesenchymal markers (Vimentin, Fibronectin) in cells treated as indicated for 72 h. (F) Fluorescence microscopy images of E-cadherin (red) and Phalloidin (green) in cells treated as indicated for 72 h. DAPI stains nuclear DNA (blue). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . (G) Western blot analysis of mesenchymal markers and EMT-TF in cancer cells treated as indicated for 72 h. (H) Flow cytometry analysis of cells surface markers of cancer cells treated as indicated for 72 h and corresponding quantification. Bars and error bars, mean values and SD of three independent biological replicates. MDA-MB-468 cells were used throughout the figure. Cells were treated at the  $\text{IC}_{50}$  concentration at 72 h of Metformin or Metforminyn respectively, unless stated otherwise. See also S12 and S13 Figs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206764.g003>

## Conclusion

To provide insights into mechanisms underlying the effect of metformin in cancer cells undergoing EMT or cancer cells exhibiting a mesenchymal phenotype, we have developed a surrogate probe of this drug that can be chemically labeled in cells by means of click chemistry. This probe is both more potent than metformin in cancer models and enables the visual detection of sites of action of biguanides in fixed cells. We provide visual evidence that biguanides preferentially target mitochondria in several cancer cell lines including cancer cells isolated from patients. Furthermore, the fact that azide-alkyne labeling of Met can be performed in cells in absence of added copper catalyst and that metformin promotes oxidation of  $\text{Cu}^+$  *in vitro* validate mitochondrial copper as a putative mechanistic target of metformin. In line with this, the biologically more potent analogue Met alters copper redox potentials to a greater extent than metformin, whereas the latter preferentially affects that of iron *in vitro*. Importantly, we show that metformin impacts levels of mitochondrial  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ , providing a mechanistic rationale underlying inhibition of the ETC and ATP-synthase and suggesting that effects on AMPK occurs downstream of mitochondrial targeting. This investigation shows that cancer cells in a mesenchymal state are more sensitive to biguanides compared to their epithelial state and that this effect relies on mitochondrial copper targeting. Increased levels of mitochondrial copper-containing and copper uptake proteins during EMT, together with the synergistic effect of copper and growth factors of cytokines to induce EMT, support a prevalent role of mitochondrial copper in the maintenance of a mesenchymal state of cancer cells. We show a central role of copper in the regulation of the EMT program, a process associated to the genesis of persister cancer cells, metastasis and cancer relapse. In this context, inhibition of EMT by biguanides strongly argues in favor of a cross-talk between mitochondria and the nucleus, potentially involving mitochondrial metabolites that could regulate EMT plasticity. Moreover, it is conceivable that in models of diabetes [32], metformin targets mitochondrial copper to promote mitochondrial dysfunction, forcing cells to switch to a lower yielding anaerobic mode. These findings strengthen the notion that cancer cells exhibiting a mesenchymal phenotype are susceptible to mitochondrial copper targeting, which paves the way toward the establishment of novel therapeutic strategies [33–36].

## Supporting information

**S1 Fig.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Met.**  
(PDF)

**S2 Fig.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of Met.**  
(PDF)



**S3 Fig. UPLC trace analysis of purified Met.**

(PDF)

**S4 Fig. Electrospray mass spectrum of Met.**

(TIF)

**S5 Fig. Western blot analysis of GAPDH, GLUT1, IGF1 receptor-P, AMPK $\alpha$ , and P-AMPK $\alpha$ -Thr172 levels.** MDA-MB-468 cells were treated with metformin or Met as indicated for 72 h.

(TIF)

**S6 Fig. Fluorescence microscopy imaging of labeled Met and competition experiments.**

Metforminyn was labeled (green) in cells in the presence or absence of Met, and with 100 equivalents of Metformin (0.3 mM Met and 30 mM metformin).

(TIF)

**S7 Fig. Fluorescence microscopy imaging of labeled Met.** (A) Metforminyn was labeled (green) in cells in the presence of added copper catalyst. (B) Metforminyn was labeled (green) in cells in absence of added copper catalyst. The indicated cell lines were treated with Met prior to being subjected to click-labeling as described in Method Details. Mitochondria were detected using cytochrome *c* immunostaining or mitotracker (red), DAPI stains nuclear DNA (blue). Scale bars, 10  $\mu$ m.

(TIF)

**S8 Fig. Western blot and flow cytometry analyses of Ctr1 levels.** (A) Western blot analysis of Ctr1 levels in MDA-MB-468 cells treated as indicated for 72 h. (B) Flow cytometry analysis of Ctr1 levels in MDA-MB-468 cells treated as indicated for 72 h.

(TIF)

**S9 Fig. Cyclic voltammetry analysis of an iron(III) solution.** Data recorded towards reduction potentials (purple arrow) in the absence (black) and presence of 2 mol. equiv metformin (blue) or 2 mol. equiv metforminyn (red). Redox peak potentials are marked with dashed lines.

(TIF)

**S10 Fig. Analysis of mitochondrial dysfunction.** (A) Flow cytometry analysis of mitochondrial ROS in MDA-MB-468 cells treated as indicated for 48 h. (B) Quantification of flow cytometry data monitoring mitochondrial membrane potentials in MDA-MB-468 cells treated as indicated for 48 h. CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) was used as positive control. Bars and error bars, mean values and SD of three independent biological replicates. (C) Fluorescence microscopy analysis of mitochondrial morphology in cells treated as indicated. MDA-MB-468 cells were treated as indicated for 48 h. Mitochondria were detected using cytochrome *c* immunostaining (grey), DAPI stains nuclear DNA (blue). Scale bars, 10  $\mu$ m.

(TIF)

**S11 Fig. Flow cytometry and western blot analyses of apoptosis.** (A) Quantification of flow cytometry data monitoring Annexin V-FITC (AN) and Propidium Iodide (PI) fluorescence in MDA-MB-468 cells treated as indicated for 72 h. Bars and error bars, mean values and SD of three biological replicates. (B) Western blot analysis of caspase 3 cleavage. MDA-MB-468 cells were treated as indicated for 72 h.

(TIF)



**S12 Fig. Flow cytometry analysis of mesenchymal phenotypes.** (A) MDA-MB-468 breast cancer cells were treated with EGF and CuCl<sub>2</sub> as indicated for 72 h. (B) Transformed human mammary epithelial HMLER CD44<sup>low</sup>/CD24<sup>high</sup> (HMLER CD24<sup>high</sup>) cells were treated with TGF- $\beta$  and CuCl<sub>2</sub> as indicated for 72h. (C) DU-145 prostate cancer cells were treated with TGF- $\beta$  and CuCl<sub>2</sub> as indicated for 72 h. Bars and error bars, mean values and SD of three independent biological replicates.  
(TIF)

**S13 Fig. Flow cytometry and western blot analyses of the effect of metformin on EMT.** (A) Western blot analysis of mesenchymal markers and EMT-TF in MDA-MB-468 breast cancer cells treated as indicated for 72 h. (B) Bar chart of viable cells using Trypan blue exclusion of MDA-MB-468 breast cancer cells treated as indicated for 72h. (C) Flow cytometry analysis of cells surface markers of MCF-7 cells treated as indicated for 72 h and corresponding quantification. Bars and error bars, mean values and SD of three independent biological replicates. (D) Western blot analysis of mesenchymal markers and EMT-TF in MCF-7 breast cancer cells treated as indicated for 72 h. (E) Flow cytometry analysis of cells surface markers of DU-145 cells treated as indicated for 72 h and corresponding quantification. Bars and error bars, mean values and SD of three independent biological replicates. (F) Western blot analysis of mesenchymal markers and EMT-TF in DU-145 prostate cancer cells treated as indicated for 72 h.  
(TIF)

**S14 Fig. Syntheses supporting information.**  
(PDF)

## Acknowledgments

Results incorporated in this article have received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement No [647973]), Emergence Ville de Paris and Ligue Contre le Cancer (Equipe Labellisée). We thank the ICP-MS platform at the Institut de Physique du Globe de Paris, which is supported by IPGP multidisciplinary program PARI, and by Paris-IdF region SESAME Grant no. 12015908.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Sebastian Müller, Tatiana Cañeque, Raphaël Rodriguez.

**Formal analysis:** Sebastian Müller, Tatiana Cañeque, Raphaël Rodriguez.

**Investigation:** Sebastian Müller, Antoine Versini, Guillaume Belthier, Laurence Grimaud, Tatiana Cañeque.

**Methodology:** Sebastian Müller, Tatiana Cañeque, Raphaël Rodriguez.

**Project administration:** Raphaël Rodriguez.

**Supervision:** Raphaël Rodriguez.

**Validation:** Sebastian Müller, Fabien Sindikubwabo, Supaporn Niyomchon, Julie Pannequin.

**Visualization:** Sebastian Müller.

**Writing – original draft:** Sebastian Müller, Raphaël Rodriguez.

**Writing – review & editing:** Sebastian Müller, Raphaël Rodriguez.

## References

1. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002; 346: 393–403. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012512> PMID: 11832527.
2. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005; 330: 1304–5. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7> PMID: 15849206.
3. Pernicova I, Korbonits M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014; 10: 143–56. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256> PMID: 24393785.
4. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1167–74. <https://doi.org/10.1172/JCI13505> PMID: 11602624.
5. Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 10574–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409844111> PMID: 25002509.
6. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000; 348: 607–14. PMID: 10839993.
7. Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*. 2014; 462: 475–87. <https://doi.org/10.1042/BJ20140620> PMID: 25017630.
8. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*. 2014; 3: e02242. <https://doi.org/10.7554/eLife.02242> PMID: 24843020.
9. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab*. 2014; 2: 12. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-12> PMID: 25184038.
10. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res*. 2009; 69: 7507–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2994> PMID: 19752085.
11. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells—what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13: 497–512. <https://doi.org/10.1038/nrd4253> PMID: 24981363.
12. Zhu M, Lu L, Yang P, Jin X. Bis(1,1-di-methyl-biguanido)copper(II) octahydrate. *Acta Crystallographica Section E*. 2004; 58: m217–m9.
13. Repiscak P, Erhardt S, Rena G, Paterson MJ. Biomolecular mode of action of metformin in relation to its copper binding properties. *Biochemistry*. 2014; 53: 787–95. <https://doi.org/10.1021/bi401444n> PMID: 24433134.
14. Mai TT, Hamai A, Hienzsch A, Cañeque T, Müller S, Wicinski J, et al. Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nat Chem*. 2017; 9: 1025–33. <https://doi.org/10.1038/nchem.2778> PMID: 28937680.
15. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed*. 2001; 40: 2004–21. PMID: 11433435.
16. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed*. 2002; 41: 2596–9. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4) PMID: 12203546.
17. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem*. 2002; 67: 3057–64. PMID: 11975567.
18. Sletten EM, Bertozzi CR. Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int Ed*. 2009; 48: 6974–98. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942> PMID: 19714693.
19. Cañeque T, Müller S, Rodriguez R. Visualizing biologically active small molecules in cells using click chemistry. *Nat Rev Chem*. 2018; 2: 202–2015.
20. Grillet F, Bayet E, Villeronce O, Zappia L, Lagerqvist EL, Lunke S, et al. Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture. *Gut*. 2017; 66: 1802–10. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311447> PMID: 27456153.

21. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008; 3: e2888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888> PMID: 18682804.
22. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. *Cell*. 2016; 166: 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028> PMID: 27368099.
23. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res*. 2007; 67: 9066–76. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0575> PMID: 17909010.
24. Wang H-H, Xue L, Fang Z-J, Li G-P, Jiang H. A colorimetric and fluorescent chemosensor for copper ions in aqueous media and its application in living cells. *New J Chem*. 2010; 34: 1239–42.
25. Dodani SC, Leary SC, Cobine PA, Winge DR, Chang CJ. A targetable fluorescent sensor reveals that copper-deficient SCO1 and SCO2 patient cells prioritize mitochondrial copper homeostasis. *J Am Chem Soc*. 2011; 133: 8606–16. <https://doi.org/10.1021/ja2004158> PMID: 21563821.
26. Petrat F, Weisheit D, Lensen M, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem J*. 2002; 362: 137–47. PMID: 11829750.
27. Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15: 348–66. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.6> PMID: 26775689.
28. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281: 1309–12. PMID: 9721092.
29. Farnie G, Sotgia F, Lisanti MP. High mitochondrial mass identifies a sub-population of stem-like cancer cells that are chemo-resistant. *Oncotarget*. 2015; 6: 30472–86. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5401> PMID: 26421710.
30. Lamb R, Bonuccelli G, Ozsvari B, Peiris-Pages M, Fiorillo M, Smith DL, et al. Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: Understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling. *Oncotarget*. 2015; 6: 30453–71. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5852> PMID: 26421711.
31. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005; 120: 483–95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001> PMID: 15734681.
32. Logie L, Harthill J, Patel K, Bacon S, Hamilton DL, Macrae K, et al. Cellular responses to the metal-binding properties of metformin. *Diabetes*. 2012; 61: 1423–33. <https://doi.org/10.2337/db11-0961> PMID: 22492524.
33. Laws K, Bineva-Todd G, Eskandari A, Lu C, O'Reilly N, Suntharalingam K. A Copper(II) Phenanthroline Metallopeptide That Targets and Disrupts Mitochondrial Function in Breast Cancer Stem Cells. *Angew Chem Int Ed*. 2017; 57: 287–91. <https://doi.org/10.1002/anie.201710910> PMID: 29144008.
34. Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, Friis S, Majera D, Gursky J, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature*. 2017; 552: 194–9. <https://doi.org/10.1038/nature25016> PMID: 29211715.
35. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*. 2015; 11: 9–15. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1712> PMID: 25517383.
36. Müller S, Cañeque T, Acevedo V, Rodriguez R. Targeting Cancer Stem Cells with Small Molecules. *Isr J Chem*. 2017; 57: 239–50.

# Metastatic colorectal cancer cells maintain TGF $\beta$ program and use TGFBI to fuel angiogenesis

Barbara Chiavarina <sup>\*1,2,3,4</sup>, Brunella Costanza <sup>5\*</sup>, Roberto Ronca <sup>6</sup>, Arnaud Blomme <sup>5</sup>, Sara Rezzola <sup>6</sup>, Paola Chiodelli <sup>6</sup>, Ambre Giguelay <sup>1,2,3,4</sup>, Guillaume Belthier <sup>2,4,7,8</sup>, Gilles Doumont <sup>9</sup>, Gaetan Van Simaey <sup>9,10</sup>, Simon Lacroix <sup>9,10</sup>, Takehiko Yokobori <sup>11</sup>, Bilguun Erkhem-Ochir <sup>11</sup>, Vincent Cavailles <sup>2,3,4,12</sup>, Eric Fabbri <sup>2,3,4,13</sup>, Stephanie Gofflot <sup>14</sup>, Olivier Detry <sup>15</sup>, Guy Jerusalem <sup>16</sup>, Serge Goldman <sup>9,10</sup>, Philippe Delvenne <sup>17</sup>, Akeila Bellahcène <sup>5</sup>, Julie Pannequin <sup>2,4,7,8</sup>, Vincent Castronovo <sup>5†</sup> and Andrei Turtoi <sup>1,2,3,4†</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute of Montpellier, Tumor Microenvironment Lab, Montpellier, France

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Montpellier, France

<sup>3</sup>Institut du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

<sup>4</sup>Université de Montpellier, Montpellier, France

<sup>5</sup>Metastasis Research Laboratory, GIGA Cancer, University of Liège, Liège, Belgium

<sup>6</sup>University of Brescia, Department of Molecular and Translational Medicine, Brescia, Italy

<sup>7</sup>Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France.

<sup>8</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France.

<sup>9</sup>Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI), Université libre de Bruxelles (ULB), rue Adrienne Bolland 8, B-6041 Charleroi (Gosselies), Belgium

<sup>10</sup>Nuclear Medicine department, ULB Hôpital Érasme, route de Lennik 808, B-1070 Brussels, Belgium

<sup>11</sup>Department of General Surgical Science, Gunma University Graduate School of Medicine, Gunma, Japan

<sup>12</sup>Cancer Research Institute of Montpellier, Hormon Signaling and Cancer Lab, Montpellier, France

<sup>13</sup>Cancer Research Institute of Montpellier, Oncogenic Pathways in Cancer Lab, Montpellier, France

<sup>14</sup>BIOTHEQUE, University of Liege, Liege, Belgium

<sup>15</sup>Department of Abdominal Surgery, University Hospital, University of Liège, Liège, Belgium

<sup>16</sup>Department of Medical Oncology, University Hospital, University of Liège, Liège, Belgium

<sup>17</sup>Department of Pathology, University Hospital, University of Liège, Liège, Belgium

**Running title:** TGFBI expression fuels angiogenesis in CRC metastases.

**Grant support:** This work was supported with grants from the University of Liège, National Fund for Scientific Research (FNRS) Belgium, Agence Nationale de la Recherche (Labex MabImprove) France and Gunma University (GIAR Research Program for Omics-Based Medical Science) Japan. The CMMI is supported by the European Regional Development Fund (ERDF), the Walloon Region, the Fondation ULB, the Fonds Erasme and “Association Vinçotte Nuclear” (AVN). AT is supported by LabEx MabImprove Starting Grant, SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa\_Inserm\_DGOS\_12553 and he is a Research Fellow of INSERM. A.BE is a Research Director at the FNRS. BC is supported by the Fondation de France grant (No. 00078461) and the foundation Weisbrem-Benenson. RR was supported by Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (IG 2019 ID. 23151 project) and SR by a Fondazione Veronesi Fellowship. No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Disclosure of Potential Conflicts of Interest:** Authors have no conflict of interest to disclose.

\* Equal contribution

† Corresponding Authors:

Andrei Turtoi, PhD

Email: andrei.turtoi@inserm.fr

Vincent Castronovo, MD, PhD

Email: vcastronovo@uliege.fr

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) cells are traditionally thought to be unresponsive to TGF $\beta$  due to mutations of the receptor or/and downstream signalling. CRC cells have been shown to benefit from TGF $\beta$  only indirectly, via stromal cells such as cancer-associated fibroblast. The ability of CRC cells to directly respond to TGF $\beta$  remains unexplored/underestimated and as such a missed opportunity for diagnostic and therapeutic intervention.

**Methods:** We examined the ability of CRC cells from both primary and metastatic tumors to respond to TGF $\beta$  via the induction of TGF $\beta$ -induced protein ig-h3 (TGFBI). The contribution of canonical and non-canonical TGF $\beta$  signalling was examined *in vitro*, while the impact of TGFBI on metastasis and angiogenesis was examined both *in vitro* and *in vivo*. Novel antibodies against TGFBI were raised and their diagnostic/ tumor-targeting value was examined on patient sera and in the mouse model of CRC liver metastasis.

**Results:** We show for the first time that metastatic CRC cells, such as circulating tumor cells, maintain TGF $\beta$  responsiveness. They are characterized by absence of TGF $\beta$  receptor mutations and frequent presence of p53 mutations. The pro-tumorigenic program orchestrated by TGF $\beta$  in CRC cells is facilitated by TGFBI, whose expression was positively regulated by non-canonical TGF $\beta$  signalling. Inhibition of TGFBI was sufficient to significantly reduce liver metastases *in vivo*. We further show that pro-tumorigenic function of TGFBI stems from its ability to stimulate angiogenesis. Levels of TGFBI in sera of CRC patients were higher than in normal individuals and were significantly reduced by chemotherapy. Systemically injected radiolabelled TGFBI antibody selectively targeted metastatic deposits *in vivo*, underscoring the value of this target for both diagnostic and therapeutic purposes.

**Conclusions:** TGF $\beta$  program in CRC cells is not a marginal event, but it rather assures their metastatic capacity and stromal-independence. Proteins resulting from activated TGF $\beta$ -signalling, such as TGFBI, represent novel unexplored diagnostic and therapeutic targets allowing for more specific anti-metastatic therapies.

**Key words:** alternative TGF $\beta$  signaling, liver metastases, endothelial cells.



## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent cause of cancer-related death worldwide, and is usually lethal when associated with liver metastases. Unfortunately, 40% of CRC patients have metastatic deposits in the liver at the time of diagnosis [1]. Our ability to treat metastases is thus the most important aspect of the medical care for CRC patients. Despite decades of research the process of tumor dissemination is insufficiently understood precluding the development of metastasis-specific treatments. It is clear that only a subpopulation of tumor cells is responsible for metastases and among those circulating tumor cells (CTC) are considered as the most probable actors [2, 3]. To make the issue more complex, not only cancer cells, but tumor microenvironment (TME) as well plays an important role. While the cells of the TME have been traditionally considered as accomplices to cancer cells [4], we know today that TME is also an important barrier for tumor development [5]. Early metastatic cells arrive in all but friendly environment and thus require plasticity, especially until tumor-promoting paracrine interactions with the stroma have been established.

TGF $\beta$  and its signalling machinery are important if not the most essential mediators of cancer cell plasticity [6]. Paradoxically, TGF $\beta$  signalling switches the function from tumor-suppressor to tumor-promoter, in particular during colon cancer progression. TGF $\beta$  signalling in epithelial colonic cells synergizes with NOTCH pathway to counteract APC mutation-induced Wnt hyperactivation [7]. Today it is widely accepted that transformation of APC mutated cells ultimately requires their unresponsiveness to TGF $\beta$  signalling that is often achieved through SMAD4 or/and TGF $\beta$ -receptor mutations. It is further established that TGF $\beta$  stimulates CRC progression mainly through cancer-associated fibroblasts (CAF) [8]. CAF supply a plethora of TGF $\beta$ -induced factors, such as MMPs, PDGF, CTGF, etc., that colon cancer cells necessitate to survive, proliferate and invade [9, 10]. The majority of colon cancer cells certainly require the paracrine interaction with CAF. However, when thought at the level of the metastatic cells, inability to respond to TGF $\beta$ -stimulus would make these cells particularly vulnerable. They would not benefit from the TGF $\beta$ -orchestrated autocrine signalling that helps maintain their ability to adapt to the new environment. One thus asks the question whether some CRC cells could maintain TGF $\beta$ -responsiveness despite inactivating mutations in the canonical TGF $\beta$ -signalling machinery. Indeed, this could be achieved via alternative SMAD independent pathways (e.g. ERK, p38) that are intact in most cancer cells [9, 10]. Mutations of TGF $\beta$ -receptors are also not absolutely prohibitive and studies have demonstrated that despite frame-shift mutations the resulting TGFBR2 protein remains functional [11]. Nonetheless, TGF $\beta$ -responsive cancer cells represent

the minority of CRC cell universe and their existence and phenotype remains to date debatable and unknown.

To gain a better insight into the TGF $\beta$ -mediated pro-metastatic program in CRC cells we have investigated the expression pattern and function of a major TGF $\beta$ -induced protein, TGFBI. TGFBI has been cloned as TGF $\beta$ -inducible gene in lung adenocarcinoma cells [12]. TGFBI contains 4 FAS1 domains, which are thought to represent cell adhesion domains conserved between plants and animals [13]. The 4<sup>th</sup> FAS1 domain of TGFBI contains also an RGD motif that has a strong affinity to integrins [14]. A wealth of literature exist on TGFBI function in solid cancer, most of which has been recently reviewed by Yokobori & Nishiyama [15]. Despite this richness of data, there is a significant lack of consensus whether and in which context is the function of TGFBI pro- or anti-tumorigenic. For example, Zhang et al. [16] showed that TGFBI null animals developed rapidly lung and liver malignancies. Opposite to this, Ma et al. [17] demonstrated that overexpression of TGFBI in colon cancer cells enhanced liver metastases. Paradoxically, very few studies on TGFBI have connected its function with TGF $\beta$  activity. However, the fact that TGFBI is modulated by TGF $\beta$ -program renders the function of this protein (tumor promoting or suppressing) cell and context dependent. In the present study we therefore show that TGFBI produced by cancer cells following their activation by TGF $\beta$ , fuels angiogenesis and thus assumes a pro-metastatic function. This finding puts forward TGFBI as a novel therapeutic target that is downstream of TGF $\beta$ , eliminating the need to target the entire pathway and rather focus on specific, metastasis-promoting components.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Human samples**

The ethical committee of the University Hospital Liege approved the use of human material in the present study. All samples were obtained from the institutional Biobank. Patients obtained the information that the residual material could be used for research purpose and the consent is presumed as long as the patient does not oppose (opting-out in line with Belgian law). For immunohistochemistry analysis, 78 colorectal cancer (**Table S2**) and 21 colorectal cancer liver metastases (**Table S3**) patients were included. When available adjacent normal tissue was evaluated as control. For serum measurement of TGFBI levels, 14 normal human individuals along with 17 colorectal cancer patients were enrolled. Treatment information and patient status are given in **Table S1**.

## **Immunohistochemistry**

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections were prepared from primary CRC and CRC-liver metastases lesions. Five  $\mu\text{m}$  thick paraffin sections were deparaffinized three times in xylene for 5 min and hydrated in a methanol gradient (100%, 95%, 70%, and 50%). Blocking of unspecific peroxidase activity was performed for 30 min with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 90% methanol. Following antigen retrieval step (citrate buffer pH6, 95°C, 40 min), tissues were blocked with Protein Block Serum-Free solution (Protein Block Serum-Free Ready-to-Use, catalog no. X0909, Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min at room temperature, and incubated with 1:200 dilution of anti-TGFBI (Cell Signaling, Danvers, USA; catalog no. 2719) overnight at 4°C. Next, samples were washed in PBS and incubated with Histofine MaxPo-Multi HRP-polymer (Nichirei, Tokyo, Japan; cat. no. 414152F) for 30min. Sections were washed three times for 5 min in PBS and then stained with 3,3'-diaminobenzidine solution (Agilent-Dako, cat. no.: GV800). The slides were counter-stained with hematoxylin (Sigma Aldrich, cat. no.: MHS32) and mounted with Eukitt (Orsatech GmbH, Bobingen, Germany). Scoring of protein expression was performed in accordance with the previously published methodology [18]. Briefly, each IHC slide was assessed for the intensity of the staining using the following scale: 0 = no staining, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = strong. The tissue was further evaluated for the extent of positivity (percent positive area) using the following scale: 0 = 0%–25%, 1 = 25%–50%, 2 = 50%–75% and 3 = 75%–100%. The values obtained by each of the two scales were multiplied to yield a composite value called the IHC score. Pictures of representative fields were taken under a Leica DMRB light microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Two independent pathologists scored the samples using the above method and average scores were reported.

## **Immunofluorescence**

Paraffin removal, antigen retrieval and blocking steps were performed as described above. The sections were then washed three times using Tris-buffered saline with 0.05% Tween-20 (TBS-T) and then incubated ON at 4°C with 1<sup>st</sup> antibody, anti-TGFBI or anti-murine IgG (Sigma-Aldrich; catalog no. M5284). Following 5 wash steps at 5 min each, the slides were incubated with Histofine MaxPo-Multi HRP-polymer for 30 min at RT. After additional 5 wash steps, the signal was revealed using 100 $\mu\text{L}$  stain solution prepared from 2  $\mu\text{L}$  Opal dye and 98  $\mu\text{L}$  Amplifying Buffer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA; cat. no.: NEL810001KT). Following 10 min incubation, the slides were washed and subjected to microwave-assisted antibody removal (as described by the manufacturer). After new blocking step, sections were either counterstained and mounted (anti-murine IgG) or incubated with the next antibody overnight at 4 °C. Following antibodies were used subsequently (all at 1:1000 dilution): anti-VIM (Cell Signalling; catalog no.

57415) and anti-panCK (Abcam; catalog no. ab24647). After incubation with the 3<sup>rd</sup> antibody and staining with Opal dye, slides were washed and mounted using VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector, Burlingame, USA). Images were accrued using Zeiss Apotome microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

## Cell culture

Human colorectal cancer cell lines LS174T, LOVO, HT29 and HCT116 cells were obtained from ATCC (Virginia, USA). SW1222 colon carcinoma cells were a kind gift of Prof. W. Bodmer, Department of Medical Oncology, Weatherall Institute, Oxford, UK. HT29-LM and HT29-HM were a kind gift of Dr. Raffaella Giavazzi, Institute Mario Negri, Milano, Italy. Human normal colon fibroblasts CCD-18Co were obtained from ATCC. All cells were cultured in enriched medium (Dulbecco's Modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum; Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Additionally, to the WT cells, SW1222 cells depleted for TGFBI expression were generated using lentiviral shRNA particles. The latter was obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA; cat. no.: TRCN0000062177 and TRCN0000062175). Control shRNA was anti-eGFP shRNA plasmid (Sigma; cat. no.: SHC005). All shRNA were inserted into the pLenti6/V5 using the pLenti6/V5 Directional TOPO® Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Part # K4955-00). Lentiviral vectors were obtained by co-transfection of Lenti-X™ 293T Cell Lines (Clontech, Mountain View, CA, USA; Part # 632180) with pLenti6-Luciferase, psPAX2 (Addgene, Cambridge, MA, USA; Part #12260) and pVSV-G plasmids. Viral supernatants were collected, 48h-96h post transfection, and filtered (0.45 µm). SW1222 cells were incubated with these lentiviral particles for 48h and subsequently subjected to blasticidine selection (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; 7 µg/mL). Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used at early passages (passages II–V) and grown on plastic surface coated with porcine gelatin in M199 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% fetal calf serum (Invitrogen), 100 µg/mL endothelial cell growth factors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 100 µg/mL porcine heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). CTC, primary and metastatic CPP were isolated and established as previously described [19, 20]. They were maintained in 1mL of M12 medium (using ultralow attachment 24-well plates (Corning). The M12 medium contained DMEM-F12 (Gibco), 2mmol/L of L-glutamine (Gibco, Thermo Fisher Sci., Waltham, MA, USA), 100unit/mL of penicillin and streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Sci., Waltham, MA, USA), N2 supplement (Gibco, Thermo Fisher Sci., Waltham, MA, USA), 20ng/mL of epidermal growth factor (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and 10ng/mL of

fibroblast growth factor-basic (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Conditioned medium (CM) from colorectal cancer cell lines was obtained after 48h incubation of 80% confluent cells in serum-free medium. Cells CM were collected, centrifuged for 5 min at 150xg, room temperature, and then added to fibroblast monolayer (cells were pre-starved in serum-free medium for 6h) for an additional 48h. Following this, fibroblast monolayers were washed two times with PBS and then lysed for Western blot analysis. For TGF- $\beta$ 1 treatment, eighty percent confluent cells were starved in serum-free media for 16h and then treated for 48h with 5ng/ml of recombinant TGF- $\beta$ 1 (Roche, catalog no. 11412272001) in serum-free medium. The treatment was repeated every 24h.

Human SMAD2 siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool Human SMAD2 (4087)) and scrambled siRNA (ON-TARGETplus NonTargeting Control Pool, catalog no. D-001810-10-05) were purchased from Dharmacon. Transfection of cultured SW1222 cells with 20 nM of each siRNA was performed using Lipofectamine (Lipofectamine 2000 reagent, catalog no. 11668-019, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

The following compounds were used to treat the cells: SB202190 (5  $\mu$ M, catalog no. S7067, Sigma-Aldrich), BAY11-7082 (5  $\mu$ M, catalog no. B5556, Sigma-Aldrich), SP600125 (5  $\mu$ M, catalog no. S5567, Sigma-Aldrich), MK2206 (1  $\mu$ M, catalog no. 1032350-13-2, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), PD98059 (5  $\mu$ M, catalog no. 19-143, Merck Millipore, Burlington, MA, USA), ARRY-614 (10  $\mu$ M, catalog no. S7799, Selleckchem), LY2228820 (5  $\mu$ M, catalog no. A413122, Sigma-Aldrich).

### **Western blot analysis**

Crushed snap-frozen tissue or cell pellets were extracted using RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Na-deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) and protease/phosphatase inhibitor cocktails (catalog no. 16829900; Sigma-Aldrich). Protein lysates of all samples were quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific ; catalog no. 23225). Twenty micrograms of proteins were supplemented with Laemmli buffer (0.1% 2-mercaptoethanol, 0.0005% bromophenol blue, 10% glycerol, 2% SDS in 63 mM Tris-HCl (pH 6.8)), boiled for 5 min and loaded on 10% polyacrylamide gel. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes for 2h at 100V. After blocking in 5% skim milk, membranes were incubated with the primary antibody (overnight, 4°C). The following antibodies were used: 1:500 dilution anti-TGFBI (Cell Signaling; catalog no. 2719), 1:1000 dilution anti-SMAD2/3 (Cell Signaling; catalog no. 8685,) and 1:10000 dilution anti-beta-actin (Cell Signaling; catalog no. 4967). Beta-actin was used as a normalizer.

### ***In vitro* assays on HUVEC**

Tumor cells (50,000/cm<sup>2</sup>) were seeded in complete medium. After 24 hours, cells were washed and grown in absence of serum with or without the addition of 20 µg/ml recombinant TGFBI or 20 µg/ml of the anti-TGFBI antibodies (4G6 and 10G9). The conditioned media were collected, filtered and used for the *in vitro* assays. Proliferation assay: HUVECs (15,000/cm<sup>2</sup>) were treated with conditioned media (100%) in the presence of 2.5% FCS. 24 hours later, cells were detached and counted with a MACSQuant cytofluorimeter (Milteny Biotec). Sprouting assay: HUVEC spheroid aggregates were embedded in fibrin gel and stimulated with 50% of conditioned media in the presence of 5% FCS. After 24 hours, growing cell sprouts were photographed and counted under an inverted microscope (Carl Zeiss Vision GmbH). Wound repair assay: HUVEC monolayers were scratched with a 200 µL tip to obtain a 2-mm-thick denuded area and cultured in the presence of 100% conditioned media with 3.5% FCS. After 18 hours, wounded monolayers were photographed and the percentage of repaired area was quantified with Fiji software [21].

### ***In vivo* models of CRC**

Chicken-chorioallantoic membrane (CAM) *in vivo* colorectal carcinoma tumor model was based on SW1222 cells as previously described [22]. CAM were implanted on embryonic day 11 with 2x10<sup>6</sup> cancer cells suspended 1:1 in culture medium with Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) (100µl final volume). Tumor volume was estimated assuming the ellipsoid shape and using the formula  $V = 4/3 \cdot \pi \cdot ((l \cdot w \cdot h)/8)$ , where l, w, h represent the length, width and height of the tumor.

Orthotopic model of CRC liver metastases was performed using SW1222, HT29 and HCT116 cells that were injected intra-spleen in NOD-SCID mice (Janvier Labs, Saint Berthevin Cedex, France). All experimental procedures used in the current work were performed in accordance with the ARRIVE ethical guidelines [23]. They were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Ethics Committee of the University of Liège (Belgium). The experimentation adhered to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by National Academy Press, as well as to European and local legislation. Mice were anesthetized using 75 mg/kg of Ketamine (CEVA, Bruxelles, BE) and 10 mg/kg of Xylazine (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Diegem, BE), spleen was surgically exposed and injected with 500.000 cells in 100µL saline solution with 5mM EDTA. Following the splenic injection of cancer cells, development of metastatic deposits in the liver was assessed after 6 weeks at necropsy.

### **ELISA assay on human sera**



Homemade sandwich ELISA assay was used to quantify TGFBI levels in sera samples. MaxiSorp 96 microtiter plates (Nunc, GmbH, Germany) were coated with 100  $\mu$ L of TGFBI antibody (clone 4G9A10, Targetome SA), at a concentration of 1  $\mu$ g/mL in carbonate buffer, and incubated overnight at 4°C. The coated wells were washed three times with PBS-tween (0.05%) and blocked with 200  $\mu$ L of 10% FBS-PBS for 2h at 37°C. Microtiter plate was then washed three times as described above and filled with 100  $\mu$ L of samples/well. Serial dilution of human Recombinant TGFBI (Targetome SA) in a range varying from 0  $\mu$ g/mL to 5  $\mu$ g/mL was prepared in PBS to serve as a calibration curve. Patient sera were diluted 1:20 in PBS. Following this, the plate was incubated for 1h at 37°C. After washing, the wells were incubated with 100  $\mu$ L of TGFBI antibody (Dilution 1:500 in 10%FBS-PBS; clone 4G6B10, Targetome SA) for 1h at 37°C. Microtiter plate was washed as described above and to the samples 100  $\mu$ L of anti-mouse antibody (Dako; cat. no. P0260) at a dilution of 1:3000 in 10% FBS-PBS was added. The samples were then incubated for 1h at 37°C. Following a washing step, optical density was measured after incubation with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ABTS (1mM; 2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] solution, using Filter Max F5 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 405 nm.

### **<sup>89</sup>Zr-radiolabeling of the monoclonal antibodies targeting TGFBI**

The radiolabeling of the TGFBI antibody was performed in a three-step procedure accordingly to the previously published method [24]: (1) the coupling of the antibody with a chelate, the p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine, (2) the radiolabeling of the chelated antibody with <sup>89</sup>Zr oxalic acid and (3) the purification by exclusion chromatography on a Sephadex G25 matrix. Radiolabeling yield and volume activity were assessed. Thin layer chromatography (TLC) was then performed to check the absence of free <sup>89</sup>Zr contamination in the radiolabeled antibody solution. Finally, antigen-binding properties of radiolabeled TGFBI antibody were evaluated by ELISA assay.

### **PET/CT imaging of anti-TGFBI bio-distribution**

Orthotopic mouse models based on TGFBI expressing HT29 cells and TGFBI negative HCT116 cells were made as described above. Mice were injected with a contrast product (Exitron® nano12000, Miltenyi Biotec, Germany; 50ul/mouse) to highlight the liver and the spleen on X-ray computed tomography (CT) imaging. One hundred  $\mu$ g of <sup>89</sup>Zr-radiolabeled 4G6B10 TGFBI antibody were injected intravenously in 10 mice/model aiming at 4-5MBq/mouse at the time of injection. PET/CT imaging was performed on a preclinical nanoScan PET/CT scanner (Mediso, Hungary). The mice were anaesthetized with isoflurane gas for the duration of the examination (induction: 4l O<sub>2</sub>/min, 3.5% isoflurane; maintenance: 1.5lO<sub>2</sub>/min, 1.75%

isoflurane). PET imaging was performed at 2 days (D2, 30min scan), 6 days (D6, 30min scan) and 13 days (D13, 45min scan) post injection of radiolabeled antibodies. PET emission data were recorded in 3-to-1 coincidence mode in normal count rate. PET acquisitions were reconstructed with a fully three-dimensional iterative algorithm (TeraTomo from Mediso, with 4 iterations, 6 subsets, normal regularization setting, median filtering period defined from iteration counts, and spike filter) to get a voxel size of 0.4 mm (“normal” mode). Each PET scan was followed by a 6-minute CT scan for anatomical localization, as well as attenuation and scatter correction of PET images. CT acquisition parameters were 50 kV for a tube current of 520  $\mu$ A, 300 ms per projection, 480 projections per rotation, a 4-to-1 frame binning, and a cubic reconstructed voxel size of 251  $\mu$ m. All PET images were also corrected for random counts, dead time and decay. Viewing and quantitative analysis of PET-CT images of mice injected with <sup>89</sup>Zr-radiolabeled 4G6B10 and <sup>89</sup>Zr-radiolabeled 18D4H1 were performed using VivoQuant v2.5 (InVivo, MA, USA).

### Statistical analysis

Unless otherwise indicated, statistical analysis was performed using a two-sided, unpaired Student’s *t*-test, assuming equal variances using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA; version 5.01). The *t*-test was used when data followed a normal distribution (Shapiro-Wilk test, threshold 0.05). For IHC evaluation, box-plots were generated using Sigma Plot software (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA; version 11.0). Testing of statistical significance for IHC data was performed using Mann-Whitney-U-test because the data did not follow the normal distribution (Shapiro-Wilk test, threshold 0.05).

## RESULTS

**TGFBI expression is predominantly stromal in primary CRC, while it is detectable in cancer cells of matched metastases.** In order to understand the expression pattern of TGFBI in CRC we have initially screened using Western blot its expression in 5 pairs of matched primary tumor/liver metastasis samples, including normal colon. As shown in the **Figure 1a**, regardless of the TGFBI expression in the primary tumor (2 cases out of 5 are nearly negative), TGFBI is always highly expressed in CRC liver metastasis. To better delineate the source of expression variability, we further sought to examine TGFBI levels in histological sections of CRC and CRC-LM (**Figure 1b**). In the primary tumor, 12 out of 78 patients had low (score 2-4) or no TGFBI expression while the majority had medium to high expression (score 6-9). As far as the metastasis is concerned, all but one patient had high TGFBI expression. The discrepancy between the primary tumor and metastasis stemmed mainly from the observation that in the primary tumor

only tumor stroma is positive for TGFBI, while in the metastasis both cancer cells and the stroma are equally positive (**Figure 1c**). To better understand why some CRC cells expressed TGFBI while others did not, we next sought to examine the status of TGF- $\beta$  signaling in a panel of CRC cells as well as normal colonic fibroblasts.

**TGF $\beta$ -signaling is active in TGFBR wild-type cancer cells.** To obtain an overview of TGF $\beta$ -signaling in colon cancer cells and colon fibroblasts we have assembled a panel of commercially available cell lines and tested their basal TGFBI expression (**Figure 2a**). Among the cell lines tested, only HT29 and SW1222 CRC cells as well as CCD-18Co colonic fibroblasts have detectable basal levels of TGFBI. The screening indicated that compared to HT29 parental clone (HT29pt), TGFBI expression is higher in the highly metastatic derivative of HT29 cells (here called HT29hm) while it is lower in the low metastatic derivative (HT29lm)[25]. As far as the fibroblasts are concerned, the expression of TGFBI is increased following their exposure to the conditioned media of all CRC cancer cells studied here. Knowing that TGFBI status is indicative of TGF $\beta$ -signaling, we next sought to test if exposure of different cancer cells to TGF- $\beta$ 1 could induce TGFBI expression. As shown in the **Figure 2b**, of all the cell lines tested, only SW1222 and HT29, as well as its clones, were responsive to TGF- $\beta$ 1. Next to this, we also examined primary circulating tumor cells isolated from the blood of CRC patients. All CTCs tested positive for TGFBI expression and were responsive to TGF- $\beta$ 1 exposure, leading to an increase of TGFBI levels. A closer look at the status of TGF $\beta$  signaling machinery in terms of possible mutations, gave a potential explanation for the observations made above (**Figure 2c**). Namely, HCT116 and LS174T cells that did not respond to TGF- $\beta$ 1 have mutations in the TGF $\beta$  receptor. LOVO cells had mutation in the SMAD2. All the responder cells, including CTC44 and CTC45 (for which sequencing data were available; BioProject PRJNA384289) had no mutations in the TGF $\beta$  receptor or SMAD2. Interestingly, the strongest responders such as HT29 and CTCs had additionally p53 mutations. In order to further confirm that TGF $\beta$  signaling (and hence TGFBI expression) is stronger in metastatic CRC cells compared to ones isolated from primary tumors, we turned next to a set of primary cells isolated from primary tumors and CRC metastases (**Figure 2d**). In line with the previous observation, all cancer cells derived from CRC liver metastases expressed TGFBI. This was in sharp contrast to primary tumor cell lines that had no detectable levels of this protein. Metastatic cells that had low TGFBI expression could further augment these levels following TGF $\beta$ -treatment, while primary tumor cells did not respond to TGF $\beta$  (**Figure 2d**). Altogether these results indicated that a functional TGF $\beta$  receptor is mandatory for TGF $\beta$ -responsiveness, while the contribution of canonical/alternative signaling required further clarification. These considerations led us to propose two different mechanisms for TGFBI secretion in primary CRC and CRC-liver metastasis (**Figure 2e**). While in primary tumors TGFBI

levels are maintained by stromal TGF $\beta$ -program, in liver metastases TGFBI is also secreted by cancer cells which in turn can respond to TGF $\beta$  stimulation.

**Different, alternatively wired TGF $\beta$ -signaling pathways are responsible for TGFBI induction in CRC cells.** Given the fact that SMAD2 was not mutated in CRC cells able to respond to TGF $\beta$ -stimulation, we first sought to verify if SMAD2 is required for TGFBI induction. To this end we silenced SMAD2 in HT29hm cells and observed that TGF- $\beta$ 1 can induce TGFBI expression regardless of SMAD2 status (**Figure 3a**). Considering that SMAD4 was found mutated in all TGFBI expressing cells and that SMAD2 is not required for the expression, we hypothesized that a non-canonical signaling pathway may be responsible for the ability of CRC cells to respond to TGF- $\beta$ 1. To clarify this, we have tested if p38, AKT, JNK or MAPK are involved in alternative TGF- $\beta$ 1 signaling in HT29hm cells. As shown in **Figure 3b**, selective inhibitors of p38 (SB202190 and ARRY-614) dampened the TGF- $\beta$ 1-mediated induction of TGFBI in HT29hm cells. In contrast to this, the inhibition of AKT (MK2206), JNK (SP600125) and MEK1/MEK2 (PD98059) (**Figure 3c**) could not suppress TGFBI expression following the treatment of HT29hm cells with TGF- $\beta$ 1. It is also worth noting that all inhibitors mentioned above, except p38-related ones, induced TGFBI expression even in absence of TGF- $\beta$ 1 treatment. While p38 seems to be relevant to the ability of TGF- $\beta$ 1 to induce TGFBI expression in HT29hm cells, it was unclear how this process may happen given the inability of p38 to function as transcription factor. To this end we sought to test NFKB as this transcription factor has been shown in the past to be able to mediate p38 signaling. Indeed, a selective inhibitor of NFKB (BAY11-7082) reduced TGFBI levels post TGF- $\beta$ 1 stimulation of HT29hm cells, suggesting that NFKB could be in part involved as transcription factor (**Figure 3d**). Having acquired evidence that p38 is key for TGFBI expression in HT29hm cells, we next sought to confirm this using SW1222 cells. None of the MAP kinases tested showed the ability to decrease TGFBI expression post TGF- $\beta$ 1 stimulation of SW1222 cells (**Figure S1**). In contrast to HT29hm, inhibition of p38 in SW1222 cells caused a strong induction of TGFBI expression that was additionally exacerbated by TGF- $\beta$ 1 treatment (**Figure S1a**). These findings collectively indicate that TGF- $\beta$ 1 signaling is certainly differently wired in different CRC cells and that therapeutic strategies should rather focus on down-stream proteins that assume effector functions. In line with this thought we next sought to better understand the function of TGFBI in CRC progression.

**TGFBI silencing reduces tumor growth *in vivo* and suppresses angiogenesis *in vitro*.** Previous studies have reported a dual role of TGFBI in the progression of many different tumors. In the light of these opposite observations it was important to verify which type of function does TGFBI assume in the present model of CRC. For this purpose, we examined the impact of modulating TGFBI levels on the migration and proliferation of the SW1222 cells. As displayed in

**Figure S2**, silencing TGFBI in SW1222 cells was efficient in reducing their migratory capacity. Supplementing TGFBI to SW1222 cells increased their proliferation as well as their migration (**Figure S2**). To further understand the putative mechanism, we engaged in the proteomic analysis of SW1222 and HT29 cells following their depletion of TGFBI. We analyzed both intra- and extra-cellular proteins, the latter being collected from the conditioned media. As shown in **Figure S3**, particularly up-regulated were proteins involved in JAK-STAT signaling, activation of RAPI and RAC1 small GTPases as well as in detoxification and photolytic-degradation processes. Down-regulated were proteins involved in particular in metabolism and infectious diseases (**Figure S4**). Having demonstrated that TGFBI is favoring migration and proliferation of cancer cells *in vitro* we next sought to examine its effects *in vivo*. For this purpose we used two models, one based on CAM tumor development and the second on orthotopic engraftment in mice livers by intrasplenic injection of cancer cells. Silencing TGFBI in SW1222 cells reduced tumor growth in the CAM assay (**Figure 4a**) and decreased the development of liver metastases in the orthotopic murine model (**Figure 4b**). Following these *in vivo* experiments, especially the CAM assay, it was evident that the TGFBI depleted tumors display a markedly low level of vascularization. This observation led to further *in vitro* experiments aiming at clarifying the potential role of TGFBI in angiogenesis. To this end we recovered conditioned media from control (shNT) and TGFBI-silenced SW1222 and HT29 cells and we tested their effect on HUVEC cells. As shown in the **Figure 4c-e**, conditioned media from TGFBI silenced cancer cells significantly decreased the proliferation, migration and sprouting capacity of HUVEC cells. Moreover, supplementing these media with recombinant TGFBI blocked the inhibitory effect, while in the case of sprouting assay the effect was even reversed (**Figure 4e**). Following this observation, we next sought to understand the potential mechanism underlying the pro-angiogenic function of TGFBI. We have resorted to proteomic analysis of HUVEC, which were treated with recombinant TGFBI. As outlined in the **Figures S5/S6**, recombinant TGFBI in HUVEC activated spliceosome and lysosome related pathways while it decreased processes related to platelet activation, axon guidance and cellular response to stress. Collectively, the data indicated an overall tumor-promoting role of TGFBI in CRC and thus warranted the development of appropriate means to target this protein.

**Monoclonal antibodies targeting TGFBI suppress angiogenesis *in vitro* and serve as diagnostic tools *in vivo*.** In order to develop novel antibodies against TGFBI we engaged in a de novo immunization and screening process. As outlined in **Figure S7a**, nine anti-TGFBI antibodies have been overall selected, all of which had no cross reactivity to POSTN. Subsequent validations using FACS, WB, SPR and IF analysis have ultimately led to a choice of two clones, 10G9A10 and 4G6B10, which were further validated *in vitro* (**Figure S7b-e**). Following the validation, we

next sought to test functionally the selected antibodies for their ability to inhibit angiogenesis using HUVEC cells. For this purpose, HUVEC proliferation and sprouting was monitored after their challenge with CM from SW1222 and HT29hm cells, with or without the presence of anti-TGFBI antibodies. Both clones were able to significantly suppress HUVEC proliferation and sprouting (**Figure 5a**), while this effect was abrogated after antibody denaturation/boiling. Next to therapeutic applications, monoclonal antibodies are also used today in clinical diagnostics. We have thus sought to test if the selected antibodies could qualify as diagnostic tools. To this end we have developed a sandwich ELISA assay based on the two anti-TGFBI clones. We have used this assay to screen sera from CRC patients who were either naïve or were under active chemotherapy treatment. As demonstrated in **Figure 5b**, TGFBI was readily detectable in the serum of both healthy individuals as well as CRC patients (for clinical information see **Table S1**). The latter group had a significantly higher TGFBI serum levels when the patients were untreated, while patients under treatment had comparable levels to normal individuals. Having demonstrated the value of TGFBI antibodies for *in vitro* diagnostics, we next sought to clarify if these could be also used for *in vivo* imaging of liver metastases. To further explore this, we have selected 4G6B10 anti-TGFBI clone because of higher target binding affinity as shown in SPR analysis (**Figure S7d**). Following the antibody labeling using  $^{89}\text{Zr}$  PET tracer, the purified product was injected *i.v.* in mice bearing either HCT116 or HT29hm liver metastases. The former was used as a negative control knowing that these CRC cells do not express the target. Following injection, PET signal was clearly observable in the CRC-LM of HT29hm mice as early as 2 days post injection (data not shown). The signal intensity reached a maximum at day 6 (**Figure 5c**), and was still detectable on day 14 (data not shown). To further examine the specificity of the signal as well as to gain information on the microscopic distribution, animals bearing HT29hm CRC-LM were injected with either IgG control antibody or anti-TGFBI. Livers were recovered from animals at day 6 post-injection and examined histologically (**Figure 5d**). The results showed a very strong accumulation of the anti-TGFBI antibody especially in the stroma of the liver metastases. Very little to no staining was observed in the HT29hm cells themselves, suggesting that antibodies against TGFBI target cannot be internalized.

## DISCUSSION

TGF $\beta$  superfamily comprises a large family of different cytokines that include TGF- $\beta$ , activin, bone morphogenetic proteins (BMPs) and 6 receptors. The latter have varying affinities to groups of ligands and signal downstream in canonical (SMAD-mediated) and non-canonical fashion (ATK, MAPK and others). In the normal colon mucosa, the gradient of BMP/TGF $\beta$  levels is inversely proportional with the differentiation degree of the epithelial cells, and as such is



important for the stem cell maintenance in the colon crypts. Our current understanding of TGF $\beta$  function in malignant transformation is strongly limited to its tumor inhibiting and tumor promoting functions. Both are viewed as temporarily separated processes and solely caused by loss-of-function mutations across the TGF $\beta$  superfamily [7]. These events are thought to segregate early versus late steps in CRC development, drawing a line between tumor inhibiting and promoting roles of TGF $\beta$ . For example, SMAD4 is mutated in juvenile polyposis patients, predisposing these individuals for diverse gastrointestinal tumors [26]. In CRC, MSI-HI patients present multiple mutations of TGF $\beta$  signaling components and have lower TGF $\beta$  activity and longer survival times [27]. Conversely, CRC patients with highest TGF $\beta$  activity have the worst clinical prognosis [28]. As cancer cells are mutated for several components of the TGF $\beta$  signaling, it is commonly thought that they cannot directly benefit from this potent cytokine. Thus, a model has been developed (largely based on animal studies) where CAF orchestrate pro-tumorigenic TGF $\beta$  program in CRC [8]. In this model, TGF $\beta$  activates SMAD3 in the CAF, which in turn produce several pro-metastatic factors such as ANGPTL4, PTHLH, CTGF or JAG1. In the light of these results targeting TGF $\beta$  should represent a veritable treatment opportunity, especially in the late phase of tumor development. However, clinical trials with various TGF $\beta$  inhibitors have proven rather disappointing across different malignancies including colorectal cancer [29]. This is a strong indicator that tumor inhibiting and promoting functions of TGF $\beta$  cannot be separated in time, suggesting that cell-type specific pro- and anti-tumor wiring of the pathway needs to be fundamentally revisited.

In the frame of the present work we focus on TGFBI, a protein that evidences activation of TGF $\beta$  pathway across different cell models. In colon, TGFBI has been identified as a marker gene that distinguishes normal mucosa from benign adenoma and colon cancer in humans [30]. Its increasing mRNA expression positively correlated with the transition from normal to cancer. We and others have repeatedly found significant up-regulation of TGFBI in the colon tumors and associated metastases [17, 22, 31]. While a paucity of data implicates TGFBI in tumoral progression, surprisingly very little is known on its relationship with TGF $\beta$  – beyond the fact that TGF $\beta$  induces TGFBI expression. This is indeed primordial in order to understand the role of TGFBI in early aspects of tumor progression. TGFBI knockout mice are predisposed to multiple cancer formation including CRC [16] as well as alterations in cartilage and bone formation [32]. This in turn suggests that basal levels of TGFBI, such as frequently seen in the fibroblasts of normal colon, are required for homeostatic function of TGF $\beta$ . In normal colon TGF $\beta$  is produced by resident fibroblasts for autocrine and paracrine purposes. TGF $\beta$  activity in fibroblasts stimulates ECM production and the formation of the basement membrane. The latter serves as an important support for the epithelial cells, contributing to epithelial polarity [33]. TGFBI might in

particular be implicated in this process. However, the role of TGFBI in the physiology of the normal colon remains to be clarified in future studies. We critically show here that TGFBI expressed by metastatic CRC cells serves a pro-tumorigenic function. The latter affects the crosstalk between cancer and endothelial cells, resulting in enhanced angiogenesis.

An important feature that may clarify the role of TGFBI in colon cancer is probably related to the upstream signaling that controls its expression. Namely, a handful of human studies have for nearly two decades reported on responsiveness of CRC epithelial cells to TGF $\beta$ , despite numerous mutations in the downstream signaling machinery [11, 34, 35]. If TGF $\beta$  functionality in the tumor epithelium was actually never completely lost, then it is intriguing to ask the question when and how TGF $\beta$  tumor suppressor function was rewired to tumor promoter. Before attempting to do so, it is worth taking a look at other much more aggressive human tumors, such as melanoma or glioblastoma. In those particular instances TGF $\beta$  signaling is maintained in cancer cells and is mainly facilitated by non-canonical signaling through PI3K/AKT and RAS/MAPK pathways [36]. In these tumors, canonical SMAD-dependent signaling can also contribute to pro-metastatic functions, in particular by up-regulating pro-EMT genes SLUG and SNAIL [37]. In the present work, we show that TGFBI signaling follows an alternative, non-canonical pathway that at least in some cases relies on p38. Our data suggest that other non-canonical pathways are certainly essential, yet their identity remains to be unveiled. While this process may help the development of new therapeutic strategies for CRC patients, their implementation will inevitably require personalized medicine. Indeed, as shown here, not all cancer cells (and most probably not all patients) will follow the same alternative TGF $\beta$ -signaling pathway. In the light of this mechanistic complexity, targeting the effector proteins that result from this alternative signaling might be a more promising strategy. Our study reinforces previous findings that TGFBI is certainly one of such targets in colon cancer. Importantly, we show that TGFBI is accessible to therapeutic antibodies *in vivo*, and relate its function to induction of angiogenesis. Future studies should examine how more potent anti-TGFBI antibodies can be put in place to achieve a stronger functional effect. In addition, one should explore the combination of these TGFBI targeting strategies with other therapies that affect other hallmarks of cancer such as proliferation and metabolism.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Nicolas Passon and Marie-Aline Laute for the technical support in PET/CT imaging, Bernard Hauquier and Dominique Egrise for performing the ELISA.

## REFERENCES

1. Engstrand J, Nilsson H, Stromberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer*. 2018; 18: 78.
2. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14: 611-22.
3. Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016; 529: 298-306.
4. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012; 21: 309-22.
5. Ronca R, Van Ginderachter JA, Turtoi A. Paracrine interactions of cancer-associated fibroblasts, macrophages and endothelial cells: tumor allies and foes. *Curr Opin Oncol*. 2018; 30: 45-53.
6. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev*. 1996; 10: 2462-77.
7. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2017; 152: 36-52.
8. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer cell*. 2012; 22: 571-84.
9. Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 2007; 16 Spec No 1: R14-20.
10. Luo J, Chen XQ, Li P. The Role of TGF-beta and Its Receptors in Gastrointestinal Cancers. *Transl Oncol*. 2019; 12: 475-84.
11. de Miranda NF, van Dinther M, van den Akker BE, van Wezel T, ten Dijke P, Morreau H. Transforming Growth Factor beta Signaling in Colorectal Cancer Cells With Microsatellite Instability Despite Biallelic Mutations in TGFBR2. *Gastroenterology*. 2015; 148: 1427-37 e8.
12. Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD, Purchio AF. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol*. 1992; 11: 511-22.
13. Huber O, Sumper M. Algal-CAMs: isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga *Volvox* with homology to *Drosophila* fasciclin I. *EMBO J*. 1994; 13: 4212-22.
14. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester HJ, Schwaiger M, et al. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017; 9.
15. Yokobori T, Nishiyama M. TGF-beta Signaling in Gastrointestinal Cancers: Progress in Basic and Clinical Research. *J Clin Med*. 2017; 6.
16. Zhang Y, Wen G, Shao G, Wang C, Lin C, Fang H, et al. TGFBI deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development. *Cancer Res*. 2009; 69: 37-44.
17. Ma C, Rong Y, Radloff DR, Datto MB, Centeno B, Bao S, et al. Extracellular matrix protein betaig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes Dev*. 2008; 22: 308-21.
18. Waltregny D, Bellahcene A, Van Riet I, Fisher LW, Young M, Fernandez P, et al. Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 1000-8.
19. Grillet F, Bayet E, Villeronce O, Zappia L, Lagerqvist EL, Lunke S, et al. Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture. *Gut*. 2017; 66: 1802-10.
20. Giraud J, Failla LM, Pascussi JM, Lagerqvist EL, Ollier J, Finetti P, et al. Autocrine Secretion of Progastrin Promotes the Survival and Self-Renewal of Colon Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res*. 2016; 76: 3618-28.
21. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9: 676-82.
22. Turtoi A, Blomme A, Debois D, Somja J, Delvaux D, Patsos G, et al. Organized proteomic heterogeneity in colorectal cancer liver metastases and implications for therapies. *Hepatology*. 2014; 59: 924-34.
23. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010; 8: e1000412.

24. Vosjan MJ, Perk LR, Visser GW, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc.* 2010; 5: 739-43.
25. Price JE, Daniels LM, Campbell DE, Giavazzi R. Organ distribution of experimental metastases of a human colorectal carcinoma injected in nude mice. *Clin Exp Metastasis.* 1989; 7: 55-68.
26. Johansson J, Sahin C, Pestoff R, Ignatova S, Forsberg P, Edsjo A, et al. A Novel SMAD4 Mutation Causing Severe Juvenile Polyposis Syndrome with Protein Losing Enteropathy, Immunodeficiency, and Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. *Case Rep Gastrointest Med.* 2015; 2015: 140616.
27. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1196-206.
28. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015; 21: 1350-6.
29. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2015; 147: 22-31.
30. Buckhaults P, Rago C, St Croix B, Romans KE, Saha S, Zhang L, et al. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res.* 2001; 61: 6996-7001.
31. Greening DW, Kapp EA, Ji H, Speed TP, Simpson RJ. Colon tumour secretome: insights into endogenous proteolytic cleavage events in the colon tumour microenvironment. *Biochimica et biophysica acta.* 2013; 1834: 2396-407.
32. Yu H, Wergedal JE, Zhao Y, Mohan S. Targeted disruption of TGFBI in mice reveals its role in regulating bone mass and bone size through periosteal bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2012; 91: 81-7.
33. Stahl PJ, Felsen D. Transforming growth factor-beta, basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease. *The American journal of pathology.* 2001; 159: 1187-92.
34. Ilyas M, Efstathiou JA, Straub J, Kim HC, Bodmer WF. Transforming growth factor beta stimulation of colorectal cancer cell lines: type II receptor bypass and changes in adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 3087-91.
35. Baker K, Raut P, Jass JR. Microsatellite unstable colorectal cancer cell lines with truncating TGFbetaRII mutations remain sensitive to endogenous TGFbeta. *J Pathol.* 2007; 213: 257-65.
36. Zhang L, Zhou F, ten Dijke P. Signaling interplay between transforming growth factor-beta receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2013; 38: 612-20.
37. Moustakas A, Heldin CH. Mechanisms of TGFbeta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Med.* 2016; 5.

## Figure Legends

**Figure 1:** TGFBI is strongly expressed in CRC and CRC-LM human tumors. **a.** Western blot analysis of TGFBI expression profile in tissue extracts from normal colon, CRC and matched CRC-LM from 5 different patients. Ponceau Red staining was used for normalization. **b.** Immunohistochemical analysis of TGFBI expression in CRC (n=78) and CRC-LM (n=21) patients. Adjacent normal colon and normal liver tissues, when available, served as controls (\*\* and \*\*\* indicate  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively; error bars are standard deviation of means). **c.** IF analysis of TGFBI expression in CRC and CRC-LM specimens, co-stained with pan-cytokeratin (cancer cells), vimentin (stromal cells) and DAPI (nuclei). Shown are representative pictures of 20 cases.

**Figure 2:** Metastatic CRC cells maintain TGF $\beta$ -signaling. **a.** Western blot analysis of TGFBI expression in a set of commercially available CRC cell lines (left panel) and in normal colon fibroblasts (CCD-18Co) treated or not with conditioned media of CRC cells (right panel). ACTB was used for normalization. **b.** Western blot analysis of TGF- $\beta$ 1-responsiveness of CRC cells and human CTC. **c.** Table showing the mutation profile of key components of TGF $\beta$ -signaling and tumor driver genes in CRC and CTC cells (CTC31 no sequencing information available). **d.** Basal expression of TGFBI in human primary and metastatic CRC cells (left panel). TGFBI expression levels in primary and metastatic CRC cells from 2 different patients under TGF- $\beta$ 1 stimulation. **e.** Proposed mechanism of TGFBI secretion in primary CRC and in CRC-LM.

**Figure 3:** Alternative TGF $\beta$ -signaling in CRC is at least in part driven by p38. **a.** Western blot analysis of TGFBI expression in HT29hm cells treated with TGF- $\beta$ 1 following the silencing of SMAD2. ACTB as loading control. **b.** TGFBI protein levels in HT29hm cells after treatment with TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) and SB202190 (5  $\mu$ M) or ARRY-614 (10  $\mu$ M) p38 inhibitors, alone or in combination for 48h. **c.** Same as in panel (b), instead of p38 inhibitors MK2206 (1  $\mu$ M, AKT inhibitor), SP600125 (5  $\mu$ M, JNK inhibitor) and PD98059 (5  $\mu$ M, MAPK inhibitor) were used. **d.** Same as in panel (b) with BAY11-7082 (5  $\mu$ M, NFKB inhibitor). Immunoblots were quantified by densitometric analysis using Image J software and normalized using ACTB.

**Figure 4:** TGFBI promotes tumor growth and angiogenesis. **a.** CAM angiogenesis/tumor development model using SW1222 cells silenced for TGFBI or scrambled shRNA and quantification of the tumor volume. **b.** Orthotopic liver metastasis model using the same cells as in (a). **c.** Proliferation and **d.** wound healing assays using HUVEC incubated with conditioned media of SW1222 and HT29 cells silenced for TGFBI or scramble shRNA, treated or not with recombinant TGFBI. **e.** Sprouting assay using HUVEC; same conditions as panel (c). and (d). Panels a-e \*/\*\* denote statistical significance with  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively, error bars are standard deviations of means.

**Figure 5:** TGFBI is a diagnostic marker for CRC-LM. **a.** Targeting proliferation and sprouting of HUVEC cells using specific anti-TGFBI antibodies *in vitro*. **b.** Quantification of TGFBI levels using ELISA based on 4G6B10 and 10G9A10 anti-TGFBI antibodies, in sera from healthy individuals and CRC patients treated or not with chemotherapy (for further details see **Table S1**). **c.** Comparison between bio-luminescence (left) and PET/CT (right) imaging using  $^{89}\text{Zr}$ -radiolabeled 4G6B10 mAb (day 6) in mice with liver metastasis xenografts. **d.** Ex-vivo detection

of 4G6B10 antibody or irrelevant IgG following their i.v. injection in the HT29hm orthotopic mouse model (shown are representative images of 5 animals/group).



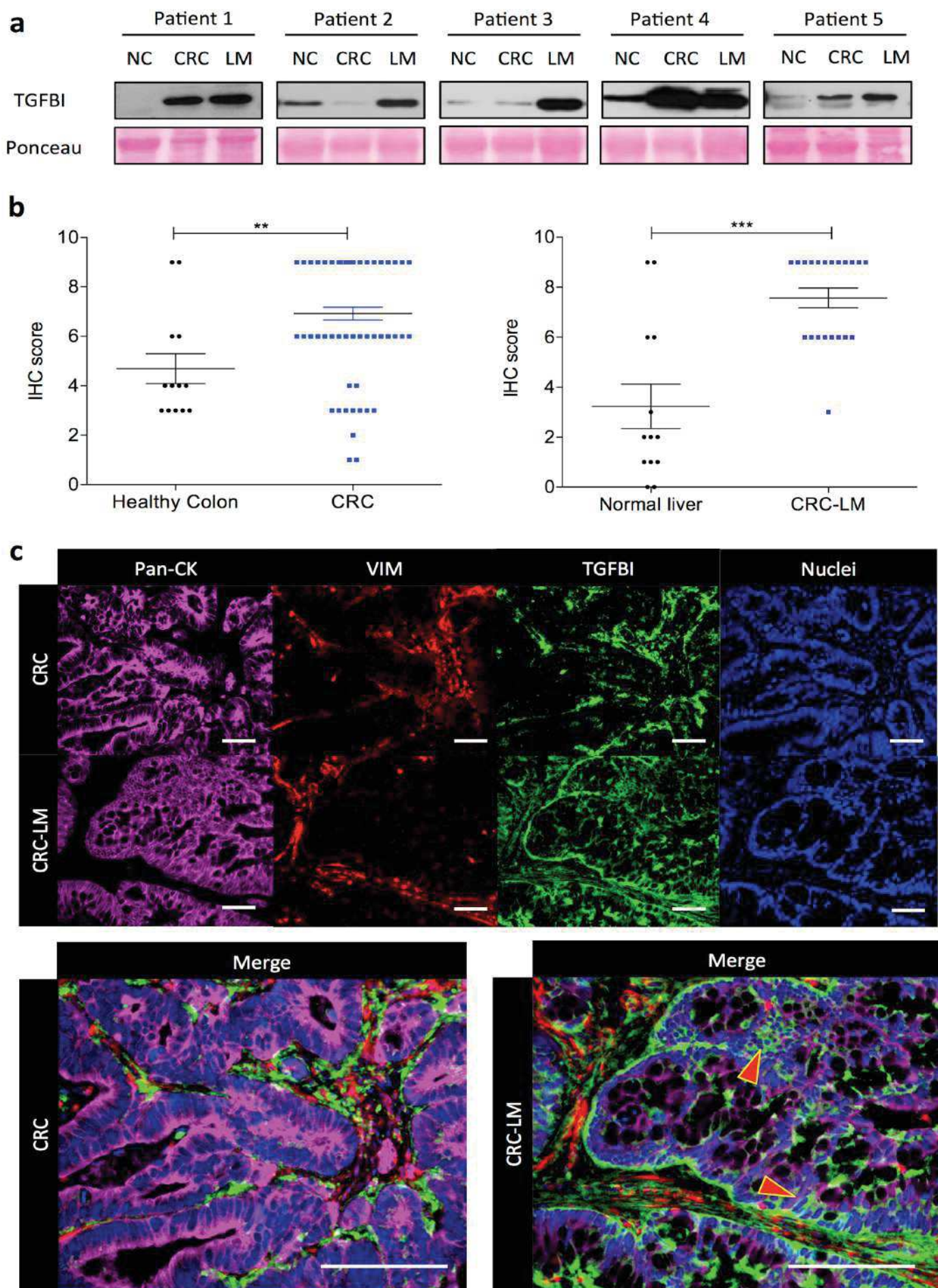


Figure 1

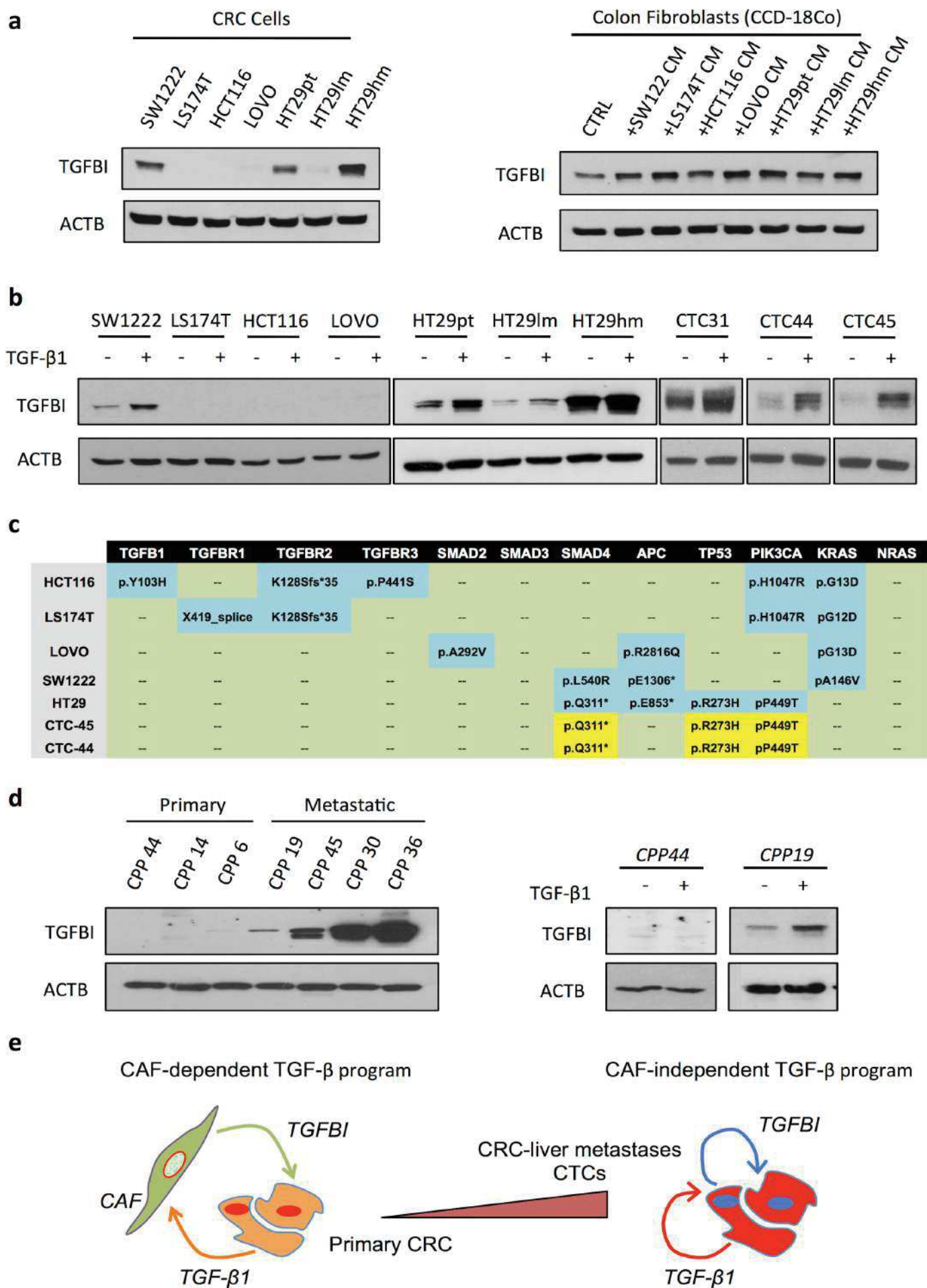


Figure 2

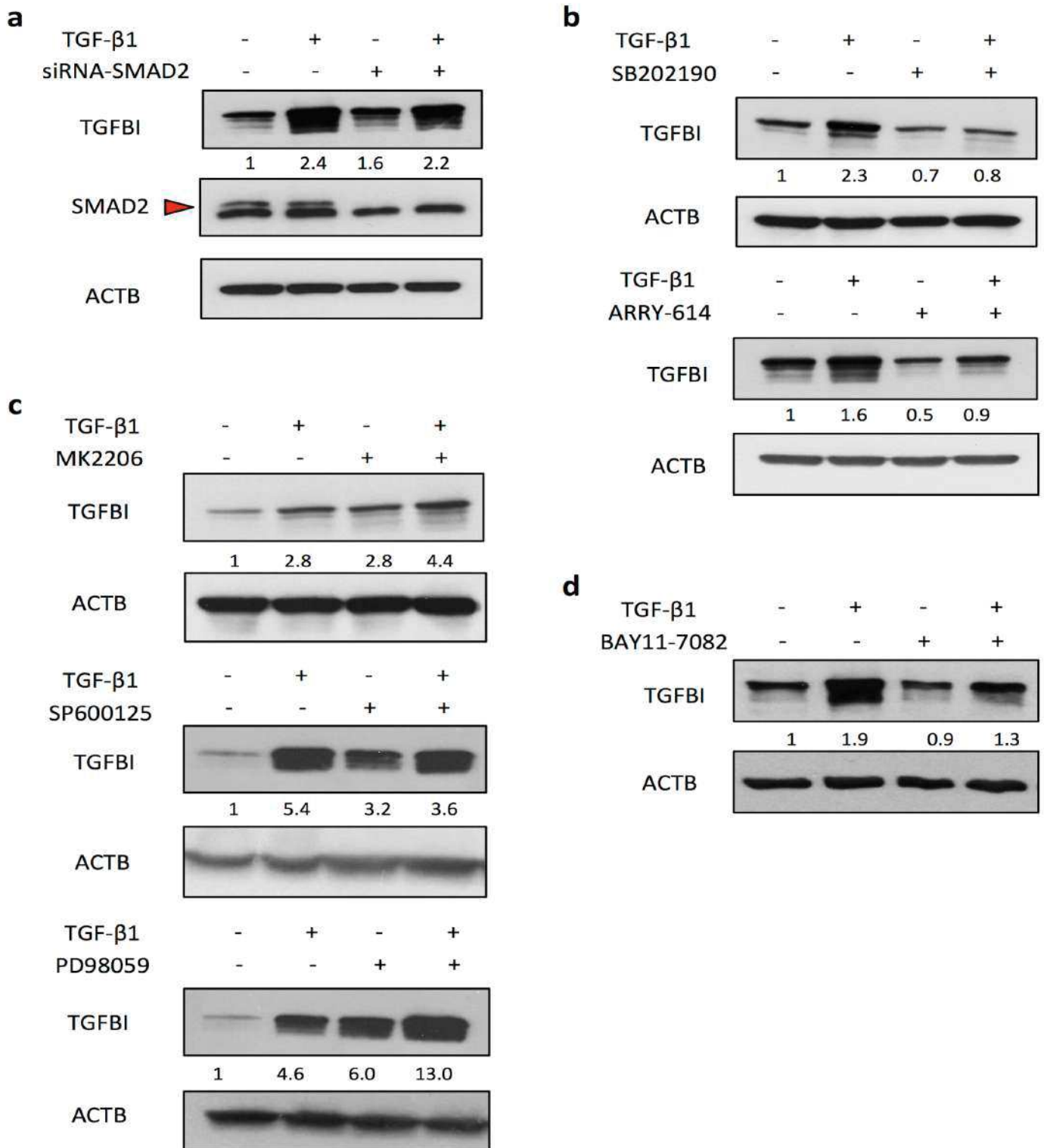


Figure 3



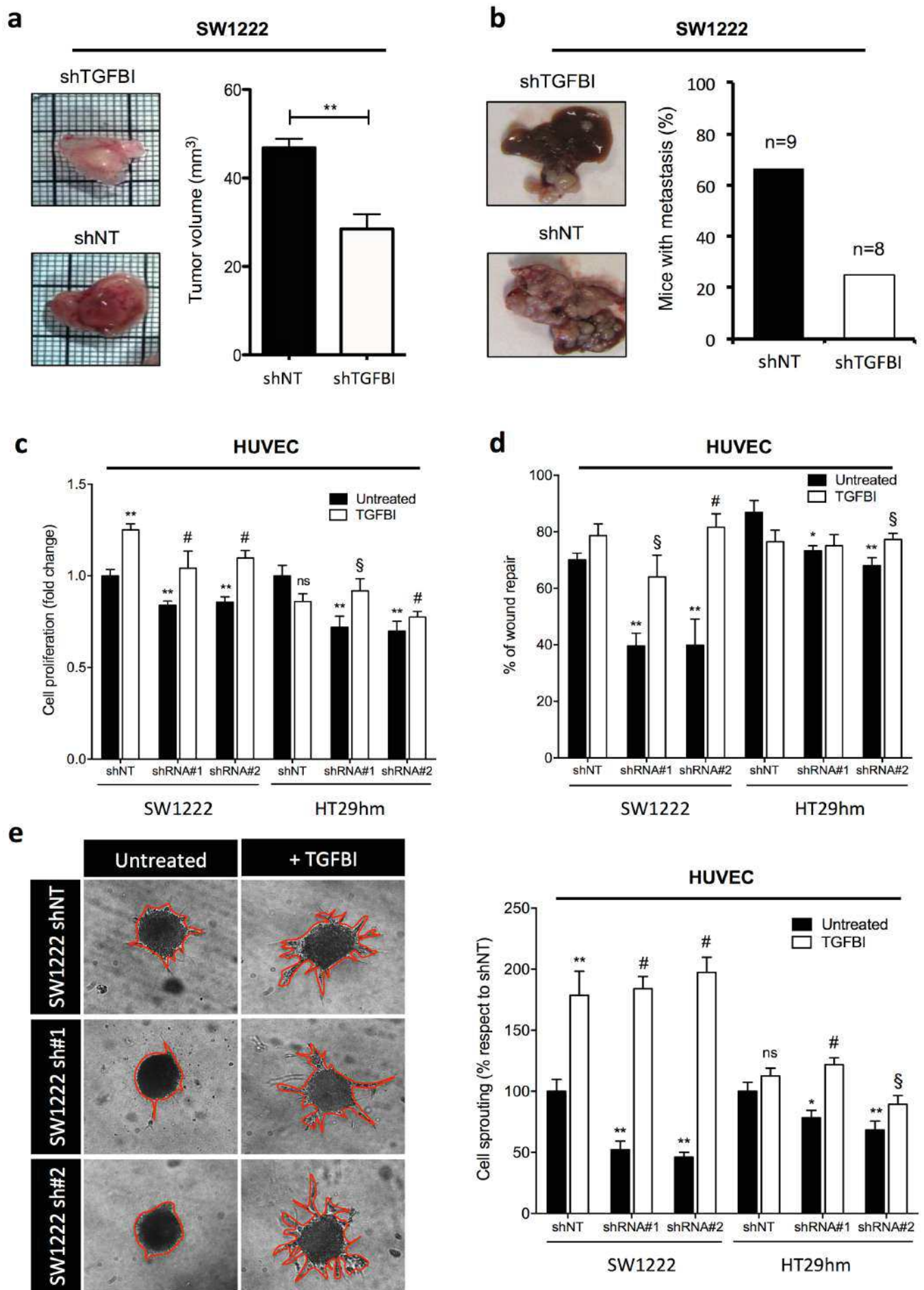


Figure 4

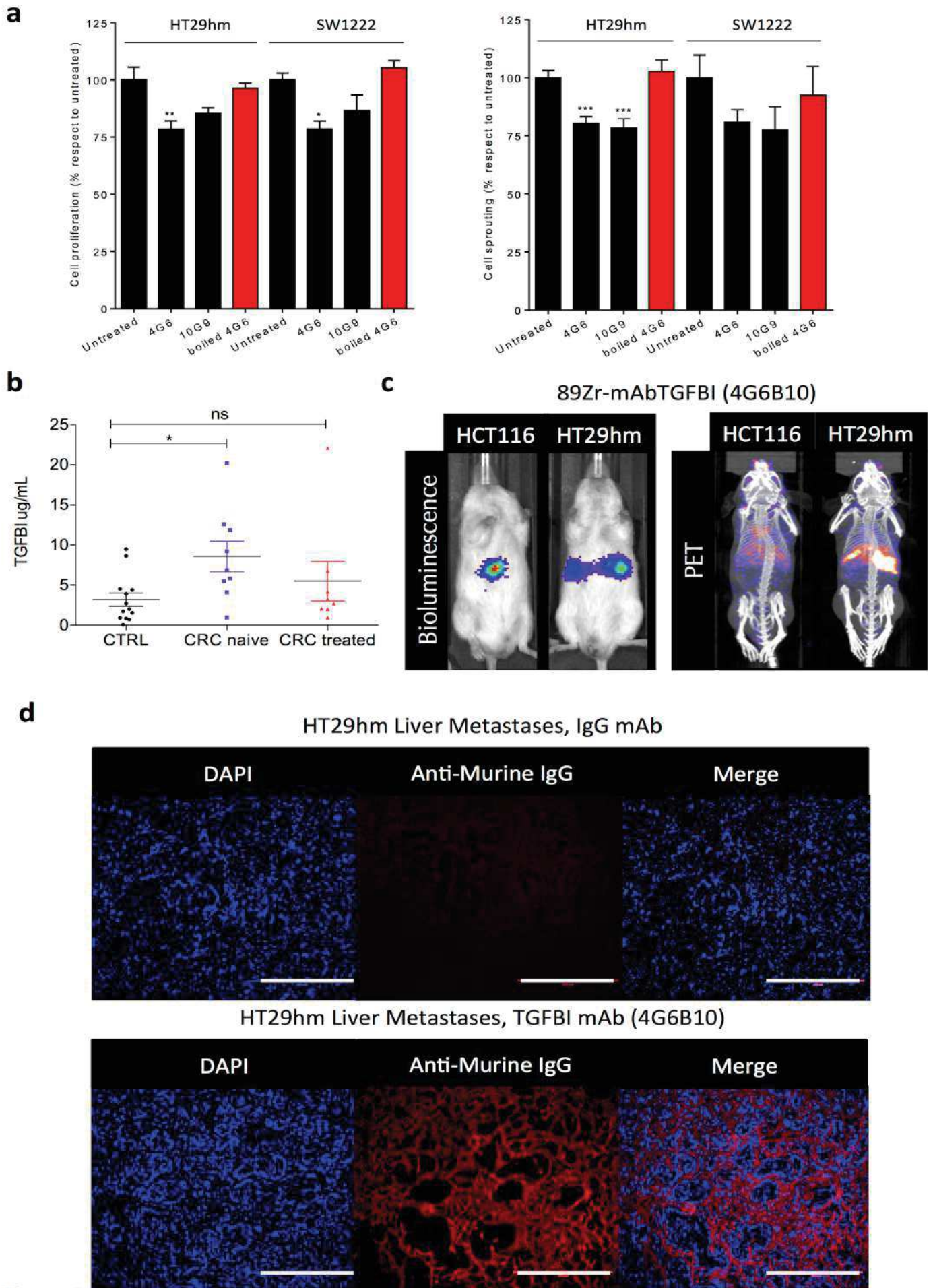


Figure 5

## **Supplemental Material and Methods**

### **Gene expression analysis**

Total RNA was isolated from PBS-washed cell monolayers with High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany; cat. no.: 11828665001). One microgram of total RNA was converted to cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche; cat. no.: 04897030001). The cDNA (100 ng) was mixed with primers (0.5  $\mu$ M), human UPL-probe system (0.2  $\mu$ M) (Roche; cat. no.: 04683633001), 2X Fast Start Universal Probe Master mix (Roche; cat. no.: 04914058001) and analyzed in triplicate using the LightCycler480 system (Roche). The following conditions were used: 95°C for 10 min then 40 cycles of 95°C (15 sec) and 60°C (1 min). Sequences of TGFBI primers were: forward 5'-cgagtgcctgctggatg-3' and reverse 5'-cccagggtctcgtaaaggtt-3' and UPL probe #66. The relative gene expression levels were normalized using 18S rRNA content (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; cat. no.: 4310893E).

### **Proliferation Assay**

$1 \times 10^5$  SW1222 cells were seeded into 24 well/plate in a complete medium and were left to adhere during 24h. Cells were then washed 2 times in PBS and starved in DMEM without serum for 16h. After that, the cells were treated with 10  $\mu$ g/mL of recombinant TGFBI (Targetome) during 24h-48h-72h-96h. The proliferation rate was assessed measuring the cell DNA content. Briefly, at the established time point cells were sonicated in 1 mL PBS for 10 seconds. 100  $\mu$ L of this cell suspension was incubated with an equal volume of Hoechst solution (Cat: #382061, Calbiochem) in a 96-well plate for 30 minutes under agitation and in dark. The plates were read (Ex.: 352 nm/ Em.: 461 nm) using Filter Max F5 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **Migration Assay**

$5 \times 10^5$  SW1222 cells were resuspended in serum-free DMEM (containing 0.1% BSA, 1% penicillin/streptomycin) and seeded into the upper part of a Transwell filter (diameter 6.5mm, pore size 8 $\mu$ m, Costar, Cambridge, MA) coated with gelatine (100  $\mu$ g/ml). Human recombinant TGFBI protein was added at concentration of 10  $\mu$ g/mL. The lower part of Boyden Chamber was filled with a complete medium (10% FBS-DMEM) and served as chemoattractant. After 24 hours incubation at 37°C, migrating cells were fixed and stained with Diff-Quick kit (Cat. # 130832. Medion Diagnostics, Düringen, Switzerland). Representative pictures for each insert were taken at a 5X magnification and migrating cells



were further quantified by densitometry using the ImageJ software (National Institute of Health, USA, public access). Three wells (technical replicates) per condition were counted.

### **Proteomic analysis**

Protein extracts from cells were prepared as described for Western blot analysis (see above). Conditioned media were collected from cancer cells, centrifuged to remove debris and then concentrated using Amicon ultra-filtration devices with 3 kDa cutoff (Merck-Millipore; cat. no.: UFC900308). Fifty microgram of protein extract or concentrated conditioned media was subjected to reduction using 20 mM DTT for 30 min at 60°C, followed by alkylated using 50 mM 2-chloroacetamide for 30 min at RT. The proteins were precipitated using 2D Clean-Up kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA; cat. no. 80648451). The pellets were suspended in 50 µl 100 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8) containing 1 mM calcium chloride, 0.01% ProteaseMAX surfactant (Promega, Madison, WI, USA; cat. no.: V2071) and 1 µg of trypsin (Promega; cat. no.: V5280). The samples were digested ON at 37°C. Following digestion, 1/10th of each sample was transferred in a new tube where all the samples were mixed in a library. The library sample was subjected to peptide fractionation using High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit (Thermo Fisher; cat. no.: 84868). Eight individual peptide fractions were eluted and further desiccated to dryness. Samples were then dissolved in 0.1% TFA and purified using ZipTip (Merck, Darmstadt, Germany; cat. no.: C5737).

The peptide samples were analyzed using the 1D-nano-HPLC-Q-TOF 6600 system (Sciex, Framingham, MA, USA). One microgram of sample was injected on the C18 column (Acclaim® 75 µm x 150 mm, p/n: 162224; Dionex, California, USA). The peptides were resolved with a gradient of 0–40% phase B (90 % acetonitrile, 9.9 % water and 0.1 % formic acid) for 100 min at the flow rate of 0.3 µl/min. Two acquisition modes were used, data dependent (DDA) for the library measurement and SWATH for the samples. In the DDA mode the setting was as follows: one full scan in the mass range 400 to 1600 m/z followed by up-to 30 MS/MS scans of the most intensive peptides bearing +2 or +3 charges. The acquired data for each fraction of the library sample were merged and used for MS/MS database search with Protein Pilot software (Sciex). For the SWATH acquisition, DDA method was adapted using automated method generator embedded in the Analyst software (Sciex). Proteins were quantified using Peak View software SWATH algorithm and the previously generated protein library. Further data analysis was conducted using R. SWATH data were normalized based on total protein load as estimated by the sum of all MS intensities reported for all proteins found in the given sample. Averages of 3 replicates per condition were made and ratios of treated

versus control sample were calculated. Proteins that showed modulation greater than 2-fold were retained for further analysis.

### **Network analysis using STRING software**

Protein-protein interaction analysis was performed using online tools STRING version 10 ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)).

### **Raising TGFBI antibodies (10G9A10 and 4G6B10) and their validation**

Custom-made murine monoclonal TGFBI antibodies were raised (Diaclone, France) by immunizing 5 mice in the footpads with 1 µg/mouse/injection of recombinant TGFBI (Targetome, Belgium). Cells collected from lymph nodes were pooled and fused to myeloma X63/AG.8653 (Diaclone) and distributed on 96-well plates. Mice hybridoma were screened for TGFBI reactivity using ELISA. Briefly, plates were first coated using goat anti-mouse IgG (Diaclone), saturated in PBS 5% BSA and then incubated with 10 µl/well of hybridoma supernatants. Following extensive washing, 2 ng of biotinylated TGFBI or biotinylated POSTN were added into each well, followed by 1h incubation at RT. Finally, the plates were washed and streptavidin-HRP (Europa Bioproducts; cat. no. PZCJ30H) was added to each well. The signal was revealed using TMB according to manufacturer's recommendations (1-Step Ultra TMB-ELISA, Thermo Scientific; cat. no. 34028).

Purified TGFBI antibodies (clones 10G9A10 and 4G6B10) were also evaluated on HEK-293 cells transfected with either TGFBI or POSTN (Targetome), cultured 5 hours in presence of Brefeldin A (Sigma-B7651). Unlabeled isotype controls were from Diaclone. Cells were treated first with Cytofix/Cytoperm buffer (BD Biosciences; cat. no.: 554722) 20 min at 4°C and then with BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences; cat. no.: 554723) with a range of diluted antibody (1 µg to 0.01 µg/well) for 30 min at 4°C. Following washing, secondary antibody was added GAM-FITC (MP Biomedicals; cat. no.: 55526) (dilution 1/800) and the cell mixture was incubated for 30 min at +4°C. The cells were analyzed using Guava® easyCyte flow cytometer (Millipore).

Binding of TGFBI antibodies was further evaluated using surface plasmon resonance (SPR) analysis and IF. Antibodies 4G6 and 10G9 were analyzed for their capacity to directly bind to immobilized TGFBI using a BIAcore X-100 apparatus (Cytiva, Marlborough, MA, USA). TGFBI (20 µg/ml in 10 mM sodium acetate, pH 4.0) was allowed to react with a flow cell of a CM5 sensor chip previously activated with a mixture of 0.2 M N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride and 0.05 M N-hydroxysuccinimide (35 µl, flow rate 10 µl/min). After ligand immobilization, matrix neutralization was performed with

1.0 M ethanolamine (pH 8.5) (35  $\mu$ l, flow rate 10  $\mu$ l/min) and the activated/deactivated dextran was used as reference (control) system. Increasing concentrations of 4G6 and 10G9 (ranging between 18.75 and 600 nM) were injected over the TGFBI-coated sensor chip and the response was recorded as a function of time tracking the SPR intensity change upon binding progression. Injection lasted for 2 min (flow rate 10  $\mu$ l/min) to allow association to immobilized TGFBI and was followed by 10 min of dissociation; each run was performed in HBS-EP buffer (Cytiva) and the sensor chip was regenerated with glycine pH2. The equilibrium (plateau) values of the SPR sensorgrams were used to build the binding isotherms displayed, after normalization. Binding isotherm points were fitted with the Langmuir equation for monovalent binding to evaluate the mass surface dissociation constant,  $K_d$ . The best-fitting procedure was performed with the SigmaPlot 11.0 software package (Systat Software Inc.).

For IF, fresh frozen human CRC-LM were cut using cryostat (CM3050, Leica) and fixed using cold methanol. The sections were then treated with 0.5% Triton X-100 in PBS at room temperature for five minutes, followed by blocking in 5% BSA for 1h at RT. Tissues were then incubated using a 1:500 dilution of anti-TGFBI (clones 10G9A10 and 4G6B10) in 1% BSA at 4°C overnight. Following extensive washing the slides were incubated with the secondary goat anti-mouse antibody coupled to Alexa Fluor® 488 (Thermo Fischer; cat. no.: A32723) at 1:2000 dilution for 1h at RT. Next, the slides were washed and incubated with a mix of anti-vimentin Alexa Fluor® 555 conjugated antibody (Cell Signaling; cat. no. 9855) and anti-panCK Alexa Fluor® 647 conjugated antibody (Cell Signaling; cat. no. 4528), both at 1:50 dilution. Following final washing step, slides were counterstained with DAPI and mounted for viewing as described above (see IF materials and methods).

## Figure Legends

**Table S1:** Clinical information for patients used in ELISA analysis of serum TGFBI levels.

**Table S2-S3:** Clinical information for primary CRC (S2) and CRC-liver metastasis (S3) patients involved in immunohistochemistry and immunofluorescence analysis.

**Table S4:** Significantly modulated proteins from proteomic analysis of cell lysates and conditioned media from HT29hm and SW1222 cancer cells (depleted for TGFBI) as well as cell lysates of HUVEC (treated with recombinant TGFBI).

**Figure S1:** Effect of MAP kinases treatment on SW1222 cells **a.** Western blot analysis of TGFBI expression in SW1222 cells after treatment with TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml), SB202190 (5  $\mu$ M, p38 inhibitor) and MK2206 (1  $\mu$ M, AKT inhibitor) alone or in combination for 48h. **b.** TGFBI expression levels in SW1222 cells treated with TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml), SP600125 (5  $\mu$ M, JNK inhibitor), PD98059 (5  $\mu$ M, MAP kinase inhibitor), (c) BAY11-7082 (5  $\mu$ M, NFKB inhibitor) alone or in combination. Western blots were quantified by densitometric analysis using Image J software and normalized with ACTB.

**Figure S2:** TGFBI promotes cell proliferation and migration *in vitro*. **(a).** Validation of TGFBI silencing in SW1222 cells by quantitative real-time PCR 48h, 72h and 96h post-transfection. **(b)** Migration assay using SW1222 siTGFBI and siCTRL cells following 24h incubation. **(c).** Proliferation assay using SW1222 cells treated with recombinant TGFBI 10ug/mL during 24h, 48h, 72h and 96h. **(d).** Migration assay on SW1222 cells treated with recombinant TGFBI for 24h. Panels c-d \*\*\*/\*\*\* denote statistical significance with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively, error bars are standard deviations of means.

**Figure S3:** Network of up-regulated proteins found in lysates and conditioned media of SW1222 and HT29hm cells following their silencing for TGFBI. Significantly enriched pathways are displayed in the table below.

**Figure S4:** Network of down-regulated proteins found in lysates and conditioned media of SW1222 and HT29hm cells following their silencing for TGFBI. Significantly enriched pathways are displayed in the table below.

**Figure S5:** Network of up-regulated proteins found in lysates of HUVEC cells following their treatment with recombinant TGFBI. Significantly enriched pathways are displayed in the table below.

**Figure S6:** Network of down-regulated proteins found in lysates of HUVEC cells following their treatment with recombinant TGFBI. Significantly enriched pathways are displayed in the table below.

**Figure S7:** Selection and validation of monoclonal TGFBI antibodies. **a.** ELISA screen of nine TGFBI antibodies for their binding to recombinant TGFBI or POSTN. **b.** FACS analysis of two top binding TGFBI antibodies, 10G9A10 and 4G6B10, in HEK-293 cells transfected

with either TGFBI or POSTN. **c.** Western blot analysis of 10G9A10 and 4G6B10 TGFBI antibodies in different CRC cell lines. **d.** SPR analysis of 10G9A10 and 4G6B10 TGFBI antibody target affinity. **e.** IF analysis of 10G9A10 and 4G6B10 TGFBI antibody localization in fresh frozen human CRC-LM samples, along with vimentin and pan-cytokeratin labeling (shown are representative images of 10 cases).

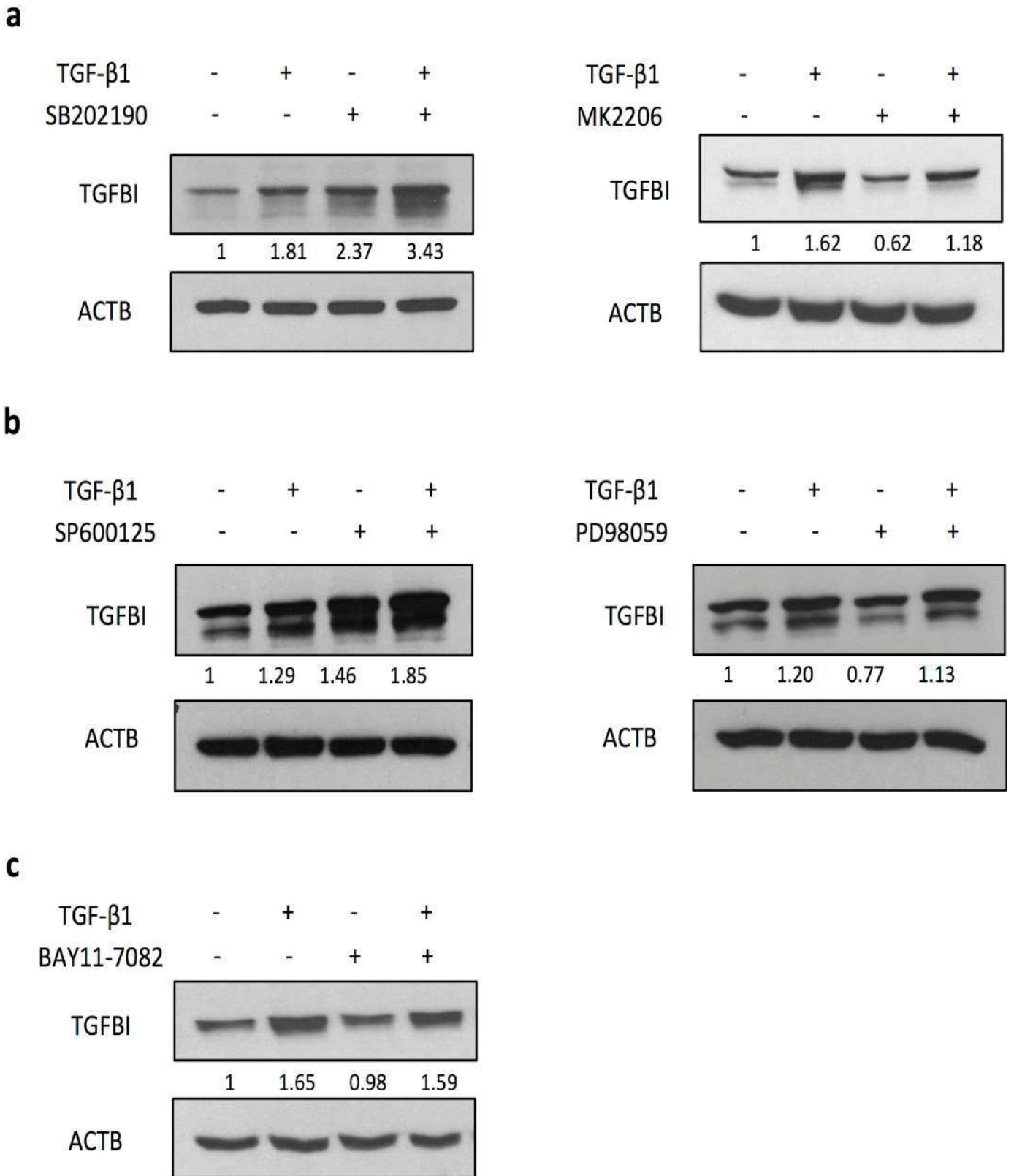


Figure S1



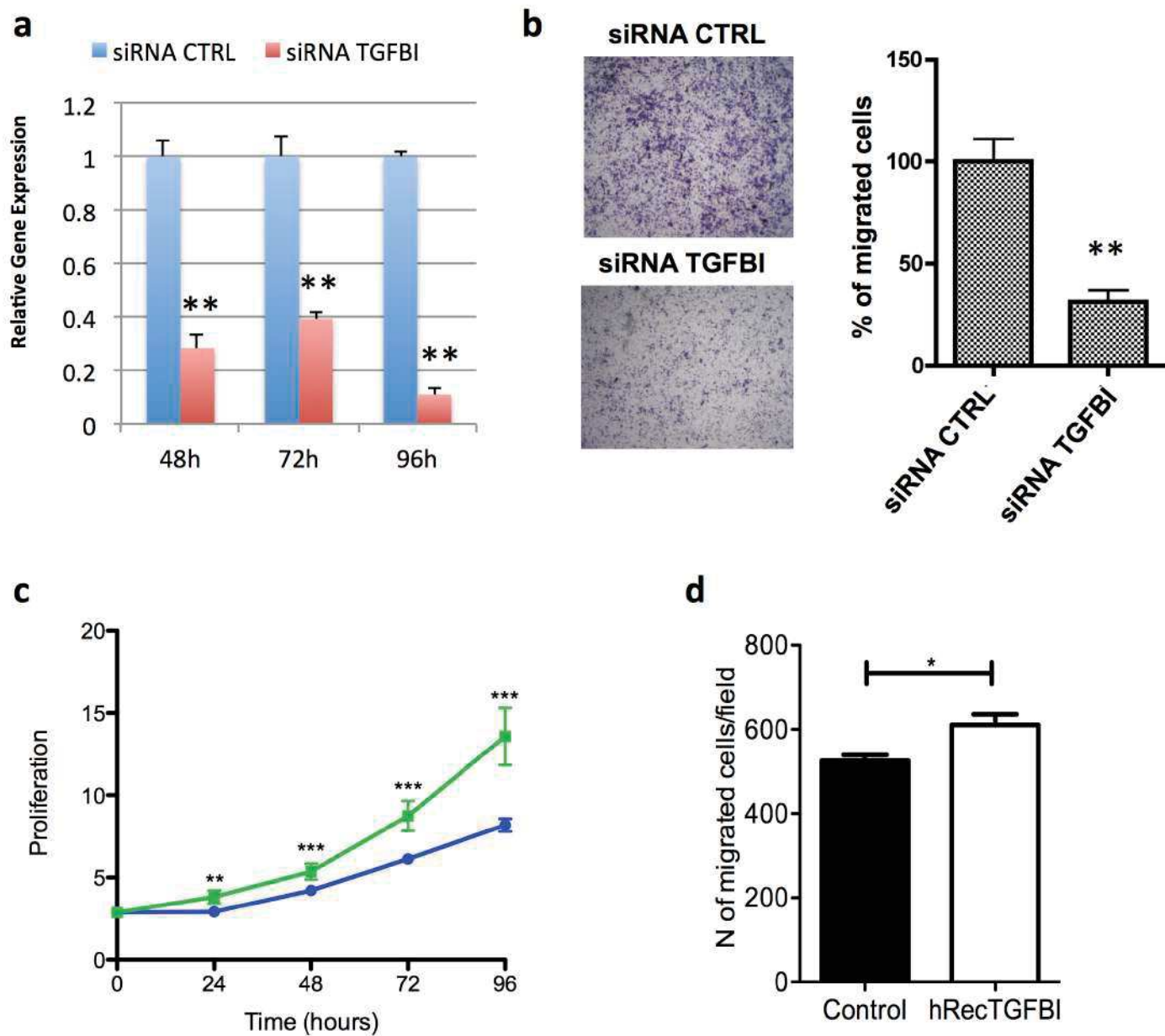
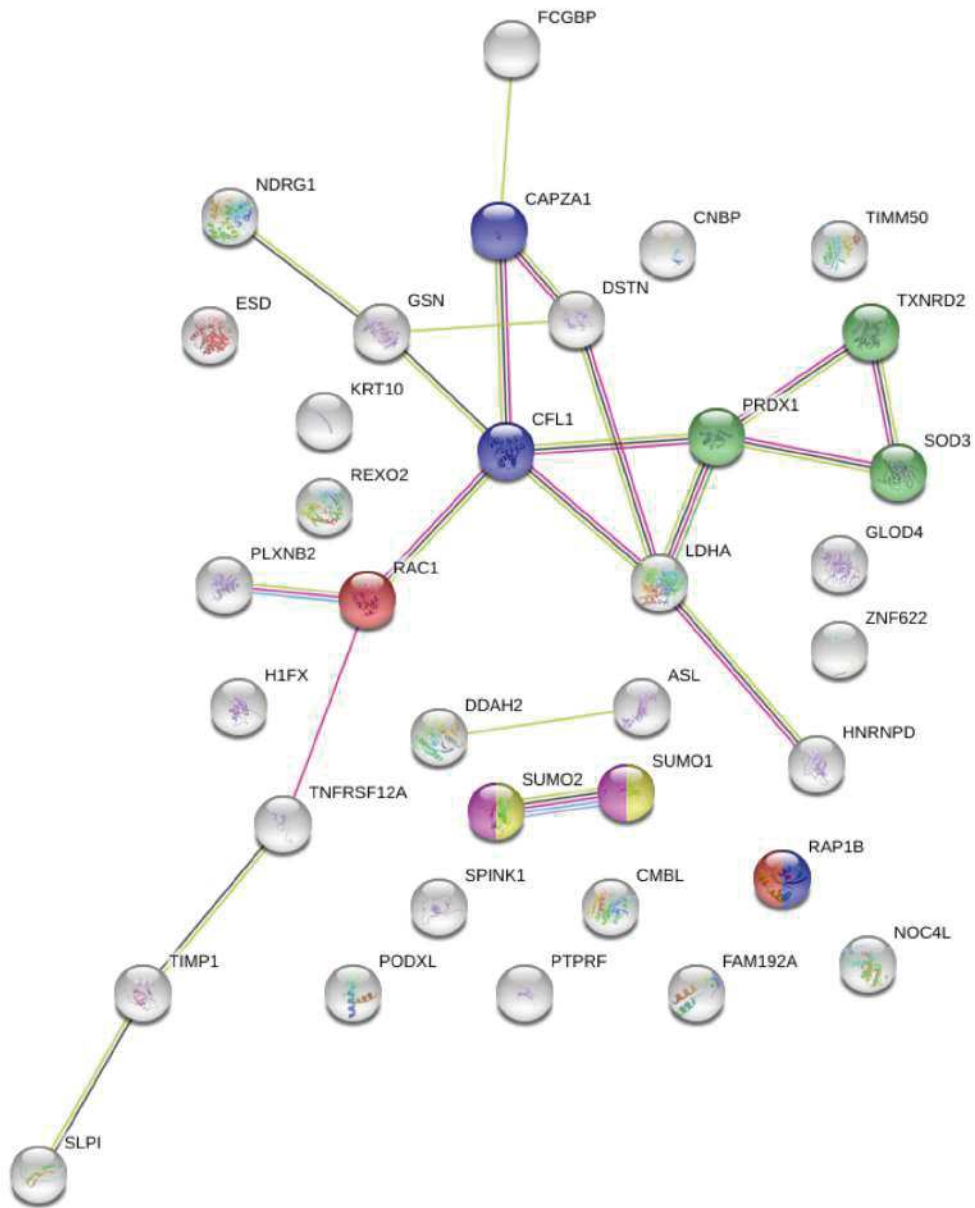


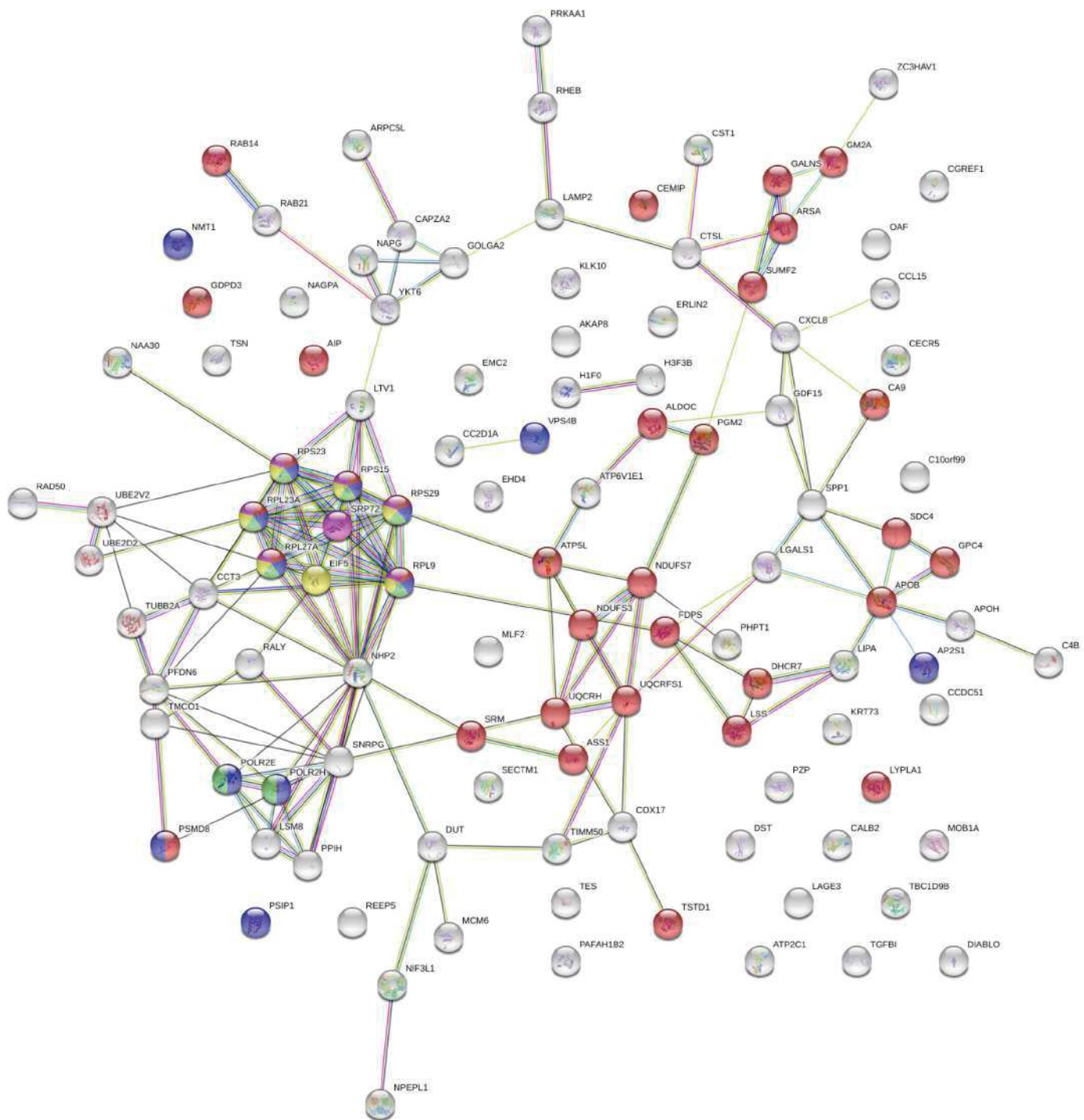
Figure S2



### Reactome Pathways

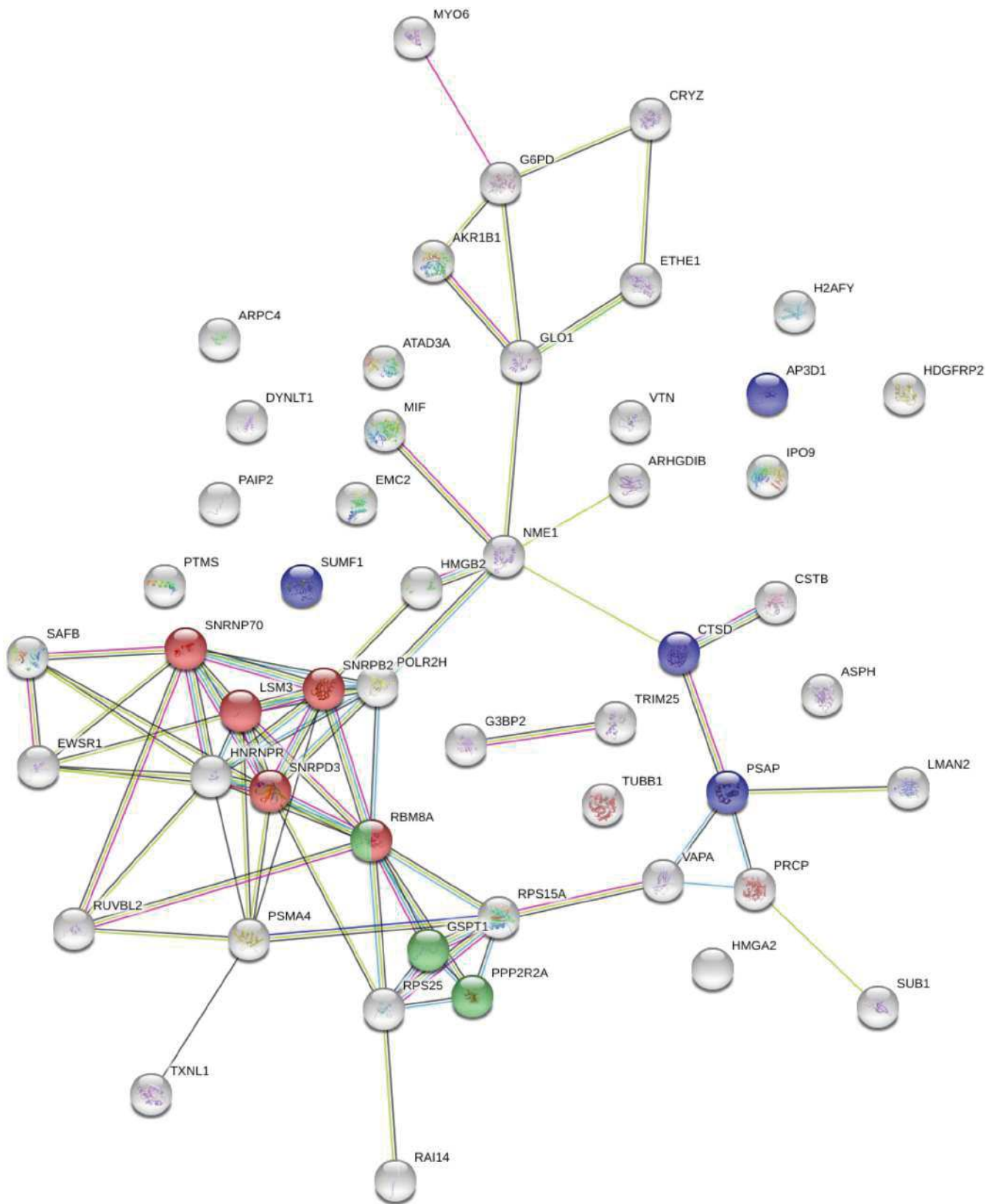
<i>pathway</i>	<i>description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>	
HSA-8950505	Gene and protein expression by JAK-STAT signaling after In...	3 of 38	0.0093	Blue
HSA-8875555	MET activates RAP1 and RAC1	2 of 10	0.0093	Red
HSA-3299685	Detoxification of Reactive Oxygen Species	3 of 35	0.0093	Green
HSA-3065679	SUMO is proteolytically processed	2 of 5	0.0093	Yellow
HSA-3065678	SUMO is transferred from E1 to E2 (UBE2I, UBC9)	2 of 6	0.0093	Purple

Figure S3



Reactome Pathways				
<i>pathway</i>	<i>description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>	
HSA-1430728	Metabolism	33 of 2032	1.68e-05	<span style="color: red;">●</span>
HSA-5663205	Infectious disease	13 of 363	7.03e-05	<span style="color: blue;">●</span>
HSA-168273	Influenza Viral RNA Transcription and Replication	8 of 128	0.00022	<span style="color: green;">●</span>
HSA-72706	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	7 of 108	0.00042	<span style="color: yellow;">●</span>
HSA-1799339	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membr...	7 of 109	0.00042	<span style="color: purple;">●</span>

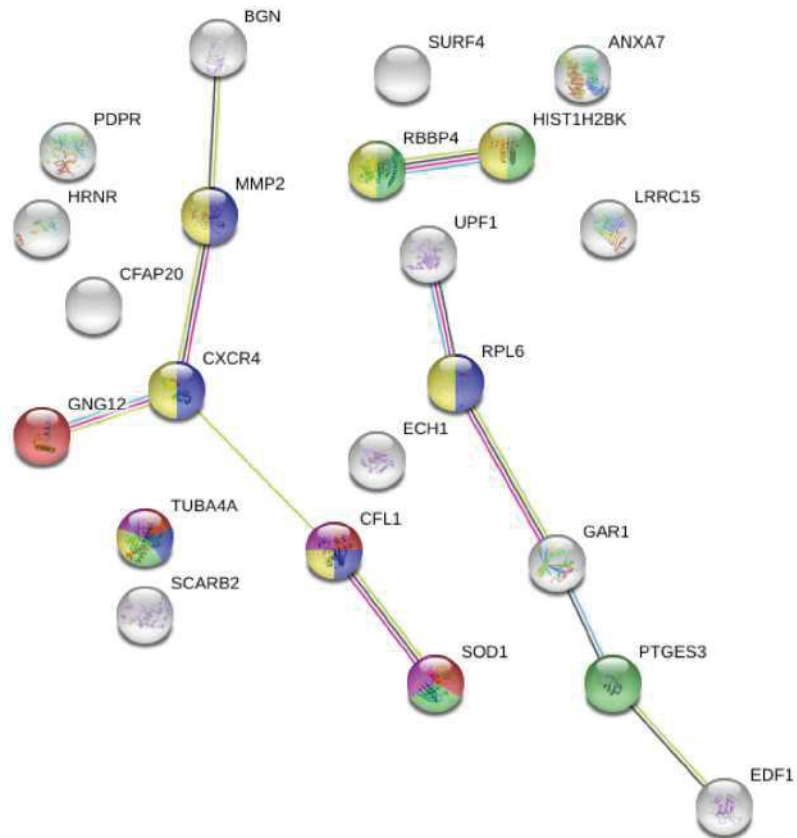
Figure S4



KEGG Pathways			
<i>pathway</i>	<i>description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
hsa03040	Spliceosome	5 of 130	0.0018
hsa04142	Lysosome	4 of 123	0.0112
hsa03015	mRNA surveillance pathway	3 of 89	0.0400

Figure S5





Reactome Pathways				
<i>pathway</i>	<i>description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>	
HSA-76002	Platelet activation, signaling and aggregation	4 of 256	0.0181	
HSA-422475	Axon guidance	5 of 541	0.0181	
HSA-2262752	Cellular responses to stress	5 of 384	0.0181	
HSA-1266738	Developmental Biology	7 of 1023	0.0181	
HSA-114608	Platelet degranulation	3 of 125	0.0192	

Figure S6

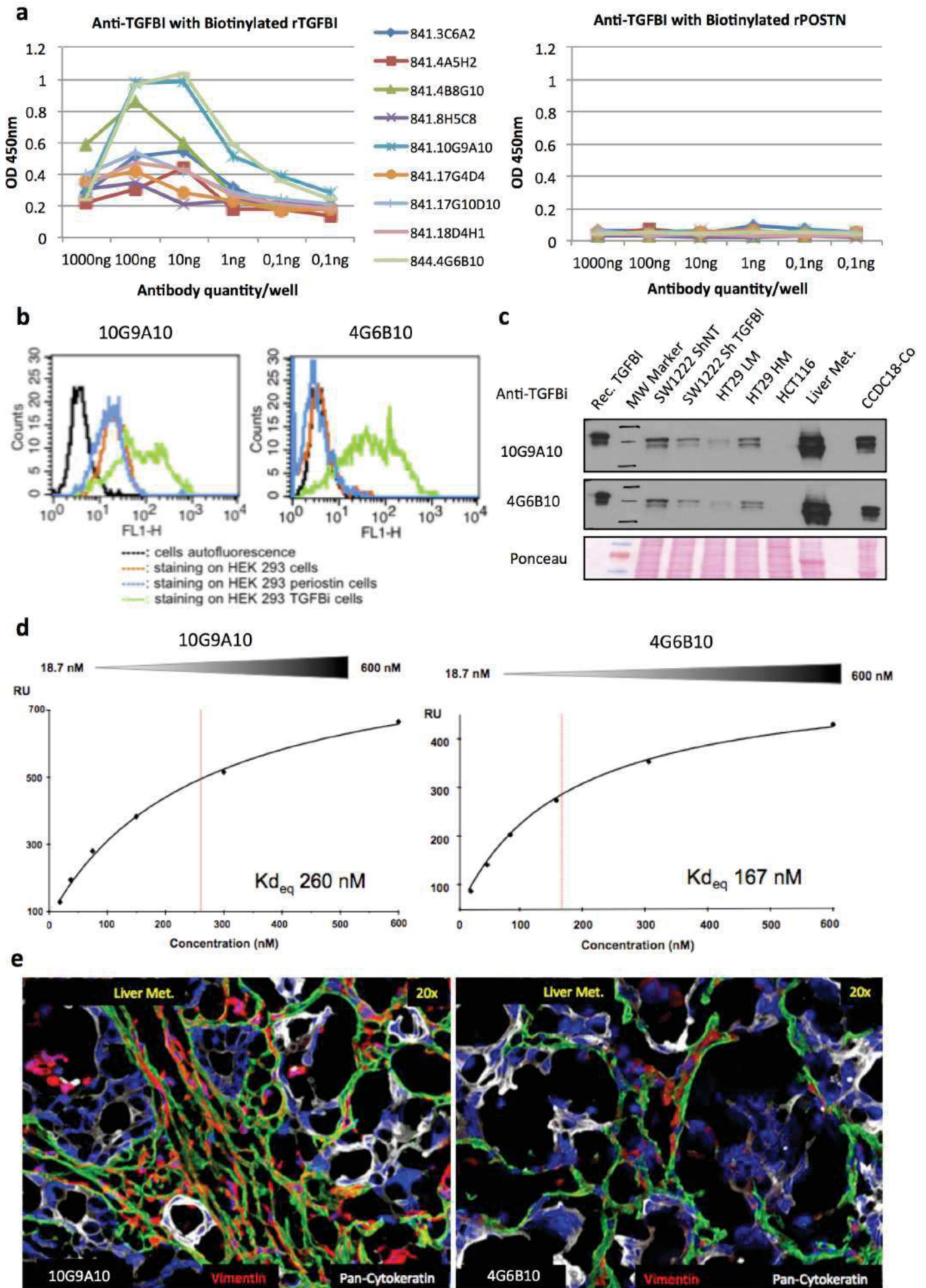


Figure S7



## **Résumé - Étude de la dissémination du cancer colorectal**

Le processus de dissémination du cancer colorectal (CCR) est un processus extrêmement peu efficace mais qui de par sa fréquence, parvient à initier des métastases. Elle débute par le départ de quelques cellules depuis la tumeur primaire selon différents modes de migration et des stratégies individuelles ou collectives. Parvenues à entrer dans un vaisseau sanguin, les cellules cancéreuses deviennent des cellules tumorales circulantes (CTCs). Ces CTCs profitent de la circulation sanguine pour se propager dans l'organisme. Cependant chacune de ces étapes les confrontes à microenvironnement qui peut être un avantage ou un désavantage. Certaines cellules tumorales disséminées (CTDs) parviennent cependant à éduquer le microenvironnement en un microenvironnement pro-tumoral. Si ce n'est pas le cas, elles peuvent entrer en dormance et attendre que ce dernier change et devienne pro-tumoral. Chacune des étapes de ce processus peuvent faire l'objet d'une stratégie thérapeutique visant à empêcher la dissémination colorectale. Il est donc nécessaire de mieux comprendre l'hétérogénéités tumorale et les interactions qu'elles ont avec le microenvironnement. De plus, le processus de dissémination est un phénomène dynamique et qui doit être pris en compte dorénavant très tôt afin d'intégrer la notion de dissémination précoce du cancer colorectal.

## **Abstract- Deciphering the dissemination process of colorectal cancer**

The colorectal cancer (CRC) dissemination is an extremely inefficient multistep, but despite this, metastasis can be successfully formed. Dissemination starts by few cells that leave the primary tumor and use different type of migration individually or collectively. Once they enter into blood vessels, cancer cells become circulating tumors cells (CTCs). CTCs use the blood stream circulation to disseminate to distant organs. However, in each of the dissemination step, CTCs can face a new microenvironment that can give them advantages or disadvantages. Some of these disseminated tumor cells (DTCs) transform the microenvironment to a pro-tumoral microenvironment. If not, they can enter in dormancy and wait until that the microenvironment changes and became permissive. Each of these steps could be used to develop a targeted therapeutic strategy in order to impede the colorectal cancer dissemination. We face thus an urgent need to better understand the tumoral heterogeneity and their microenvironmental interactions. Furthermore, the dissemination process is a dynamic phenomenon and it must be considered earlier in order to integrate the early dissemination of the colorectal cancer.