



HAL
open science

Rôle de la Fibrillarine dans le cancer colorectal

Sophie Naït Slimane

► **To cite this version:**

Sophie Naït Slimane. Rôle de la Fibrillarine dans le cancer colorectal. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10016 . tel-04216247

HAL Id: tel-04216247

<https://theses.hal.science/tel-04216247v1>

Submitted on 24 Sep 2023

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.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

**Ecole Doctorale N° 340
BIOLOGIE MOLECULAIRE, INTEGRATIVE ET CELLULAIRE**

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 23/09/2022, par :
Sophie NAIT SLIMANE

Rôle de la Fibrillarine dans le cancer colorectal

Devant le jury composé de :

M VAN COPPENOLLE, Fabien, Professeur, UCBL1

Président

Mme EMADALI, Anouk, Dr, CHU de Grenoble

Rapportrice

Mme SABBAH, Michèle, Dr, Centre de recherche Saint Antoine, Paris

Rapportrice

Mme PLATEROTI, Michelina, Dr, CHU Strasbourg

Examinatrice

M VAN COPPENOLLE, Fabien, Professeur, UCBL1

Examinateur

MERTANI, Hichem, Dr, UCBL1

Directeur de thèse

À mon Papa, ma Maman et mes trois petits frères

Résumé

Le ribosome est responsable de la traduction des ARNm en protéines. Les altérations du profil de méthylation des ARN ribosomiques (ARNr) et de l'expression de la méthyltransférase correspondante, Fibrillarine (FBL) sont associées à la progression tumorale et à la résistance aux chimiothérapies des cancers du sein mais aucun travail n'a encore été abordé concernant le cancer colorectal. Mon projet de thèse vise à comprendre le rôle de la Fibrillarine dans la tumorigenèse. En effet à l'heure actuelle, aucune donnée n'existe qui indique que la FBL intervient dans les phénomènes de migration, d'invasion et de dissémination des cellules cancéreuses. Dans le cadre du cancer colorectal, les données sont encore plus rares et nous allons répondre à ces questions grâce à nos modèles cellulaires qui seront testées en conditions in vitro. L'objectif est de déterminer le rôle de la FBL dans la croissance tumorale, la migration et l'invasion cellulaire des cellules colorectales cancéreuses in vitro. Nous avons utilisé les modèles HT-29 et HCT-116 dans lequel le sh de la FBL peut être induit pour inhiber l'expression de la Fibrillarine. Les expériences ont été réalisées en présence ou non de molécules conventionnellement utilisées en chimiothérapie dont le 5-Fluorouracile (5-FU). Les résultats obtenus à l'issue de ce projet de thèse, montrent une potentielle implication de l'enzyme Fibrillarine dans la progression tumorale des cellules de cancer colorectal. En parallèle, un travail de recherche initié dans notre équipe dans lequel il a été démontré que la molécule du 5-FU s'incorpore dans les ARNr de ribosomes matures de cellules cancéreuses, des xénogreffes de cancer colorectal ainsi que dans des tumeurs humaines. Les expériences menées ont montré que ces ribosomes « fluorés » étaient fonctionnels et engagés dans la traduction d'ARNm. Cette traduction s'est avérée sélective en favorisant la traduction d'ARNm contenant une longue région 5'UTR très structurée tel que l'IGF1-R qui est un facteur de survie cellulaire, impliqué dans la tumorigenèse. Nous avons étudié la voie de l'IGF1-R en réponse au traitement au 5-FU, en étudiant ses effets sur la croissance cellulaire des cellules de cancer colorectal HT-29 et HCT-116, ainsi que sur l'expression de la protéine IGF1-R et de son précurseur.

Mots clés : Cancer colorectal. Ribosome. Fibrillarine. 5-Fluorouracile. IGF-1R. Croissance cellulaire. Migration cellulaire.

Abstract

The ribosome is responsible for translating mRNAs into proteins. Alterations in the ribosomal RNA (rRNA) methylation profile and the expression of the corresponding methyltransferase, Fibrillarin (FBL) are associated with tumor progression and resistance to chemotherapy in breast cancers, but no work has yet been done regarding colorectal cancer. My thesis project aims to understand the role of Fibrillarin in tumorigenesis. Indeed, at present, no data exists indicating that FBL is involved in the phenomena of migration, invasion and dissemination of cancer cells. In the context of colorectal cancer, data are even rarer and we are going to answer these questions thanks to our cell models which will be tested under *in vitro* conditions. The objective is to determine the role of FBL in tumor growth, migration and cell invasion of colorectal cancer cells *in vitro*. We used the HT-29 and HCT-116 models in which FBL shRNA can be induced to inhibit Fibrillarin expression. The experiments were carried out in the presence or absence of molecules conventionally used in chemotherapy, including 5-Fluorouracil (5-FU). The results obtained at the end of this thesis project show a potential involvement of the Fibrillarin enzyme in the tumor progression of colorectal cancer cells. In parallel, a research work initiated in our team in which it was demonstrated that the 5-FU molecule is incorporated into the rRNAs of mature ribosomes of cancer cells, colorectal cancer xenografts as well as in human tumors. The experiments carried out showed that these “fluorinated” ribosomes were functional and engaged in mRNA translation. This translation was found to be selective by promoting the translation of mRNA containing a long highly structured 5'UTR region such as IGF1-R, which is a cell survival factor involved in tumorigenesis. We investigated the IGF-1R pathway in response to 5-FU treatment, investigating its effects on cell growth in colorectal cancer cells HT-29 and HCT-116, as well as on IGF-1R protein expression and its precursor.

Keywords: Colorectal cancer. Ribosome. Fibrillarin. 5-Fluorouracil. IGF-1R. Cell growth. Cell migration.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier la ligue contre le cancer qui m'a attribué une bourse doctorale et qui m'a permis d'effectuer ma thèse. Ensuite, je tiens à remercier la fondation ARC pour la recherche sur le cancer de m'avoir attribué un financement pour une quatrième année de thèse. Je remercie les fondateurs et les donateurs de permettre aux jeunes chercheurs de leur donner les moyens d'apporter leur pierre à l'édifice et de pouvoir faire avancer la science et la recherche contre le cancer.

Je tiens aussi à remercier mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Docteur SABBAH Michèle ainsi que Docteur EMADALI Anouk d'avoir accepté d'être les rapportrices de ce travail de thèse. Au Professeur VAN COPPENOLLE Fabien ainsi qu'au Docteur PLATEROTI Michelina d'avoir accepté d'être examinateur et examinatrice de ce travail de thèse. Je remercie également Docteur Julie PANNEQUIN, qui avec le Docteur PLATEROTI, ont fait parties de mon comité de suivi de thèse.

Je veux aussi remercier l'équipe Diaz dans sa globalité, tous les permanents ainsi les non permanents, post-docs, doctorants, stagiaires qui sont passés à un moment ou un autre par l'équipe Diaz qui m'ont apporté leurs aides techniques et de réflexions scientifiques mais aussi tous ceux qui ont contribué à apporter une ambiance de travail agréable au sein de cette équipe.

Je remercie chaleureusement Jean-Jacques pour ses qualités de chef d'équipe, tu as su insuffler une bonne ambiance au sein de l'équipe pour s'épanouir et mûrir sur le plan scientifique. Je remercie aussi Virginie et Frédéric pour leur bonne humeur, leur aide et leurs conseils scientifiques. Ainsi que Anne et Nicole pour m'avoir encadré et formé à mes débuts au sein de l'équipe. Je remercie aussi Fabien, tout simplement pour sa bienveillance et sa gentillesse.

Je remercie bien évidemment Hichem de m'avoir encadré depuis mon stage de Master 2 jusqu'à la fin de ma thèse, d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu dans toutes les phases que j'ai pu traverser durant ma thèse, des plus joyeuses aux plus difficiles. Je te remercie aussi pour ta bienveillance, pour ta confiance et ta bonne humeur ainsi que pour tes autres qualités humaines.

Je remercie notamment tous mes ami.e.s qui ont été présent.e.s et qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse et qui ont su comprendre ce que je traversais.

Pour finir je tiens à remercier ma famille sans qui je ne serai pas arrivée jusque-là. Papa et Maman, Abdellah, Fadila et mes trois petits frères, Lyes, Abderrahmane et Yanis, vous m'avais toujours soutenu et vous avais toujours cru en moi et j'espère vous rendre fières. Malgré la distance, votre soutien était un pilier et m'a permis d'arriver jusque-là aujourd'hui, je suis fière de vous, vous m'avais permis de tenir le coup jusqu'au bout. Mon rôle de grande sœur m'a aussi motivé à arriver jusqu'au bout et j'espère donner un bon exemple pour mes trois petits frères. Ma famille, c'est à vous que je dédie ce travail, sans vous il n'aurait pas vu le jour. A travers ces quelques mots, je vous exprime tout mon amour et toute ma reconnaissance. Encore merci.

Ça a été une très belle aventure humaine et scientifique durant laquelle j'ai appris, j'ai grandi et j'ai mûri, merci à tous ceux qui y ont contribué de quelque manière que ce soit. Si c'était à refaire, je le refaire sans aucune hésitation. Je voulais aussi dire que je suis fière de moi, de mon parcours professionnel ainsi que de mon parcours de vie et de dire merci à cette petite fille pleine de rêves d'avoir cru en elle. Il reste encore de belles aventures à vivre et de grandes choses à accomplir !

LISTE DES ABREVIATIONS

APC Adenomatous Polyposis Coli
ARNm ARN messenger
ARNr ARN ribosomique
CCR cancer colorectal
CIN chromosomal instability
CIMP CpG island methylator phenotype
Dox doxycycline
DPD dihydropyrimidine déshydrogénase
FAP familial adenomatous polyposis
FBL Fibrillarine
MMR Mismatch repair genes
MSI Microsatellite instability HNPCC
RiBi Ribosome Biogenesis
shRNA short hairpin RNA
shNS short hairpin Non Silencing
siRNA small interfering RNA
SVF sérum de vœu foetal
TS thymidilate synthase
ULA Ultra Low Adhésion
5-FU 5-Fluorouracile

I.	Introduction	12
I.1	Partie I : Le cancer colorectal.....	13
I.1.1	Définition de la santé selon l’OMS.....	13
I.1.2	Définition du cancer.....	13
I.1.3	Anatomie et fonctions du colon normal.....	14
I.1.3.1	Microbiote intestinale.....	14
I.1.3.2	Histologie du colon	15
I.1.3.3	Types cellulaires.....	16
I.1.4	Epidémiologie	16
I.1.4.1	Incidence.....	16
I.1.4.2	Mortalité.....	16
I.1.4.3	Survie	17
I.1.4.4	Le cancer colorectal demain	17
I.1.5	Facteurs de risques	18
I.1.6	Dépistage	19
I.1.7	Répartitions des cancers colorectaux	19
I.1.7.1	La forme héréditaire du CCR.....	19
I.1.7.1.1	Familial adenomatous polyposis (FAP)	20
I.1.7.1.2	Cancer colorectal héréditaire sans polypose HNPCC.....	20
I.1.7.2	Le cancer colorectal familiale	20
I.1.7.3	Le cancer colorectal sporadique	21
I.1.7.3.1	Les instabilités chromosomiques, chromosomal instability (CIN)	21
I.1.7.3.2	Les instabilités microsatellitaires, microsatellite instability MSI.....	21
I.1.7.3.3	La méthylation des îlots CpG, CpG island methylator phenotype (CIMP)	22
I.1.8	Classification moléculaire du cancer colorectal.....	22
I.1.8.1	Mutation APC et la voie WNT B-caténine	23
I.1.8.2	Mutation APC.....	23
I.1.8.3	Mutation B-caténine.....	24
I.1.8.4	Mutation C-MYC	25
I.1.8.5	Mutation K-RAS et la voie MAP kinases, PI3K/AKT	25
I.1.8.6	Mutation du récepteur EGFR	26
I.1.8.7	Mutation K-RAS.....	26
I.1.8.8	Mutation B-RAF.....	27
I.1.8.9	Mutation PI3K	28
I.1.8.10	Mutation P53.....	28
I.1.9	Développement du CCR et signature moléculaire	30

I.1.10	Classification histopathologique du cancer colorectal.....	30
I.1.11	Les traitements du cancer colorectal.....	32
I.1.11.1	La chirurgie	32
I.1.11.1.1	Chirurgie du colon.....	32
I.1.11.1.2	Chirurgie du rectum.....	33
I.1.11.2	Radiothérapie.....	33
I.1.11.3	Chimiothérapie	33
I.1.11.3.1	5-Fluorouraciles et dérivés	34
I.1.11.3.2	L'Irinotecan	35
I.1.11.3.3	Oxaliplatine	36
I.1.11.3.4	Les Régimes	36
I.1.11.4	Thérapies ciblées	36
I.1.11.5	Les immunothérapies dans le CCR.....	38
I.1.12	Résistance au cancer colorectal.....	38
I.1.13	L'hétérogénéité du CCR	39
I.1.14	Effet de tolérance induit par le 5-FU	40
I.2	Partie II : Biogénèse des ribosomes dans les cellules humaines.....	41
I.2.1	Synthèse des composants ribosomiques.....	41
I.2.2	Maturation des ARN ribosomiques.....	44
I.2.3	Modifications post-transcriptionnelles des ARNr	44
I.2.4	L'assemblage et export des ribosomes.....	44
I.3	Partie III : Biogénèse des ribosomes dans les cancers	45
I.3.1	Régulation de la biogénèse des ribosomes par les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs.....	45
I.3.2	Effets des traitements thérapeutiques sur la biogénèse des ribosomes	46
I.3.3	Ciblage de la Biogénèse des ribosomes dans les cancers	46
I.4	Partie IV : Biogénèse des ribosomes dans le cancer colorectal	48
I.4.1	Régulation des premiers stades de la biogénèse des ribosomes dans le CCR.....	48
I.4.2	Régulation des stades tardifs de la biogénèse des ribosomes dans le CCR.....	49
I.5	Partie V : La Fibrillarine, enzyme de la biogénèse des ribosomes	52
I.5.1	Structure	53
I.5.2	Expression de la Fibrillarine dans les cancers (CCR).....	55
II.	Hypothèses et objectifs de thèse.....	56
III.	Matériels et Méthodes	60
III.1	Lignées cellulaires	61
III.1.1	• HT-29.....	61

III.1.2	• HCT-116.....	61
III.2	Modèles cellulaires de l'inhibition de la Fibrillarine	61
III.2.1	siRNA-FBL	61
III.2.2	shRNA-FBL.....	62
III.3	Caractérisation du modèle cellulaire	63
III.3.1	Western blot	63
III.3.2	RTqPCR.....	64
III.4	Etude de la croissance cellulaire en 2D.....	65
III.4.1	xCELLigence.....	65
III.4.2	Test MTS	65
III.4.3	Comptage cellulaire au bleu de trypan.....	66
III.4.4	Etude de la croissance cellulaire en 3D : formation de sphéroïdes	66
III.5	Etude de la migration et de l'invasion cellulaire	66
III.6	Analyse des ARNr 18S et 28s dans les cellules CCR.....	67
III.7	Test Sunset.....	67
IV.	Résultats	68
IV.1	Partie I – Fibrillarine dans le cancer colorectal	69
IV.1.1	Expression de la FBL dans les cellules colorectales cancéreuses	69
IV.1.2	Modèles cellulaires de l'inhibition de la Fibrillarine	69
IV.1.2.1	• siRNA-FBL	69
IV.1.2.2	• shRNA-FBL.....	70
IV.1.3	Etude de la croissance cellulaire en 2D.....	74
IV.1.3.1	Le test MTS : viabilité cellulaire	74
IV.1.3.2	Etude de la croissance cellulaire des cellules CCR par xCELLigence.....	74
IV.1.4	Etude de la migration cellulaire des cellules CCR par xCELLigence.....	75
IV.1.5	Etude de l'invasion cellulaire des cellules CCR par xCELLigence	77
IV.1.6	Etude de la croissance cellulaire en 3D : formation de sphéroïdes	78
IV.1.7	Comptage cellulaire des cellules CCR.....	81
IV.1.8	Caractérisation des ARN ribosomiques des cellules CCR.....	82
IV.1.9	Mesure de la synthèse protéique totale par le test Sunset.....	82
IV.2	Partie II 5-Fluorouracile, cancer colorectal et ribosomes.	90
IV.2.1	La voie IGF1-R en réponse au traitement par le 5-Fluorouracile : effets sur la croissance cellulaire des cellules CCR.....	90
IV.2.1.1	Plan de manipulation des cellules CCR avant expériences de croissance cellulaire : 90	
IV.2.1.2	Etude de la croissance cellulaire en réponse à l'IGF1	90

IV.2.1.3	Etude de la croissance cellulaire en réponse à l'IGF1 lors d'un pré-traitement au 5-FU :.....	91
IV.2.2	Expression du récepteur IGF1-R en réponse au traitement 5-Fluorouracile	96
V.	DISCUSSION	98
V.1	PARTIE I – FIBRILLARINE DANS LE CANCER COLORECTAL	99
V.1.1	Validation des modèles cellulaires de l'inhibition de la Fibrillarine	99
V.1.2	Caractérisation des ARN ribosomiques des cellules CCR	100
V.1.3	Mesure de la synthèse protéique totale par le test Sunset.....	101
V.1.4	Rôle de Fibrillarine dans la croissance cellulaire.....	101
V.1.5	Etude de la croissance cellulaire en 3D.....	104
V.1.6	Rôle de la Fibrillarine sur la migration et l'invasion cellulaire des cellules CCR.....	104
V.2	PARTIE II 5-FLUOROURACILE, CANCER COLORECTAL ET RIBOSOMES.....	106
VI.	Perspectives et conclusion.....	108
VII.	Références bibliographiques.....	111
VIII.	Publications.....	125

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : schéma illustrant une partie du tube digestif, de l'intestin grêle jusqu'au sphincter anal.
- Figure 2** : schéma d'une coupe transversale illustrant l'histologie du colon avec les différentes tuniques qui le composent.
- Figure 3** : Incidence et mortalité du CCR pour l'année 2020.
- Figure 4** : Estimation du nombre de nouveaux cas de CCR en 2040, dans les deux sexes et à tout âge.
- Figure 5** : Histogrammes représentant les 20 gènes les plus mutés dans le CCR.
- Figure 6** : Camembert de types de mutations APC observés en pourcentage sur un total de 7547 échantillons mutés.
- Figure 7** : Camembert de types de mutations CTNNB1 observés en pourcentage sur un total de 538 échantillons mutés.
- Figure 8** : Camembert de types de mutations KRAS observés en pourcentage sur un total de 24167 échantillons mutés.
- Figure 9** : Camembert de types de mutations BRAF observés en pourcentage sur un total de 11762 échantillons mutés.
- Figure 10** : Camembert de types de mutations P53 observés en pourcentage sur un total de 8880 échantillons mutés.
- Figure 11** : Les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT interconnectées et les différentes protéines mutées.
- Figure 12** : Schéma du développement du CCR et signatures moléculaires.
- Figure 13** : Schéma des stades histologiques de développement du CCR humain.
- Figure 14** : Schéma de métabolisation du 5-FU.
- Figure 15** : Déroulement et étapes de la biogenèse des ribosomes.
- Figure 16** : Schéma du déroulement du clivage ou « processing » de l'ARN précurseur 47S chez l'humain.
- Figure 17** : Régulation des étapes précoces de la RiBi dans le CCR.
- Figure 18** : Représentation schématique des facteurs de la biogenèse des ribosomes surexprimés dans les cellules CCR et leurs sites de régulation du « processing » des ARNr dans les étapes tardives de la RiBi.
- Figure 19** : Représentation schématique du complexe snoRNP à boîte C/D de la Fibrillarine.
- Figure 20** : Structure de domaine de la fibrillarine.
- Figure 21** : Images des cellules HT-29 prises au microscope.
- Figure 22** : Images des cellules HCT-116 prises au microscope.
- Figure 23** : Expression de la Fibrillarine dans les cellules de cancer colorectal.
- Figure 24** : Résultats de l'inhibition de la FBL par siARN quantification western blot.
- Figure 25** : caractérisation du modèle cellulaire d'inhibition de la FBL par shARN dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116.
- Figure 26** : caractérisation du modèle cellulaire d'inhibition de la FBL par shARN.
- Figure 27** : Histogrammes représentant le test MTS sur les cellules CCR.
- Figure 28** : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 en temps réel mesurée par xCELLigence.

Figure 29 : Courbes de migration cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 en temps réel mesurée par xCELLigence.

Figure 30 : Courbes d'invasion cellulaire des cellules CCR HCT-116 en temps réel mesurée par xCELLigence.

Figure 31 : Formation de sphéroïdes en culture tridimensionnelle des cellules CCR HT-29 et HCT-116.

Figure 32 : Histogrammes du comptage cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116.

Figure 33 : Courbes du comptage cellulaire, cellules vivantes et cellules mortes, des cellules CCR HT-29 et HCT-116.

Figure 34 : Gel d'agarose de caractérisation des ARN ribosomiques des cellules CCR.

Figure 35 : Mesure de la synthèse protéique totale par le test Sunset dans les cellules CCR.

Figure 36 : Chronologie des traitements des cellules dans les expériences de croissance cellulaire par xCELLigence.

Figure 37 : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 en temps réel mesuré par xCELLigence.

Figure 38 : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 en temps réel mesuré par xCELLigence après 24 heures de 5-FU

Figure 39 : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 en temps réel mesuré par xCELLigence après 48 heures de 5-FU

Figure 40 : Caractérisation de l'IGF1-R et de l'IGF1-R précurseur dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116.

I. Introduction

I.1 Partie I : Le cancer colorectal

I.1.1 Définition de la santé selon l'OMS

- *La santé est un état de complet bien-être physique, mental et social et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité.*
- *La possession du meilleur état de santé qu'il est capable d'atteindre constitue l'un des droits fondamentaux de tout être humain, quelles que soit sa race, sa religion, ses opinions politiques, sa condition économique ou sociale.*
- *La santé de tous les peuples est une condition fondamentale de la paix du monde et de la sécurité ; elle dépend de la coopération la plus étroite des individus et des États.*

I.1.2 Définition du cancer

Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg, dans leur revue publiée en 2000, expliquent les altérations qui conduisent une cellule normale à se transformer en cellule cancéreuse. Le cancer est une maladie multifactorielle altérant l'organisme au niveau moléculaire, biochimique et cellulaire, ces altérations sont le reflet de changement dynamique dans le génome. Ces changements dans le génome sont des mutations génétiques qui donnent naissance à un gain de fonction pour les oncogènes et une perte de fonction pour les gènes suppresseurs de tumeurs. Le développement tumoral est un processus familier à l'évolution Darwinienne dans laquelle une succession de changement génétique ont lieu conférant des avantages à la cellule normale pour se transformer peu à peu à une cellule cancéreuse [1].

Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg ont identifié six altérations acquises durant le développement tumoral qui confèrent un mécanisme de défense aux cellules cancéreuses, que l'on peut sans doute retrouver dans tous les types de cancers : auto-suffisance en signaux de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance (anti-croissance), échappement à la mort cellulaire (apoptose), potentiel de réplication illimité, angiogenèse soutenue et invasion et métastase. Et plus récemment, d'autres études ont démontré deux altérations en plus des six déjà cité, qui contribueraient au développement tumoral qui sont : la reprogrammation du métabolisme et l'échappement au système immunitaire. En plus des cellules tumorales, la tumeur baigne dans un « microenvironnement tumoral » constitué de cellules saines mais qui contribuent au développement tumoral [2][3].

Selon les statistiques de Global cancer 2020 (<https://gco.iarc.fr/>), il y a eu environ 20 millions de cas de cancer dans le monde, tous types de cancers confondus, dans les deux sexes et pour tout âge confondu. Ainsi, le cancer serait la deuxième cause de décès dans le monde avec près de 10 millions de morts par an. Il existe plusieurs facteurs de risques, de différents types, comme l'obésité, les radiations UV, l'alcool ou bien le tabagisme. Mais aussi des agents biologiques, appelés « cancérogènes » tels que les virus, exemple le Papillomavirus qui provoque le cancer du col de l'utérus, ou bien les virus de l'hépatite (B et C) qui provoquent

le cancer du foie, ou encore la bactérie *Helicobacter pylori* qui provoque le cancer de l'estomac.

I.1.3 Anatomie et fonctions du colon

Le rôle principal du tube digestif est la digestion, l'extraction des nutriments et l'élimination des éléments non-assimilables pour l'organisme et ce processus commence depuis la bouche et se termine au niveau de l'anus, chaque partie du tube digestif ayant un rôle bien précis. Le colon ou gros intestin, fait partie du tractus gastro-intestinal. Le colon mesure environs 1.5 m chez l'Homme, il est principalement composé de trois parties : le colon proximal, le colon moyen et le colon distal. Il peut notamment être subdivisé en six segments distincts et de deux angles : le cæcum qui est la partie initiale du colon, le colon ascendant, l'angle droit du colon, le colon transverse, l'angle gauche du colon, le colon descendant, le colon sigmoïde, le rectum et le canal anal qui se termine par le sphincter anal (figure 1). Le rôle principal du colon est l'absorption digestive des électrolytes, des vitamines et de l'eau en absorbant 80% de l'eau résiduelle, afin de transformer les résidus alimentaires liquides venant de l'intestin grêle en fèces, et par la suite leur propulsion vers le rectum, puis leur évacuation [4][5][6].

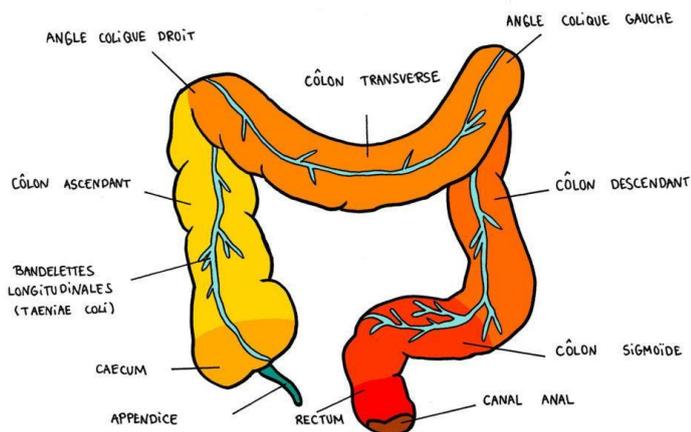


Figure 1 : schéma illustrant une partie du tube digestif, de l'intestin grêle jusqu'au sphincter anal.

Source : <https://fautqucasorte.fr/road-tripes/colon/>

I.1.3.1 Microbiote intestinal

Il est clair qu'on ne peut pas parler du tractus gastro-intestinal sans évoquer le microbiote intestinal. La flore commensale est présente tout au long du tube digestif, mais sa densité et sa diversité est nettement marquée au niveau du colon, elle représente environ 500 à 1000 variétés d'espèces différentes (bactéries, champignons, levures). Elle est présente dès la naissance puis elle évolue tout au long de la vie et devient caractéristique de chaque individu

[7]. Les recherches de ces dernières années ont mis au jour l'importance ainsi que l'impact que peut avoir le microbiote sur notre santé. En effet, on peut estimer cet impact rien qu'en sachant que ce microbiote contient autant de bactéries qu'en contient tout le corps humain [8]. Cet écosystème biologique à part entière interagit avec son hôte, qui est le corps humain, il est composé d'une grande diversité de bactéries dites commensales, ou flore commensale, et il en résulte plusieurs interactions, notamment les interactions entre l'hôte et le microbiote, les bactéries entre elles-mêmes et des interactions externes avec l'environnement, ce qui rend complexe et difficile de compréhension le rôle exact de chaque bactérie composant ce microbiote [9]. Les dernières études ont nettement démontré l'impact de l'alimentation sur le développement du CCR [10], on sait notamment l'influence de l'alimentation sur la composition du microbiote [11], on sait aussi qu'une longue exposition aux traitements antibiotiques, aboutissant à une perturbation du microbiote, appelé dysbiose, est un facteur favorisant le développement du CCR [12], toutes ces études mènent à se poser la question de l'impact direct du microbiote sur le développement du CCR [13].

I.1.3.2 Histologie du colon

Le colon est composé de quatre couches cellulaires successives distinctes appelées tuniques, on cite de l'extérieur vers l'intérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire et enfin la séreuse (figure 2). Ces différentes couches forment une réelle barrière entre le microbiote intestinal et l'organisme. Au niveau de la couche muqueuse on retrouve les cellules épithéliales sur une seule couche, formant l'épithélium, la couche formant la surface en contact direct avec la cavité du tube digestif. C'est à ce niveau que le mucus est sécrété, il recouvre tout le tube digestif et il est aussi nécessaire à drainer et à expulser les fèces [5]. Toute cette paroi est notamment accompagnée d'un système sanguin, lymphatique et d'un système nerveux propre au tube digestif appelé système nerveux entérique ou intrinsèque [14].

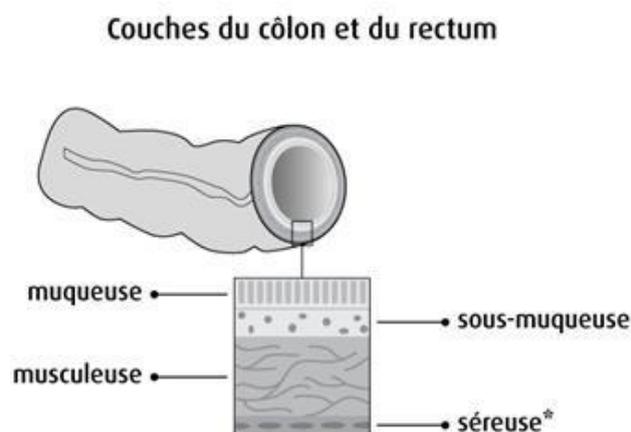


Figure 2 : schéma d'une coupe transversale illustrant l'histologie du colon avec les différentes tuniques qui le composent.

Source : <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/colorectal/what-is-colorectal-cancer/the-colon-and-rectum>

I.1.3.3 Types cellulaires

L'épithélium du colon est formé de différents types cellulaires. Tout d'abord, les cellules souches, elles ne sont pas les plus nombreuses (environ 1%), néanmoins elles restent les plus importantes car elles sont à l'origine de cellules qui se différencient vers les différents types cellulaires présents au niveau de l'épithélium. Elles sont nichées aux fonds des cryptes du colon [15]. On trouve notamment les cellules entérocytes ou cœlonocytes, elles sont dites aussi cellules absorbantes et représentent environ 80% des cellules. Elles sont caractérisées par une forme cylindrique polarisée grâce à des jonctions intercellulaires, avec un noyau au pôle basal. Leurs rôles sont l'absorption et le transport des nutriments à travers l'épithélium, d'où le nom de cellules absorbantes [16]. La troisième population cellulaire qu'on retrouve au niveau de l'épithélium du côlon sont les cellules de Goblet ou les cellules sécrétrices de mucus, auparavant appelées cellules caliciformes, elles représentent environ 15% des cellules épithéliales du côlon, elles se distinguent par leur morphologie globulaire, dû à la présence de vésicules liés à leurs fonctions de cellules productrices et sécrétrices de mucus [17]. On peut notamment retrouver d'autres types cellulaires du tube digestif détaillés dans cette revue [18]. Ces différentes cellules sont soumises à plusieurs voies de signalisations qui régulent leur prolifération et régénération, leur orientation et leur différenciation à travers des signaux, pour ne citer que la voie Wnt qui sera détailler plus tardivement dans ce manuscrit ou bien la voie Notch détaillées dans cette revue [15].

I.1.4 Epidémiologie

I.1.4.1 Incidence

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus répandu dans le monde avec près de 2 millions de personnes touchées, derrière le cancer du sein et des poumons, pour tout âge et dans les deux sexes, selon les statistiques de Global can pour l'année 2020, il représente 10% de tous les cancers (figure 3). C'est le troisième cancer le plus répandu chez les hommes, et le deuxième cancer le plus répandu chez les femmes (<https://gco.iarc.fr/>).

I.1.4.2 Mortalité

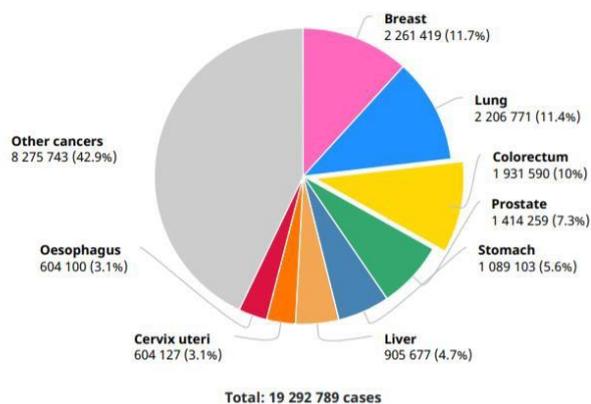
En termes de mortalité, le cancer colorectal est le deuxième cancer qui tue le plus dans le monde avec près de 1 million de morts en 2020, après le cancer des poumons, dans les deux sexes et pour tout âge (figure 3). Ce taux de mortalité élevé est dû au diagnostic tardif de la maladie. Chez les hommes, le CCR est le troisième cancer qui tue le plus, et chez les femmes c'est aussi le troisième. En France, le cancer colorectal est le quatrième cancer le plus répandu. Vu la grande incidence ainsi que la mortalité dû au cancer colorectal, il est très important d'identifier les facteurs de risques qui contribuent au développement de cette maladie, car on prédit 2.5 millions de nouveaux cas en 2035 (<https://gco.iarc.fr/>).

Colorectal cancer

Source: Globocan 2020



Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Number of deaths in 2020, both sexes, all ages

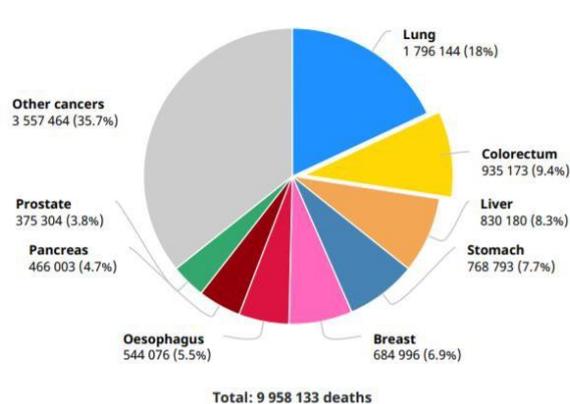


Figure 3 : Incidence et mortalité du CCR pour l'année 2020. Camembert de gauche : le CCR représente le troisième cancer avec un taux d'incidence de près de 2 millions de cas dans le monde, à tout âge et dans les deux sexes, derrière le cancer des poumons et le cancer du sein. Camembert de droite : taux de mortalité du CCR avec près d'un million de mort en 2020, derrière le cancer du poumon.

Source : Globocan 2020.

I.1.4.3 Survie

Le taux de survie à 5 ans est généralement donné selon le stade de la maladie, et les différences de taux entre les différents stades d'évolution sont majeures. Comme pour le cancer colorectal, le taux de survie à 5 ans s'élève à 90% lorsque la maladie est détectée dès les premiers stades de développement. Ce taux chute à 70% lorsque le cancer se développe et touche les organes adjacents et les ganglions lymphatiques. Au stade métastatique, la survie à 5 ans des patients atteints du cancer colorectal est seulement de 12% [19].

I.1.4.4 Le cancer colorectal demain

D'ici 2040, l'agence internationale de recherche sur le cancer IARC, prédit une augmentation de plus de 50% de nouveaux cas de cancer colorectal, c'est-à-dire près de 3 millions de nouveaux cas pour les deux sexes, dans le monde. Pour l'Europe, une augmentation de +25%. Mais les plus touchées seront les pays en voie de développement avec +70% pour l'Asie, +75% pour l'Amérique latine et +95% pour l'Afrique (figure 4). Ces pays seront d'autant plus touchés probablement à cause de l'occidentalisation de leurs modes de vies mais aussi à cause du vieillissement de la population mondiale [19]. Parallèlement à l'incidence croissante du cancer colorectal, on observera une augmentation de la mortalité due au cancer colorectal de +70%, c'est-à-dire, 1.5 millions de mort en 2040, contre 900 000 en 2020.

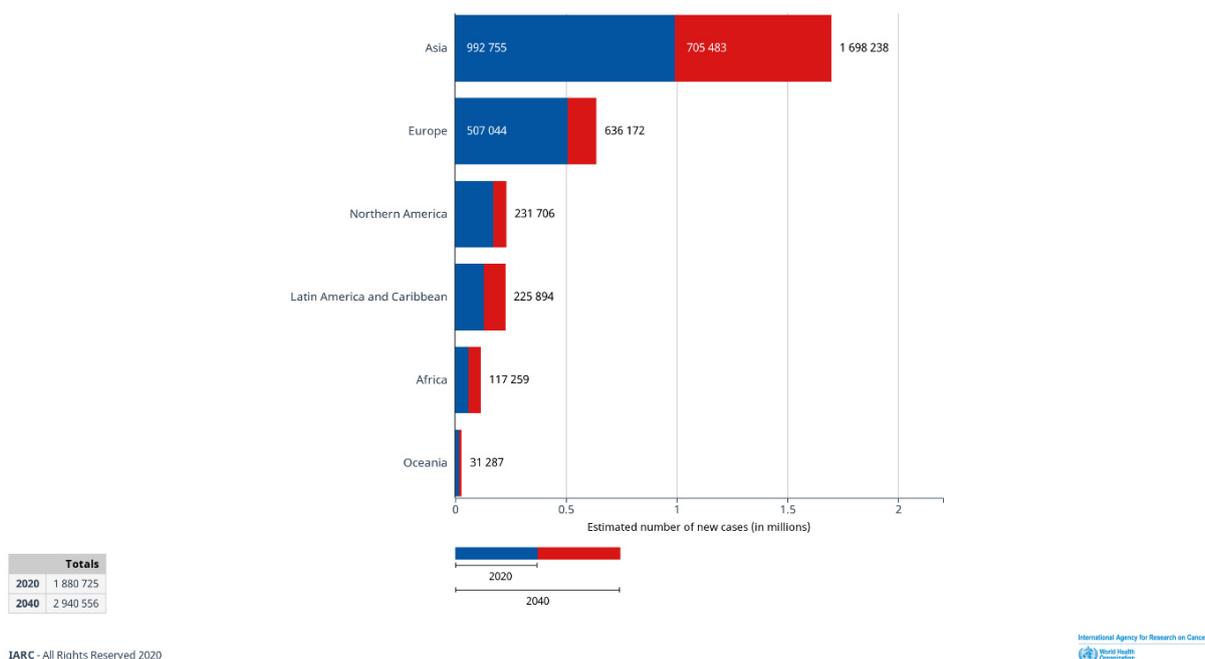


Figure 4 : Estimation du nombre de nouveaux cas de CCR en 2040, dans les deux sexes et à tout âge. Représentation de l’estimation d’incidence du CCR en fonction des régions du monde en histogrammes inversés. En bleu, le taux d’incidence pour 2020. En rouge, l’estimation des nouveaux cas pour 2040. Source : Globocan 2020.

I.1.5 Facteurs de risques

Indépendamment du risque héréditaire, et donc de la prédisposition génétique de développer le cancer colorectal, que j’aborderai dans la partie « répartition des cancers colorectaux », il existe de nombreux facteurs de risque de nature environnementale, qui favorisent le développement du cancer colorectal. L’un des premiers facteurs de risques est le vieillissement, en effet, la médiane d’âge des personnes atteintes par le cancer colorectal est de 68 ans chez les hommes et 72 ans chez les femmes. Néanmoins, l’incidence du cancer colorectal chez les moins de 50 ans augmente ces dernières années [20]. Le deuxième facteur de risque est le genre, en effet le risque de développer le cancer colorectal est plus élevé chez les hommes que chez les femmes. On constate qu’il y a un plus grand nombre de cas d’incidence chez les hommes que chez les femmes, avec plus d’un million chez les hommes et 800 000 cas chez les femmes. De même pour la mortalité qui est plus élevée chez les hommes comparés aux femmes, avec 500 000 morts en 2020 chez les hommes et 400 000 chez les femmes (<https://gco.iarc.fr/>). Cette différence peut s’expliquer par le comportement à risque chez les hommes dû à une forte consommation d’alcool mais aussi au tabagisme, qui sont aussi des facteurs de risques non négligeables. Il existe aussi d’autres facteurs liés notamment à l’alimentation comme la consommation de viandes rouges, la viande transformées, le manque de fruits et légumes et l’obésité, le manque d’activité physique et la sédentarité. En effet l’obésité serait responsable de 17.7% des cancers colorectaux, selon les statistiques de Global can 2020. Tous ces facteurs augmenteraient le risque de développer le cancer colorectal. Mais aussi, le tabac et l’alcool [21]. L’alcool serait aussi responsable de 21.1% des cancers colorectaux (<https://gco.iarc.fr/>).

I.1.6 Dépistage

Il existe plusieurs méthodes de dépistage du cancer colorectal, des méthodes invasives et non-invasives. Le « Guaiac faecal occult blood tests » FOBT ou GFOBT, est un test non-invasif, comme son nom l'indique, c'est un test sanguin des selles sur papier Guaiac, il est donc utilisé pour détecter le sang dans les selles. Le papier Guaiac en contact avec le sang, se colore en bleu après une réaction d'oxydation. Ce test est pratique mais peu fiable, en effet c'est un test peu coûteux, facile d'utilisation mais peu spécifique car la détection de sang dans les selles n'est pas toujours liée à la présence d'un cancer, en effet, le sang dans les selles peut-être un symptôme de diverticules ou bien même d'hémorroïdes. Mais lorsque le test est positif avec un certain seuil, les patients sont dirigés afin d'effectuer des tests plus invasifs et plus spécifiques tels que la coloscopie [22]. Test immunochimique fécal en anglais Faecal immunochemical test (FITs), est aussi un test non-invasif. Ce test permet de détecter les globines humaines par le moyen d'anticorps spécifiques. Ce test est nettement plus spécifique comparé au test GFOBT précédemment décrit, car il détecte les protéines globines qui sont spécifiquement humaines. Ce test a aussi une meilleure sensibilité avec un seuil de détection plus faible [23]. Concernant les tests invasifs, il y a la sigmoïdoscopie. Cette technique consiste à utiliser un endoscope flexible, muni d'une caméra qui peut seulement atteindre la partie sigmoïde du colon, d'où son nom de sigmoïdoscopie, elle est aussi appelée coloscopie courte. Cette technique permet aussi de faire des prélèvements de petits polypes. Une colonoscopie est prescrite lors de la détection de trois polypes ou plus. Colonoscopie, qui elle permet la visualisation du colon en entier, ce qui fait de cette méthode un gold standard en matière de dépistage du cancer colorectal, et dans certains pays c'est la méthode utilisée en premier pour détecter le cancer colorectal [24].

I.1.7 Répartitions des cancers colorectaux

Le cancer colorectal peut être classé en trois grands groupes, sporadique, héréditaire ou bien familiale. Dans cette partie, je vous présenterai ces trois grandes catégories et de ce qui les différencie [25].

I.1.7.1 La forme héréditaire du CCR

Pour commencer, la forme la moins répandue, la forme héréditaire du cancer colorectal et qui représente 5 à 10% des CCR [26]. On distingue principalement deux formes de CCR héréditaire, la première est le HNPCC pour hereditary nonpolyposis colorectal cancer en anglais et cancer colorectal héréditaire sans polypose, en français, ou aussi appelé le syndrome de Lynch. La deuxième forme est familiale adenomatous polyposis (FAP) en anglais, et polypose adénomateuse familiale (PAF), en français. La forme héréditaire se définit sur un certain nombre de critères, et parfois elle peut se confondre avec la forme familiale qui partage quelques mêmes critères et qui représente environ 20% des CCR [27].

I.1.7.1.1 FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS (FAP)

Les patients atteints de PAF peuvent développer des centaines de polypes dans le colon, lorsqu'ils ne sont pas retirés, ils peuvent devenir potentiellement malins et donc se développer en cancer colorectal. PAF est un syndrome qui prédispose à développer le cancer du côlon, il se caractérise par une mutation germinale touchant le gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) et touche moins de 1% de tous les CCR. L'inactivation du gène *APC* conduit à la sur-activation de la voie WNT qui favorise la croissance cellulaire. Un sous-groupe de patients atteints de PAF se caractérisent aussi par la présence d'une mutation bi allélique du gène *MYH*, gène de réparation de l'ADN. L'apparition des polypes peut se manifester dès l'âge de 16 ans, et peut se développer en cancer colorectal vers les 40 ans. Les individus avec une mutation germinale du gène *APC*, un parent au premier degré diagnostiqué avec un syndrome de PAF, ont de fortes probabilités de développer eux-mêmes le syndrome de PAF. Les individus avec ces critères sont soumis à un tester afin de détecter une mutation du gène *APC*, dans le but de diagnostiquer éventuellement le syndrome de PAF [28].

I.1.7.1.2 CANCER COLORECTAL HEREDITAIRE SANS POLYPOSE HNPCC

Les patients atteints de HNPCC se caractérisent par une mutation germinale au niveau des gènes du système de réparation des mésappariements (Mismatch repair genes - MMR) chez plusieurs individus au sein de la même famille, ce système est composé de protéines capables de reconnaître et de réparer les mésappariements durant la réplication de l'ADN. Plusieurs protéines de ce système sont impliquées dans le développement des HNPCC, dont *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH3*, *PMS1*, *PMS2*, *TGFBR2*, et *EXO1*. Néanmoins, entre 50 et 70% des patients diagnostiqués avec un HNPCC portent des mutations au niveau des gènes, *MLH1* et *MSH2*. Par conséquent, lors du diagnostic des patients HNPCC, ce sont ces deux gènes qu'on recherche en premier. Ces mutations sont plus particulièrement des MSI autrement dit, des instabilités microsatellites ou en anglais Microsatellite instability - MSI. Ces MSI peuvent parfois aider à la distinction des patients atteints de HNPCC des patients PAF, lorsque les critères cliniques ne sont pas assez clairs. Durant plusieurs années, les critères afin d'identifier les patients atteints de HNPCC ont évolués, et trois schémas de critères cliniques sont connus par les cliniciens, « The Amsterdam criteria I », « The Bethesda criteria » et plus récemment « The Amsterdam criteria II ». Selon les critères de Amsterdam II, on parle de HNPCC lorsqu'il y a au moins trois individus de la même famille atteints d'un cancer associé au HNPCC, c'est-à-dire, le cancer colorectal, le cancer du duodénum, ou bien le cancer de l'urètre. Le deuxième critère est que l'un des individus soit être un parent des deux autres. Le troisième critère est que deux générations successives doivent être affectées. Le quatrième critère est que au moins un individu doit être diagnostiqué avant l'âge de 50 ans. Aussi, la PAF doit être exclu et des examens pathologiques doivent être effectués afin d'identifier le HNPCC [29].

I.1.7.2 Le cancer colorectal familial

Il représente 20-25% de tous les cancers colorectaux, tout comme le cancer colorectal héréditaire, il se caractérise par des mutations germinales, mais ne remplit pas tous les critères définissant le groupe héréditaire.

I.1.7.3 Le cancer colorectal sporadique

Le cancer colorectal sporadique représente la plus grande majorité des CCR avec environ 80%. Indépendamment du risque génétique, comme expliqué pour le CCR héréditaire et le CCR familiale, le CCR sporadique n'a pas de prédisposition génétique, mais son développement serait influencé par des facteurs de risque comme l'alimentation, l'activité physiques ou même des facteurs environnementaux, détaillés dans la partie « Facteurs de risques » ci-dessus, mais aussi des mutations somatiques qui surviennent au cours de la vie, et leurs accumulations conduisant au dérèglement de voies de signalisation cellulaire majeures. On distingue trois grandes voies de dérégulation génétique qui caractérise le CCR sporadique, ces voies génétiques impliquent des mutations au sein d'un ensemble de protéines impliquées dans des voies de signalisations cellulaires. On distingue, Les instabilités chromosomiques, ou chromosomal instability (CIN) en anglais, les instabilités microsatellitaires autrement dit, microsatellite instability (MSI) en anglais, et enfin la méthylation des îlots CpG, CpG island methylator phenotype (CIMP) [30].

I.1.7.3.1 LES INSTABILITES CHROMOSOMIQUES, « CHROMOSOMAL INSTABILITY » (CIN)

Les instabilités chromosomiques représentent environ 70% des CCR sporadiques. Ces instabilités représentent des déséquilibres dans le nombre de chromosomes, appelé aneuploïdie, des amplifications chromosomiques, ainsi que des pertes d'hétérozygotie, en anglais loss of heterozygosity (LOH). Ces instabilités chromosomiques se caractérisent donc par des gains ou des pertes de parties entières ou importantes de chromosomes. Ces changements génétiques engendrent, par ailleurs l'activation de proto-oncogènes tels que K-Ras et C-Myc et l'inactivation gènes suppresseurs de tumeurs, tels que P53 et APC. Ces CIN marquent des événement génétiques clé durant le développement du CCR, comme une des mutations les plus répandu dans le CCR, qui est la mutation du gène APC, qu'on retrouve dans 80% des CCR et qui marque l'initiation des adénomes chez l'humain. Ainsi que d'autres mutations qui se déclenchent marquants des évènements clé dans le développement du cancer colorectal. Ces différentes mutations seront décrites dans la partie « classification moléculaire du cancer colorectal ».

I.1.7.3.2 LES INSTABILITES MICROSATELLITAIRES, « MICROSATELLITE INSTABILITY » MSI

Les MSI sont une accumulation anormale de mutations génétique, au niveau de régions génétiques appelées « microsatellites » aussi appelé séquence répétée en tandem « short tandem repeat » qui sont des répétitions de séquences de 1 à 6 paires de bases, ces accumulations de mutations sont dues au dysfonctionnement des protéines du système réparations de l'ADN. Ce dysfonctionnement est lui-même dû à des mutations au niveau des MMR (Mismatch repair genes), les gènes des réparations des mésappariements, le rôle des MMR étant d'identifier et de corriger les mésappariements. Les gènes MMR peuvent être touchés par une mutation spontanée, une hyperméthylation du promoteur, ou bien une mutation germinale, comme précédemment décrite dans le syndrome de Lynch. 10 à 15% des CCR sporadiques sont dus au MSI [31].

I.1.7.3.3 LA METHYLATION DES ILOTS CPG, CPG ISLAND METHYLATOR PHENOTYPE (CIMP)

En plus des altérations génétiques précédemment décrites à travers CIN et MSI, il existe une altération épigénétique qu'on retrouve dans les CCR sporadiques, qui la méthylation des îlots CpG, CIMP. Le terme CpG signifie une séquence ADN où les nucléotides Cytosine et Guanine s'enchaînent sur le même brin d'ADN, cytosine-phosphate-guanine, contrairement à la notion CG, qui elle fait référence à une paire de bases sur deux brins d'ADN distincts. La méthylation du dinucléotide CpG se fait au niveau du 5-méthylcytosine. Ces îlots CpG peuvent se trouver à l'extrémité 5' de la moitié des gènes du génome humain, très souvent au niveau des promoteurs de gènes, ou bien des régions régulatrices en amont des gènes. Le phénotype CIMP est défini comme une hyperméthylation des régions génétiques CpG. Cette hyperméthylation touchant les promoteurs de gènes, elle empêche la transcription des gènes touchés et par conséquent, l'expression protéique de ces gènes. Le phénotype CIMP est très peu décrit comparé au MSI et CIN. En revanche, les chercheurs s'accordent à identifier certains critères pour définir le phénotype CIMP, en effet, le statut CIMP est défini lorsque au moins 3 des 5 marqueurs suivants sont touchés par une hyperméthylation (RUNX3, SOCS1, NEUROG1, CACNA1G, IGF2).

Au sein du groupe CIMP, on retrouve une autre classification selon l'intensité de la méthylation. CIMP1 qui correspond à un niveau élevé de la méthylation aussi appelé CIMP-high, souvent lié à la présence d'une mutation *BRAF*. CIMP2 qui correspond à un niveau faible de méthylation aussi appelé CIMP-low, aussi associé à la présence d'une mutation *KRAS*. Ces sous-groupes de CIMP sont définis selon le nombre de marqueurs positifs à la méthylation, précédemment cités. On définit le sous-groupe CIMP-high en présence de 3 marqueurs ou plus, CIMP-low par la présence de deux marqueurs ou moins. [32] [33] [34].

I.1.8 Classification moléculaire du cancer colorectal

Le cancer colorectal est une maladie hétérogène, en effet, au cours de son développement plusieurs mutations peuvent survenir, touchant différents gènes, activant des oncogènes ou désactivant des gènes suppresseurs de tumeurs. Néanmoins, un certain nombre de mutations touchant des gènes spécifiques orchestrent le développement du cancer colorectal à des étapes précises, et que l'on retrouve dans 70 à 80% des CCR [35]. Cette succession de mutations s'accompagne de dérèglements de voies de signalisations clé au sein de la cellule, responsable de phénomènes tels que la prolifération, l'invasion ou bien l'arrêt du cycle cellulaire [36].

Selon le Catalogue of Somatic Mutations in Cancer Database, au total plus de 1195572 mutations sont recensées dans le cancer colorectal (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=colorectal+cancer>), et dans le top 20 des gènes mutés dans le CCR, on retrouve *KRAS* (32%), *BRAF* (12%), *TP53* (44%), *APC* (47%), *PI3CA* (14%) et *SMAD4* (10%) et *CTNNB1* (5%) (figure 5). Je détaillerai toutes ces mutations et les voies de signalisations impliquées dans les prochains paragraphes.

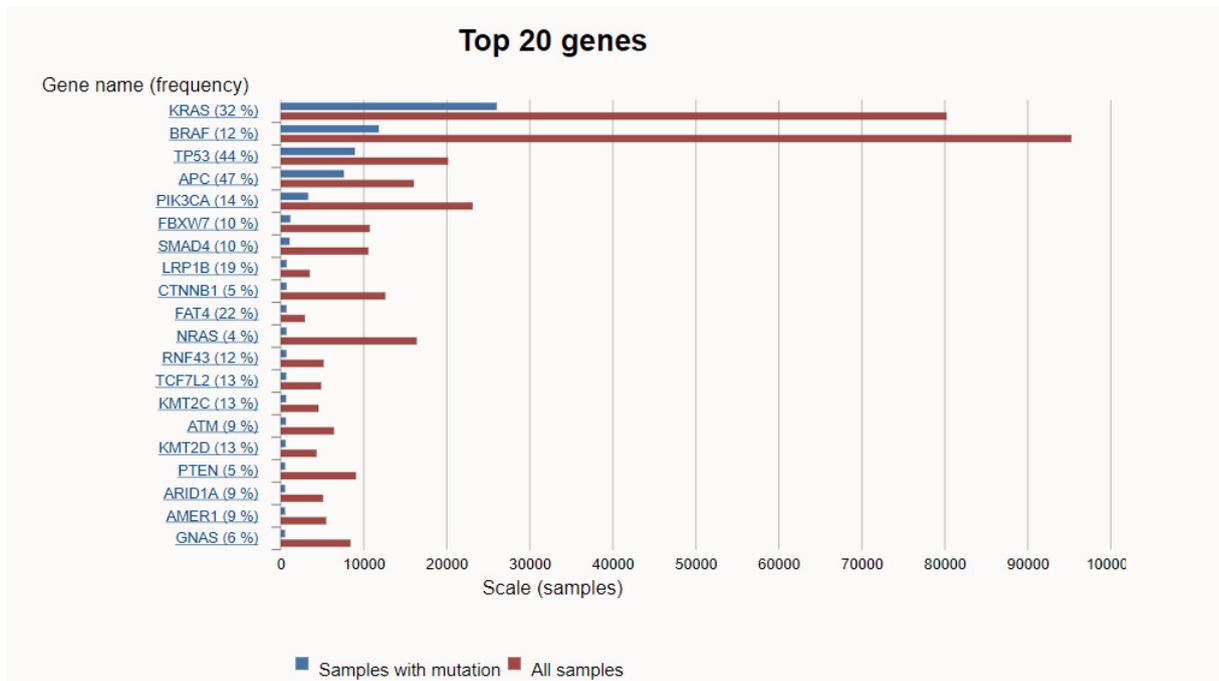


Figure 5 : Histogrammes représentant les 20 gènes les plus mutés dans le CCR. Les fréquences de mutation sont affichées à côté du nom du gène. Le tableau est trié par le nombre d'échantillons mutés examinés. La barre bleue montre les échantillons mutés et la barre rouge montre le nombre total d'échantillons analysés.

Source : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=colorectal+cancer>

I.1.8.1 Mutation APC et la voie WNT B-caténine

La voie WNT joue un rôle primordial dans le renouvellement et l'organisation des cellules du colon ainsi que le maintien de l'architecture de l'épithélium intestinal et la prolifération normale des cellules [37]. Les cellules du colon se renouvèlent à un rythme de sept jours, orchestrées par les facteurs de croissance de la voie WNT. Il existe plusieurs types de cellules au sein d'une crypte de l'intestin, on retrouve notamment des cellules souches en bas des cryptes qui donnent naissance à des cellules différenciées. Ces cellules se placent et forment des invaginations, donnant ainsi l'aspect de cryptes. Ainsi, au bout d'une semaine ces cellules entrent en apoptose et laissent place à de nouvelles cellules dérivées de cellules souches intestinales. Dans le cancer colorectal, un ou plusieurs composantes de la voie WNT sont mutés, perturbant ainsi l'organisation des cryptes intestinales. APC (Adenomatous Polyposis Coli) est un régulateur négatif de la voie WNT, en s'associant au complexe multiprotéique composé de GSK3B, CK1 et Axin, qui s'associent afin de phosphoryler la protéine B-caténine pour que par la suite, elle soit détruite par le protéasome. Ainsi grâce à ce complexe, le niveau cytoplasmique de B-caténine est constamment régulé ainsi que la signalisation de la voie WNT [38].

I.1.8.2 Mutation APC

La mutation APC est un évènement précoce dans le développement du CCR, on le retrouve dans environ 70% des CCR sporadique et serait même un évènement clé dans l'initiation du

CCR [39]. Comme précédemment décrit, la mutation germinale de APC est responsable de forme héréditaire du CCR FAP (Familial Adenomatous Polyposis) [27]. Ainsi, la mutation APC empêche la formation du complexe qui permet à la Kinase GSK3B de phosphoryler B-caténine est ainsi permettre sa dégradation par le protéasome, et par conséquent, la protéine B-caténine s'accumule dans le cytoplasme, et la signalisation de la voie WNT est perpétuellement maintenue et ce qui permet à B-caténine de transloquer dans le noyau et transcrire les différents gènes régulés par la voie de signalisation WNT, impliqués dans la prolifération tumorale et l'invasion [40][36].

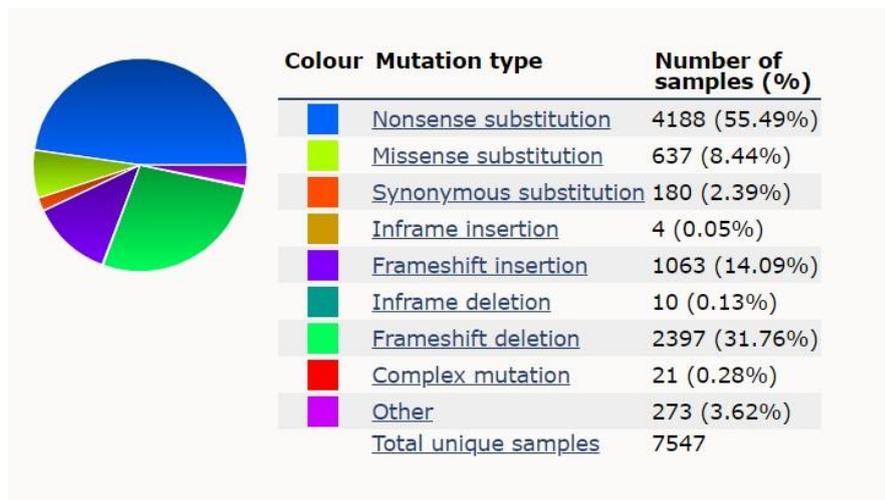


Figure 6 : Répartition de types de mutations APC observés en pourcentage sur un total de 7547 échantillons mutés.

Source : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

I.1.8.3 Mutation B-caténine

Moins commune que la mutation APC, on retrouve la mutation B-caténine dans environ %10 des CCR. C'est une mutation qui procure un gain de fonction à la protéine B-caténine, situé sur son site de phosphorylation l'empêchant ainsi d'être dégradé et reste donc constitutivement active [41]. Néanmoins, il semblerait que les mutations APC et B-caténine ne se manifestent pas au sein d'une même tumeur, en effet, les tumeurs portant la mutation APC portent toujours une B-caténine wild type et vice-versa [42].

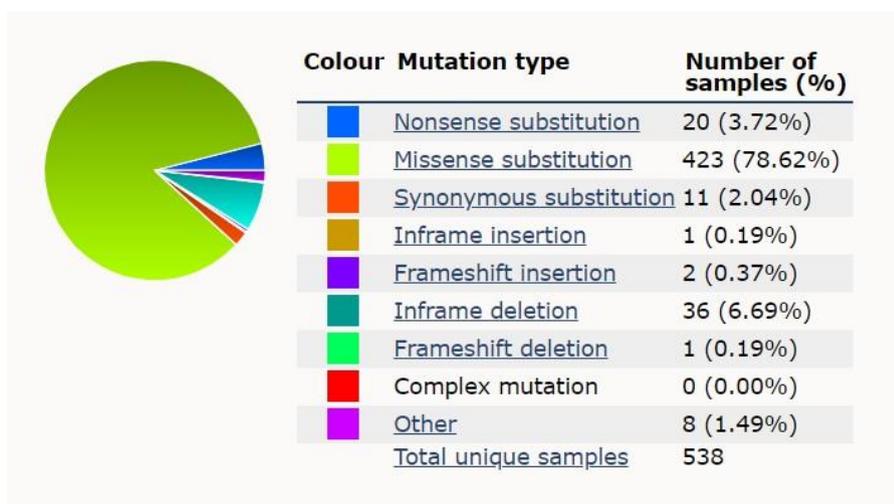


Figure 7 : Répartition de types de mutations CTNNB1 observés en pourcentage sur un total de 538 échantillons mutés.

Source : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

I.1.8.4 Mutation C-MYC

C-Myc est un proto-oncogène muté dans près de 50% des cancers [43], notamment dans les CCR où une amplification du gène a été montrée dans 5 à 10% des CCR [44], et une amplification de l'expression de la protéine de 30% [45]. C-Myc fait partie de la famille des protéines myc qui contient aussi N-MYC qui est essentiellement associé au neuroblastome et L-MYC au cancer du poumon [46]. Myc est un facteur de transcription qui régule plusieurs processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire, la survie, le métabolisme et la biogénèse des ribosomes [47]. Par conséquent, sa dérégulation implique la perturbation de plusieurs mécanismes majeurs de la tumorigenèse, tels que la prolifération cellulaire incontrôlée, l'immortalisation ou même l'angiogenèse et la métastase [46]. Dans le CCR, C-Myc a aussi un rôle majeur, notamment durant la biogénèse des ribosomes, comme décrit dans la revue [48].

I.1.8.5 Mutation K-RAS et la voie MAP kinases, PI3K/AKT

La voie de signalisation MAP kinase est sans doute la voie la plus connue et la mieux étudiée, elle aboutit à la transduction du signal à travers une cascade de phosphorylation de protéines intracytoplasmiques et termine par la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'invasion et la migration cellulaires, l'angiogenèse, ainsi que la survie cellulaire (figure 11). A travers un signal extracellulaire porté par un facteur de croissance ou bien une cytokine, le récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ou (ErbB-1), s'autophosphoryle et déclenche ainsi la transduction du signal [49]. Le récepteur EGFR fait partie d'une famille de récepteur comprenant notamment HER-2/neu (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3), et HER-4 (ErbB-4). Cette voie de signalisation clé est dérégulée dans de nombreux cancers, notamment le CCR, à travers des mutations ponctuelles de son récepteur, mais aussi de plusieurs autres protéines de cette voie, et qui sont aussi des cibles thérapeutiques dans le traitement de cancers tels que le CCR [50].

I.1.8.6 Mutation du récepteur EGFR

Le récepteur EGFR de la famille des RTK, récepteur à tyrosine kinase, est l'un des premiers récepteurs identifiés en lien avec le développement tumoral, car aussi le plus étudié [51]. Il existe plusieurs mécanismes par lesquels le système EGFR/ligands est détourné et dérégulé dans les cancers, comme une amplification du gène accompagné de la surexpression du récepteur EGFR ainsi que des ligands, mutation au niveau du domaine kinase permettant au récepteur de maintenir son activation ainsi que la voie de signalisation et de stimuler la prolifération cellulaire indépendamment du ligand (figure 11) [50][52]. La surexpression du récepteur EGFR a bien été décrite dans le cancer colorectal [53] et fait l'objet de plusieurs thérapies ciblant le récepteur, dont je parlerai en détails dans la partie « Traitements du cancer colorectal ».

I.1.8.7 Mutation K-RAS

KRAS (Kirsten rat sarcoma virus), aussi appelée p21, est une protéine de la famille des Ras, localisé sur le chromosome 12. Cette protéine intracellulaire intervient en aval de la voie de signalisation activée par le récepteur EGFR, précédemment décrit [54]. La mutation KRAS est la plus fréquente en aval de la voie de signalisation EGFR (figure 11). Cette mutation est la mutation la plus fréquente, elle est retrouvée dans approximativement 30% de tous les cancers [55]. Dans une cellule normale, grâce à un système d'activation, la protéine KRAS passe d'un état actif à un état inactif régulé par un système d'activation GTP/GDP. Sous la forme GTP (guanine triple phosphates) KRAS est active, grâce à une protéine de la famille GAP (GTPase activating Proteins), elle passe à un état inactif sous la forme GDP (guanine double phosphates) [56]. Ce système de régulation de l'activation de KRAS est dérégulé dans les cancers avec une mutation KRAS. La mutation KRAS est l'une des mutations les plus fréquentes dans les CCR avec environs 35% [57]. 80% des mutations KRAS sont localisées au niveau du codon 12 et 15% au niveau du codon 13 [58]. Ces mutations maintiennent la protéine KRAS sous sa forme GTP et donc sa forme active de manière constitutive, et maintien la voie de signalisation active indépendamment de l'Activation du récepteur EGFR. Par la suite, KRAS est devenu un facteur prédictif pour le patient recevant un traitement anti-EGFR, KRAS étant la mutation la plus fréquente se trouvant en aval du récepteur EGFR, les patients avec une mutation KRAS n'ont pas répondu aux traitements ciblant le récepteur EGFR. Ainsi, la valeur de KRAS autant que biomarqueur moléculaire a été validé dans plusieurs études [59].

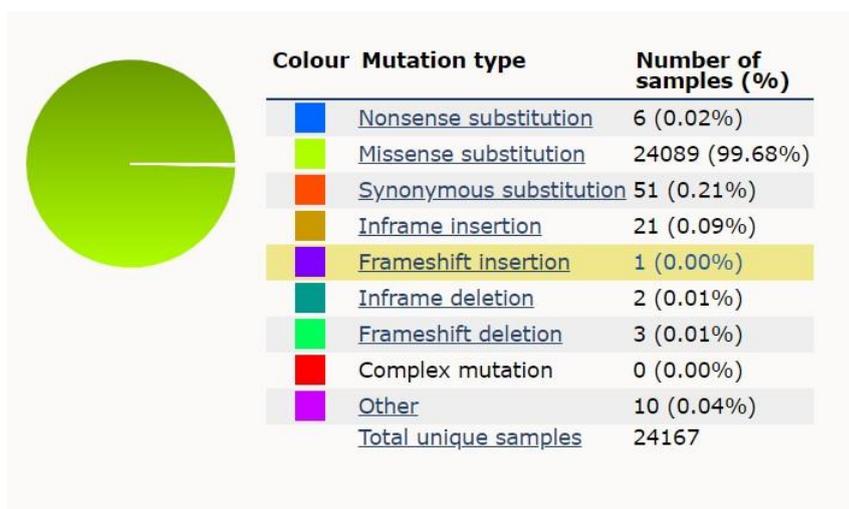


Figure 8 : Répartition de types de mutations KRAS observés en pourcentage sur un total de 24167 échantillons mutés.

Source : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

I.1.8.8 Mutation B-RAF

BRAF est une protéine membre de la famille Raf kinase qui joue un rôle déterminant dans la voie MAPKinase. La mutation BRAF est présente dans environ 10% des CCR. La mutation la plus fréquente est la mutation V600E sur le codon 600, une substitution de l'acide aminé Valine par un acide glutamique. Cette mutation provoque une activation constitutive de la protéine [60]. BRAF, tout comme KRAS, étant situé en aval du récepteur EGFR (figure 11), est elle aussi considéré comme un facteur prédictif aux traitements anti-EGFR [61].

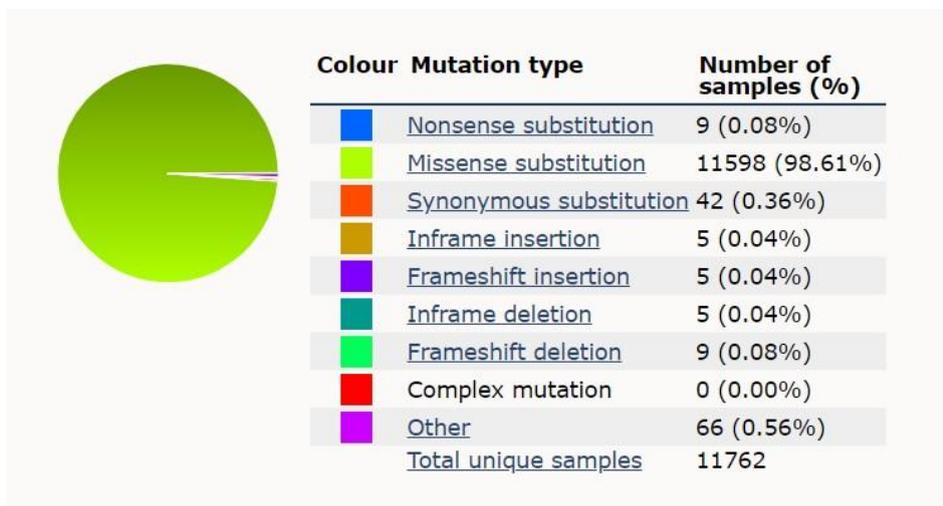


Figure 9 : Répartition de types de mutations BRAF observés en pourcentage sur un total de 11762 échantillons mutés.

Source : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

I.1.8.9 Mutation PI3K

Phosphatidylinositide 3-kinase PI3K de la voie PI3K/AKT. La protéine PI3K est composée de deux sous-unités, une sous-unité catalytique de 110 kDa et une autre sous-unité régulatrice de 85 kDa. PI3K est aussi activé par le récepteur EGFR ou bien directement par la protéine Ras (figure 11), au niveau de la sous-unité catalytique contenant un domaine de liaison Ras, (Ras Binding Domain RBD). PI3K a pour rôle de phosphoryler le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) à la position 3'-OH du cycle inositol, afin de le convertir en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). PIP3 à son tour, interagit avec PDK, qui lui-même active AKT. La dérégulation de PI3K est retrouvée dans plusieurs cancers et semble participer activement au développement tumorigénique [62]. La dérégulation de PI3K peut se faire à travers la mutation de KRAS, précédemment décrite. KRAS étant mutée et constitutivement activé dans le CCR, elle active PI3K à travers son domaine RBD au niveau de la sous-unité catalytique. Néanmoins, PI3K est aussi dérégulée à travers des mutations pouvant toucher le domaine kinase et le domaine Hélicase, des domaines considérés comme hotspot, autrement dit des points fonctionnellement déterminants. Ces mutations sont E545K et H1047R, et d'après certaines études, elles augmentent significativement l'activité kinase de PI3K [63].

I.1.8.10 Mutation P53

Le suppresseur de tumeur P53 est une protéine centrale qui orchestre plusieurs processus clé tel que l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la senescence ; ces processus sont déclenchés par un stress cellulaire, ou bien des dommages au niveau de l'ADN [64][65]. p53 est le gène le plus souvent muté dans les cancers humains, et est muté dans 40 à 50% des CCR sporadique, avec des fréquences plus élevées observées dans les tumeurs distales du côlon et du rectum et des fréquences plus faibles dans les tumeurs proximales [66]. On ressent plusieurs mutations différentes de P53 dans le CCR, majoritairement sur les exons 5,7 et 8 sur différents codons, modifiant ainsi les nucléotides et par conséquent les acides aminés de la protéine [67]. Aussi, les patients avec une mutation P53 développent une chimiorésistance et ont un mauvais pronostic [68].

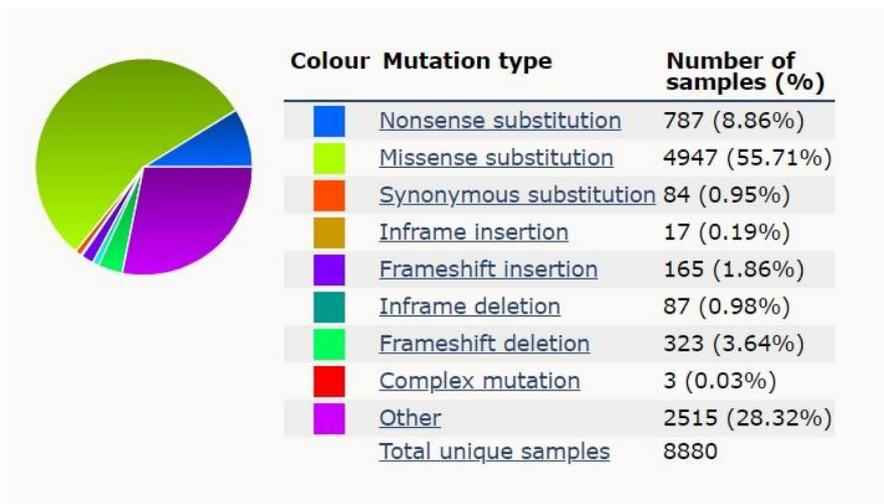


Figure 10 : Répartition de types de mutations P53 observées en pourcentage sur un total de 8880 échantillons mutés. Source : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

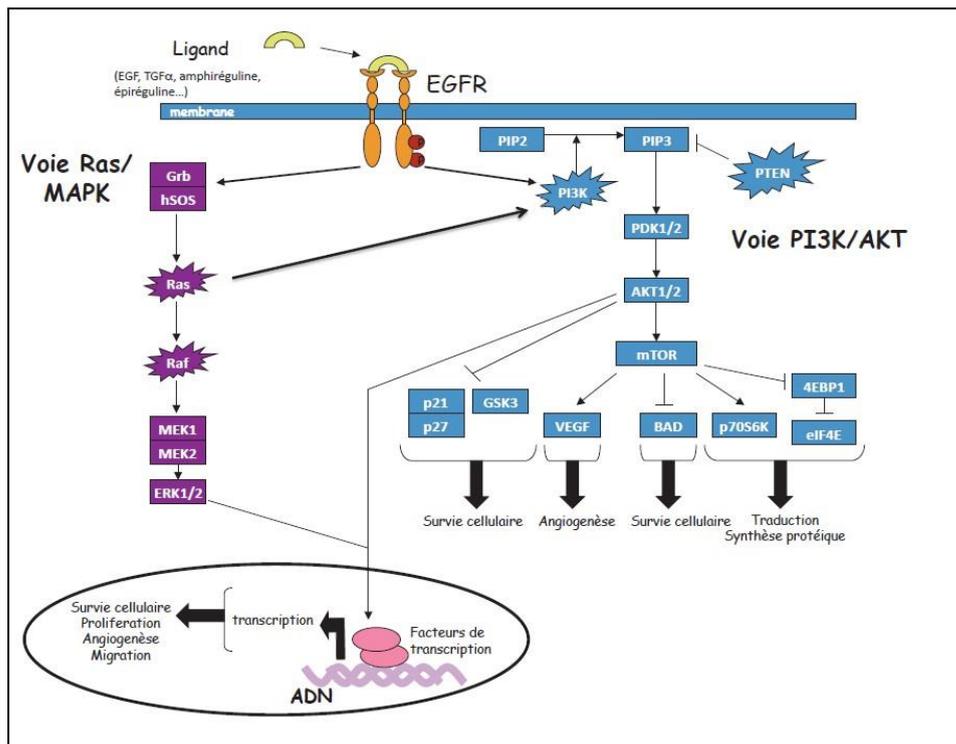


Figure 11 : Les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT interconnectées et les différentes protéines mutées. Dans les conditions physiologiques, la liaison des ligands facteurs de croissances (EGF, TGF-alpha ...) sur le domaine extracellulaire du récepteur membranaire EGFR à activité tyrosine-kinase. L'activation de ce dernier par autophosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques situés sur son domaine intracellulaire déclenche sa dimérisation (homo/hétérodimérisation), ainsi, qu'une cascade de signalisation successive par le biais de phosphorylation de plusieurs protéines kinases intracytoplasmiques. Par la suite, le complexe GRB2/hSOS est recruté sur les résidus phosphorylés sur le domaine intracellulaire du récepteur et servent de point d'ancrage, et qui active par la suite la protéine RAS qui active la protéine RAF, ainsi une cascade d'activation passant par les protéines MEK et ERK pour aboutir à sa translocation au niveau du noyau pour activer des facteurs de transcriptions tels que C-MYC ou C-JUN, et à leurs tours stimuler la transcription de gènes impliqués dans la survie, la prolifération, l'angiogénèse et la migration. Dans les cellules tumorales, l'activation de la voie RAS/MAPK est anormale dû aux mutations RAS et RAF qui rendent cette voie activée constitutivement. Voie PI3K/AKT à droite du schéma. Le complexe GRB2/hSOS permet aussi l'activation de la voie PI3K à travers l'activation de la protéine AKT, qui va par la suite activer la protéine mTOR elle-même va stimuler l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la survie cellulaire, l'angiogénèse, la traduction et la synthèse protéique. Dans la cellule tumorale, plusieurs mutations perturbent cette voie de signalisation, comme la mutation PI3K ou la mutation de la protéine PTEN qui est normalement un régulateur négatif de la voie [69][70].

Source : d'après Astrid Lièvre, Pierre Laurent-Puig
http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/30747/Cancero_dig_2010_1_038_042.pdf

I.1.9 Développement du CCR et signature moléculaire

Le cancer colorectal se développe suite à une succession d'altérations génétiques des gènes majeurs qui régulent des processus biologiques clé. Dans les parties ci-dessus, j'ai énuméré les mutations majeures que l'on peut retrouver dans les CCR. Dans cette partie, nous allons voir comment ces mutations qui dérégulent à leurs tours des voies de signalisations, ce qui contribuent au développement et la progression du CCR (Figure 12). La littérature s'accorde à définir la dérégulation de la voie WNT à travers la mutation *APC* comme évènement précoce et initiateur du processus de cancérisation et cela par le passage d'un épithélium sain à un adénome précoce aussi appelé crypte dysplasique. La protéine *APC* muté, ne s'associe plus à la protéine B-caténine, le processus de prolifération cellulaire devient incontrôlé [71]. Les voies de signalisation *MAPK* et *PI3K* stimulent elles-aussi la prolifération cellulaire ainsi que le processus d'apoptose. Leur dérégulation à travers des mutations telles que *K-RAS* et *B-RAF* provoque le passage de l'adénome précoce à l'adénome intermédiaire et cela grâce à l'activation constitutive de la voie *MAPK* provoquant une prolifération anarchique mais aussi en échappant à l'apoptose [72][73]. En dernier, les voies du *TGF-Beta* ainsi que de *p53*, qui contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose sont des voies anticancéreuses et sont inactivées durant la progression tumorale du CCR. L'activation de voie du *TGF-Beta* déclenche la formation d'un complexe formé par les protéines *SMAD2*, *SMAD3* et *SMAD4*, ce complexe se lie à la protéine *p21* afin de stopper la prolifération cellulaire. Cette voie de signalisation est donc désactivée durant la progression tumorale à travers des mutations telles que *SMAD4* et qui provoque le passage à l'adénome tardif (figure 12) [74]. Enfin, une des dernières étapes que l'on retrouve durant ce processus est la mutation *p53*, empêchant la réparation des dommages à l'ADN des erreurs de réplication dû à la prolifération anarchique (figure 12), ainsi que l'échappement à l'apoptose [75].

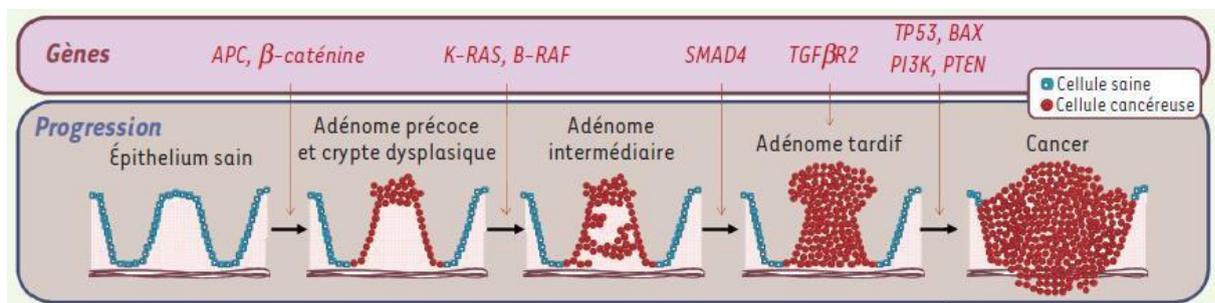


Figure 12 : Schéma du développement du CCR et signatures moléculaires. Progression de l'épithélium sain du colon ou du rectum et mutations de protéines marquant le passage d'un stade au suivant.

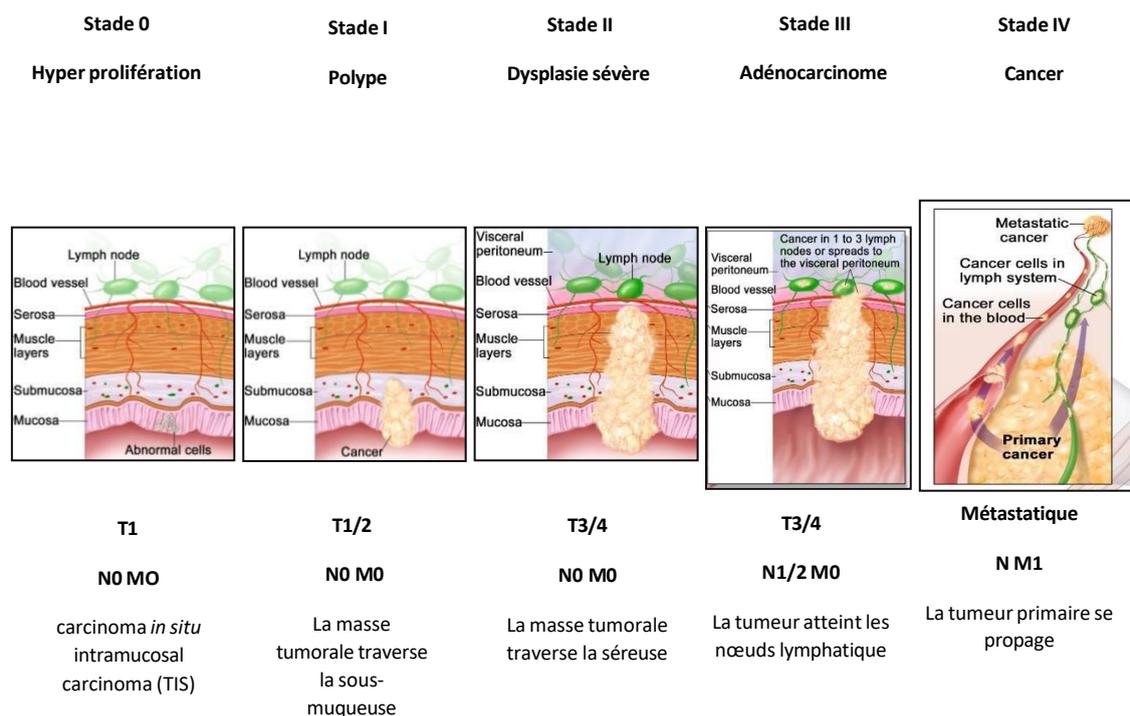
Source : d'après Stéphanie Olivier, Anne-Marie Mir, Jean-Claude Michalski, Tony Lefebvre [76]

I.1.10 Classification histopathologique du cancer colorectal

Les cancers colorectaux sont classifiés selon plusieurs critères histologiques et la classification TNM (Tumor Node Metastasis) est très souvent utilisée par les cliniciens, c'est aussi un indicateur pronostic de la maladie car il permet de renseigner sur le degré de propagation de la tumeur à travers la paroi intestinale. Cette classification est déterminée par un examen macroscopique et microscopique, à partir d'une pièce opératoire d'une tumeur primitive et non traitée. Le stade T renseigne sur l'invasion local du cancer au niveau des différentes couches du tissu intestinal, le stade N renseigne sur la propagation du cancer au niveau des

nœuds lymphatique et le stade M renseigne sur l'invasion du cancer dans un site secondaire tel que le foie ou les poumons concernant le CCR. Chaque stade est lui-même subdivisé par plusieurs catégories selon les différentes couches tissulaires touchées, du stade 0 au stade 4. Cette classification permet aussi de guider dans le choix de la thérapie selon le stade diagnostiqué, en plus de la classification moléculaire du cancer et des différentes mutations pouvant être détectées chez les patients, comme détaillé ci-dessus [77]. Le stade 0 ou Tis pour carcinoma *In situ* ou encore T1, représente la croissance de la masse tumorale au niveau intramucosale de la paroi intestinale, à ce stade on parle d'une hyperprolifération. Au stade I aussi appelé T1/2, la masse tumorale traverse la couche muqueuse, cette masse est aussi appelé polype. Au stade II, aussi appelé T3/4, la masse tumorale traverse la couche séreuse, à ce stade on parle d'une dysplasie sévère. Aux stades 0, I et II, la masse tumorale est encore localisé et les ganglions lymphatiques ne sont pas encore envahis, en clinique ils sont annotés T (1/2/3/4) N0, M0. A partir du stade III, la tumeur atteint les ganglions lymphatiques mais ne touche pas de site secondaire, elle est alors annotée T3/4 N1/2 M0 et à ce stade on parle d'adénocarcinome. Au stade IV, les cellules tumorales traversent les barrières et migrent à travers le système lymphatique pour coloniser un site secondaire, on parle alors de métastase.

1.1.1.1.1 Stades histologiques de développement du CCR humain



T = taille tumeur
 N = nombre de nœuds lymphatiques envahis
 M = présence de métastases (foie, poumons)

Les TNM suivies d'un X signifie que l'organe ne peut pas être évalué, exemple, TX signifie que la tumeur primaire ne peut pas être évaluée [78].

Figure 13 : Schéma des stades histologiques de développement du CCR humain. Stade 0 : ou Tis (carcinome In situ) ou encore T1 représente une hyperprolifération, croissance de la masse tumorale au niveau intra-mucosale. Stade I : T1/2, la masse tumorale traverse la couche muqueuse. Stade II : T3/4, la masse tumorale traverse la couche séreuse. Stade III : T3/4 N1/2 M0, la tumeur atteint les ganglions lymphatiques. Stade IV : N/M1, métastase, propagation de la tumeur primaire au niveau d'un site secondaire.

Source : <https://www.oncolink.org/healthcare-professionals/nci/>

I.1.11 Les traitements du cancer colorectal

I.1.11.1 La chirurgie

Certains cancers au stade très précoce et localisé sont facilement traités, comme certains polypes qui peuvent être retirés lors du dépistage durant une endoscopie, comme précédemment décrit dans le chapitre « Dépistage ». Cette technique reste très utilisée et elle est considérée comme moins invasive et plus économique. Néanmoins lorsque le cancer détecté est plus répandu et à des stades plus avancés, cela nécessite des traitements plus lourds, telles que la chirurgie, la radiothérapie, ou bien la chimiothérapie [21]. Cependant, les patients ayant subi une résection des polypes restent sous surveillance car leurs potentiels de développer à nouveau des lésions tumorales restent élevés [79]. La chirurgie reste la méthode standard et à visée curative dans le traitement du CCR et aussi le premier moyen de guérison en l'absence de métastases, elle permet de retirer la masse tumorale avec parfois une marge de résection chirurgicale circonférentielle de 5 cm du tissu sain afin de ne pas laisser de cellules cancéreuses, car le résultat dépend fortement de la qualité de la chirurgie ainsi que du choix du traitement post ou pré opératoire choisi, en fonction du schéma de prise en charge choisi par les cliniciens basé sur la bonne classification histopathologique TNM. Néanmoins, avant une chirurgie, il y a plusieurs facteurs à prendre en compte afin d'évaluer la balance bénéfique/risque, comme l'âge du patient, l'indice de masse corporelle, le stade de développement de la tumeur, en effet, par exemple pour les patients les plus âgés, le risque de complications post-opératoires sont parfois très élevés [80].

I.1.11.1.1 CHIRURGIE DU COLON

On distingue la chirurgie du colon et celle du rectum par des techniques d'interventions différentes, car la disposition anatomique et spatiale de ceux derniers sont très distincts. Concernant la chirurgie du colon, la laparoscopie est souvent utilisée. C'est une technique chirurgicale plus récente, qui permet d'accéder au colon d'une manière moins invasive qu'une chirurgie dite ouverte, c'est pour cela qu'elle est appelée opération à ventre fermé. Grâce à trois ou quatre incisions, on peut insérer un système optique relié à un écran et que des instruments chirurgicaux, ainsi le chirurgien peut effectuer l'opération en visualisant ses gestes sur l'écran [81]. C'est une technique qui permet de réduire la douleur, les complications ainsi que la durée de l'hospitalisation [82]. Au cours de l'intervention chirurgicale, la tumeur est retirée ainsi que les ganglions lymphatiques avoisinants [83].

I.1.11.1.2 CHIRURGIE DU RECTUM

La chirurgie du cancer du rectum est plus complexe dû à l'anatomie complexe du bassin. Il existe plusieurs approches chirurgicales en fonction du stade du cancer rectal [80]. La microchirurgie endoscopique transanale MET (Transanal endoscopic microsurgery-TEM) est une technique peu invasive pour les tumeurs locales et peu différenciées comme les tumeurs au stade T1NO. Elle est pratiquée à travers l'anus, elle permet donc d'éviter les complications liées à l'exérèse totale du rectum, comme la poche de stomie, et donc d'améliorer la qualité de vie des patients [84]. Pour les stades plus avancés, T2 et T3, la technique standard pour la chirurgie du rectum est l'excision totale du mésorectum, Total mesorectal excision (TME). Cette technique consiste à l'exérèse totale du rectum, du mésorectum entourant le rectum, ainsi que l'enveloppe mésorectale. La partie du mésorectum contient les ganglions lymphatiques, c'est pour cela qu'il est important de retirer toutes ces parties afin de diminuer les chances de récidives [85]. Néanmoins, dû à la complexité anatomique du bassin, la chirurgie du mésorectum totale est une technique qui engendre plusieurs complications comme une grande perte de sang, une durée de l'opération allongée, une résection de plus d'organes concomitants, mais aussi des complications postopératoires telles que la fuite anastomotique, dysfonctionnement du plancher pelvien, incontinence et problèmes génito-urinaires [86].

I.1.11.2 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement localisé et non-invasif avec des radiations dirigées vers les cellules cancéreuses. Ces radiations tuent les cellules cancéreuses en ciblant l'ADN de la cellule et par conséquent, causant des dommages à l'ADN. La radiothérapie est donc un traitement cytotoxique utilisé pour les cancers dits solides [87]. La radiothérapie est aussi utilisée comme thérapie néoadjuvante de la chirurgie afin de réduire la taille de la tumeur, notamment dans le cancer rectal après une excision totale du mésorectum, la combinaison de TME ainsi que de la radiothérapie néoadjuvante réduirait le taux de rechute. Cette combinaison est très souvent proposée aux patients de stades avancés, contrairement aux patients de stade 1 dont les rechutes sont inférieures à 3% [88]. La radiothérapie est plus souvent utilisée comme traitement néoadjuvant (préopératoire) plutôt que comme traitement adjuvant (postopératoire), et cela car elle montre de meilleurs résultats avec moins de rechutes et moins d'effets toxiques [89]. Cependant, son efficacité est étroitement liée au stade diagnostiqué de la tumeur ainsi que de la qualité de la chirurgie [21]. En revanche, la radiothérapie néoadjuvante n'est pas recommandée pour le cancer du côlon, jusqu'à présent aucune étude n'a démontré son efficacité [24][25]. La radiothérapie en combinaison avec la chimiothérapie est appelée chimioradiothérapie, elle est très souvent associée au traitement par le 5-Fluorouracile ou bien à la capecitabine. La chimioradiothérapie est parfois aussi donnée comme traitement adjuvant dans le cancer rectal [90].

I.1.11.3 Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement dit anticancer qui consiste à administrer au patient une ou plusieurs molécules en combinaison, ciblant les cellules cancéreuses afin de les détruire. Les molécules de chimiothérapie ciblent préférentiellement les cellules avec un fort taux de prolifération, une caractéristique que l'on retrouve dans les cellules cancéreuses, mais aussi dans les cellules follicules pileux, moelle osseuse et tractus gastro-intestinal, provoquant ainsi

les effets indésirables connus lors de traitement chimio thérapeutiques, tels que la perte de cheveux, diarrhée et vomissement [91][92]. La chirurgie étant le traitement « gold standard » dans les CCR, la chimiothérapie est souvent prescrite en complément de celle-ci. L'analyse de la tumeur permettra de déterminer si une chimiothérapie est nécessaire après l'opération afin de réduire le risque de récurrence locale, on l'appelle alors chimiothérapie adjuvante, ou bien préopératoire, on l'appelle alors chimiothérapie néoadjuvante. Elle peut être administrée à tous les stades de la tumeur en fonction du protocole choisi, en revanche, elle est prescrite de manière systématique dans les CCR métastatiques [21]. La chimiothérapie peut être administrée en injection ou bien par voie orale, en cure durant plusieurs jours, espacée par quelques jours ou parfois quelques semaines. La chimiothérapie peut être administrée dans plusieurs situations. Tout d'abord afin de guérir d'un cancer, afin de réduire les chances de rechutes après une chirurgie ou bien une radiothérapie afin de détruire toutes les cellules cancéreuses restantes ayant échappées au traitement, afin de réduire la taille de la tumeur de manière préopératoire pour augmenter les chances de succès de l'opératoire [83]. Néanmoins, les effets indésirables majeurs liés à la chimiothérapie sont sa toxicité et la résistance qui sera abordée plus tard dans ce manuscrit.

I.1.11.3.1 5-FLUOROURACILES ET DERIVES

Durant plus de 50 ans le traitement par le 5-Fluorouracile (5-FU) a été le traitement « gold standard » de première ligne pour les patients atteints de CCR, mais aussi d'autres cancers tels que le cancer du sein [93]. La molécule de 5-FU est un analogue de l'uracile avec un atome de fluor en position C-5 à la place de l'hydrogène. Le 5-FU est une « prodrug », qui après plusieurs conversions métaboliques au sein de la cellule, se transforme en un métabolite actif qui s'incorpore dans l'ADN et l'ARN et qui inhibe le fonctionnement de la Thymidilate Synthase (TS), enzyme responsable de la conversion des deoxyuridine monophosphate (dUMP) en deoxythymidine monophosphate (dTMP), qui est nécessaire pour la réplication de l'ADN ainsi que sa réparation. Le 5-FU est métabolisé en trois métabolites actifs, le fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), le fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) et le fluorouridine triphosphate (FUTP) et il existe plusieurs mécanismes de conversion du 5-FU. Néanmoins, 80% du 5-FU administrés est métabolisé dans le foie par l'enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) en un métabolite inactif, le dihydrofluorouracil (DHFU), les mécanismes de conversion du 5-FU sont détaillés dans la revue suivante [94].

Le taux de réponses positives au traitement 5-FU administré seul n'est que de 10-15% [93], cependant, plusieurs stratégies ont été développées afin d'augmenter les taux de réponses au traitement. Parmi elles, la leucovorine (LV, 5'-formyltetrahydrofolate). L'un des métabolites actifs du 5-FU est le FdUMP qui cible la TS, en présence du donneur méthyl 5,10-méthylentetrahydrofolate (CH₂THF). Le FdUMP, en se liant à la TS et au CH₂THF, forment un tétramère covalent, empêchant ainsi la liaison du substrat normal dUMP et empêchant la synthèse des dTMP. Le leucovorine, une fois dans la cellule se métabolise en CH₂THF augmentant ainsi sa disponibilité dans la cellule et par conséquent, la toxicité du 5-FU [95]. La combinaison 5-FU/LV a montré une efficacité de 23% comparé au traitement au 5-FU seul qui lui est de 11% [96].

Une autre stratégie a été développée, cette fois-ci en ciblant la DPD, l'enzyme responsable de la dégradation du 5-FU en DHFU, en administrant une formulation de 4:1 une combinaison d'uracile et de 5-FU. Uracile sert à saturer la DPD et par conséquent la biodisponibilité du 5-FU augmente ainsi que son efficacité [97].

Une autre molécule a été développée et approuvée en 2001, la capecitabine, qui est une molécule de la famille des fluoropyrimidines. La capecitabine est une fluoropyrimidine orale, elle a été développée afin de contrer les effets indésirables de l'administration en intraveineuse du 5-FU [98]. Une fois absorbée la capecitabine se catabolise en 5-FU et cible préférentiellement la cellule cancéreuse [99]. La dose standard recommandée pour la capecitabine est de 2500 mg/m²/jour durant deux semaines, suivie d'une semaine sans traitement [100].

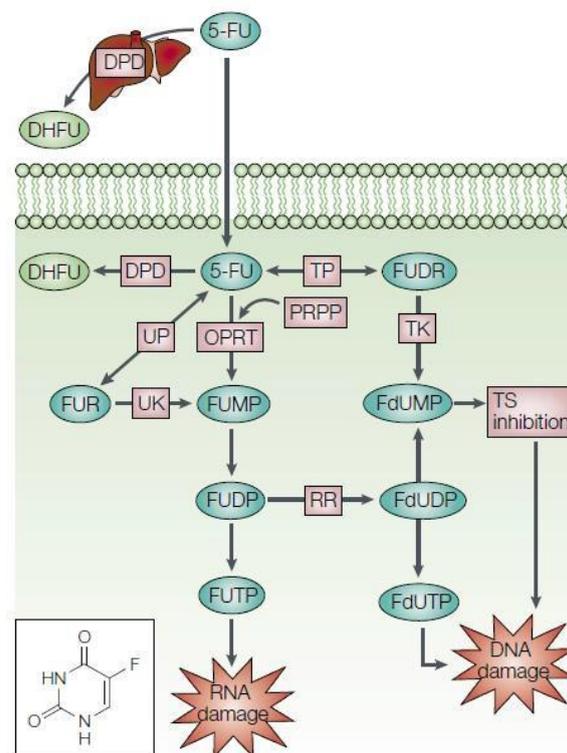


Figure 14 : Schéma de métabolisation du 5-FU. Une grande partie du 5-FU administré est métabolisé par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) en un métabolite inactif le dihydrofluorouracile (DHFU) dans le foie. Le 5-FU est converti en trois principaux métabolites actifs, fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP), triphosphate de fluorodésoxyuridine (FdUTP) et fluorouridine triphosphate (FUTP). Ces trois métabolites actifs provoquent des dommages à l'ADN et à l'ARN.

Source : d'après Daniel B. Longley, D. Paul Harkin and Patrick G. Johnston [94]

1.1.11.3.2 L'IRINOTECAN

C'est une molécule anticancéreuse dérivée d'une molécule naturelle qui est la camptothécine. L'Irinotecan est approuvée et mise sur le marché depuis 1994 au Japon, en France depuis 1995, au Etats-Unis depuis 1996 et c'est depuis, un traitement incontournable dans les cancers solides, notamment le cancer colorectal [101]. Le mécanisme d'action de l'Irinotecan est bien défini. Il est basé sur le ciblage de la topoisomérase I, enzyme essentielle dont le rôle est

d'assurer le bon déroulement de l'ADN durant la réplication et la transcription. Cette molécule cible naturellement la Topoisomérase I en formant un complexe covalent avec l'enzyme ainsi que le brin d'ADN sur lequel elle est fixée et provoque ainsi la mort cellulaire [102]. Cette molécule est utilisée en monothérapie ou bien en combinaison avec d'autres traitements chimio thérapeutiques tels que le 5-FU ou bien l'Oxaliplatine, avec des thérapies ciblées comme le Cetuximab et le Bevacizumab, ou notamment des immunothérapies qui seront détaillées dans les prochaines parties de ce manuscrit. L'Irinotecan est administré principalement sous forme injectable, mais la forme orale a récemment été développée et démontre des résultats positifs [103]. Plusieurs dérivés ont été développés ces dernières années, néanmoins ils ont montré peu d'efficacité comparé à la molécule originel qui est l'Irinotecan [104].

I.1.11.3.3 OXALIPLATINE

L'Oxaliplatine est une molécule chimio thérapeutique, c'est un dérivé de platine dont les mécanismes d'actions cytotoxiques sont basés sur les dommages à l'ADN, en provoquant des liaisons d'ADN intra-brins, des liaisons d'ADN inter-brins et des liaisons ADN protéines, mais aussi à travers l'arrêt de la synthèse d'ADN en ayant une action directe sur l'enzyme thymidilate synthase provoquant l'arrêt de la mitose, et d'ailleurs cette action se ferait avec une action synergique avec le 5-FU. L'Oxaliplatine semble avoir aussi une action sur l'inhibition de la synthèse d'ARN, en effet les liaisons ADN-platine formées favorisent la liaison de facteurs de transcriptions, particulièrement lorsqu'ils ont une affinité pour les platines, empêchant ainsi la liaison de ces facteurs à leurs promoteurs, et ces liaisons ont aussi la capacité de bloquer l'accès à l'ARN polymérase à l'ADN [105]. Néanmoins le traitement par l'Oxaliplatine provoque plusieurs effets indésirables tels que la neuropathie, les troubles proprioceptifs (coordination corporelle), l'ototoxicité (perte de l'ouïe), les nausées, les vomissements, la diarrhée, la neutropénie, l'hypokaliémie, rhabdomyolyse (dégradation aiguë des muscles squelettiques, suivie d'une insuffisance rénale) tous détaillés dans la référence suivante [106].

I.1.11.3.4 LES REGIMES

Le choix du traitement est déterminant pour la réussite et l'efficacité de la thérapie et ce choix est déterminé selon plusieurs facteurs à prendre en considération, comme le stade de la tumeur, le profil moléculaire, l'âge du patient ou même la présence de comorbidité [107]. Les patients atteints de CCR métastatiques sont traités à base de combinaison de traitements chimio-thérapeutiques ou bien même des thérapies ciblées afin d'augmenter le taux de réponses chez les patients. Plusieurs régimes thérapeutiques ont été développés selon des protocoles cliniques différents. On peut citer les régimes à bithérapies comme FOLFOX à base de 5-FU et Oxaliplatine, le régime FOXFIRI (5-FU + Irinotecan), le régime XELOX ou CAPOX (Capecitabine + Oxaliplatine), ou bien les trithérapies comme le régime FOLOXIRI (5-FU + Oxaliplatine +Irinotecan) [108][109][110]. Il existe de nombreux schémas thérapeutiques développés, et ces régimes ont montré une augmentation de la moyenne de survie nette comparé aux monothérapies [107].

I.1.11.4 Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées représentent un nouvel espoir dans le traitement des cancers métastatiques pour lesquels les traitements standards comme la chimiothérapie ou bien la chirurgie n'ont pas aboutis à des résultats positifs. Les thérapies ciblées sont des thérapies

basées sur de petites molécules de taille inférieure à 900 Da qui pénètrent facilement les cellules tumorales. Ces sont majoritairement des anticorps monoclonaux qui ciblent des enzymes clés dans les cellules cancéreuses, bloquant différents processus cellulaires comme la prolifération ou même l'angiogénèse. Certaines cibles sont aussi à la surface de la cellule cancéreuse, comme par exemple des récepteurs [111][108].

Ces thérapies sont sur le marché depuis une vingtaine d'années, à commencer par le Cetuximab qui est le premier anticorps monoclonal chimérique qui cible la partie extérieure du récepteur EGFR et provoque son internalisation puis sa dégradation, empêchant ainsi la liaison du ligand au récepteur et par conséquent, son activation et l'activation des voies de signalisations en aval du récepteur [112]. Comme décrit précédemment, la voie de signalisation EGFR est une voie particulièrement dérégulée lors du développement du CCR, en effet, la surexpression du récepteur est décrite dans de nombreux cancers, notamment le CCR [113]. Néanmoins, l'anticorps Cetuximab étant chimérique, c'est-à-dire de nature humaine mais comportant une région variable dérivée de la souris, il provoque un effet indésirable de cytotoxicité immunogène [114], ainsi, par la suite le Panitumumab entièrement humanisé a été développé pour contrer cet effet indésirable, et une étude de non-infériorité a démontré aucune différence d'efficacité entre le Cetuximab et le Panitumumab, indiquant que le Panitumumab est tout aussi efficace que le Cetuximab [115]. Néanmoins, ces thérapies sont efficaces seulement chez les patient RAS wild type (non muté), car la mutation KRAS maintient la voie de signalisation activée, indépendamment de l'activation du récepteur, ce qui rend l'inhibition du récepteur inefficace [116]. Gefitinib et erlotinib sont deux thérapies ciblant le domaine kinase intracellulaire de l'EGFR, ce sont donc des inhibiteurs de tyrosines kinase « Tyrosine Kinase Inhibitors – TKIs ». Par la suite, des inhibiteurs de secondes générations ont été développées pour contrer la résistance due à la mutation T790M, comme afatinib et dacomitinib, mais il s'est avéré que ces traitements été peu efficace contre la mutation. C'est ainsi que des inhibiteurs de troisièmes générations ont été développé comme WZ-4002 [117].

Une autre protéine est ciblée dans le traitement du CCR c'est BRAF, elle est mutée dans le CCR et est considéré comme mutation driver, elle est notamment liée à un mauvais pronostic [32]. Plusieurs molécules inhibitrices ont été développées, qu'on appelle « BRAF inhibitors » dans la littérature, qui initialement ont été développé dans le traitement du mélanome car ce cancer présente un très fort taux de mutation BRAF, avec près de 50% [118]. Dans les inhibiteurs BRAF développé on cite le Vemurafenib, le Dabrafenib et le Encorafenib, c'est un traitement oral de petites molécules dont le rôle est l'inhibition sélective des BRAF Kinases et interfère la voie de signalisation MAPKinase qui régule la prolifération et la survie [119]. Néanmoins les réponses cliniques au Vemurafenib sont seulement de 5% chez les patients BRAF muté CCR [120].

Un des processus qui caractérise la progression tumorale est l'angiogénèse. Ce processus physiologique consiste à former de nouveau vaisseaux sanguins, il joue un rôle clé dans la croissance tumorale et la dissémination métastatiques. Plusieurs facteurs orchestrent et régulent ce processus, des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques [121]. Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible le VEGF-A [122]. Par la suite, des agents anti-VEGFR ont été développé, comme l'Aflibercept qui est une protéine qui cible le domaine extracellulaire des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 [123], ou bien le Ramucirumab qui un anticorps monoclonal entièrement humanisé ciblant le VEGFR-2 [124].

I.1.11.5 Les immunothérapies dans le CCR

Les immunothérapies développées jusqu'à présent en cancérologie sont des anti-checkpoints « Checkpoints inhibiteurs », ce sont des anticorps monoclonaux qui ciblent des récepteurs inhibiteurs à la surface de cellules immunitaires, telles que les cellules T, les cellules B, les cellules dendritiques ou bien les cellules NK (natural killer). En condition physiologique, ces récepteurs inhibiteurs interviennent afin de réguler l'activation des cellules immunitaires, afin de prévenir le risque de d'auto-immunité, renforcer l'activité du système immunitaire en cas d'infection et notamment éviter une réaction excessive. Les cellules cancéreuses contournent ce système et surexpriment à leurs surfaces les ligands de ces récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1 et PD-L2, et par conséquent, elles induisent une immunosuppression. Les checkpoints inhibiteurs développés en cancérologie ciblent le CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), le PD1 (programmed cell death 1) ou leurs ligands (PD-L1, ligand de PD1) [125]. Les anti-checkpoints ont la particularité d'avoir un spectre d'activité large comparé à d'autres traitements conventionnels. En effet, on observe une réponse des anti-checkpoints dans mélanome, cancer du poumon, cancer du rein, de la vessie, cancer du sein, lymphome, cancer de la plèvre. La deuxième particularité des anti-checkpoints est la durabilité de la réponse, en effet, les patients qui répondent au traitement ont tendance à répondre de façon prolongée, et parfois alors même que le traitement a été arrêté, et certain évoque un effet mémoire induit par ces immunothérapies [126]. On peut citer plusieurs thérapies utilisées dans le traitement du CCR, telles que le Pembrolizumab (PD-1), le Nivolumab (PD-1), Ipilimumab (CTLA4), néanmoins ces thérapies ont montré peu d'efficacité chez les patients atteints de CCR [127][128]. En effet, jusqu'à présent les seuls patients bénéficiaires du traitement par immunothérapie sont les patients dont le cancer sont MSI autrement dit, avec des instabilités microsatellitaires, mais les patients avec la signature MSI ne représentent que 5% des patients CCR métastatiques. Les patients MSI High présentent de multiples mutations somatiques, ce qui génère des néo-peptides de nature antigénique présentés à la surface de la cellule tumorale qui sont reconnus comme non-soi. Ce processus permet une forte réponse immunitaire et par conséquent, une surexpression des récepteurs checkpoints, ce qui explique l'efficacité des immunothérapies anti-checkpoints chez les patients CCR-MSI-High [129].

I.1.12 Résistance au cancer colorectal

Malgré l'innovation et l'émergence de plusieurs thérapies, la survie à 5 ans des patients atteints de CCR métastatiques n'est que de 12.5%, et une des raisons principales est la résistance aux traitements qui survient dans 90% des cancers métastatiques, la résistance aux traitements anti-cancéreux est donc un facteur limitant leur efficacité. Ainsi, comprendre et contrer la résistance est un enjeu majeur dans le traitement des cancers et dans le développement de nouvelles thérapies [130]. On distingue deux types de résistances, une résistance innée ou primaire et une résistance acquise ou secondaire. La résistance primaire désigne une résistance phénotypique ou bien génotypique, qui ne survient pas suite à un traitement donné, mais qui est présente avant tout traitement. Le meilleur exemple pour illustrer cela est la mutation RAS, en effet, au début de leur utilisation, seul 10 à 20% des patients répondaient aux thérapies ciblant l'EGFR comme le Cetuximab et le Panitumumab.

C'est suite à la découverte de la mutation RAS et de son implication dans les réponses aux anti-EGFR, que RAS est devenu un marqueur de résistance primaire [131]. La résistance secondaire ou acquise se manifeste suite à l'exposition de la tumeur à un traitement, qui initialement était efficace. Il existe plusieurs mécanismes de résistance secondaire ou acquise, que l'on retrouve suite aux traitements cytotoxiques, néanmoins ces mécanismes sont différents lorsqu'il s'agit de thérapies ciblées [132].

Résistance aux chimiothérapies : Les mécanismes de résistances secondaires que l'on retrouve le plus souvent suite à un traitement chimio thérapeutiques sont, tout d'abord, le mécanisme d'efflux de la drogue, ce mécanisme permet le transport de la molécule thérapeutique à l'extérieur de la cellule cancéreuse et cela grâce à l'activation des transporteurs ABC tel que la Glycoprotéine P (PGP) et protéines de la famille « multi drug resistance » (MDR) [133]. Un autre mécanisme que l'on retrouve souvent est l'inactivation de la molécule thérapeutique, on peut citer l'exemple du 5-FU qui est métabolisé en un métabolite inactif par l'enzyme DPD, certaines études ont démontré que la DPD est surexprimé dans certains cancers au niveau de l'ARNm [134] ainsi qu'au niveau protéique et serait donc associé à la résistance au 5-FU [130]. Un autre mécanisme qui est aussi bien décrit est la modification de la cible de la molécule thérapeutique. Pour citer l'exemple du 5-FU, qui est la molécule la plus utilisée et aussi la mieux étudiée, plusieurs études ont démontré que l'expression de l'enzyme TS est liée à la réponse au traitement au 5-FU, plus précisément la surexpression de la TS est corrélée à la résistance au 5-FU. Ceci est expliqué du fait que la liaison du 5-FU à la TS inhibe le mécanisme de rétroaction négative (negative feedback), ce qui permet une augmentation de l'expression de l'enzyme [135]. Bien d'autres mécanismes contribuant à la résistance aux thérapies ont été décrits dans la littérature, telles que la réparation des dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mutation P53, et l'augmentation des signaux pro-survie [130].

Résistance aux thérapies ciblées : Concernant la résistance aux thérapies ciblées, là aussi plusieurs mécanismes ont été décrits, comme une modification de la cible par des mutations, une surexpression ou une activation de la voie en aval de la cible initiale, ou bien même un cross-talk entre différents effecteurs de voies de signalisations [132]. En plus du statut de la protéine RAS qui détermine la résistance primaire aux anti-EGFR, d'autres mécanismes de résistance à ces traitements ont notamment été décrits. Ainsi, la mutation S492R de l'EGFR induit le remplacement d'une serine par une arginine au niveau du codon 492, ce qui modifie le domaine extracellulaire du récepteur et confère une résistance au Cetuximab, et cette mutation a été décrite seulement chez les patients ayant reçu auparavant un traitement anti-EGFR, démontrant ainsi que c'est une résistance acquise [136]. Bien d'autres mécanismes ont été décrits qui contournent la signalisation en aval de l'EGFR, tels que la mutation PI3K [137], la perte de fonction du régulateur négatif PTEN [138].

I.1.13 L'hétérogénéité du CCR

Le CCR est un cancer très hétérogène au niveau génétique, moléculaire et histologique, et cette hétérogénéité peut se manifester de manière inter tumorale et intra tumorale. Tout au long de cette première partie, nous avons reporté et décrit les différentes caractéristiques génétiques, moléculaires et histologiques que l'on peut trouver au sein du CCR, comme le statut MSI, les différents stades TNM ainsi que les différents statuts mutationnels tels que

KRAS ou bien BRAF et toutes ces caractéristiques font l'hétérogénéité du CCR. Néanmoins, cette hétérogénéité peut se manifester au sein d'une même tumeur, autrement dit au sein d'une même tumeur il existerait des clones, chacun avec ses propres caractéristiques génétiques, épigénétiques, morphologique ou même inflammatoires. L'hétérogénéité intra tumorale pourrait en partie expliquer les différences de réponses aux traitements des patients avec les mêmes profils et probablement contribuer à la résistance aux traitements [139].

I.1.14 Effet de tolérance induit par le 5-FU

La tolérance est définie comme la disposition des cellules cancéreuses de survivre et de tolérer un traitement chimiothérapeutique en diminuant leurs capacités prolifératives, c'est un phénotype transitoire non mutationnel, dont les mécanismes de tolérances sont encore mal compris mais qui permet aux cellules d'acquérir par la suite une résistance secondaire forte [140]. Comme précédemment décrit le 5-FU s'intègre dans l'ADN et l'ARN [94], mais nous avons récemment découvert dans notre équipe que le 5-FU s'intègre aussi dans les ribosomes de manière significative *in vitro*, *in vivo* ainsi que dans les ARNr extraits tumeurs colorectales humaines. Ces ribosomes fluorés sont appelés F-ribosomes et dans cette étude nous avons démontré, de manière surprenante que ces F-ribosomes sont fonctionnels et s'engagent dans la traduction. Dans cette étude nous avons voulu démontrer est-ce qu'il y avait un lien entre l'incorporation du 5-FU dans les ribosomes de cellules du CCR et la réponse au traitement. De manière encore plus intéressante, nous avons découvert que l'incorporation du 5-FU dans les ribosomes induisait une reprogrammation traductionnelle, autrement dit, le 5-FU altère la machinerie de traduction et ceci en favorisant la traduction de certaines protéines telle que l'IGF1R en promouvant la survie cellulaire. Ces résultats ont montré que le traitement au 5-FU sensibilise la voie IGF-1/IGF-1R et par ailleurs, cette voie pourrait contribuer au développement de la tolérance à travers le contrôle de la traduction, un mécanisme non-génomique [141]. Je détaillerai cette étude ainsi que les résultats dans la partie résultat de ce manuscrit.

I.2 Partie II : Biogénèse des ribosomes dans les cellules humaines

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) composés de quatre ARN ribosomiques (ARNr) et de quatre-vingt protéines ribosomiques (PR), et ces ribosomes sont issus d'un processus appelé la biogénèse des ribosomes (figure 15) [142][143]. La fonction du ribosome est la traduction des ARN messagers en protéine. La biogénèse des ribosomes (RiBi – Ribosome Biogenesis) est un processus complexe et hautement coordonné par plusieurs facteurs, il débute dans le noyau et se termine dans le cytoplasme [144]. Le ribosome humain (80S) a un poids moléculaire de 4,3 kDa. Le ribosome mature et fonctionnel est localisé dans le cytoplasme, organisé en deux sous-unités. La grande sous-unités 60S est composée de 47 PR et des ARNr 28S, 5S, et 5.8S. alors que la petite sous-unité 40S elle est composée de 33PR et de l'ARNr 18S. Les ARNr 28S, 5.8S et 18S sont synthétisés par l'ARN polymérase (ARN Pol) I, alors que les 5S est synthétisé par l'ARN polymérase III. Le processus de la BR passe principalement par quatre étapes clés qui sont la synthèse, le « processing », la modification chimique et l'assemblage, à l'issue de ce processus, découle des ribosomes matures et fonctionnels à la structure tri-dimensionnelle adéquate pour la traduction des ARN messagers en protéines. C'est un processus très énergivore pour la cellule et il en découle 1 à 2 millions d'unités de ribosomes par génération de cellule [145]. La structure tri-dimensionnelle du ribosome déterminé par la méthode de cristallographie couplées à la spectrométrie aux rayons X et de cryo-microscopie électronique (cryo-ME) a permis de révéler que l'ARNr est le support de l'activité catalytique et que les PR permettent le maintien de la structure du ribosome [146].

I.2.1 Synthèse des composants ribosomiques

Les premières étapes de la RiBi est la synthèse des ARNr et celle-ci prend place dans le noyau, plus précisément, dans le nucléole qui est la partie dense du noyau qu'on distingue facilement au microscope, à ce niveau se concentre les nombreux facteurs nécessaires pour la RiBi. La biogenèse des ribosomes implique la participation des trois ARN polymérases. L'ARN Pol I synthétise l'ARNr précurseur le 47S (ARNr pré 47S) qui suite à plusieurs clivages donne les ARNr 28S, 5.8S et 18S. L'ARNr précurseur 47S est codé par environ 400 copies de gènes d'ADN ribosomiques localisés dans les régions sous-télomériques des chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 22 et organisés en tandems. L'ARN Pol II synthétise les ARNm des PR, et l'ARN Pol III synthétise l'ARNr 5S qui est codé par différents groupes de gènes d'ADNr également organisés en tandem mais exclusivement localisés sur chromosome 1. Le processus détaillé du clivage de l'ARNr pre-47S en 28S, 5.8S et 18S est détaillé ici [147][144][48] et dans la figure 16.

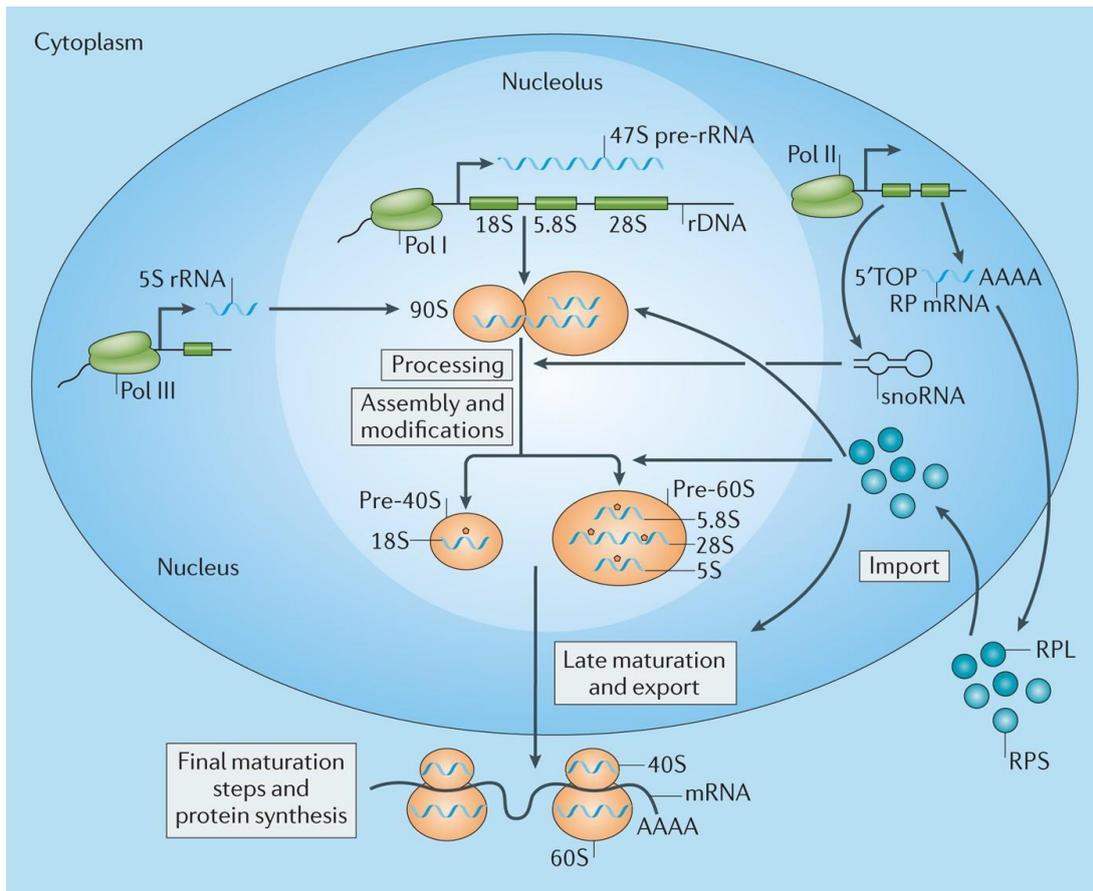


Figure 15 : Déroulement et étapes de la biogenèse des ribosomes. La biogenèse des ribosomes débute dans le noyau, plus précisément dans le nucléole par la synthèse dans ARNr. L'ARN polymérase I synthétise le l'ARNr précurseur 47S qui subit plusieurs clivages et modifications chimiques afin de donner les ARNr 18S, 5.8S et 28S. L'ARNr 5S est lui synthétisé par l'ARN polymérase II codé par des gènes différents de l'ARNr 47S. Parallèlement à la synthèse et au « processing » des ARNr, l'ARN polymérase II transcrit les gènes des protéines ribosomiques en ARNm, puis sont exportés dans le cytoplasme pour leurs traductions en protéines ribosomiques puis sont importés dans le noyau afin d'être assemblé aux ARNr pour former les sous-unités pre-40S et pre-60S. Le processus de biogenèse des ribosomes se termine par une maturation des sous-unités 40S et 60S et leur export dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme on retrouve des ribosomes matures et fonctionnels dont les deux sous-unités s'assemblent lors de la synthèse protéique, donc de la traduction des ARN messagers en protéines.

Source : Pelletier et al. [148]

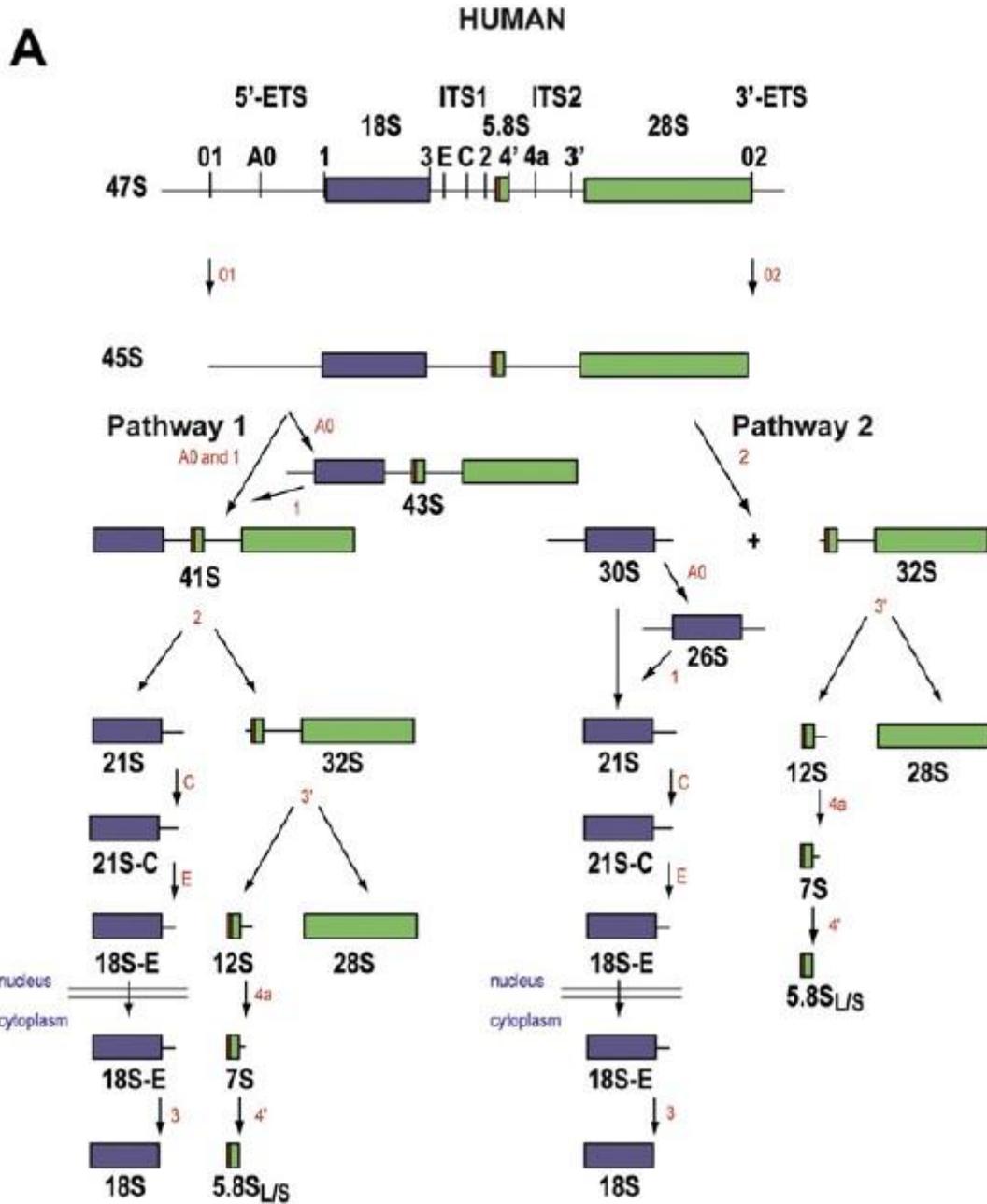


Figure 16 : Schéma du déroulement du clivage ou « processing » de l'ARN précurseur 47S chez l'humain. Cette étape de « processing » survient tout de suite après la synthèse de l'ARNr précurseur 47S par l'ARN Pol I. Celui-ci compte 12 sites de clivages. Cette étape début par le clivage des deux extrémités 5'-ETS et 3'-ETS, au niveau des site 01 et 02 et donne ainsi l'ARNr précurseur 45S. A partir de là, deux voies de clivages sont possibles, suites à des coupures endo et exonucléasiques donnant des intermédiaires différents mais aboutissants aux séquences finales des ARNr 18S, 5.8S et 28S.

Source : Sahra-Taylor Mullineux a, Denis L.J. Lafontaine [149]

I.2.2 Maturation des ARN ribosomiques

La maturation des ARNr débute dès la synthèse du précurseur ARN 47S par la coupure des deux extrémités pour donner pré-ARN un 45S, puis s'en suit une succession de clivages ou « processing » au niveau des 12 sites de clivages recensés afin d'éliminer progressivement différents segments. Et pour cela le pré-ARN 45S peut suivre de grandes voies de clivages, avec des intermédiaires différents et cela faisant intervenir plusieurs endo et exo nucléases, mais pour aboutir aux ARNr 28S, 5.8S et 18S (figure 16) [149].

I.2.3 Modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Les modifications post-transcriptionnelles consistent en des modifications chimiques sur des sites spécifiques des ARNr et elles ont lieu parallèlement aux étapes de clivages. Parmi ces modifications, on compte les méthylations de bases [150], mais les modifications les plus répandues sont la pseudouridylation (ψ) de certaines bases uridines et la 2'-O-méthylation (2'-O-me) de certains riboses. On compte 98 sites de pseudouridylation et cette modification est effectuée par des complexes ribonucléoprotéiques formés autour de snoARN à boîtes H/ACA et l'enzyme responsable est la Dyskérine. Pour la 2'-O-méthylation, on compte environ 106 sites identifiés dans la littérature, ces modifications sont guidées par des complexes ribonucléoprotéiques formés autour de snoARN à boîtes C/D et l'enzyme responsable est la Fibrillarine (FBL) [151] dont je parlerai plus en détails dans la partie « Partie V : La Fibrillarine, enzyme de la biogénèse des ribosomes ».

I.2.4 L'assemblage et export des ribosomes

L'assemblage des PRs aux ARNr grâce aux facteurs d'assemblage commence dès la synthèse des ARNr, ce processus est très complexe et encore très peu connu. L'assemblage des PRs aux ARNr encore dans le noyau, forment des particules 90S pré-ribosomiques. Celles-ci subissent encore des étapes de maturation pour enfin être exportés dans le cytoplasme sous formes de deux sous-unités matures et distinctes la petite sous-unités 40S et la grande sous-unités 60S [152].

I.3 Partie III : Biogénèse des ribosomes dans les cancers

L'augmentation de la synthèse des protéines est contournée pour assurer une croissance et une prolifération cellulaire, deux phénomènes liés. La croissance cellulaire assure une bonne quantité de composants cellulaires à diviser, et donc à proliférer. Cette synthèse accrue de protéines s'accompagne d'une régulation à la hausse de la biogénèse des ribosomes. La biogénèse des ribosomes et la prolifération cellulaire sont des processus si étroitement liés que lorsque les protéines ribosomiques 40S sont supprimées dans les cellules hépatiques de souris, la prolifération échoue. De plus, la biogénèse des ribosomes est suractivée dans les cellules cancéreuses et joue un rôle crucial dans la progression tumorale. Ainsi, le taux de biogénèse des ribosomes est proportionnel à la réponse cellulaire proliférative au cours du cycle cellulaire [157].

Une des principales caractéristiques des cellules cancéreuses est l'hyperprolifération, et par conséquent il nécessite une augmentation de la synthèse protéique, corrélée à l'augmentation de la RiBi [153][154].

I.3.1 Régulation de la biogénèse des ribosomes par les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs

L'augmentation de la RiBi dans les cellules cancéreuses est liée la modulation d'expression et/ou d'activité de plusieurs facteurs régulateurs des ainsi que des voies de signalisations prolifératives, et particulièrement les protéines ayant un rôle connu d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur. On cite notamment l'importance de la protéine mutée PTEN qui est un régulateur négatif de la voie PI3K-Akt-mTOR. mTOR est un médiateur important dans la signalisation de la croissance cellulaire ainsi que la synthèse protéique, à travers notamment l'activation des protéines de la RiBi et de l'activation de la traduction telles que p70S6K 4EBP1 et eIF4e. Dans les cellules cancéreuses, l'inactivation de PTEN induit une suractivation de la voie mTOR (figure 11) [155]. Une suractivation de la RiBi dans les cellules cancéreuses est également souvent associée à la suractivation de l'ARN Pol I. La famille des protéines de la voie de signalisation ERK, dont Ras, Raf et le récepteur à tyrosine kinase EGFR sont fréquemment mutés dans les cancers. L'ARN Pol I étant régulée à travers cette voie, on constate une forte augmentation de son activité dans les cancers [145]. Un autre facteur qui joue un rôle majeur dans la régulation de la RiBi est le proto-oncogène MYC. En effet, c-myc joue un rôle central dans la production quantitative de ribosomes à travers l'activation des trois ARN polymérases, et cela en se liant directement à l'ADNr et en activant l'ARN Pol I responsable de la synthèse de l'ARNr précurseur 47S. MYC active également la transcription des gènes codant pour les facteurs d'assemblage ribosomique et pour les RP en activant l'ARN Pol II, ainsi que celle de l'ARNr 5S en activant l'ARN Pol III [156].

Les facteurs suppresseurs de tumeurs P53 et RB jouent un rôle important, la biogénèse des ribosomes et la prolifération cellulaire. Ces facteurs suppresseurs de tumeurs sont souvent mutés dans la plupart des cancers, induisant une perte de leur fonction de contrôle des

dérèglements du cycle cellulaire. Le rôle du facteur rétinoblastome (Rb) s'exerce suite à sa liaison au facteur de transcription E2F empêchant leur action de transcription d'une série de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. En plus du contrôle négatif du cycle cellulaire, Rb est également impliqué dans la croissance cellulaire en interférant directement avec l'assemblage des complexes d'initiation de la transcription en se liant à l'UBF, modulant ainsi la synthèse de l'ARN ribosomique.

En plus de pRb, l'inactivation de p53 contribue à une augmentation de la biogenèse des ribosomes. En effet, à l'état normal, p53 régule négativement la biogenèse des ribosomes en se liant au facteur sélectif SL1 de l'initiation du complexe réduisant ainsi l'activité de l'ARN polymérase I. La perte de fonction des suppresseurs de tumeur pRb et p53 est donc associée à une augmentation de la RiBi principalement par l'augmentation de l'activité de l'ARN polymérase I [157]

Les oncogènes cités ci-dessus, p53 pRB et C-myc semblent déréguler de manière quantitative la biogenèse des ribosomes dans les cas pathologiques comme les cancers, puisque la cellule tumorale prolifère massivement, pour cela, la cellule a besoin de croître et de produire des protéines, c'est pourquoi la biogenèse des ribosomes est hautement activée.

I.3.2 Effets des traitements thérapeutiques sur la biogenèse des ribosomes

Au début de l'utilisations des traitements anticancéreux, leurs cibles cellulaires et moléculaires n'étaient pas encore identifiées, et on ne connaissait pas leurs mécanismes d'actions au sein de la cellule [158]. Par la suite, plusieurs chimiothérapies ont montré un des effets cytotoxiques par ciblage de l'ADN et provoquant des dommages irréversibles [92]. En étudiant les mécanismes d'actions du 5-FU, on a découvert qu'il a, en plus de son action sur l'ADN, un effet sur le métabolisme de l'ARN et que cela contribue nettement à son action cytotoxique [94]. En effet, l'incorporation de 5-FU dans l'ARN inhibe le « processing » de l'ARNr, les modifications post-transcriptionnelles des ARNt, des ARNr et des snoARN ainsi que l'épissage des ARNm [159]. Plusieurs études ont démontré les effets des traitements thérapeutiques sur la RiBi, et cela à travers un effet direct ou indirect sur différentes étapes de synthèse et de maturation des ARNr. Dans une étude, des chercheurs ont montré l'effet cytostatique de plusieurs classes de molécules thérapeutiques agissant sur la synthèse et la maturation des ARNr, un total de 36 molécules a été testé. A l'issue de cette étude, il a été démontré que certaines molécules comme le Cisplatine, l'oxaliplatin, la doxorubicine, et le mitoxantrone bloquent entièrement la synthèse de l'ARNr précurseur 47S. Les chercheurs ont aussi montré que ces molécules peuvent avoir un impact sur différents niveaux de la RiBi, comme la synthèse des ARNr, les étapes précoces et tardives de leurs [158].

I.3.3 Ciblage de la Biogenèse des ribosomes dans les cancers

Davantage d'études démontrent l'implication de la biogenèse des ribosomes dans le contexte tumoral suggérant que la biogenèse des ribosomes est une stratégie de ciblage thérapeutique puissante [160]. En effet, le caractère cancéreux des cellules implique une plus forte biogenèse des ribosomes par rapport à des cellules normales ; par conséquent, elles sont plus sensibles à l'inhibition de la production des ribosomes [161]. Les thérapies émergentes ciblant sélectivement la biogenèse des ribosomes montrent une efficacité pour éliminer les cellules

cancéreuses, aujourd'hui on peut citer trois molécules, à savoir, CX-5461, CX-3543 et BMH-21 qui sont de nouvelles thérapies prometteuses qui agissent par différents mécanismes pour inhiber l'activité de transcription de l'ARN polymérase I. La molécule CX-5461 est une petite molécule qui inhibe sélectivement la transcription de l'ARNr induite par l'ARN Pol I en perturbant la liaison du facteur de transcription SL1 au promoteur de l'ADNr, et inhibant l'initiation de la synthèse de l'ARNr par le complexe PIC de l'ARN polymérase I [162]. Il a été démontré que la molécule CX-5461 a un effet spécifique sur les cellules cancéreuses *in vitro* et moins d'effet sur les cellules non transformées. L'inhibition sélective de la synthèse d'ARNr par CX-5461 a également été confirmée dans les cellules cancéreuses colorectales HC-T116 [163]. La molécule CX-3543 est une petite molécule dérivée de fluoroquinolone qui se lie à l'ADN G-quadruplex et perturbe sélectivement l'interaction des structures G-quadruplex des ADNr avec la protéine nucléoline, inhibant ainsi l'activité de transcription de l'ARN Pol I et induisant la mort apoptotique dans les cellules cancéreuses, et ses effets ont été notamment démontrés sur cellules cancéreuses colorectales HCT116 [164].

BMH-21 une autre molécule ciblant l'activité de transcription de l'ARN Pol I en se liant à l'ADN riche en GC, en particulier dans l'ADNr. La molécule BMH-21 a démontré une activité antitumorale puissante, contre la croissance des cellules HCT-116 implantées sous forme de xénogreffe dans des souris immunodéficientes [165]. Ainsi, les inhibiteurs de l'ARN polymérase I sont des candidats très prometteurs pour le traitement du CCR. En parallèle, de nouvelles thérapies ciblant la biogenèse des ribosomes sont aussi à l'étude dans le modèle de la levure. En effet, une étude a passé au crible environ 1000 molécules de faible poids moléculaire provenant de différentes chimiothèques, afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la biogenèse des ribosomes [166]. De nombreux inhibiteurs ont été identifiés dans cette étude qui avaient déjà un lien avec la biogenèse des ribosomes, comme l'analogue de la pyrimidine carmofur, un dérivé du 5 fluorouracile. D'autres nouveaux inhibiteurs prometteurs comme les composés bubicines, l'acide vulpinique, la streptonigrine, l'acivicine et l'acide mycophénolique. Ces inhibiteurs ont montré des changements dans le « processing » des pré-ARNr et interfèrent dans différentes étapes de maturation des ARNr, il faut désormais conduire davantage de recherches afin d'identifier les cibles précises de ces inhibiteurs. Un autre composé prometteur de faible poids moléculaire est la diazaborine, identifiée pour cibler la maturation de la sous-unité ribosomale 60S dans des cellules de levure [167]. Tous ces nouvelles molécules prometteuses doivent être étudiées dans des cellules eucaryotes supérieures afin de valider leurs effets inhibiteurs mais aussi afin de les tester dans différents cancers dont la biogenèse des ribosomes est dérégulée, notamment dans le cancer colorectal.

I.4 Partie IV : Biogénèse des ribosomes dans le cancer colorectal

Le renouvellement des cellules du tractus gastrointestinal est continu et ininterrompu, 1-10 milliards de cellules épithéliales sont régénérées par jour chez une personne adulte [18]. Ce renouvellement cellulaire repose sur une forte activité proliférative des cellules qui est soutenu par l'activation de tous les processus impliqués dans la croissance cellulaire, la division et la synthèse des protéines, ainsi que la RiBi [168]. Plusieurs corrélations entre la RiBi et le CCR ont été montrées dans la littérature, néanmoins, aucune étude n'a établi un lien direct. Cependant, dans notre revue [48], nous avons reporté toutes les dérégulations de la RiBi constatées dans le CCR retrouvées dans la littérature scientifique. Ces altérations peuvent avoir un impact sur les stades dits précoces de la RiBi, c'est-à-dire l'activation des ARN polymérases, la transcription de l'ADNr, mais aussi les étapes tardives de la production de ribosomes comme le « processing » de l'ARNr, les modifications chimiques de l'ARNr, l'assemblage et export des sous-unités du ribosome, élargissant les possibilités de nouvelles thérapies ciblées centrées sur la biogénèse des ribosomes dans le CCR.

I.4.1 Régulation des premiers stades de la biogénèse des ribosomes dans le CCR

L'oncogène MYC est surexprimé dans les cancers ainsi que dans le CCR [169]. Il a été démontré que cette surexpression entraîne la tumorigénèse qui provoque ainsi la dérégulation de plusieurs processus cellulaires dont Myc est un facteur régulateur, tels que la transcription, la régulation de la structure de la chromatine, la traduction, la réplication de l'ADN et, plus récemment, la biogénèse des ribosomes [170]. En effet, Myc est un acteur central dans la régulation des étapes précoces de la RiBi, et cela en régulant les trois ARN polymérases mais aussi en régulant l'expression et le recrutement de cofacteurs essentiels à l'activité des ARN polymérases [171], ainsi que les facteurs nécessaires au « processing » de l'ARNr, à l'assemblage des ribosomes et à l'exportation des sous-unités ribosomiques matures du noyau vers le cytoplasme [172][173]. Myc se lie directement à l'ADNr d'une part pour remodeler la structure de la chromatine et d'une autre part en interagissant avec les cofacteurs UBF et SL1 nécessaires pour le recrutement de l'ARN polymérase I afin de transcrire l'ARNr précurseur 47S (figure 17) [174]. Myc active également l'ARN polymérase III responsable de la transcription de l'ARNr 5S, avec la coopération des protéines RRS1 et RPF2 (figure 17) [175]. De plus, Myc régule la transcription de gènes de protéines ribosomales à travers l'ARN polymérase II, mais aussi la transcription de gènes de protéines impliquées dans le « processing » des ARNr, l'assemblage ainsi que l'export des sous-unités mature, des protéines telles que NOP56, BOP1, Fibrillarine (FBL), Dyskérine (DKC1) ou encore nucléoline (NCL) [176]. Dans notre revue [48], nous avons relevé également la dérégulation de plusieurs autres facteurs agissant sur la RiBi dans le CCR, tel que le cofacteur RRS1 « ribosome biogenesis regulatory protein homolog 1 », qui interagit avec l'ARN polymérase III ainsi que la protéine RPF2 dans la synthèse de l'ARNr 5S et qui participe également aux étapes de maturation de la

particule pré-60S [175]. L'expression de RRS1 est significativement augmentée dans une cohorte de patients atteints de CCR [177].

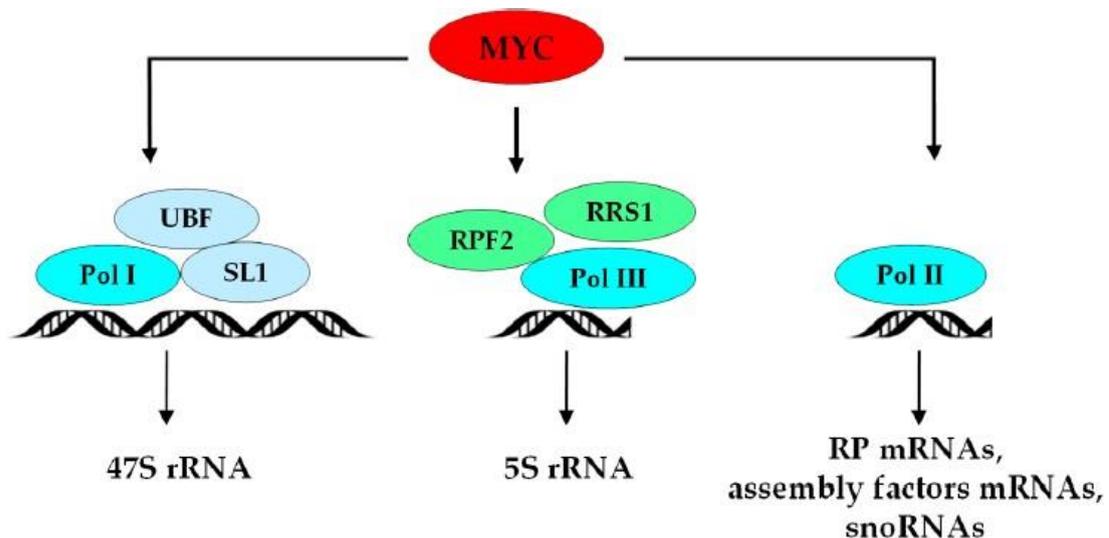


Figure 17 : Régulation des étapes précoces de la RiBi dans le CCR. Myc se lie aux séquences d'ADNr et interagit avec les protéines UBF et SL1 et active l'ARN polymérase I et enclenche la transcription de l'ARNr précurseur 47S. Myc active aussi la transcription de l'ARNr 5S médié par l'ARN polymérase III en interagissant avec les protéines RPF2 ainsi que RRS1. Enfin, Myc agit notamment sur l'activation de l'ARN polymérase II qui transcrit les protéines ribosomiques ainsi que d'autres facteurs de la RiBi.

Source : NAIT SLIMANE S et al. 2021 [48]

I.4.2 Régulation des stades tardifs de la biogenèse des ribosomes dans le CCR

Nous avons également relevé dans notre revue [48] les altérations et les dérégulations de facteurs intervenant dans les étapes dites tardives de la RiBi qui sont le « processing » de l'ARNr, les modifications chimiques de l'ARNr, l'assemblage et exportation des sous-unités du ribosome. Durant l'étape du clivage de l'ARN précurseur intervient le complexe PeBoW composé de trois protéines qui sont Pescadillo homolog 1 (PES1), block of prolifération (BOP1), et WD-repeat domain 12 protein (WDR12) qui est essentiel pour le clivage de la partie ITS-2 de l'ARNr 32S en 28S et 5.8S (figure 18), ainsi que pour la formation et l'assemblage de la grande sous-unité 60S [178]. PES1 qui est une cible de Myc, est significativement surexprimé dans les échantillons cliniques de CCR comparé aux cellules épithéliales adjacentes et au colon normal [179]. Et la surexpression de PES1 dans les cellules CCR est associée à une résistance aux chimiothérapies telles que le 5-FU ou la doxorubicine [180]. Dans une étude, il a été reporté que le nombre de copie du gène *BOP1*, le deuxième membre du complexe PeBoW, est

amplifié de 40% dans les CCR primaires humains avec une surexpression de l'ARNm [181], ainsi qu'une surexpression au niveau protéique [182], et une surexpression au niveau des échantillons cliniques comparé aux cellules épithéliales normales adjacentes [183]. Dans les cellules CCR SW480, la surexpression de *BOP1* a stimulé l'invasion de la matrice extracellulaire et les propriétés migratoires bidimensionnelles (2D) [184]. Dans une autre étude, le troisième composé du complexe PeBoW, WD12 est aussi surexprimé dans les cellules CCR comparé aux cellules normales adjacentes [185]. D'autres facteurs de la RiBi dérégulés dans le CCR ont notamment été rapporté dans notre revue [48] et illustré dans la figure 18, tels que des facteurs impliqués dans les modifications chimiques des ARNr. En effet, l'activité enzymatique du ribosome est portée par les ARNr qui le composent [186], et les différentes modifications chimiques apportées aux ARNr stabilisent la structure tridimensionnelle (3D) des ribosomes fonctionnels. Pour citer un exemple, le SNORD16, de la famille des snoARN non-codant C/D box qui servent de guide pour cibler la 2'-O-ribose méthylation sur un site spécifique qui est le 18S-Am484, durant les modifications chimiques de la FBL (figure 18) [187], a été démontré dans une étude comme un marqueur moléculaire dans le CCR. La surexpression de SNORD16 est significativement corrélée avec l'âge, l'invasion des cellules cancéreuses, les antécédents de polypes du côlon chez le patient et à une faible survie globale du patient [188].

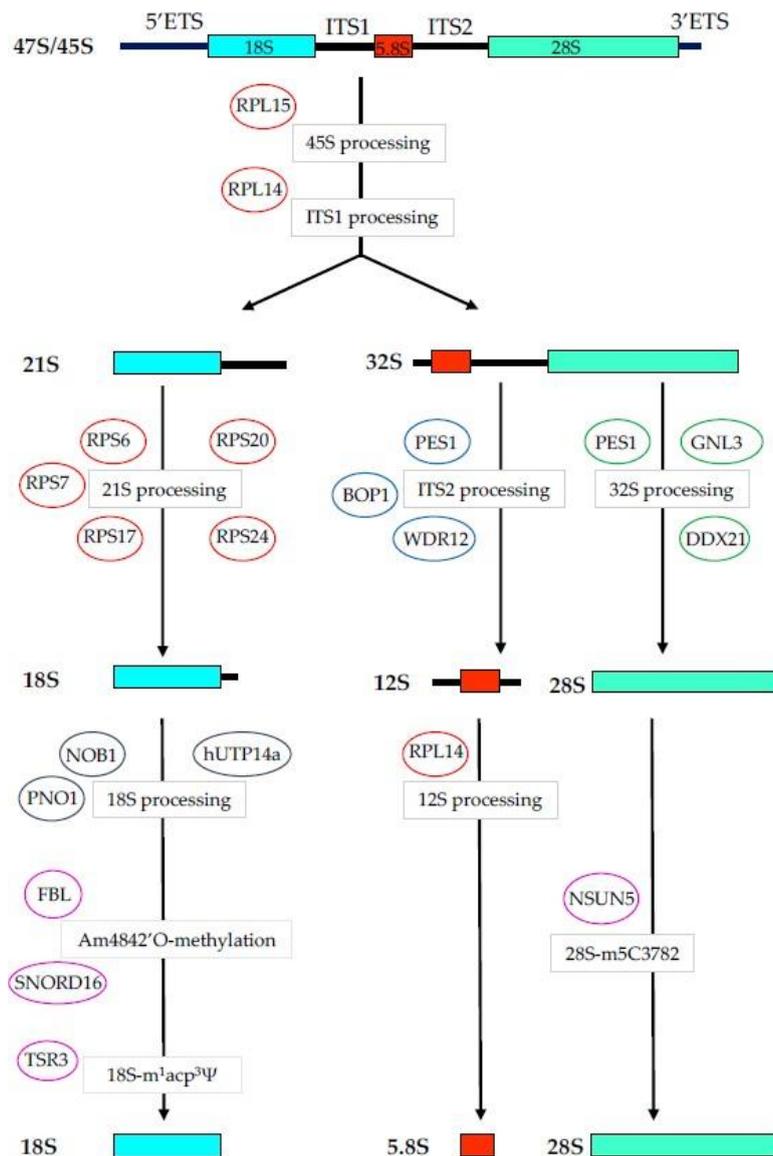


Figure 18 : Représentation schématique des facteurs de la biogenèse des ribosomes surexprimés dans les cellules CCR et leurs sites de régulation du « processing » des ARNr dans les étapes tardives de la RiBi. Le précurseur 47S est tout d’abord transcrit et tout de suite les extrémités 5’UTR et 3’UTR sont clivées pour donner l’ARNr 45S. Ensuite, il est clivé au niveau de la séquence interne ITS1 et est segmenté en deux parties qui donne les ARNr intermédiaire 21S et 32S. Ces ARNr subissent différents clivages et modifications afin de donner, respectivement, l’ARNr 18S découlant de l’ARNr 21S et les ARNr 5.8S et 28S, découlant de l’ARNr intermédiaire 32S. Sur figure, nous avons illustré les différents facteurs intervenants durant la RiBi et qui sont dérégulés dans le CCR. On peut distinguer différentes classes de facteurs, tels que les protéines ribosomiques RPL/RPS, des facteurs du « processing » et des facteurs de modifications chimiques tels que FBL et SNORD16.

Source : NAIT SLIMANE S et al. 2021 [48]

I.5 Partie V : La Fibrillarine, enzyme de la biogénèse des ribosomes

La Fibrillarine (FBL) a été décrite à l'origine dans le *Physarum polycephalum*, c'est une protéine du nucléole, où se déroule la RiBi. Le nucléole consiste en trois parties différentes : le centre fibrillaire « Fibrillar center » (FC), le composant fibrillaire dense « dense fibrillar component » (DFC) et le composant granulaire. Durant l'interphase, la FBL est détectée entre la partie FC et DFC du nucléole où a lieu la transcription de l'ADNr et le « processing » des pré-

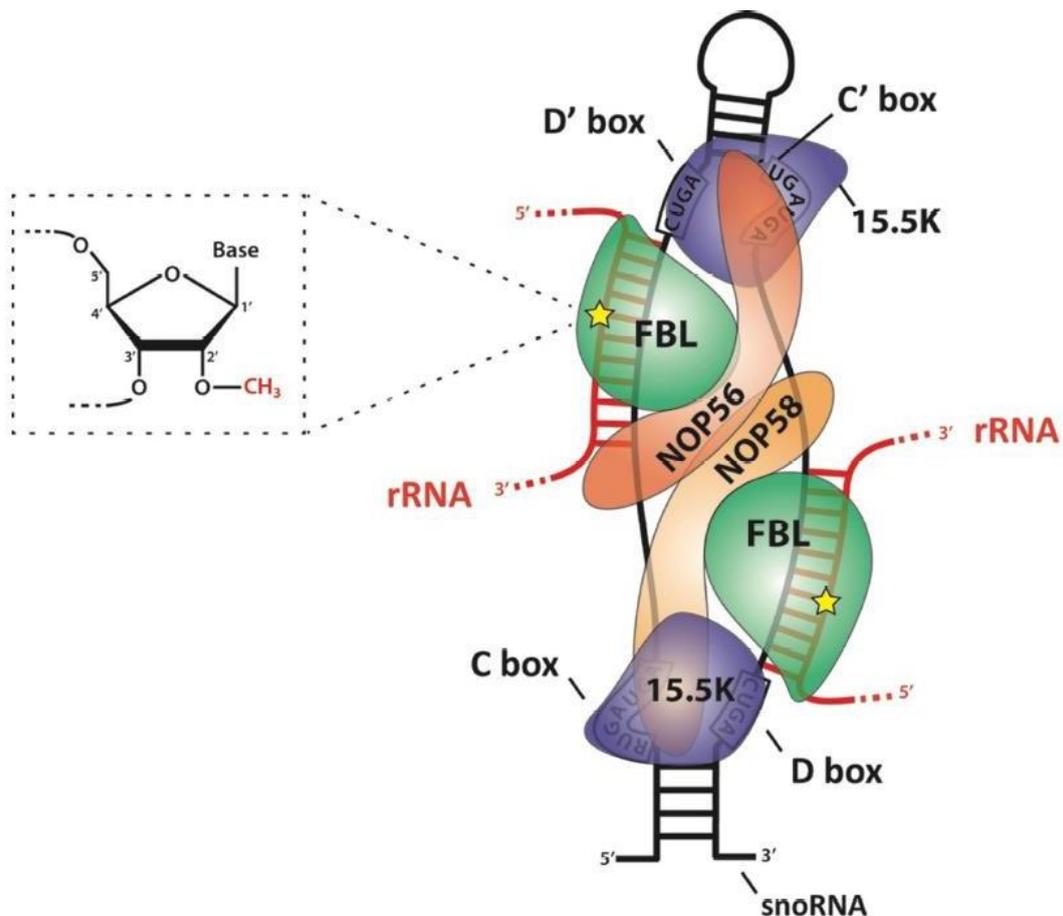


Figure 19 : Représentation schématique du complexe snoRNP à boîte C/D de la Fibrillarine.

Ce complexe ribonucléoprotéique est composé de la boîte C/D en double exemplaire défini par deux séquences conservées, la boîte C (RUGAUGA, où R est une purine) et la boîte D (CUGA), qui sont présentes en double exemplaires de séquences antisens C'/D, dont le rôle est de guider la fibrillarine pour cibler, par complémentarité de séquences avec l'ARNr, le nucléotide associé au site de 2'-O-Méthylation d'un ribose du nucléotide de manière site-spécifique r. Au sein de ce complexe, on trouve également NOP56 et NOP58, ainsi que la protéine 15.5K.

Source : Lo Monaco et. Al [189]

ARNr dans les cellules eucaryotes, et par conséquent, la FBL est utilisée comme un marqueur de nucléoles actifs [190].

La séquence et la structure de la FBL ont été conservées durant l'évolution des Archaea à l'homme [191]. La FBL est une protéine majeure de la RiBi car elle est impliquée dans le « processing » ainsi dans la méthylation des ARNr [192], en effet, la FBL catalyse la modification chimique 2'-O-méthylation (2'-O-Me) sur les riboses des ARNr (figure 19). En plus de son rôle dans les cancers, que nous allons développer dans le chapitre suivant, la FBL est impliquée dans divers processus biologiques clés tels que les infections virales, plus précisément pour l'assemblage de particules virales infectieuses cytoplasmiques [193]. Ainsi que dans l'embryogenèse de *Caenorhabditis elegans*, où la FBL est colocalisé avec le snoARN U3 durant la phase S au stade de quatre cellules de l'embryogenèse [194], et ainsi la FBL ainsi que d'autres protéines nucléolaires telles que la nucléoline, auraient un rôle dans la nucléogenèse [195]. Enfin, la FBL des est capable d'interagir avec l'histone H2A et d'effectuer sa méthylation dans le promoteur de l'ADNr [196].

I.5.1 Structure et rôle de la fibrillarine dans la biogénèse des ribosomes

Selon l'organisme, le poids moléculaire de la FBL varie entre 34 et 38 kDa, elle est composée de 321 acides aminés (A.A) répartis en trois domaines structurels, le domaine « GAR – glycine and arginine rich » qui est un domaine N-terminal riche en glycine et arginine composé de 80 A.A, un domaine « RNA binding capacity – RB » (90 A.A) qui est domaine de liaison à l'ARN, et un domaine C-terminal en hélice α (33 a.a). Entre chaque domaine, on trouve deux séquences spacers notée « Sp1 » et « Sp2 » d'environ 50 A.A (figure 20) [191].

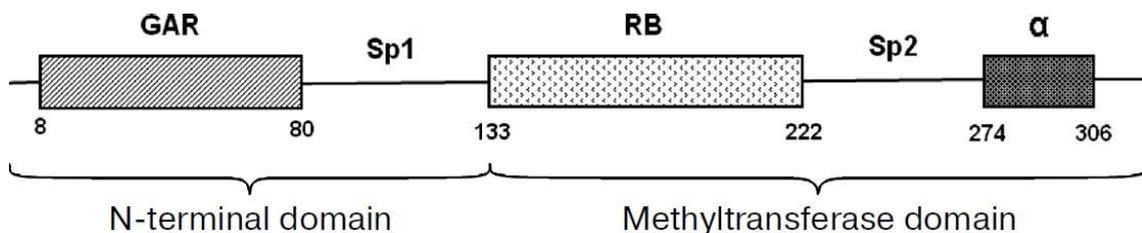


Figure 20 : Structure de domaine de la fibrillarine. RB, domaine de liaison à l'ARN ; α , domaine α -hélicoïdal ; Sp1 et Sp2, première et deuxième séquence espace.

Rôle de la Fibrillarine dans la biogénèse des ribosomes

La FBL fait partie de la famille des méthyltransférases, c'est plus précisément une S-adenosyl-L-méthionine méthyltransférase dépendante (AdoMet-dépendante méthyltransférase), c'est-à-dire qu'elle catalyse la réaction de méthylation en transférant un groupement méthyl sur un 2'-O-ribose grâce au donneur AdoMet, avec la formation de S-adenosylhomocysteine [191]. Dans son rôle de méthyltransférase durant la RiBi, la FBL (Nop1 chez la levure) fait partie d'un complexe snoRNP (Ribonucléoprotéique) composé de petits ARN nucléolaires de la famille de la boîte C/D «snoRNA C/B box family», dans lequel le snoARN guide la FBL pour définir le ribose à méthyler par complémentarité de séquences des ARNr (figure 19). Dans ce complexe, on retrouve notamment l'hétérodimère NOP56 et NOP58, ainsi que la protéine 15.5K (appelé

NHP2L1 chez la levure). La boîte C/D est définie par deux séquences conservées, la boîte C (RUGAUGA, où R est une purine) et la boîte D (CUGA), qui sont présentes en double séquences antisens C'/D' (figure 19) [197]. Chez l'homme, la boîte C/D est composée de 70 à 120 nucléotides (nt), codée par des gènes associés à la RiBi. Le complexe est assemblé via un processus de plusieurs étapes, impliquant des protéines chaperonnes telles que R2TP, et cet assemblage se fait en partie dans les corps de Cajal, puis le complexe migre vers le nucléole [198]. Il est aussi à noter que chaque nucléotide 2'-O-méthylé est modifié par un snoARN de la boîte C/D unique [189]. La FBL participe à plusieurs étapes clés de la RiBi, en plus de l'apport de la modification chimique, elle participe notamment au « processing » des pré-ARNr où elle agit comme une endonucléase et clive la partie 5'ETS [199], ainsi que dans l'assemblage des unités pré-ribosomiques [192]. Néanmoins, la communauté scientifique s'est longtemps questionnée sur le rôle de la modification 2'-O-Me dans la structure et l'activité du ribosome. Certaines études ont tout de même montré que la 2'-O-Me sert d'une part à la stabilisation de la structure du ribosome en stabilisant la conformation du nucléotide méthylé [200], ainsi la méthylation des riboses permettrait un soutien de la structure tertiaire du ribosome ainsi que les différentes interactions ARNr-ARNm, ARNr-ARNt et ARNr-protéine [201]. Elle a aussi un rôle dans le fonctionnement du ribosome dans la traduction des ARNm. En effet, une série d'études sur l'impact de l'absence de la 2'-O-Me sur l'activité des sites clés du ribosome, tels que le centre de transfert peptidique et le centre de décodage ont montré qu'au moins deux ou trois sites non méthylés pouvaient avoir un impact négatif sur la synthèse protéique ainsi que la croissance cellulaire [202][203]. En effet, la modulation de l'expression de la FBL a impacté l'initiation de la traduction en mobilisant la traduction IRES-dépendante (Internal Ribosome Entry Sites). Les éléments IRES contenus dans les ARNm sont capables d'initier la traduction en recrutant la sous-unité 40S en contournant la traduction CAP-dépendante, et ce mode de traduction est souvent stimulé dans des conditions de stress, telles que le choc thermique, l'hypoxie, ou bien les infections virales [204]. La régulation de la traduction joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression des gènes et contribue au développement des cancers [153]. Les ARNr jouent aussi un rôle central dans la traduction à travers leur activité enzymatique de type ribozyme. Dans notre étude sur l'altération des fonctions du ribosome suite à un traitement au 5-FU [141], dans laquelle nous avons montré que la molécule du 5-FU s'incorpore dans l'ARNr de ribosomes matures dans les cellules de CCR, dans les xénogreffes de cancer colorectal et dans les tumeurs humaines. Ces ribosomes fluorés restent fonctionnels mais avec une activité traductionnelle sélective. En effet, la traduction de l'ARNm de l'*IGF-1R* « *Insulin-like growth factor I receptor* », l'un des ARNm contenant l'une des plus longues séquences 5'UTR du génome humain incluant une séquence IRES, est augmentée lorsque les cellules sont traitées au 5-FU, suite à une activité IRES-dépendante. Les cellules de CCR traitées au 5-FU mettent en place une activité traductionnelle sélective qui soutient la traduction de gènes de survie cellulaire. La question qui se pose donc est de savoir si la modification des ARNr à travers les modifications chimiques de la FBL ainsi que l'incorporation du 5-FU dans les ARNr en promouvant la traduction IRES-dépendante est-il un nouveau mécanisme de la reprogrammation des cellules cancéreuses ? Davantage d'études devraient être menées afin d'investiguer cette question.

I.5.2 Expression de la Fibrillarine dans les cancers (CCR)

Il a nettement été démontré que la RiBi est augmentée dans les cancers et cela grâce à une activité soutenue de l'ARN Pol I et de récents résultats montrent que cette dérégulation n'est pas une simple conséquence de la tumorigenèse, mais bien une étape clé de celle-ci [205]. Les riboses méthylés en position 2'-O de certains nucléotides constituent des modifications post-transcriptionnelles des ARNr complexes et très spécifique qui contribue directement à l'activité traductionnelle des ribosomes. Une étude publiée au sein de notre équipe, montre que la méthylation de certains riboses des ARNr est modulable d'une manière site-spécifique y compris sur des sites fonctionnels du ribosome, démontrant que cette modification biochimique peut être un moyen d'exprimer la plasticité et la diversité des ribosomes humains sans impacter la production globale des ribosomes [151]. Ces travaux ont permis de renforcer l'hypothèse d'un code-ribosome, sur le même modèle du code-histone, qui conditionnerait l'activité de traduction en l'adaptant aux besoins cellulaires. Une autre étude publiée aussi au sein de notre équipe, montre que l'expression de la *FBL* est directement contrôlée négativement par la protéine p53 par liaison directe sur le promoteur du gène de la *FBL*. Nous démontrons ainsi une expression inversement proportionnelle entre la *FBL* et *p53*. Ces résultats montrent aussi que l'inactivation de *p53* altère directement les motifs de méthylation 2'-O-Me, en plus d'une régulation du niveau de certain snoARN de la boîte C/D. Cette étude a aussi démontré que l'augmentation de l'expression de la *FBL* dans des cellules ayant la protéine P53 inactive, stimule l'initiation de la traduction IRES-dépendante d'un certain nombre d'ARNm codant pour des facteurs de survie cellulaire [206]. Des résultats cliniques publiés dans cette même étude ont aussi montré qu'une expression élevée de la *FBL* dans les tumeurs primaires de cancers du sein est associée à un mauvais pronostic. Une expression élevée de la *FBL* a aussi été retrouvée dans d'autres cancers tels que le cancer primaire et métastatique de la prostate [207] et dans le carcinome épidermoïde du col de l'utérus [208]. L'expression de la *FBL* dans les cancers du colorectal n'a pas fait l'objet d'aucune étude à l'heure actuelle et constitue l'objet de ma thèse.

II. Hypothèses et objectifs de thèse

ETAT DE LA QUESTION

Le cancer colorectal est un problème majeur de santé publique puisqu'il représente la troisième cause de cancer et la seconde cause de décès en France avec 42 000 nouveaux cas chaque année. La moitié de ces patients mourra d'une évolution métastatique. Le diagnostic du cancer colorectal est basé sur son avancée déterminée par coloscopie et sur son stade déterminé sur pièce opératoire. Ces éléments sont insuffisants pour les cancers avancés puisque la récurrence est liée en partie à notre incapacité de la prédire par des marqueurs pronostic fiables. Les métastases représentent 90% des causes de décès liées au cancer colorectal et la principale raison de ces décès est la chimiorésistance de ces tumeurs.

Les ARNr du ribosome jouent un rôle clé dans la traduction. Des modifications dans ces ARNr pourraient avoir un impact sur son activité et l'expression génique. La synthèse de ribosomes est altérée de manière qualitative et quantitative durant la carcinogénèse. En effet, la biogénèse du ribosome est augmentée dans les cancers, ce qui induit des nucléoles plus larges et une synthèse protéique augmentée conduisant à une croissance cellulaire plus importante. L'hyper activation de l'ARN polymérase I et III conduit à augmenter la biogénèse des ribosomes dans les cancers au travers d'oncogènes comme c-Myc, ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur comme TP53 et Rb (8).

Durant la progression tumorale, la surexpression de la *FBL* a été observée dans des cellules du cancer du sein TP53-inactivées et nous avons montré que TP53 réprime l'activité du promoteur de la *FBL*. La surexpression de la *FBL* augmente l'efficacité de traduction de séquences IRES contenant des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la stimulation des activités cellulaires prolifératives comme c-Myc et le récepteur de l'IGF-IR. Toutes ces considérations mettent en relief l'importance de la *FBL* sur le pronostic et la chimiorésistance potentielle dans le cancer. Afin d'étudier la fonction de la *FBL* et son rôle dans le développement tumoral, mon équipe a développé de nombreux outils pour moduler le niveau d'expression de la *FBL* ou des mutants de la *FBL* dans des lignées modèles de cancer humains et les résultats montrent qu'elle est un activateur de la prolifération tumorale du cancer du sein. Le projet présenté vise à comprendre le rôle de la Fibrillarine dans un autre aspect de la tumorigénèse, qui est la dissémination métastatique. En effet à l'heure actuelle, aucune donnée n'existe qui indique que la *FBL* intervient dans les phénomènes de migration, d'invasion et de dissémination des cellules cancéreuses. Dans le cadre du cancer colorectal, les données sont encore plus rares et nous allons répondre à ces questions grâce à nos modèles cellulaires.

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Notre hypothèse est qu'il existe une corrélation positive entre la surexpression de la *FBL* et l'agressivité tumorale de cellules cancéreuses colorectales. Si son rôle dans la croissance tumorale est désormais bien établi, aucune étude n'a élucidé son action sur la migration et l'invasion cellulaire, deux phénomènes qui accompagnent la dissémination métastatique. En conséquence mon programme de thèse consiste à déterminer le rôle de la *FBL* dans la tumorigénèse in vitro de cellules colorectales cancéreuses.

L'objectif de mon projet est donc de déterminer l'implication de la Fibrillarine dans la progression tumorale des cellules de CRC. Nous étudierons ces caractéristiques de prolifération, mort cellulaire, migration et invasion par des approches in vitro classiques.

Déroulement du projet de thèse

Axe 1 - Expression de la FBL dans les cellules colorectales cancéreuses

L'objectif de ce premier axe est de (i) caractériser les niveaux d'expression de la FBL et pour cela, nous utilisons un large éventail de lignées cancéreuses colorectales classées en fonction de l'expression du gène suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli) de l'oncogène K-ras (Kirsten-ras) et de leurs caractéristiques d'agressivité. Les lignées d'adénocarcinome colique choisies sont, Caco-2 une lignée peu migratoire et non invasive et les lignées HCT-116 et HT-29 qui sont migratoires et invasives. A partir de ces lignées nous rechercherons par Western blot le niveau d'expression de la FBL.

Axe 2 - Effet de l'altération de la composition du ribosome sur le phénotype des cellules colorectales cancéreuses

L'objectif de cet axe est de déterminer le rôle de la FBL dans la croissance tumorale des cellules colorectales cancéreuses HT-29 et HCT-116 in vitro. Nous utiliserons un modèle cellulaire dans lequel le sh de la FBL peut être induit. Ces lignées ont été obtenues par transduction de particules virales. Pour chaque lignée nous avons construit la lignée contrôle correspondante qui exprime un vecteur vide ou un shRNA non spécifique ne reconnaissant aucune séquence d'ARN humain. Chacune des expériences décrites ci-dessous sera réalisée en présence ou non de molécules conventionnellement utilisées en chimiothérapie dont le 5-Fluorouracile (5-FU). Une gamme dose de 5-FU comprise entre 1 et 50 μM sera réalisée. Le but de l'utilisation de ces chimiothérapies étant de déterminer si elles sont plus efficaces dans un contexte où la FBL est inhibée.

Analyse de la prolifération cellulaire

En 2D, nous avons utilisé un système d'analyse de la prolifération en temps réel (xCELLigence, ACEA, Biosciences, USA). Ce système est basé sur l'analyse des variations d'impédance générées par les cellules en croissance au fond de puits dotés de microélectrodes (E-plate). L'impédance est proportionnelle au nombre de cellules qui recouvrent les électrodes et est mesurée en continu durant toute la durée de l'expérience. Nous avons testé ainsi l'effet de la suppression de FBL (shRNA-FBL) par rapport aux lignées « contrôle ». Pour les études de croissance en 3D, nous avons réalisé des agrégats sphéroïdes des différentes lignées en plaques à très faible adhésion (Ultra low adhesion, Corning®) dans un milieu semi-solide à base de collagène ou de matrigel™. Nous avons analysé et quantifié par microscopie photonique et analyse d'image le diamètre de chacun des sphéroïdes formés. Ce modèle de sphéroïdes est plus spécifique de l'architecture et des interactions cellules-cellules des tumeurs humaines colorectales et donc les résultats auront une portée plus pertinente.

Analyse de la migration et de l'invasion cellulaire

Nous avons utilisé le même système d'analyse de l'impédance cellulaire en temps réel mais avec une adaptation de la culture suivant le système des chambres de Boyden. Ainsi une chambre supérieure perforée de pores de 8 μm (CIM-plate[®]) est remplie de cellules qui si elles sont migratoires traverseront les pores pour aller contacter les microélectrodes sur l'autre face de la chambre et générer un signal électrique proportionnel au nombre de cellules ayant migré. Exactement le même système de chambres sera utilisé pour étudier l'invasion cellulaire mais au préalable la chambre supérieure aura été remplie de matrice extracellulaire (Matrigel™ 1/10 et 1/20). Seules les cellules invasives et migratoires pourront digérer la matrice et transiter sur la face opposée de la chambre dotée des électrodes et produire un signal électrique. Ce système permet de suivre l'invasion et la migration en temps réel, nous l'appliquerons à toutes les lignées décrites.

III. Matériels et Méthodes

III.1 Lignées cellulaires

III.1.1 • HT-29

La lignée cellulaire HT-29 est issue d'un adénocarcinome du colon humain. Elle est de type épithélial adhérente, isolée d'une tumeur primaire d'une femme caucasienne âgée de 44 ans en 1964 (source : atcc.org). Cette lignée cellulaire est utilisée pour l'étude de plusieurs aspects de la biologie, notamment en toxicologie et en cancérologie. Sous certaines conditions de culture cellulaire, les cellules HT-29 prolifèrent avec un phénotype polarisé, une physiologie et des marqueurs biochimiques précis. En effet, elles forment une monocouche avec des jonctions serrées entre les cellules et une bordure en brosse apicale typique. L'entretien de cette lignée cellulaire en culture cellulaire nécessite un milieu de culture DMEM supplémenté en glucose, 10% de sérum de vœu fœtal (SVF) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 µg/ml dans un incubateur humide à 5% de CO₂, atmosphère 37°C [209]. Les caractéristiques génétiques de la lignée cellulaire HT-29 sont : p53 muté au niveau du codon 273, avec une protéine K-ras non muté « wild type », une protéine APC tronquée, C-Myc surexprimé et B-Raf muté V600E (source : atcc.org)

III.1.2 • HCT-116

La lignée cellulaire HCT-116 est issue d'un carcinome de cancer colorectal d'un homme adulte, provenant d'une tumeur primaire. Ces cellules sont de type épithélial adhérentes. Cette lignée cellulaire porte la mutation RAS au niveau du codon 13. L'entretien de cette lignée cellulaire en culture cellulaire nécessite un milieu de culture DMEM supplémenté en glucose, 10% de sérum de vœu fœtal (SVF) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 µg/ml dans un incubateur humide à 5% de CO₂, atmosphère 37°C. La lignée cellulaire HCT-116 ont une protéine p53 non mutée « wild type », une mutation K-ras G13D, une APC « wild type », une protéine C-Myc surexprimée, B-Raf « wild type ».

III.2 Modèles cellulaires de l'inhibition de la Fibrillarine

III.2.1 siRNA-FBL

Nous avons inhibé l'expression de la Fibrillarine avec la technique de « Small interfering RNA » qui sont des petits ARN interférents, siRNA double brin de 21 à 24 paires de bases. Dans les expériences menées, nous avons utilisé l'INTERFERin® Polyplus comme agent de transfection à 6 et 10µl. L'inhibition de la Fibrillarine a été mesurée à 24h, 48h et 72h et pour cela une plaque cellulaire a été préparé pour chaque temps. Les cellules ont étéensemencé dans des plaques 6 puits à 100 000 cellules par puits, dans 2 ml de milieu de culture cellulaire. 48 heures après ensemencement, les siRNA sont ajoutés à une concentration de 100µM dans les puits après remplacement de l'ancien milieu de culture cellulaire. Dans cette expérience, nous

avons utilisé un mélange de trois séquences de siRNA obtenus par synthèse ciblant différentes séquences de l'ARNm de la Fibrillarine, qui sont les suivantes :

Séquence ARNm ciblée par le siFBL 1 : 5'-GUCUUCAUUUGUCGAGGAAAdTdT-3'

Séquence du gène GTCTTCATTTGTCGAGGAAA

Séquence ARNm ciblée par le siFBL 2 : 5'-UGGAGGACACUUUGUGAUUUUdtdT-3'

Séquence du gène TGGAGGACACTTTGTGATTT

Séquence ARNm ciblée par le siFBL 3 : 5'-CUGUCAGGAUUGCGAGAGAdTdT-3'

Séquence du gène CTGTCAGGATTGCGAGAGA

Les solutions siARN sont préparées dans un milieu dénué de SVF « SVF-free », à des concentrations intermédiaires (6 nM et 60 nM) pour 200µl, pour une concentration finale (100 µM) dans 1.2 ml. Nous avons notamment utilisé un siARN control à une concentration similaire de 100µM, qui est un ARN non codant, qui ne cible aucune séquence d'ARNm du génome. Après préparation de toutes les solutions nécessaires à l'expérience, dans un tube Eppendorf l'Interferin est mélangé avec les siARN correspondants délicatement par retournement du tube, puis on laisse incuber 10 à 30 minutes maximum. Puis, le milieu des plaques de culture ensemencées 48h avant est retiré, les cellules sont rincées au PBS, on ajoute 1ml de DMEM neuf et complet, puis on ajoute les 200µl de mélange siRNA/INTERFERIN dans les puits correspondants. On incube les plaques 24h, 48h et 72h puis on récupère les cellules pour effectuer une extraction protéique totale et un western blot afin de mesurer l'expression de la Fibrillarine.

III.2.2 shRNA-FBL

Dans un second temps, pour inhiber l'expression de la fibrillarine dans les cellules de cancer colorectal HT-29 et HCT-116, nous avons généré des cellules shARN-FBL, qui sont des « ARN short hairpin », ARN en épingle à cheveux. Ces ARN sont utilisés pour inhiber l'expression d'un gène cible via phénomène d'interférence par ARN. Ces lignées ont été obtenues par transduction de particules virales et où le sh peut être induit. Les infections virales ont été réalisées un membre de notre équipe expérimenté en laboratoire de type P2 car ces virus sont infectieux pour l'Homme et doivent être manipulés avec des procédures de sécurité strictes.

Dans un premier temps, la lignée cellulaire 293T est utilisée pour la production virale. Pour cette étape, les cellules doivent être à un faible passage (en dessous de 10 passages) et doivent être maintenues à faible densité, car la confluence les rendra moins faciles à transfecter.

Au jour 1, les cellules 293T sont ensemencées dans une boîte de Pétri de 10cm à une densité de $4 \cdot 10^6$ cellules/boîte dans 10 ml de milieu de culture. Au jour 2, on réalise la transfection des cellules 293T avec les plasmides avec le réactif X-tremeGene HP dans un laboratoire P2 suivant un protocole précis. Au jour 3, on collecte le surnageant contenant les particules virales. Au jour 4, on ajoute le surnageant contenant les particules virales sur les cellules HT-29 et HCT-116 durant 6 heures de contact cellule-virus. Au jour 5 et 6, passage des cellules et transférées dans une nouvelle boîte de Pétri de 10cm avec 10ml de milieu de culture puis les cellules transfectées sont sélectionnées par un traitement Puromycine (temps et concentration). Après 3 à 4 passages, les cellules sont testées pour absence de protéines virales dans le milieu,

un test INNOTEST HIV Antigen mAb INNOGENETICS permettant la détection des antigènes p24 des virus HIV-1 et HIV-2 dans le sérum ou le plasma humain, et dans le surnageant de culture cellulaire. Lorsque le test est négatif, les cellules sont entretenues tous les 2 à 3 jours.

A l'issue de cette infection plusieurs populations cellulaires ont été générées. Pour les cellules shARN ciblant la FBL dans les deux lignées cellulaires HT-29 et HCT-116, deux shARN-FBL ont été produits shARN-FBL1 et shARN-FBL2 ciblant deux différentes séquences de la *FBL*. Aussi, un contrôle négatif shARN NS non spécifique a été produit. Ces shARN (FBL et NS), sont exprimés par induction avec un traitement à la doxycycline. Pour cela, les cellules HT-29 et HCT-116 sont traitées par la doxycycline (Dox) à une certaine concentration et durant un certain temps pour induire l'expression du shARN et induire la meilleure inhibition de la FBL. La combinaison de temps et de concentration de la Dox a été choisie par la caractérisation du modèle cellulaire par Western blot pour choisir la meilleure combinaison temps/concentration montrant la plus forte inhibition de la FBL.

III.3 Caractérisation du modèle cellulaire

III.3.1 Western blot

Afin de caractériser le modèle cellulaire de l'inhibition de la FBL par le shARN, les cellules HT-29-shNS, HT-29-shFBL2, HCT-116-shNS, HCT-116-shFBL2 sont traitées à la Dox à une concentration de 0.5µg/ml durant 96 heures (5 jours), dans une flasque Falcon de 75 cm², dans un milieu de culture DMEM supplémenté en glucose, 10% de sérum de vœu fœtal (SVF) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 µg/ml dans un incubateur humide à 5% de CO₂, atmosphère 37°C, afin d'induire l'expression du shARN. Par la suite, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées au PBS 1X préalablement chauffé dans le bain-marie 37°C 15 à 20 minutes, puis décollées à la Trypsine afin de faire des culots secs de cellules. Ces culots peuvent être conservés à -20°C ou utilisés le jour même pour une extraction de protéines ou d'ARN.

Préparation de lysat total de cellules et extraction protéiques

Après décongélation des culots cellulaires sur glace, les cellules sont lysées avec un tampon de lyse Tris pH 8.0. Ce tampon de lyse pour un volume final de 10ml, est composé de 250µl de Tris 2M, 375µl de NaCl 4M, 1ml de glycérol 100%, 20µl EDTA 0.5M, 50µl de NP40 100% et 8.25ml H₂O. Les culots cellulaires sont repris dans 5 volumes de tampon de lyse qui est complété avec un inhibiteur de protéases (40µl/ml de tampon), puis les cellules sont transférées dans des tubes 1.5ml préfroidis. On incube 15 minutes dans la glace et on centrifuge 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. On prélève le surnageant contenant les protéines et on effectue un dosage protéique avec le Nanodrop.

Préparation des échantillons et migration

Les échantillons sont préparés dans un volume final de 15µl pour 40µg de protéines, le volume de protéine est complété avec du SB DTT (Sample Buffer 5X, DTT). Avant la migration, les échantillons sont chauffés et dénaturés pendant 10 minutes à 95°C. Les échantillons sont par

la suite déposés dans les puits de gels precast (pré-coulé) Bio-Rad, 15% polyacrylamide. La migration se fait durant 1h à un voltage constant de 150, dans un tampon de migration du commerce, Biorad (10X) après dilution. Après migration, on démoule le gel et on active le stain free 45 secondes avec l'option stain free gel, dans le ChemiDoc Imaging Systems Bio-Rad. Par la suite, les protéines sont transférées sur une membrane de Nitrocellulose 2h à 80 voltes, dans un tampon de transfert du commerce, Bio-Rad. Par la suite, on vérifie le transfert des protéines sur la membrane au ChemiDoc avec l'option stain free blot. Par la suite, on bloque la membrane dans du TBST 5% de lait durant 1h, puis on lave une fois au TBST durant 5 minutes.

Anticorps et révélation

L'anticorps primaire est préparé dans 10ml de solution de TBST 2.5% de lait, puis les membranes sont incubées dans la solution overnight dans une chambre froide à 4°C. Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois au TBST durant 5 minutes, puis incubées dans une solution de TBST 2.5% de lait d'anticorps secondaire durant deux heures à température ambiante. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois au TBST durant 5 minutes. Pour la révélation des bandes de protéines, nous utilisons le système ECL « Clarity and Clarity Max ECL Western Blotting Substrates » de chez Bio-Rad, les deux solutions du kit sont mélangées de manière homogène à volume égal et directement déposées sur la membrane. Après 5 minutes d'incubation, la membrane est révélée dans le ChemiDoc.

Dans nos expériences, nous avons utilisé les anticorps suivants :

FBL Abcam 5821 lapin, dilution 1/1000 KU80

Abcam 119935 souris, dilution 1/1000

III.3.2 RTqPCR

On effectue une extraction d'ARN sur les culots secs de cellules pour cela les culots sont lavés une fois au PBS 1X à température ambiante et on ajoute 500 µl de Trizol puis on laisse incuber 5 minutes à température ambiante. On transfère le lysat dans un tube de 1.5ml et on vortex. Par la suite, on ajoute 150µl de chloroforme, on vortex, on incube 5 minutes à température ambiante, puis on centrifuge à 12000 rpm durant 15 minutes à 4°C. Après cela, on collecte le surnageant dans un autre tube 1.5ml. On ajoute 0.8 de volume d'Isopropanol et 1µl de Glycoblue. On centrifuge 10 minutes à 12000rpm à 4°C. On lave deux fois avec de l'EtOH 70%, on centrifuge 5 minutes à 12000rpm à 4°C puis on laisse sécher à température amiante. On resuspend le tout dans 30 µl d'eau afin de quantifier les échantillons au Nanodrop.

Après quantification des échantillons d'ARN, on procède à l'étape de reverse transcriptase. Pour nos expériences, nous avons utilisé le kit Takara PrimScript RT. Dans le mix RT, pour chaque échantillon d'ARN nous avons utilisé 4.5µl de Rnase Free H2O, 2µl 5X PrimeScript Buffer, 0.5µl Random 6 mer 100µM, 0.5µl Oligo dT Primer 50µM, 0.5µl PrimerScript RT Enzyme Mix I ainsi que 2µl de l'échantillon d'ARN. La transcription inverse opère après 15 minutes d'incubation à 37°C + 5 secondes à 85°C. Par la suite, on dilue les échantillons d=1/20. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C ou utilisé directement pour les étapes suivantes.

Pour effectuer la PCR quantitative, on prépare tout d'abord un premier mix (Mix A) dans lequel on mélange les deux primers d'un gène, 2.5µl primer F, 2.5µl primer R et 45µl d'eau. Une fois le Mix A préparé, on prépare ensuite le Mix B qui contient à son tour, pour chaque puits de la plaque PCR, 2µl d'eau, 1µl du Mix A et 5µl de SybrGreen Roche. Dans la plaque de PCR, on dépose tout d'abord 2µl de l'ADNc (transcription reverse) et 8µl du Mix B. Une fois tous les puits de plaque remplis, suivant un plan de plaque préalablement définis, on dépose la plaque dans la machine à PCR selon un protocole préalablement définis avec les différents cycles.

III.4 Etude de la croissance cellulaire en 2D

III.4.1 xCELLigence

xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analysis) de Agilent® utilise l'impédance cellulaire afin de mesurer en temps réel la cinétique de la croissance cellulaire, la migration cellulaire et l'invasion cellulaire avec une précision, une sensibilité et une reproductibilité élevées. Les plaques 16 puits, E-plate (croissance cellulaire) et CIM-plate (migration et invasion cellulaire), utilisées sont dotées de microélectrodes en or dans le fond de chaque puits et couvrent 70 à 80 % de la surface. L'impédance électrique générées par les cellules qui tapissent le fond du puits est converti en index cellulaire.

Protocol test de la croissance cellulaire par xCELLigence

Les cellules HT-29-shNS, HT-29-shFBL2, HCT-116-shNS, HCT-116-shFBL2 sont traitées à la Dox à une concentration de 0.5µg/ml durant 96 heures (5 jours), dans une flasque Falcon de 75 cm², dans un milieu de culture DMEM supplémenté en glucose, 10% de sérum de vœu foetal (SVF) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 µg/ml dans un incubateur humide à 5% de CO₂, atmosphère 37°C, afin d'induire l'expression du shARN. Par la suite, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées au PBS 1X préalablement chauffé dans le bain-marie 37°C 15 à 20 minutes, puis décollées à la Trypsine et comptées au bleu de Trypan au compteur de cellules Ozyme®. Dans les plaques 16 puits (200µl) xCELLigence E-plate dédié à la croissance cellulaire, on dépose à la pipette 10.000 cellules/puits/200µl de milieu préalablement calculées et préparées, selon un schéma de plaques préalablement définit de sorte à avoir plusieurs répliques biologiques pour chaque condition. Enfin, on mesure la prolifération cellulaire durant 7 jours.

III.4.2 Test MTS

Les cellules HT-29-shNS, HT-29-shFBL2, HCT-116-shNS, HCT-116-shFBL2 sont traitées à la Dox à une concentration de 0.5µg/ml durant 96 heures (5 jours), dans une flasque de 75 cm², dans un milieu de culture DMEM supplémenté en glucose, 10% de sérum de vœu foetal (SVF) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 µg/ml dans un incubateur humide à 5% de CO₂, atmosphère 37°C, afin d'induire l'expression du shARN. Pour les conditions contrôles, ces mêmes cellules sont entretenues sans le traitement de Dox. Après induction du shARN, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées au PBS 1X préalablement chauffé dans le bain-marie 37°C 15 à 20 minutes, puis décollées à la Trypsine et comptées au bleu de Trypan. Les cellules sont ensuiteensemencées à 5000 cellules par puits dans 200µl de milieu dans des plaques 96 puits, puis les plaques sont incubées à 37°C 5% CO₂ atmosphère humide. Pour chaque expérimentation, 5 plaques sont préparées afin de mesurer le signal MTS à 24h, 48h, 72h, 96h et 120h. Le jour de la mesure, un tube de 2ml du réactif « CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay » Proméga®, prévu pour une plaque de 96 puits, est décongelé du -20°C à T°A une heure avant l'expérience. Puis, on distribue dans chaque puits 20µl du réactif, à l'aide de la distributrice. Par la suite, on recouvre la plaque 96 puits de papier

aluminium afin de protéger d'une réaction photochimique et on incube la plaque à 37°C 5% CO₂ atmosphère humide. Lecture de la plaque après 1h et 3h au lecteur Tecan SPARK® et mesure de l'absorbance à 490nm.

III.4.3 Comptage cellulaire au bleu de trypan

Les cellules HT-29-shFBL2 et HCT-116-shFBL2 sont traitées ou non à la Dox à une concentration de 0.5µg/ml durant 96 heures (5 jours), les cellules sont ensuiteensemencées à 200 000 cellules par puits de plaques 6 puits pour être par la suite comptées à 24h, 48h, 72 et 96h post traitement à la Dox. A chaque temps correspondant, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées au PBS 1X préalablement chauffé dans le bain-marie 37°C 15 à 20 minutes, puis décollées à la Trypsine et comptées au bleu de Trypan pour effectuer un comptage cellulaire des cellules vivantes et des cellules mortes à l'aide d'un compteur automatique de cellules, Invitrogen Countess.

III.4.4 Etude de la croissance cellulaire en 3D : formation de sphéroïdes

Les cellules HT-29-shNS, HT-29-shFBL2, HCT-116-shNS, HCT-116-shFBL2 sont traitées à la Dox à une concentration de 0.5µg/ml durant 96 heures (5 jours), dans une flasque Falcon de 75 cm², dans un milieu de culture DMEM supplémenté en glucose, 10% de sérum de vœu foetal (SVF) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 µg/ml dans un incubateur humide à 5% de CO₂, atmosphère 37°C, afin d'induire l'expression du shARN. Pour les conditions contrôles, ces mêmes cellules sont entretenues sans le traitement de Dox. Après induction du shARN, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées au PBS 1X préalablement chauffé dans le bain-marie 37°C 15 à 20 minutes, puis décollées à la Trypsine et comptées au bleu de Trypan. Les cellules sont préparées à 2500 cellules par puits dans un volume de 200µl. Les cellules sont déposées dans les puits correspondants selon le plan de manipulation préalablement défini, dans des plaques ULA (Ultra Low Adhésion) Corning® 96 puits à fonds ronds. On centrifuge la plaque quelques secondes, dans une centrifugeuse à plaque 96 puits, afin de rassembler les cellules au milieu du puit et faciliter la formation de sphères. Puis la plaque est incubée à 37°C 5% CO₂ atmosphère humide, une photo de chaque puits est prise au microscope afin de suivre la formation des sphéroïdes durant 7 jours.

III.5 Etude de la migration et de l'invasion cellulaire

Afin d'étudier la migration et l'invasion cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116, nous avons utilisé le même système xCELLigence précédemment décrit, en utilisant dans ce cas les plaques CIM-plat et non les plaques E-plat utilisées pour la croissance cellulaire. Afin de suivre la migration et l'invasion cellulaire en temps réel, les cellules sont tout d'abord traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96h dans une flasque Falcon de 75 cm², dans un milieu de culture DMEM supplémenté en glucose, 10% de sérum de vœu foetal (SVF) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 µg/ml dans un incubateur humide à 5% de CO₂, atmosphère 37°C, afin d'induire l'expression du shARN. Par la suite, le milieu de culture est retiré, les

cellules sont lavées au PBS 1X préalablement chauffé dans le bain-marie 37°C 15 à 20 minutes, puis décollées à la Trypsine et comptées au bleu de Trypan au compteur de cellules Ozyme®. Pour la migration cellulaire, les cellules sont déposées dans la partie supérieure de la plaque CIM-plate à 50 000 cellules par puits dans un volume de 200µl, en suivant un plan de plaque préalablement définis en fonction des différentes conditions de l'expérience et de sorte à avoir plusieurs répliques biologiques pour chaque condition. Ainsi, on démarre l'expérience afin de suivre la migration en temps réel. Concernant l'invasion cellulaire, nous avons utilisé exactement le même système et les mêmes plaques CIM-plat que pour la migration cellulaire avec une différence dans la composition du milieu de culture. Afin de créer des conditions semblables aux conditions physiologiques de l'invasion cellulaires, nous avons ajouté dans le milieu cellulaire du Matrigel à 5%. Puis les cellules sont déposées dans la partie supérieure de la plaque CIM-plate à 100 000 cellules par puits dans un volume de 200µl, en suivant un plan de plaque préalablement définis en fonction des différentes conditions de l'expérience et de sorte à avoir plusieurs répliques biologiques pour chaque condition. Ainsi, on démarre l'expérience afin de suivre la migration en temps réel.

III.6 Analyse des ARNr 18S et 28S dans les cellules CCR

Nous avons vérifié l'intégrité des ARNr 18S et 28S dans les cellules CCR HCT-116 et HT-29 avec un gel d'agarose 1%. Pour cela, 0.5 gramme d'agarose RNAase free a été mélangé à 50ml de tampon d'électrophorèse TAE (tris acétate EDTA) dans une éprouvette, puis passer le mélange au micro-onde environs 2 minutes. Puis, ajouter 2µl de BET dans un falcon 50ml. Déposer délicatement le mélange afin d'éviter la formation de bulles dans un moule pour former le gel et laisser le gel refroidir. En parallèle, on prépare les échantillons à déposer sur le gel, pour cela, on utilise des échantillons d'extraits d'ARN préalablement quantifiés et dosés à une concentration 100ng/ml. Les échantillons sont ensuite préparés en mélangeant 7 µl d'ARN à 100ng/ml + 7µl de SB RNA 2X concentré. Ce mélange est par la suite dénaturé à 70°C pendant 5 minutes. Par la suite, on dépose les échantillons dans les puits du gel, une fois la plaque dans le tampon TAE, puis on migre durant 20 min à 50V. Une fois la migration terminée, on prend des images du gel.

III.7 Test Sunset

Le test de sunset a été réalisé afin de mesurer la synthèse protéique totale dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116. Les cellules sont tout d'abord traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96h, puis sont lavées deux fois avec du PBS 1X, puis 24h ou 48 post traitement à la Dox, 1 µM de puromycine est incubée pendant 30 min, le milieu est ensuite aspiré, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X, puis les cellules sont lysées sur la glace avec un tampon de lyse. Le lysat est collecté et récupéré, vortexé toutes les 5 min pendant 30 min maintenu sur la glace, puis le lysat est centrifugé 10 min à 4°C 12000 rpm. Le surnageant est transféré dans un tube sur la glace et la concentration en protéine est mesuré par Nanodrop. 30µg de protéines sont mélangées à du Laemmli buffer 2x concentré, à volume égal + 5% de B-mercaptoethanol, chauffé à 95 °C. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 12% et migre durant 1h à un voltage constant de 150. Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF. Ensuite la membrane est lavée au PBS tween, bloquée avec du lait, puis rincée à nouveau avec PBST et incubée avec l'AC anti-puromycine à 4°C pendant la nuit (Sigma). La détection de l'anticorps secondaire se fait après 1h d'incubation grâce au système de détection ECL de Bio-Rad.

IV. Résultats

IV.1 Partie I – Fibrillarine dans le cancer colorectal

IV.1.1 Expression de la FBL dans les cellules colorectales cancéreuses

Nous avons recherché l'expression protéique de la FBL dans un panel de cellules de cancer colorectal, HT-29, HCT-116 type sauvage, HCT-116 p53-/- qui n'exprime pas la protéine p53, ISRECO-1, SW-480, SW-620 et CACO-2 (figure 23). Ces différentes lignées cellulaires présentent des caractéristiques moléculaires phénotypiques différentes. L'expression protéique de la FBL ainsi que sa quantification ont été mesurés dans ce panel de lignées cellulaires par western blot et les résultats sont représentés dans la figure 23. Les niveaux d'expression de la FBL ont été normalisés à leur niveau dans la lignée cellulaire HT-29. On constate que le niveau d'expression de base de la FBL varie entre les différentes lignées cellulaires, hormis les lignées HCT-116 et ISRECO-1, les niveaux d'expression protéique de la FBL restent comparables. De manière plus intéressante, son expression est doublée dans les cellules HCT-116 P53-/- comparée à la lignée sauvage HCT-116.

IV.1.2 Modèles cellulaires de l'inhibition de la Fibrillarine

IV.1.2.1 • siRNA-FBL

Afin d'inhiber l'expression de la FBL dans nos cellules CCR HT-29 et HCT-116, dans un premier temps nous avons utilisé la technique de siARN « Small interfering RNA » qui sont des petits ARN interférents, siRNA double brin de 21 à 24 paires de bases. Pour cela, nous avons utilisé deux concentrations de siARN à 1nM et 10nM, ainsi qu'un siARN control (siCTRL) aux mêmes concentrations. L'Interferine a été utilisée comme agent de transfection à un volume de 6µl et 10µl et l'inhibition de la FBL a été mesurée à 24h, 48h ainsi que 72h. Les expériences ont été reproduites plus de trois fois pour chaque lignée cellulaire. Afin de mesurer l'expression protéique et l'efficacité de la technique siARN, nous avons effectué un western blot. Les résultats de ces expériences ont été résumés dans la figure 24. Dans la figure 24, le western blot ainsi que la quantification sont représentés pour HT-29 et HCT-116. Nous avons choisi de présenter un seul résultat des expériences siARN, toutes les autres expériences ayant mené à des résultats similaires. Les contrôles de cette expérience sont les cellules non traitées (NT), les cellules traitées au siCTRL à 1 et 10nM. Les différentes conditions ont été déposées dans le blot dans l'ordre suivant, siARN 1nM 24h, siARN 1nM 48h, siARN 1nM 72h, siARN 10nM 24h, siARN 10nM 48h, siARN 10nM 72h afin de comparer l'évolution de l'inhibition de la FBL sur le temps ainsi que la concentration de siARN. On constate une nette inhibition de la FBL après 48h et 72h de traitement avec 1nM et 10nM dans les cellules HT-29. Néanmoins pas d'inhibition après 24h de traitement et cela pour 1nM et 10nM. De plus, nous n'avons pas retrouvé cette tendance dans les cellules HCT-116, en effet, elles ont présenté une expression de la FBL très variable, qui ne correspond pas à la durée du traitement ainsi qu'à sa concentration (1nM et 10nM), et cette variation a été retrouvée aussi dans les conditions contrôles NT, siCTRL 1nM 48h et siCTRL 10nM 48h. Concernant le résultat obtenu avec les cellules HT-29, les résultats n'ont pas été reproductibles dans les expériences qui ont suivies.

IV.1.2.2 • shRNA-FBL

La technique d'inhibition par siARN n'ayant pas été stable et reproductible, nous avons utilisé la technique sh-ARN ciblant la FBL dans nos lignées CCR HT-29 et HCT-116. Pour cela, les cellules ont été générées au sein de notre laboratoire. Afin d'obtenir la meilleure inhibition de la FBL dans les cellules shARN-FBL, nous avons testé la combinaison de deux temps 72h et 96h de traitement, et de deux concentrations 0.5µg/ml et 1µg/ml de Doxycycline induisant l'expression du shARN. Après analyse des résultats obtenus, nous avons choisi de traiter les cellules à la Dox à une concentration de 0.5µg/ml durant 96h. Les résultats de cette inhibition sont illustrés dans la figure 2. Les western blot montrent une nette inhibition de la FBL dans les deux shARN-FBL générés dans les deux lignées cellulaires, et cela en comparant aux différents contrôles utilisés, tout d'abord les cellules shARN-FBL non traitées à la Dox, ensuite, dans les cellules sauvages traitées et non traitées à la Dox et enfin dans les cellules sh-ARN-NS +/- Dox. Dans tous ces contrôles on voit que l'expression de la FBL est maintenue et ces résultats ont été reproduits plus de trois fois.

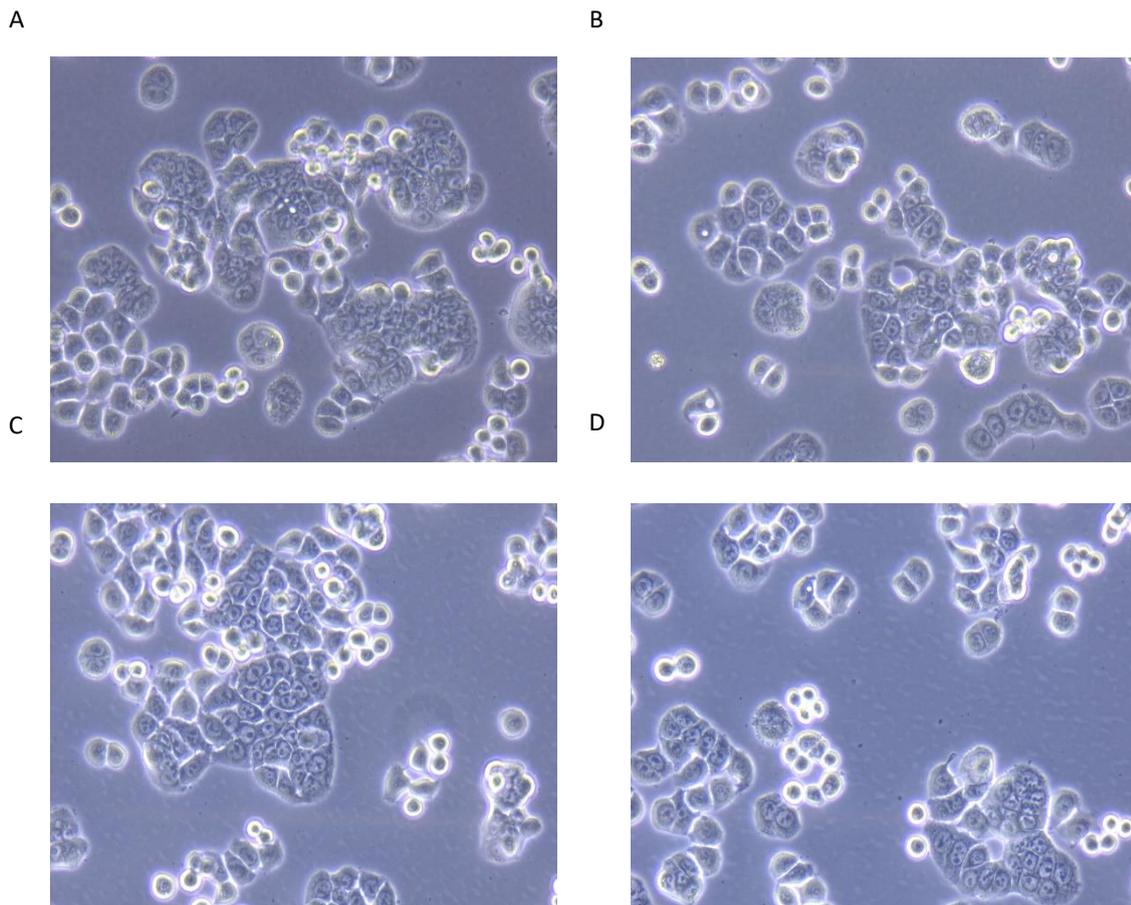


Figure 21 : Images des cellules HT-29 prises au microscope, grossissement X10, 24 heures après ensemencement. A) HT-29 type sauvage. B) HT-29 sh NS. C) HT-29 sh FBL1. D) HT-29 sh FBL2.

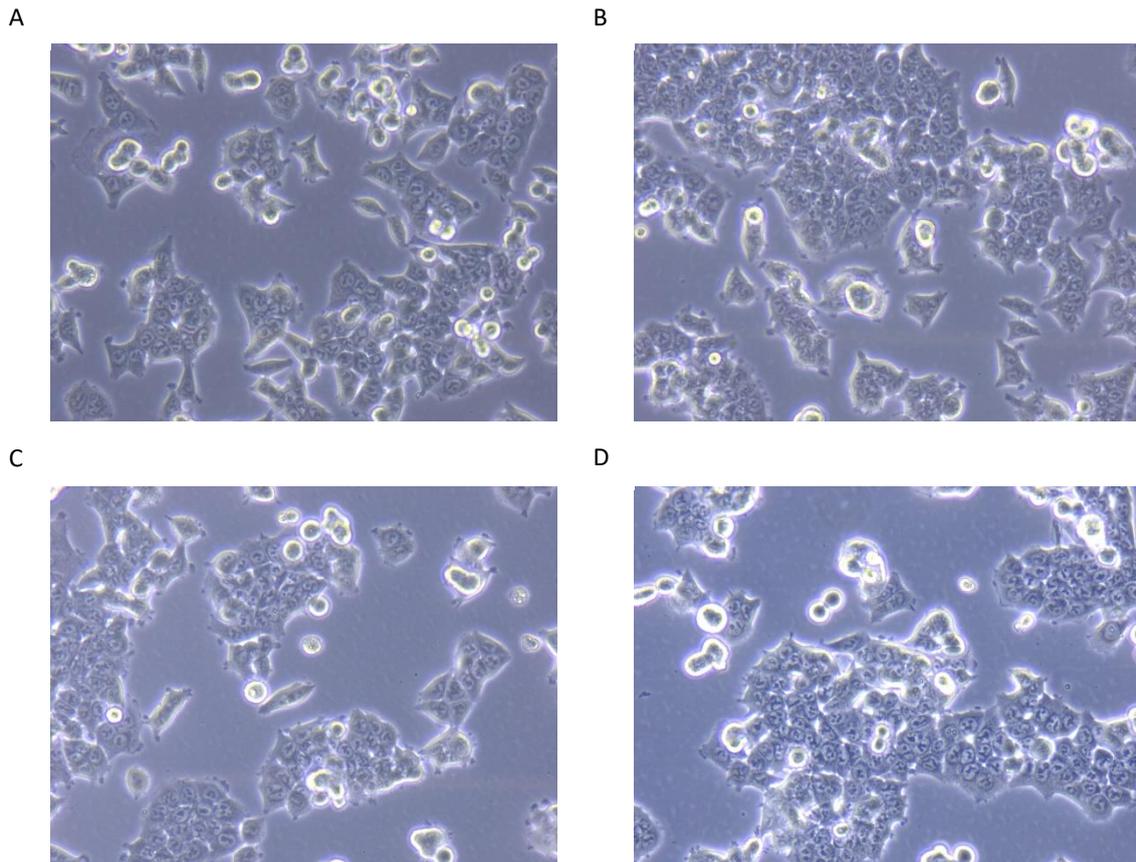


Figure 22 : Images des cellules HCT-116 prises au microscope, grossissement X10, 24 heures après ensemencement. A) HCT-116 type sauvage. B) HCT-116 sh NS. C) HCT-116 sh FBL1. D) HCT-116 sh FBL2.

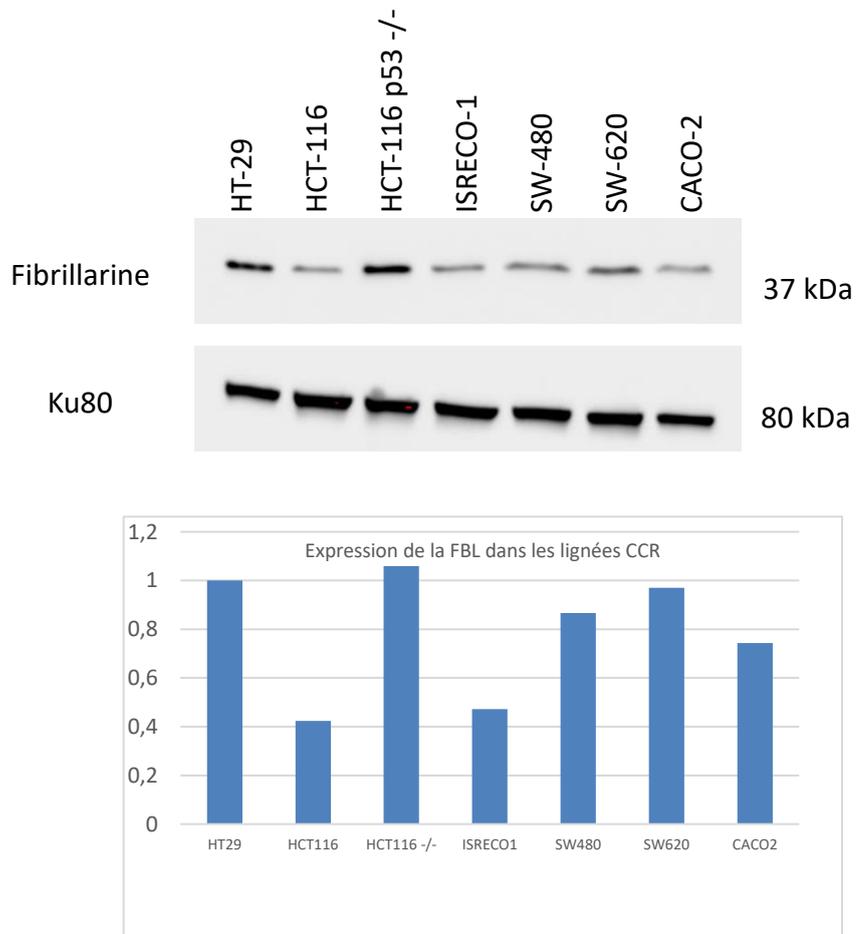


Figure 23 : Expression de la Fibrillarine dans les cellules de cancer colorectal. L'expression protéique de la FBL a été mesurée dans un panel de cellules de cancer colorectal par western blot, puis quantifiée par analyse d'image. Image d'un western blot représentatif du signal FBL (n=3).

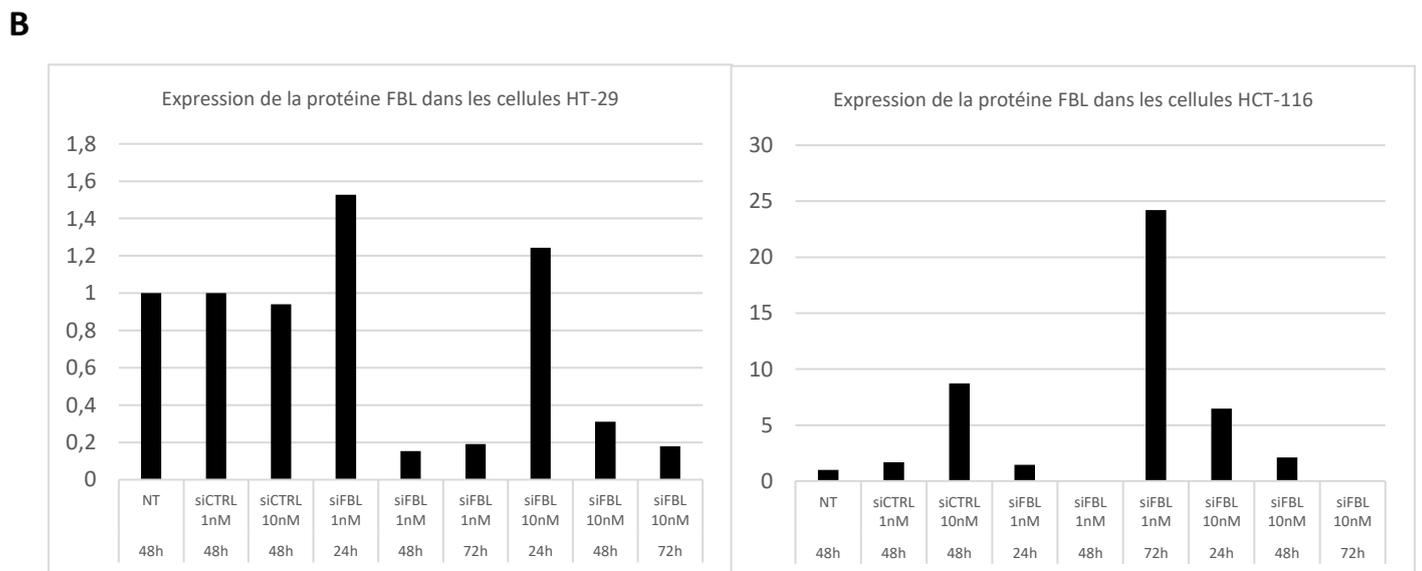
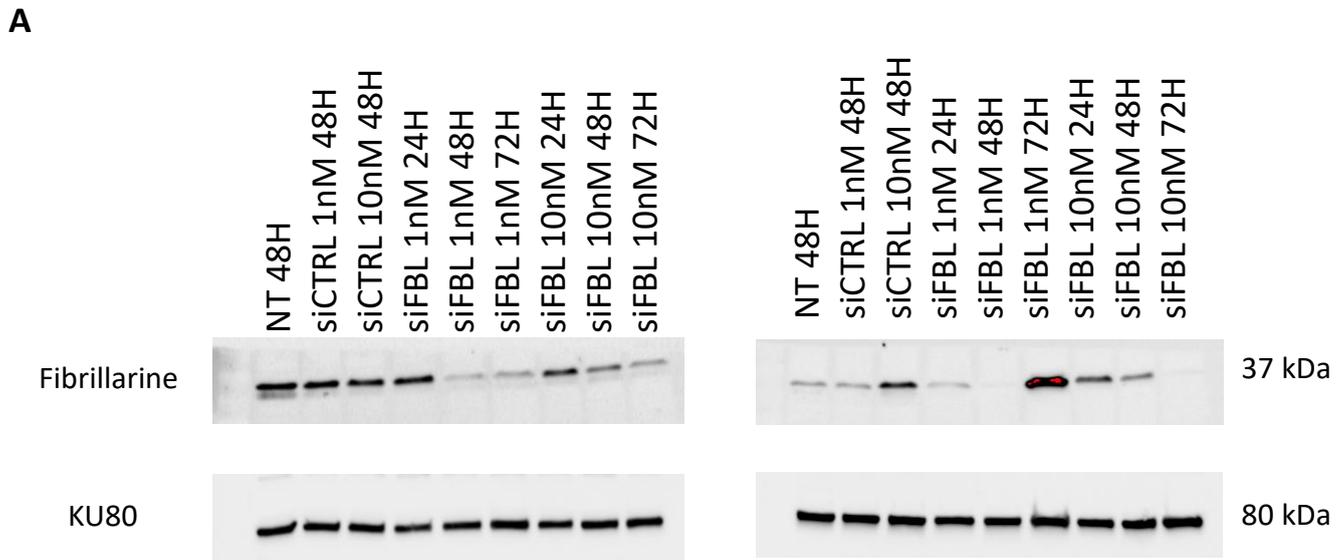


Figure 24 : Résultats de l'inhibition de la FBL par siARN quantification western blot. L'INTERFERin® Polyplus a été utilisé comme agent de transfection à 6 et 10µl et 1 et 10nM de siARN FBL et siARN control (siCTRL). L'inhibition de la Fibrillarine a été mesurée à 24h, 48h et 72h. Images représentatives de western blot obtenus pour la FBL puis quantifiées (n=3).

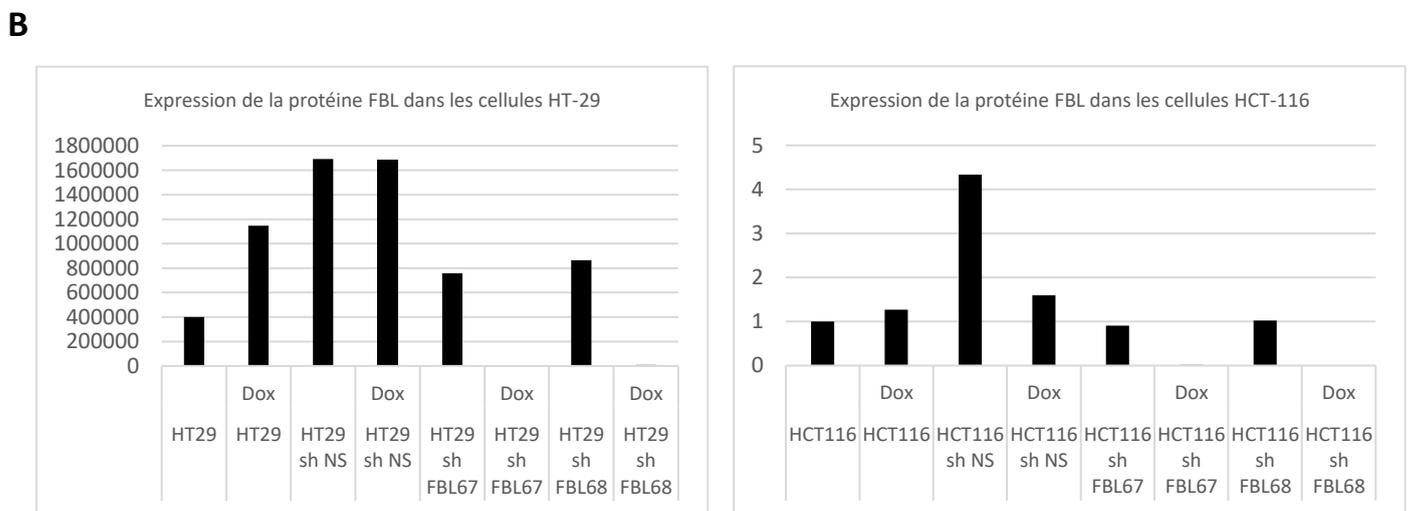
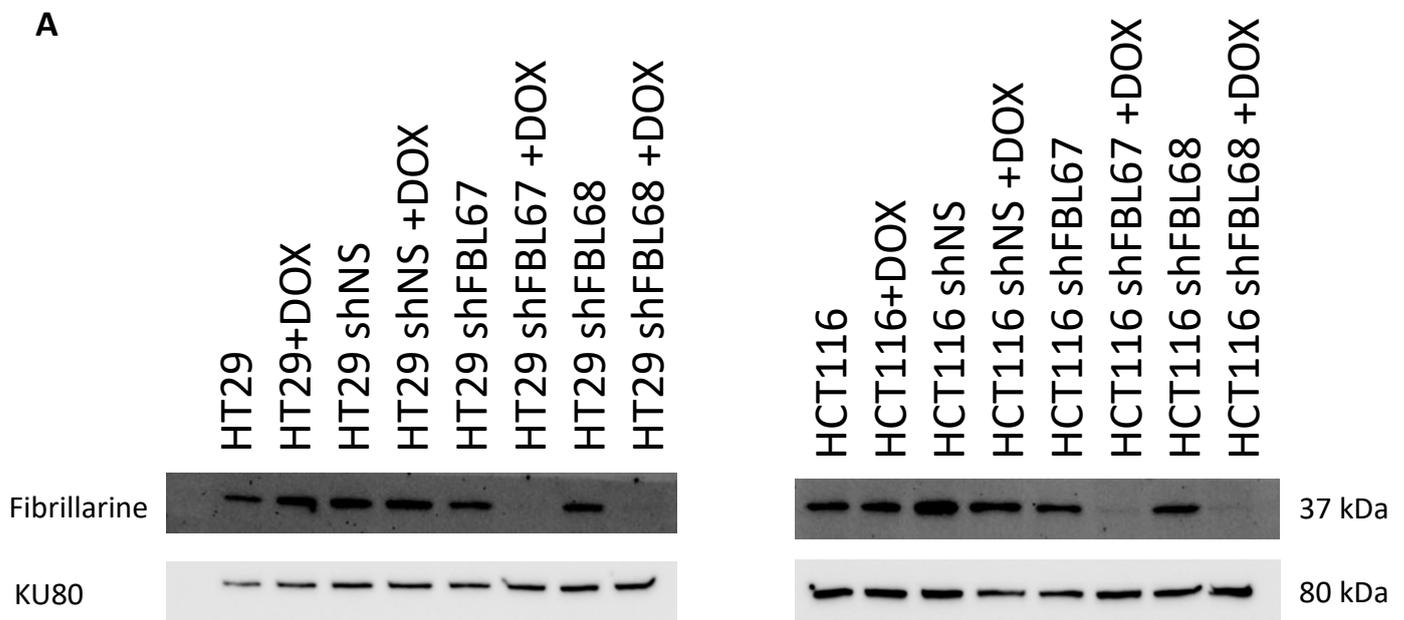


Figure 25 : caractérisation du modèle cellulaire d'inhibition de la FBL par shARN dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116, résultat et quantification western blot après traitement avec la Doxycycline à 0.5µg/ml durant 96 heures. Images représentatives de western blot obtenues pour la FBL puis quantifiées (n=3).

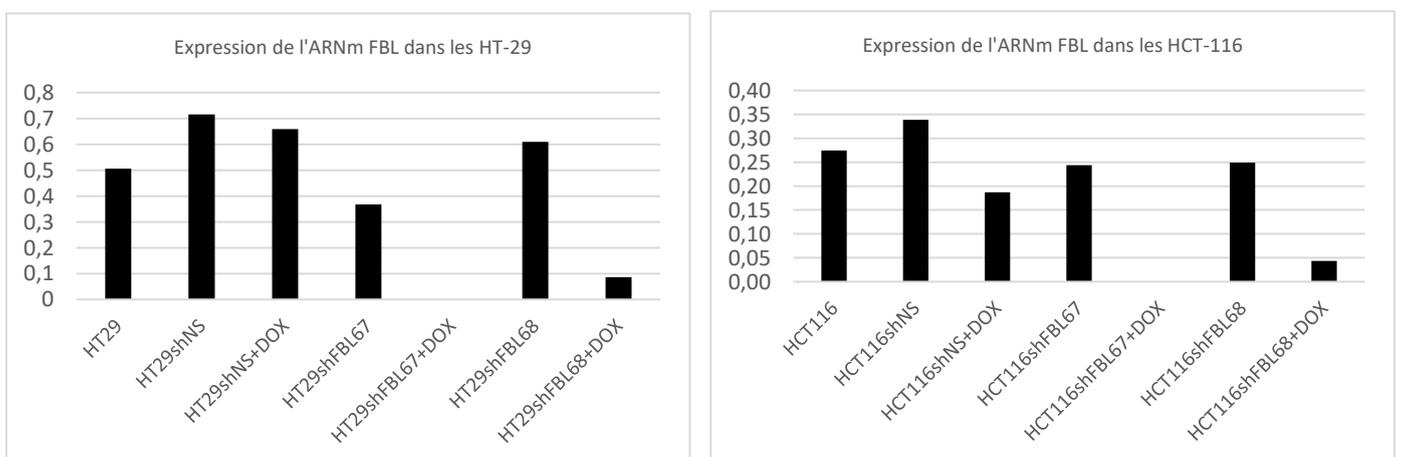


Figure 26 : caractérisation du modèle cellulaire d'inhibition de la FBL par shARN, résultat et quantification RTqPCR dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116 après traitement avec la Doxycycline à 0.5µg/ml durant 96 heures

L'expression de la FBL suite au traitement à la Dox dans les cellules shARN-FBL a notamment été mesuré au niveau ARN et les résultats sont illustrés dans la figure 25. Les cellules HT-29 et HCT-116 ont été traités à la Dox à une concentration de 0.5µg/ml durant 96h, suite à cela une RTqPCR a été effectuée sur les différentes populations cellulaires dans les différentes conditions. On constate une nette inhibition de l'expression de la FBL dans les cellules shARN-FBL traitées à la Dox (HT-29 shFBL67, HT-29 shFBL68, HCT-116 shFBL67 et HCT-116 shFBL68). D'autre part, on constate également que l'expression de la FBL au niveau ARN est maintenue dans les différents contrôles utilisés dans nos expériences (HT-29 +/- Dox, HT-29 shNS +/- Dox, HCT-116 +/- Dox, HCT-116 shNS +/- Dox).

IV.1.3 Etude de la croissance cellulaire en 2D

IV.1.3.1 Le test MTS : viabilité cellulaire

Nous avons réalisé des expériences de mesure de la viabilité cellulaire par le test MTS entre les différentes populations de notre modèle d'étude cellulaire. La mesure de l'absorbance à 490nm a été effectuée après 3 heures d'incubation avec le réactif « CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay » Proméga®. Ces expériences ont été répétées plus de trois fois pour chacune des lignées HT-29 et HCT-116, puis une moyenne de trois expériences a été faite et les résultats de ces expériences sont représentés dans la figure 27. Pour cela, nous avons effectué un test MTS à 24h, 48h, 72h, 96 et 120h, suite à un traitement à la dox à 0.5 µg/ml durant 96h. Chaque temps a été réalisé sur une plaque 96 puits, et chaque condition est une moyenne de 9 puits. On constate tout d'abord qu'il y a une augmentation de l'absorbance à 490 nm au cours des différents temps de l'expérience et dans les deux lignées, ce qui reflète une augmentation de l'activité cellulaire proportionnelle au nombre de cellules vivantes. On constate notamment qu'il n'y a pas de différence dans les valeurs d'absorbance au temps 24h, dans les différentes conditions de l'expérience, dans les deux lignées cellulaires. Aux temps 48h, 72h et 96h on détecte une différence dans la valeur d'absorbance entre les cellules shARN-FBL traitées à la dox et les différentes conditions contrôles wt, shARN-NS +/- dox et shARN-FBL non traitées, dans les deux lignées. Au temps 120h, on constate que globalement les différentes conditions de l'expérience présentent un même niveau d'absorbance et on remarque aussi un plateau comparé au temps 96h. On constate donc que l'inhibition de la FBL a un impact en diminuant la viabilité des cellules CCR HT-29 et HCT-116.

IV.1.3.2 Etude de la croissance cellulaire des cellules CCR par xCELLigence

Nous avons mesuré la croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 afin d'évaluer l'effet d'inhibition de la FBL sur la croissance cellulaire, ainsi que l'effet de la molécule 5-FU à 10 et 50 µM et la combinaison des deux. Les expériences ont été reproduites plus de trois fois pour chaque lignée cellulaire. Les résultats de ces expériences sont représentés dans la figure 28. Le suivi de la croissance cellulaire a été réalisé sur environ 5 jours (90 heures). Les cellules sont tout d'abord traitées à la Dox à 0.5µl/ml durant 96h, puisensemencées à 10.000 cellules/puits/200µl dans les plaques E-plate et chaque condition de l'expérience est la moyenne de quatre répliquas biologiques. Dans la première partie de la figure 28, on distingue plusieurs courbes représentant différentes conditions de l'expérience. On constate tout d'abord que toutes les courbes progressent de la même manière du début de l'expérience

jusqu'à 24h. La courbe en rouge représente les cellules HT-29 shFBL68, on constate que cette courbe présente l'index cellulaire le plus élevé maintenu du début jusqu'à la fin de l'expérience, qui atteint à la fin de l'expérience la valeur de 3.5. La courbe en vert représente les cellules HT-29 shFBL68 traitées à la Dox. On constate que cette courbe s'écarte progressivement de la courbe rouge et diminue à partir de 24h, et l'écart entre les deux courbes se creuse pour se rejoindre à 80 heures. La courbe bleu foncé elle représente les cellules HT-29 shFBL68 traitées à 10 μ M de 5-FU. On constate que la courbe des cellules HT-29 shFBL68 traitées à 10 μ M de 5-FU suit la courbe rouge HT-29 shFBL68 de 0 à 42 heures pour décliner et maintenir un index cellulaire constant d'environ 1.5. La courbe rose représente les cellules HT-29 shFBL68 traitées à 50 μ M de 5-FU. On constate que cette courbe progresse jusqu'à 24 heures de l'expérience et se détache des autres courbes et maintient un index cellulaire constant de 1 de 24h à 50h, pour décliner progressivement jusqu'à la fin de l'expérience à un index cellulaire de 0.5. Les courbes bleu ciel et violet représentent respectivement les cellules HT-29 shFBL68 DOX + 5-FU 10 μ M et HT-29 shFBL68 DOX + 5-FU 50 μ M. Ces courbes se comportent de manière très similaire à la courbe rose représentant les cellules HT-29 shFBL68 + 5-FU 50 μ M. Et de manière similaire la deuxième partie de la figure représente les courbes des cellules HCT-116 avec un effet encore plus marqué et plus net comparé aux résultats obtenus avec les cellules HT-29. En effet, on constate tout d'abord que l'inhibition de la FBL réduit et ralentit la croissance des cellules comparé aux cellules non traitées à la Dox induisant l'expression du shARN ciblant la FBL. Dans un second temps, on remarque l'effet du traitement 5-FU sur la croissance cellulaire des cellules CCR, en effet le 5-FU à 10 μ M diminue nettement la croissance des cellules CCR comparé aux cellules non traitées au 5-FU, et à 50 μ M cet effet est encore plus apprécié. On constate notamment que la combinaison de l'inhibition de la FBL avec le traitement 5-FU à 10 μ M a un effet égal à celui du traitement au 5-FU à 50 μ M seul.

IV.1.4 Etude de la migration cellulaire des cellules CCR par xCELLigence

Nous avons évalué l'effet de l'inhibition de la FBL dans la migration cellulaire de cellules CCR HT-29 et HCT-116 grâce aux plaques CIM-plate de l'xCELLigence. Ces plaques sont composées d'une chambre supérieure et d'une chambre inférieure. La surface inférieure de la chambre supérieure est composée d'une membrane microporeuse à travers laquelle les cellules peuvent migrer. Des électrodes en or sur la face inférieure de cette membrane détectent la présence de cellules adhérentes. Afin d'inhiber l'expression de la FBL, les cellules ont été traitées à la Dox à 0.5 μ g/ml durant 96h, puisensemencées dans les plaques CIM-plate à 50 000 cellules par puits dans un volume de 200 μ l, en présence ou non de la molécule de 5-FU à 10 ou 50 μ M. Ces expériences ont été reproduites au moins trois fois et un résultat représentatif est illustré dans la figure 29. Dans un premier temps, toutes les courbes représentant les différentes conditions de l'expérience ne présentent aucune augmentation du signal de 0 à 40 heures de l'expérience, avec un index cellulaire de 0. Après ce temps, on observe une différence de profil entre les différentes courbes. Tout d'abord, la courbe rouge représente les cellules HT-29 shFBL68 non traitées à la Dox, montre une augmentation exponentielle à partir de 50 heures de l'expérience, pour atteindre l'index cellulaire de 3, le plus élevé comparé aux autres conditions et atteindre son pic à 72h de l'expérience, puis décliner, se stabiliser entre 90h et 140h et enfin décliner jusqu'à la fin de l'expérience. La courbe verte représente les cellules HT-29 shFBL68 traitées à la Dox. On constate que cette courbe augmente de manière

tardive comparativement à la courbe des cellules non traitées à la Dox (courbe rouge) et cela à partir de 60h d'expérience. Cette augmentation est exponentielle, elle atteint un index cellulaire maximum de 2.2 au bout de 80h d'expérience, se stabilise de 80h à 140h sur un plateau à un index cellulaire de 2 et enfin décline à partir de 140h jusqu'à la fin de l'expérience. La courbe en bleu foncé représente les cellules HT-29 shFBL68 traitées à 10 μ M de 5-FU. On constate que cette courbe ne présente aucune augmentation majeure du signal, hormis une légère à 60h pour atteindre un index cellulaire de 0.5, puis revenir à zéro. On constate globalement le même résultat dans les cellules CCR HCT-116, avec une différence plus marquée entre les cellules HCT-116 shFBL et les cellules HCT-116 shFBL traitées à la Dox, et un effet impactant du 5-FU sur la migration cellulaire qui reste globalement le même que celui décrits dans les cellules HT-29.

IV.1.5 Etude de l'invasion cellulaire des cellules CCR par xCELLigence

Pour étudier l'invasion cellulaire dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116, nous avons utilisé le même dispositif que pour la migration cellulaire précédemment décrits, avec le Matrigel à 5% du volume final du milieu de culture. On utilise des plaques CIM-plate dans lesquelles les cellules sont déposées à un nombre de 100 000 cellules par puits et dans un volume de 200 μ l et les cellules sont préalablement traitées ou non à la Dox (+/- Dox). Les résultats de ces expériences sont résumés dans la figure 30. Dans la première partie de la figure, on distingue deux courbes représentant respectivement les cellules HCT-116 shFBL68 en rouge et HCT-116 shFBL68 traitées à la Dox en vert. On constate que la courbe rouge montre une augmentation après 40h d'expérience, avec un effet exponentiel qui atteint un pic avec un index cellulaire de 2.5 après 90h d'expérience, puis se stabilise en formant un plateau de 90h à 110h de l'expérience pour décliner lentement jusqu'à la fin de l'expérience. On constate une différence marquée entre les cellules HCT-116 shFBL et les cellules HCT-116 shFBL traitées à la Dox, et cela en comparant les courbes du graphique. En effet, on distingue une différence nette d'invasion cellulaire avec la courbe rouge qui atteint un index cellulaire de 2.5 alors que la courbe verte atteint un maximum de 1.5, en plus d'un décalage d'augmentation des courbes qu'on voit à 40h de l'expérience pour la courbe rouge, et plus tardivement à 50h pour la courbe verte.

Le deuxième graphique de la figure 29 représente les cellules HCT-116 shFBL +/- Dox en présence ou non de la molécule 5-FU à 10 μ M. On constate tout d'abord que la molécule 5-FU seule sur les cellules HCT-116 shFBL n'a pas un effet marquant sur l'invasion cellulaire (courbe bleue), en comparant avec l'effet de l'inhibition de la FBL (courbe verte). D'autre part, on constate que la combinaison de l'inhibition de la FBL au traitement 5-FU représenté par la courbe rose, a un effet marquant sur l'invasion cellulaire comparé à toutes les autres conditions de l'expérience, HCT-116 shFBL seules +/- Dox ou bien les cellules HCT-116 + 5-FU. En effet l'index cellulaire ne dépasse pas 0.5 tout au long de l'expérience.

IV.1.6 Etude de la croissance cellulaire en 3D : formation de sphéroïdes

Nous avons étudié la croissance des cellules CCR en trois dimensions, et pour cela nous avons choisi de travailler avec le modèle de formation de sphéroïdes afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de la FBL. La culture cellulaire en 3 dimensions permet d'imiter le micro-environnement des tissus, et cela nous permet de nous rapprocher des conditions *in vivo*. Pour cela, les cellules ont tout d'abord été traitées à la Dox afin d'induire l'expression du shARN. Après 96h de traitement à 0.5µg/ml de Dox, les cellules sontensemencées à 2500 cellules par puits dans un volume de 200µl dans des plaques ULA (Ultra Low Adhesion) à fonds ronds. Chaque condition de l'expérience avait 12 répliquas biologiques et les expériences ont été répétées 3 fois. Le suivi de la formation des sphéroïdes s'est fait durant 7 jours avec une prise de photographies au microscope au grossissement X4. La figure 31 représente les résultats de formation de sphéroïdes dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116 +/- Dox. La première partie de la figure 31 représente les sphéroïdes formés dans les cellules HT-29 shFBL au jour 1, jour 4 et au jour 7. On constate une augmentation de la taille des sphéroïdes au long de l'expérience, qui double au jour 7 comparé au jour 1, on peut notamment constater que la délimitation du sphéroïde devient de plus en plus régulière tout au long de l'expérience, pour former au jour 7 un cercle presque parfait. Les cellules HT-29 shFBL traitées à la Dox montrent la même évolution comparée au cellules non traitées. En effet, on constate une augmentation de la taille des sphéroïdes au long de l'expérience, néanmoins, on ne voit pas de différence de diamètre des sphéroïdes entre les cellules traitées et les cellules non traitées à la Dox.

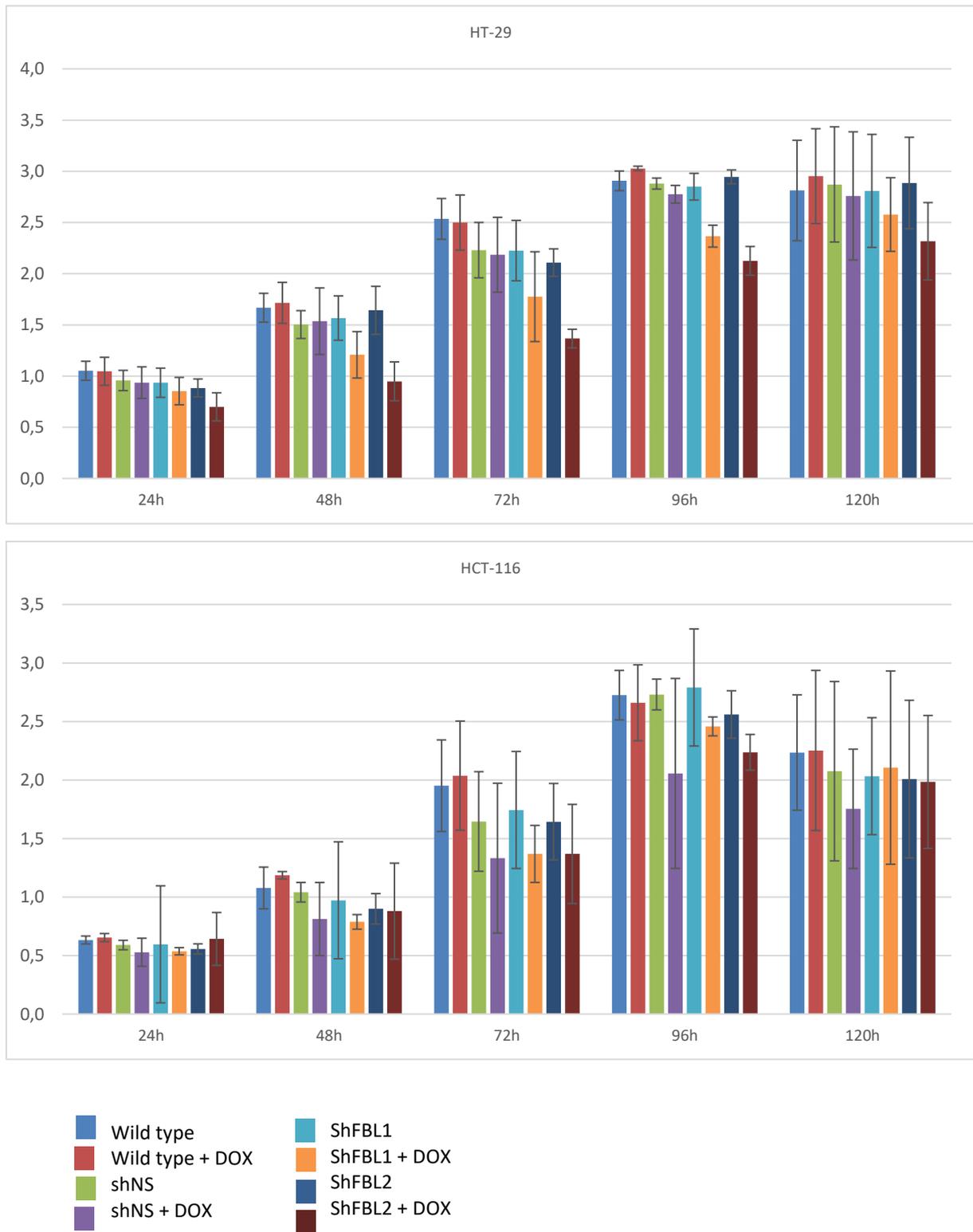


Figure 27 : Histogrammes représentant une moyenne de trois expériences indépendantes du test MTS sur les cellules CCR HT-29 et HCT-116 à 24h, 48h, 72h, 96h et 120h après ensemencement. Temps d'incubation du réactif CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Proméga® 3 heures.

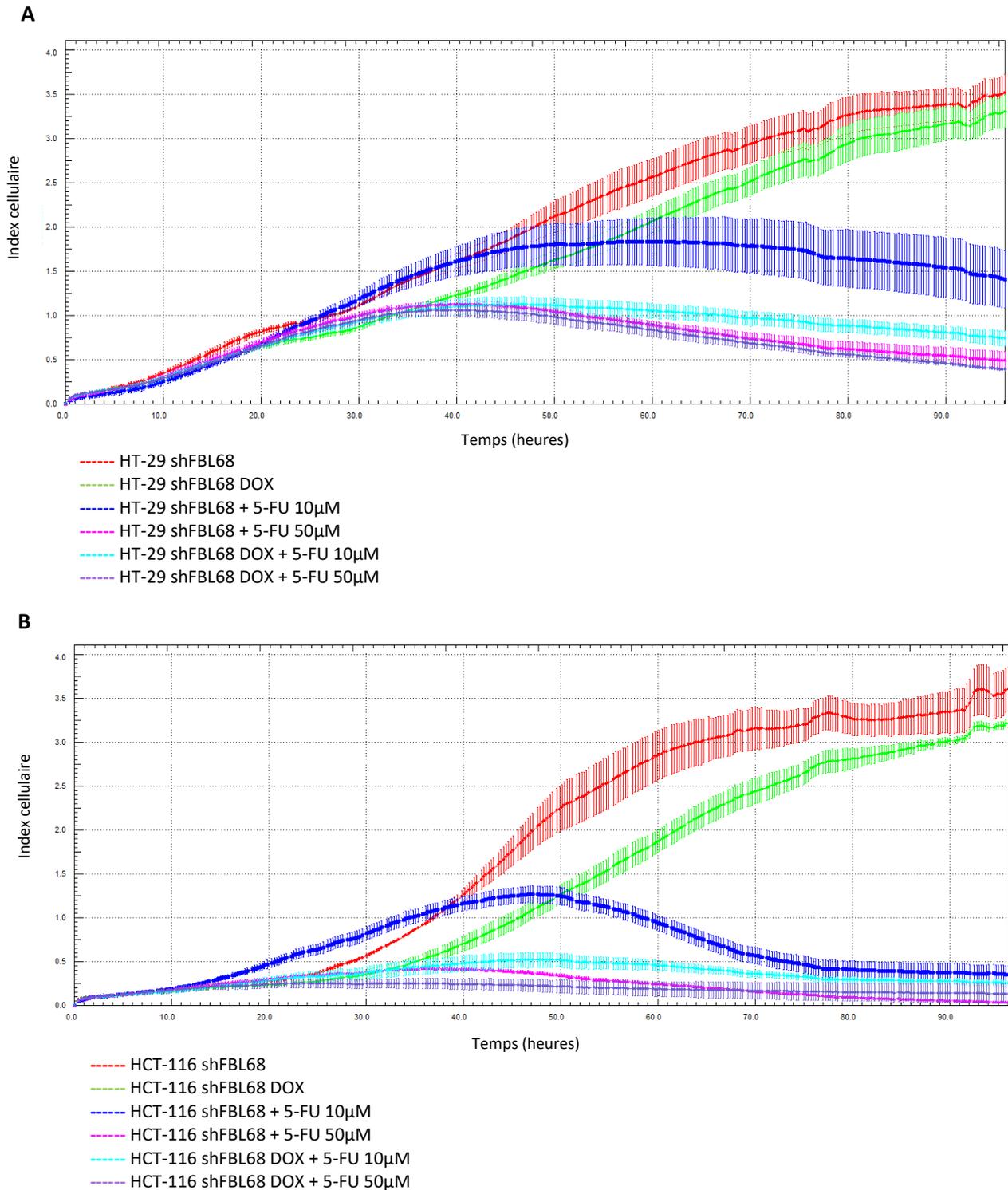


Figure 28 : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 en temps réel mesurée par xCELLigence durant environ 96h. Les cellules CCR HT-29 et HCT-116 ont préalablement été traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96 heures. Les cellules ont étéensemencées à 10.000 cellules par puits, dans un volume de 200µl +/- 10 et 50µM de 5-FU. Graphes représentatifs des signaux obtenus par xCELLigence (n=3).

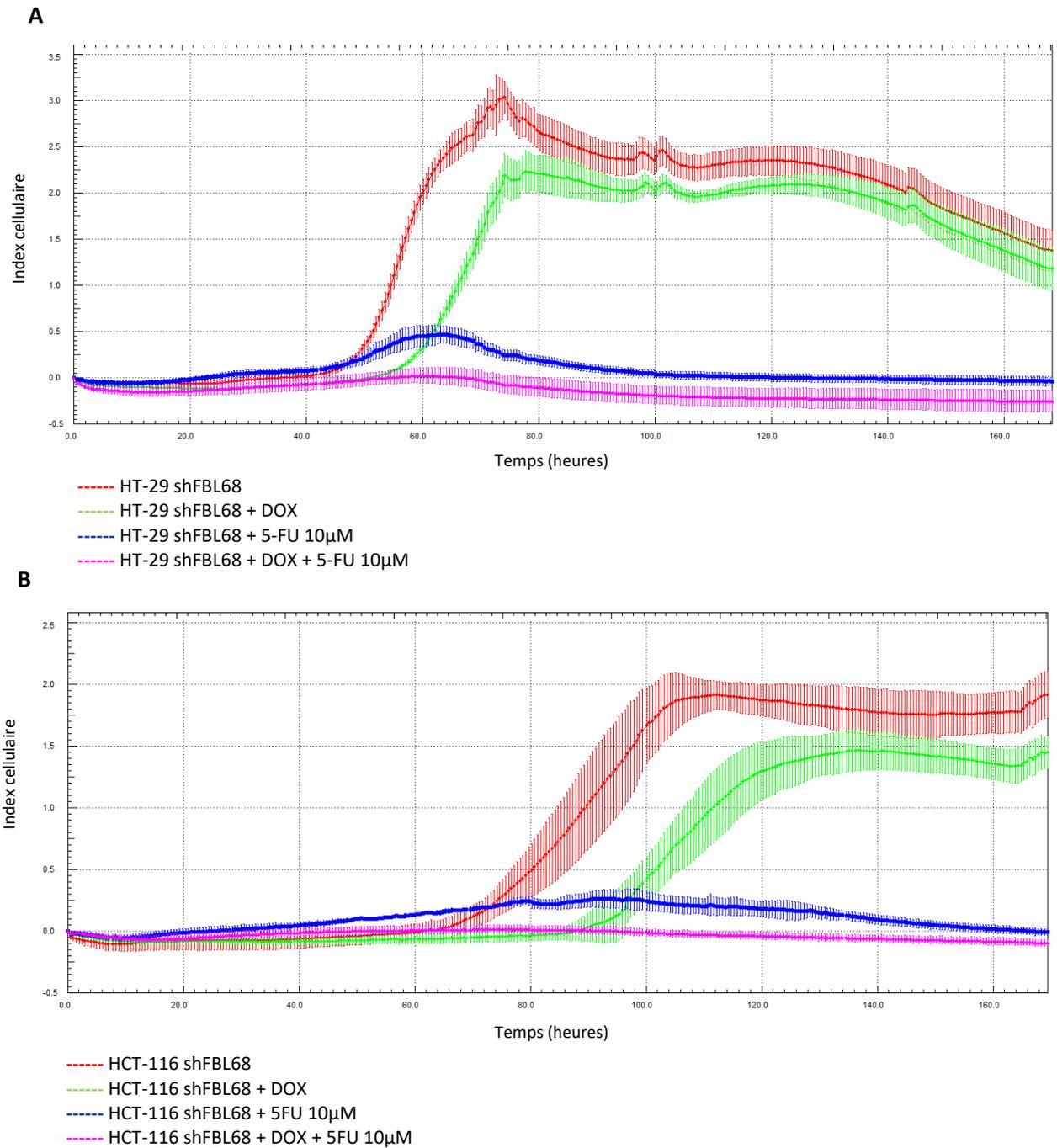


Figure 29 : Courbes de migration cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 en temps réel mesurée par xCELLigence. Les cellules CCR HT-29 et HCT-116 ont préalablement été traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96 heures. Les cellules ont étéensemencées à 50.000 cellules par puits de plaque CIM-Plate, dans un volume de 200µl +/- 10 et 50 µM de 5-FU. Graphes représentatifs des signaux obtenus par xCELLigence (n=3).

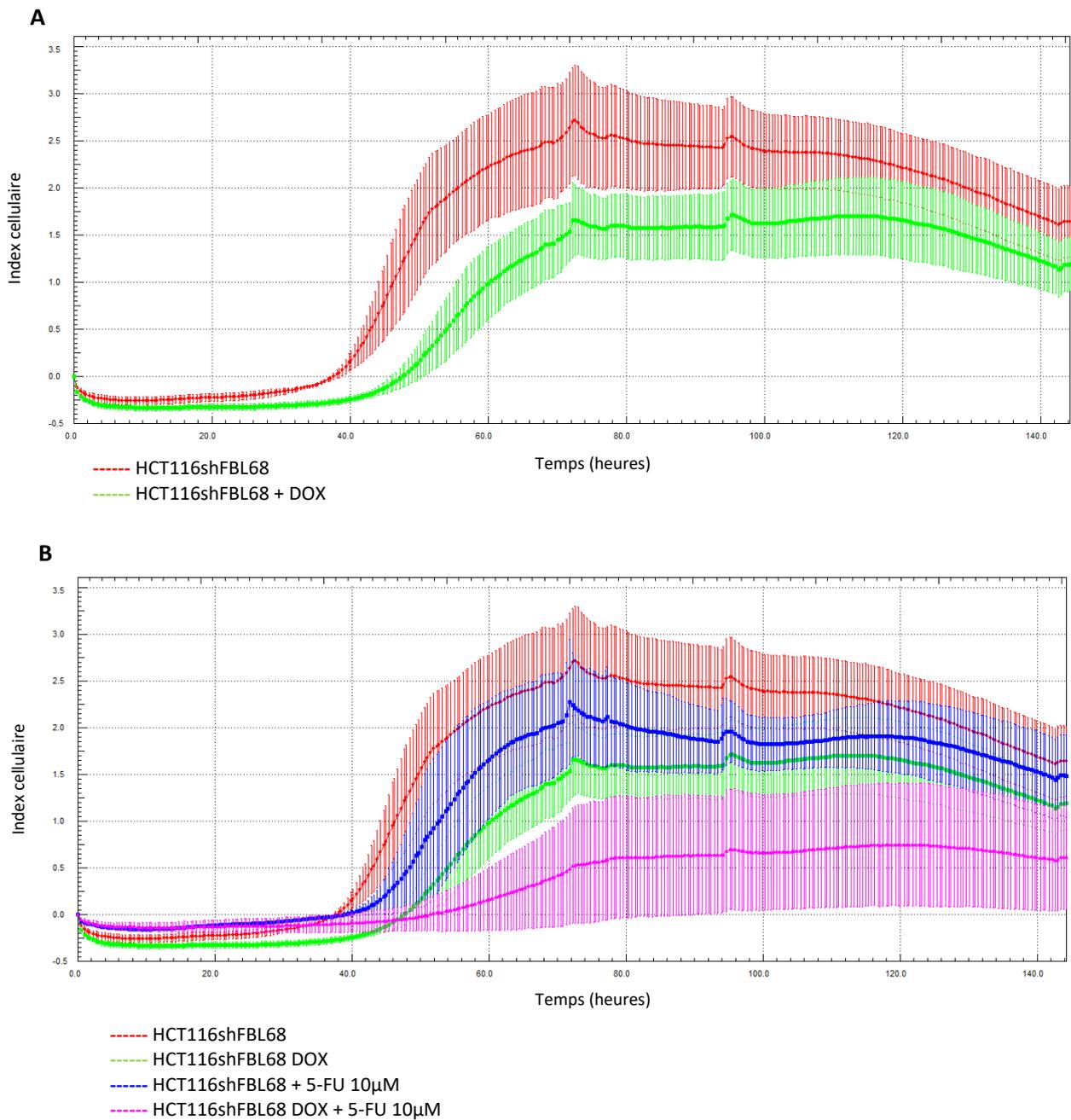


Figure 30 : Courbes d'invasion cellulaire des cellules CCR HCT-116 en temps réel mesurée par xCELLigence. Les cellules CCR HT-29 et HCT-116 ont préalablement été traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96 heures. Les cellules ont étéensemencées à 50.000 cellules par puits de plaque CIM-Plate, dans un volume de 200µl +/- 10 et 50 µM de 5-FU. Graphes représentatifs des signaux obtenus par xCELLigence (n=3).

Les cellules HCT-116 non traitées à la Dox, montrent aussi une augmentation de la taille des sphéroïdes au long de l'expérience, du jour 1 au jour 7. De même que les cellules HT-29, on constate notamment que le contour formant le sphéroïde dans les cellules HCT-116 +/- Dox est très irrégulier au jour 1. Et ce contour devient de plus en plus régulier au jour 4 et 7 de l'expérience. Au jour 7, en comparant le sphéroïde des cellules HCT-116 shFBL + dox au sphéroïde HCT-116 shFBL non traitées, on constate une différence dans le volume, en effet les cellules traitées à la Dox montrent un volume de sphéroïde plus petit.

IV.1.7 Comptage cellulaire des cellules CCR

Nous avons réalisé le comptage cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 afin d'évaluer le nombre de cellules totales, vivantes et mortes dans les différentes conditions de nos expériences, et cela à 24h, 48h, 72 et 96h post traitement à la Dox. Les cellules ont donc été traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96h, ou non traitées pour les conditions contrôles, puis ensemencées afin d'effectuer un comptage cellulaire au bleu de Trypan aux différents temps de l'expérience. Cette expérience a été répétée trois fois, et les résultats sont résumés dans la figure 32. Dans la figure 32, on distingue deux histogrammes, le premier représentant le comptage cellulaire de cellules vivantes et mortes dans les cellules HT-29 et le deuxième dans les cellules HCT-116. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules vivantes et cellules mortes pour chaque condition de l'expérience. Les cellules vivantes sont représentées par la partie bleu de l'histogramme et les cellules mortes par la partie orange de l'histogramme. Afin de comparer l'effet du traitement Dox et l'induction du shFBL au cours du temps sur les cellules CCR, les résultats de cette expérience ont été représentés dans le graphique dans l'ordre suivant, tout d'abord les cellules shFBL non traités puis les cellules shFBL traitées à la Dox dans un ordre de temps croissant (24h, 48h, 72h et 96h). On constate tout d'abord que le pourcentage de cellules vivantes dans toutes les conditions de l'expérience est supérieur à 90% dans les deux lignées cellulaires CCR. Par conséquent, le pourcentage de cellules mortes varie entre 10 et 1% et parfois moins.

La figure 32, comme la figure 33, représente les résultats de comptage cellules des cellules CCR HT-29 et HCT-116 exprimées en courbes du nombre de cellules vivantes ou cellules mortes selon les différents temps de l'expérience 24h, 48h, 72h et 96h post traitement à la Dox. Les deux premiers graphiques de la figure 32, représentent les courbes de cellules vivantes HT-29 (à gauche) et HTC-116 (à droite), en fonction du temps. Les courbes en bleu représentent les cellules non traitées à la Dox et les courbes en orange, les cellules traitées à la Dox. On constate que le nombre de cellules vivantes HT-29 shFBL augmente dans le temps qui passe de 1 million de cellules/ml à 24h à 2 millions /ml à la fin de l'expérience à 96h, contrairement au nombre de cellules HT-29 shFBL traitées à la Dox qui fluctue autour de 1 m/ml tout au long de l'expérience. On constate les cellules HT-29 shFBL continue leur croissance cellulaire tout au long de l'expérience, tandis que lorsque la FBL est inhibée suite au traitement Dox, cette croissance cellulaire est stagnée. On observe donc une différence nette du nombre de cellules entres les cellules traitées et non traitées à la Dox. On constate le même effet avec les cellules HCT-116, avec une croissance cellulaire plus élevée avec plus de 3.5 millions de cellules / ml à 96h. Les deux graphiques en bas de la figure 32 représentent les courbes de cellules mortes HT-29 (à gauche) et HTC-116 (à droite), en fonction du temps. Les courbes en bleu représentent

les cellules non traitées à la Dox et les courbes en orange, les cellules traitées à la Dox. Et le nombre de cellules mortes reste faible avec environs 0.1 m/ml dans les cellules HT-29 et HCT-116 +/- Dox, donc pas de différence significative de mort cellulaire entre les cellules +/- Dox. En résumé, dans cette expérience on constate que le nombre de cellules vivantes reste élevé dans les deux lignées cellulaires avec plus de 95% de viabilité (figure 32). L'inhibition de la FBL suite au traitement Dox ralentit la croissance cellulaire des cellules CCR, néanmoins le traitement à la Dox n'induit pas plus de mort cellulaire.

IV.1.8 Caractérisation des ARN ribosomiques des cellules CCR

Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de la FBL sur l'intégrité des ARN ribosomiques des cellules HT-29 et HCT-116 +/- Dox. Pour cela les cellules ont été traitées ou non à 0.5µg/ml de dox durant 96h, puis une extraction et une quantification d'ARN a été effectuée (voir détails dans RTqPCR matériel et méthode) afin de réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% TAE. 700ng d'ARN ont été déposés dans chaque puits du gel. Cette expérience a été reproduite plus de trois fois et les résultats pour les deux lignées cellulaires sont présentés dans la figure 34. La figure 34 représente les images des deux gels d'agarose qui illustre les ARNr 18S et 28S, le premier pour les cellules HT-29 et les différentes conditions détaillées dans la figure et la deuxième pour les cellules HCT-116. On constate que les bandes d'ARNr 18S et 28S dans les différentes conditions de l'expérience sont bien préservés et intactes.

IV.1.9 Mesure de la synthèse protéique totale par le test Sunset

Afin de mesurer la synthèse protéique totale dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116 shFBL +/- Dox, nous avons réalisé un test Sunset. Les cellules ont tout d'abord été traitées à la Dox durant 96h à 0.5µg/ml, puis la Dox est retirée et remplacée par un milieu neuf. 24h ou 48h post traitement à la Dox, les cellules sont traitées à 1µM de puromycine durant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines sont extraites afin d'effectuer un western blot en utilisant un anticorps anti puromycine pour détecter la synthèse protéique en cours. La figure 35 représente le résultat de cette expérience. Nous avons utilisé le marquage de la protéine Histone 3 comme contrôle interne à 15 kDa. On constate une forte expression protéique à 48h dans les cellules HT-29 et HCT-116 shFBL +/-Dox comparé à 24h, respectivement. De manière générale, on ne constate pas de différence entre les cellules +/- Dox dans les différentes conditions, hormis dans les cellules HCT-116 shFBL à 24h, où on constate une expression protéique plus élevée dans les cellules non traitées à la Dox. Pour conclure, dans cette expérience, on constate que la synthèse protéique totale est plus élevée après 48h post traitement à la Dox comparé à 24h. Néanmoins, on ne voit pas d'effet de l'inhibition de la FBL au sein de la même condition de temps.

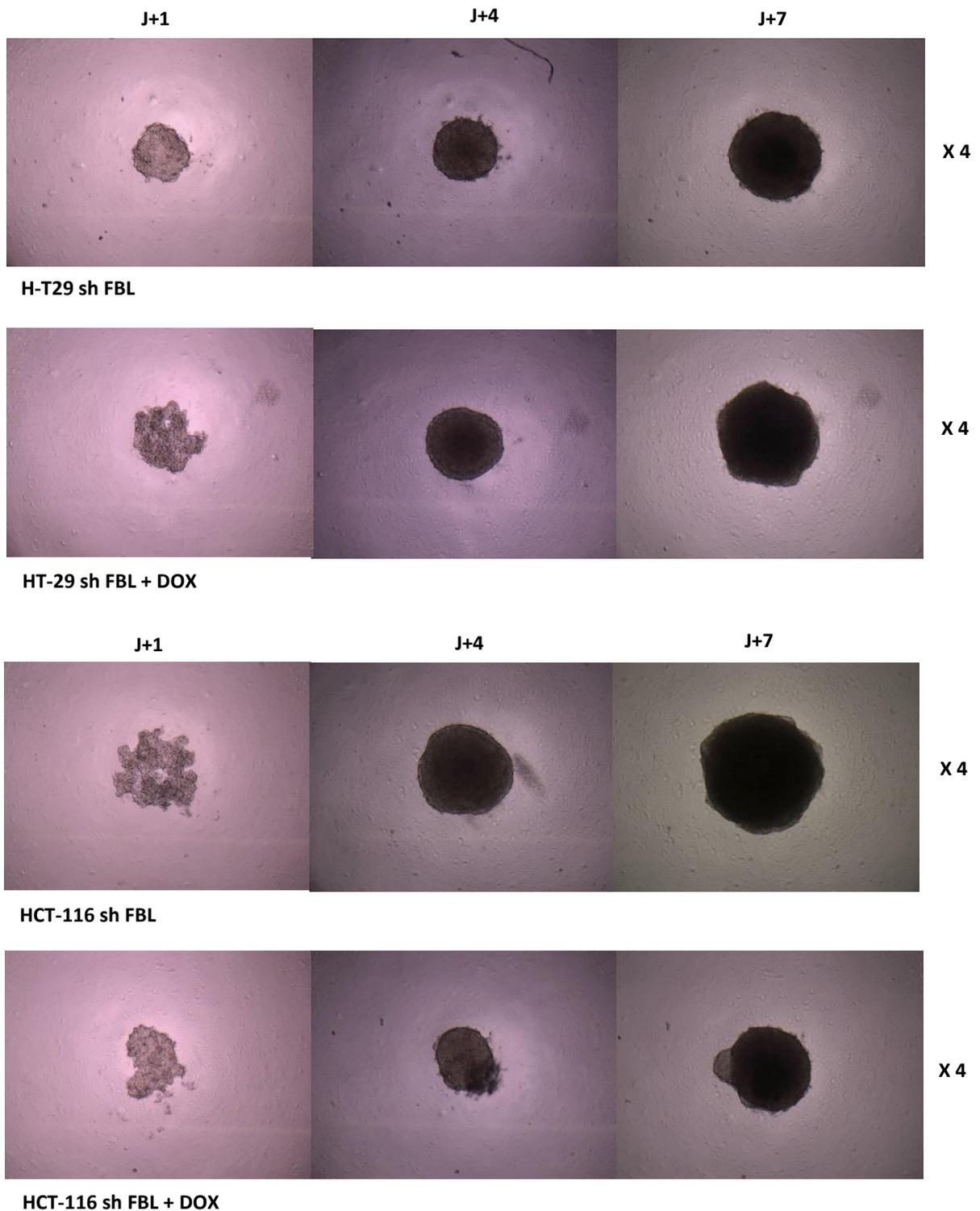
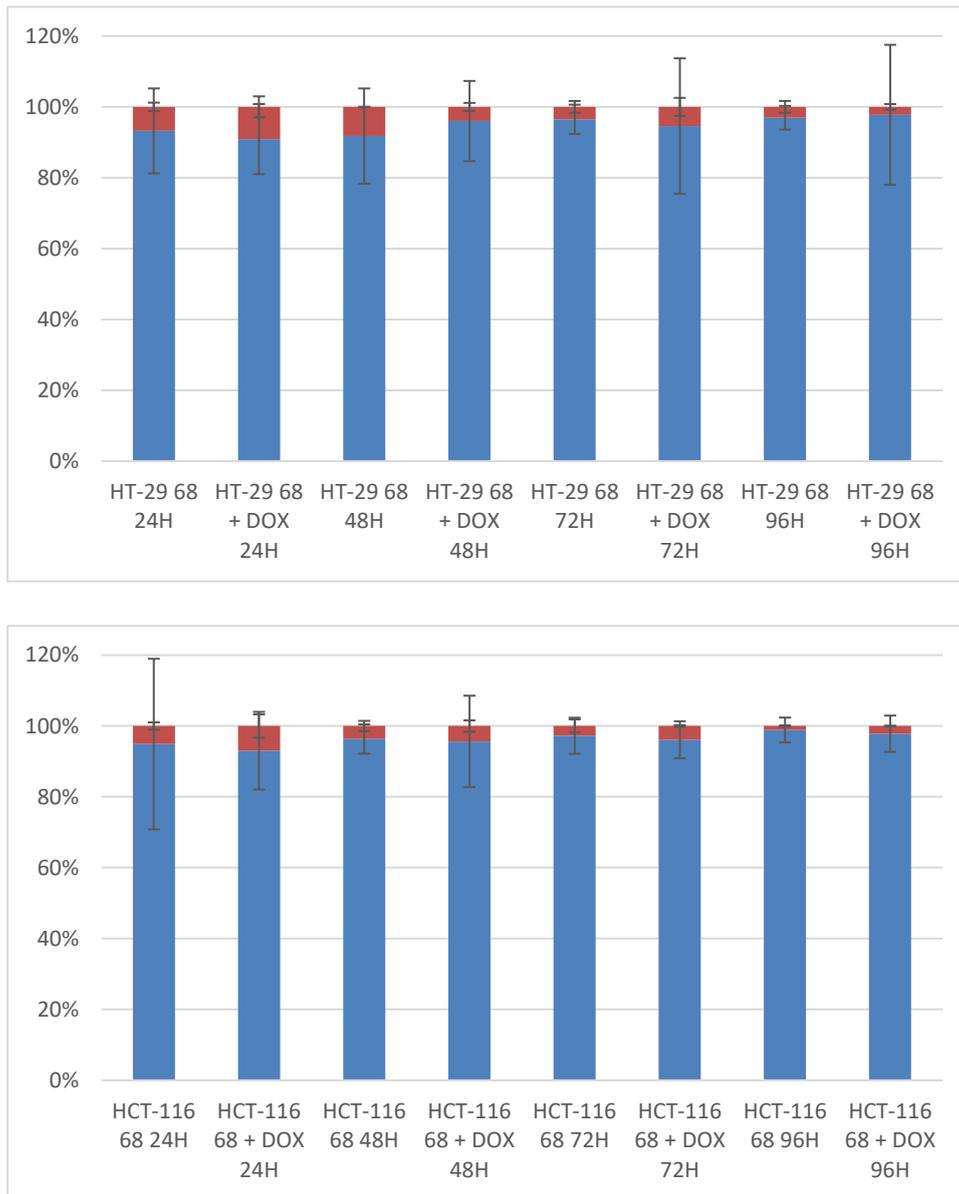


Figure 31 : Formation de sphéroïdes en culture tridimensionnelle des cellules CCR HT-29 et HCT-116. Suivi de la formation des sphéroïdes durant 7 jours. Photographies au jour 1, jour 4 et jour 7, grossissement X4 au microscope. Les cellules CCR HT-29 et HCT-116 ont préalablement été traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96 heures. Les cellules ont étéensemencées à 2500 cellules par puits de plaque ULA à fonds rond, dans un volume de 200µl, (n=3).



Cellules mortes
 Cellules vivantes

Figure 32 : Histogrammes du comptage cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 à 24h, 48h, 72h et 96h après ensemencement. Les cellules CCR HT-29 et HCT-116 ont préalablement été traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96 heures, (n=3).

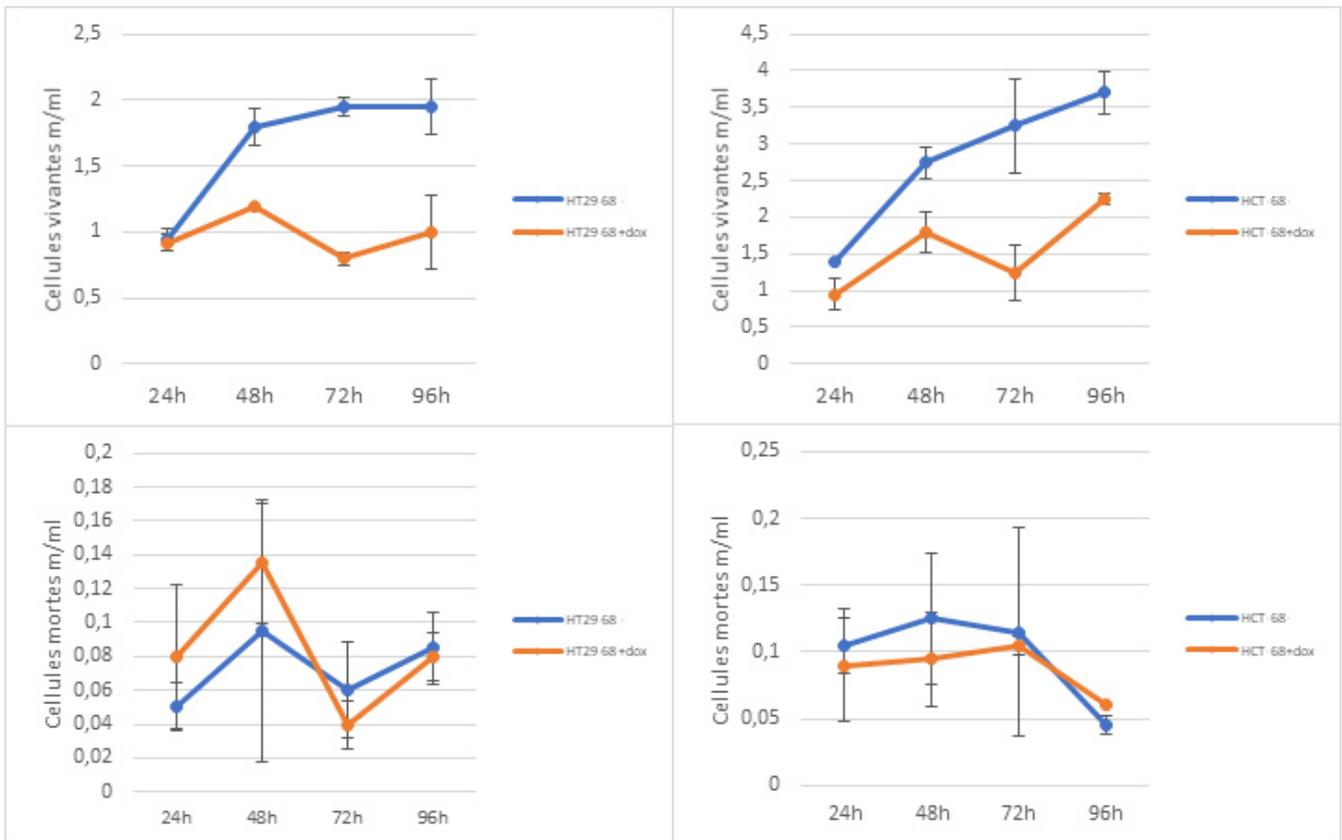


Figure 33 : Courbes du comptage cellulaire, cellules vivantes et cellules mortes, des cellules CCR HT-29 et HCT-116 à 24h, 48h, 72h et 96h après ensemencement. Les cellules CCR HT-29 et HCT-116 ont préalablement été traitées à la Dox à 0.5µg/ml durant 96 heures, (n=3).

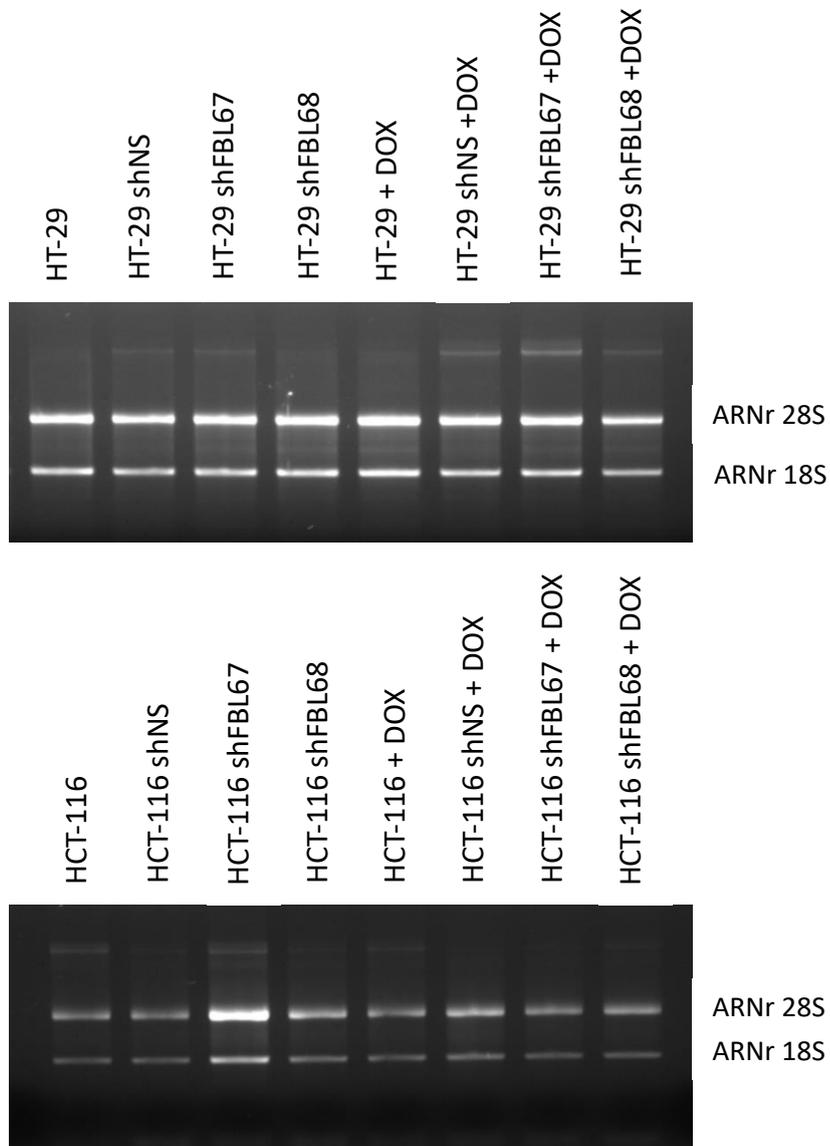


Figure 34 : Gel d'agarose de caractérisation des ARN ribosomiques des cellules CCR avec et sans traitement à la doxycycline 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durant 96h. Gel d'agarose à 1%, quantité d'ARNr 700 ng déposé dans chaque puits, (n=3).

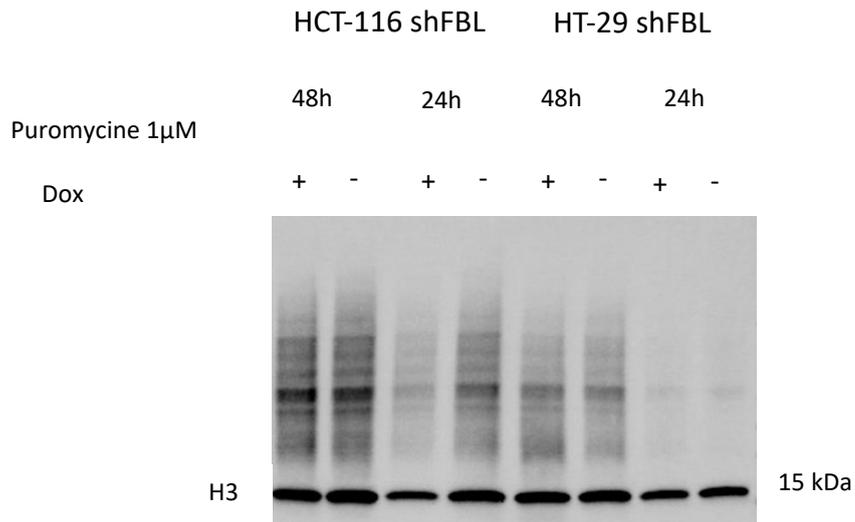


Figure 35 : Mesure de la synthèse protéique totale avec le test de puromycine dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116 shFBL traitées (+) ou non (-) à la Dox. Les cellules sont traitées à la Dox à 0.5 μ g/ml durant 96h, puis 24h ou 48 post traitement à la Dox, elles sont incubées durant 30 minutes avec 1 μ M de puromycine. Western blot de l'extraction protéique avec un anticorps anti puromycine pour détecter la synthèse protéique en cours. Détection de la protéine Histone 3 comme contrôle interne à 15 kDa, (n=2).

IV.2 Partie II 5-Fluorouracile, cancer colorectal et ribosomes

Je présente ici ma contribution à un travail de recherche initié dans notre équipe dans lequel il a été démontré que la molécule du 5-FU s'incorpore dans les ARNr de ribosomes matures de cellules cancéreuses, des xénogreffes de cancer colorectal ainsi que dans des tumeurs humaines. Les expériences menées ont montré que ces ribosomes « fluorés » étaient fonctionnels et engagés dans la traduction d'ARNm. Cette traduction s'est avérée sélective en favorisant la traduction d'ARNm contenant une longue région 5'UTR très structurée tel que l'IGF1-R qui est un facteur de survie cellulaire, impliqué dans la tumorigenèse. Dans cette partie des résultats, nous avons étudié la voie de l'IGF1-R en réponse au traitement au 5-FU, en étudiant ses effets sur la croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116, ainsi que sur l'expression de la protéine IGF1-R et de son précurseur.

IV.2.1 La voie IGF1-R en réponse au traitement par le 5-Fluorouracile : effets sur la croissance cellulaire des cellules CCR

IV.2.1.1 Plan de manipulation des cellules CCR avant expériences de croissance cellulaire

Afin d'étudier la voie de l'IGF1-R en réponse au traitement au 5-FU, nous avons étudié la croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116 répondant à une stimulation à la molécule IGF1, suite à un traitement 5-FU. Et afin de mener à bien ces expériences, les cellules ont reçu plusieurs traitements dans un ordre chronologique résumé dans la figure 36. Les cellules sont tout d'abordensemencées à 200 000 cellules par puits dans des plaques 6 puits à JO. Les cellules sont ensuite traitées au 5-FU à 10 μ M durant 48h (de J1 à J3) ou 24h (de J2 à J3). Au jour 3, on remplace le milieu de culture par un milieu neuf afin de retirer le traitement au 5-FU, et on laisse les cellules proliférer de J3 à J4. Au jour 4, les cellules sont rincées, décollées à la trypsine, comptées etensemencées dans les plaques E-plate de l'xCeLLigence à 5000 cellules par puits. Après 36 heures d'ensemencement dans les plaques xCeLLigence, de J4 à J5 et demi, on remplace le milieu de culture des cellules par un milieu sans SVF (-SVF). Cette privation de SVF a pour but de synchroniser le cycle cellulaire, elle dure 12 heures, puis les cellules reçoivent de nouveau un milieu neuf et complet contenant ou non de l'IGF1 à 5 ou 10ng/ml afin de mesurer la réponse des cellules à l'IGF1 après un traitement au 5-FU. Ces expériences ont été répétées plus de trois fois.

IV.2.1.2 Etude de la croissance cellulaire en réponse à l'IGF1

Nous avons étudié la croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 et HCT-116, en temps réel avec l'xCeLLigence. La figure 37 représente la croissance cellulaire des cellules CCR en réponse à 5 et 10ng/ml d'IGF1 après 12 heures de privation en sérum (milieu sans SVF), 36 heures après leurensemencement à 5000 cellules par puits de plaques E-plate. Ici, les cellules n'ont donc pas reçu de traitement au 5-FU. Toutes les courbes de ce graphique sont normalisées au

moment de l'ajout de l'IGF1 afin de pouvoir comparer les courbes de croissance cellulaire. La courbe rouge représente les cellules HT-29 sans aucun traitement (cellules contrôles). La courbe verte représente les cellules HT-29 avec un traitement IGF1 à 5ng/ml. La courbe bleue représente les cellules HT-29 traitées à 10ng/ml d'IGF1. On constate que les cellules ayant reçues un traitement à l'IGF1 à 5 et 10ng/ml montrent une croissance cellulaire plus importante comparés au cellules n'ayant reçues aucun traitement. Afin de mesurer cette différence de croissance cellulaire, nous avons calculé les pentes des courbes de l'xCeLLigence durant la phase exponentielle de la croissance dans une intervalle de 60 heures à partir du début de la phase exponentielle. Les histogrammes de la figure 37, montrent en effet le calcul de ses pentes. On constate que la pente de la courbe des cellules HT-29 contrôle (Ctrl) montre une pente de 1, cette pente augmente progressivement à 1.5 lorsque les cellules reçoivent 5ng/ml d'IGF1 et cette pente double à 2 lorsque les cellules reçoivent 10ng/ml d'IGF1. Donc l'IGF-1 stimule la croissance dose dépendante des cellules CCR.

IV.2.1.3 Etude de la croissance cellulaire en réponse à l'IGF1 lors d'un pré-traitement au 5-FU

La figure 38 représente la croissance cellulaire des cellules CCR en réponse à 24h de traitement au 5-FU à 10 μ M (figure 36) puis à 5 et 10ng/ml d'IGF1 après 12 heures de privation de sérum (milieu sans SVF), 36 heures après leur ensemencement à 5000 cellules par puits de plaques E-plate. Toutes les courbes de ce graphique sont normalisées au moment de l'ajout de l'IGF1 afin de mesurer seulement son effet sur les courbes de croissance cellulaire. La courbe rouge représente les cellules HT-29 sans traitement IGF1 (cellules contrôles). La courbe verte représente les cellules HT-29 avec un traitement IGF1 à 5ng/ml. La courbe bleue représente les cellules HT-29 traitées à 10ng/ml d'IGF1. De la même manière, on constate que les cellules traitées au 5-FU et ayant reçues un traitement à l'IGF1 5 et 10ng/ml montrent une croissance cellulaire plus importante comparé au cellules n'ayant reçues seulement le traitement au 5-FU. Afin de mesurer cette différence de croissance cellulaire, nous avons calculé les pentes des courbes de l'xCeLLigence durant la phase exponentielle de la croissance dans une intervalle de 60 heures à partir du début de la phase exponentielle. Les histogrammes de la figure 38, montrent en effet le calcul de ses pentes. On constate que la pente de la courbe des cellules HT-29 contrôle (Ctrl) mais traitées auparavant à 10 μ M de 5-FU durant 24h, montrent une pente de 1. Lorsque les cellules sont traitées au 5-FU 10 μ M durant 24h, puis reçoivent 5ng/ml d'IGF1 montrent une pente de la courbe équivalente à 3. Et celles-ci atteignent une pente de 3.5 lorsqu'elles reçoivent un traitement IGF1 à 10ng/ml.

La figure 39 représente la croissance cellulaire des cellules CCR en réponse à 48h de traitement au 5-FU (figure 36) puis à 5 et 10ng/ml d'IGF1 après 12 heures de privation de sérum (milieu sans SVF), 36 heures après leur ensemencement à 5000 cellules par puits de plaques E-plate. La courbe rouge représente les cellules HT-29 sans traitement à l'IGF1 (cellules contrôles). La courbe verte représente les cellules HT-29 avec un traitement IGF1 à 5ng/ml. Toutes les courbes de ce graphique sont normalisées au moment de l'ajout de l'IGF1 afin de mesurer seulement son effet sur la croissance cellulaire. La courbe bleue représente les cellules HT-29 traitées à 10ng/ml d'IGF1. De la même manière, on constate que les cellules ayant reçues un traitement à l'IGF1 à 5 et 10ng/ml montrent une meilleure croissance cellulaire comparés au cellules n'ayant pas été traitées à l'IGF-1. Afin de mesurer cette différence de croissance

cellulaire, nous avons calculé les pentes des courbes de l'xCELLigence durant la phase exponentielle de la croissance dans une intervalle de 60 heures à partir du début de la phase exponentielle. Les histogrammes de la figure 39 montrent en effet le calcul de ses pentes. On constate que la pente de la courbe des cellules HT-29 contrôle (Ctrl) mais traitées auparavant à 10 μ M de 5-FU durant 48h, montrent une pente de 1. Lorsque les cellules sont traitées au 5-FU 10 μ M durant 48h, puis reçoivent 5ng/ml d'IGF1 montrent une pente de la courbe équivalente à 12. Et celles-ci atteignent une pente de 14 lorsqu'elles reçoivent un traitement IGF1 à 10ng/ml.

Nous avons effectué les mêmes expériences sur la lignée cellulaire HCT-116 et nous avons obtenu résultats similaires à ceux observés dans les cellules HT-29 (données non montrées).

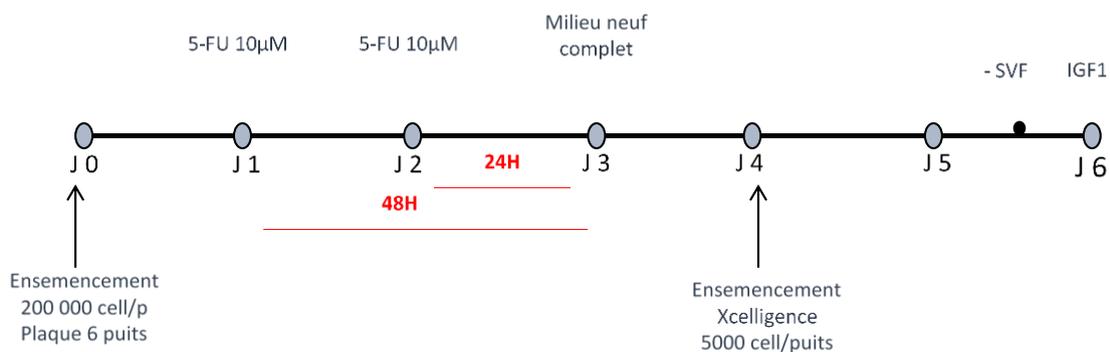
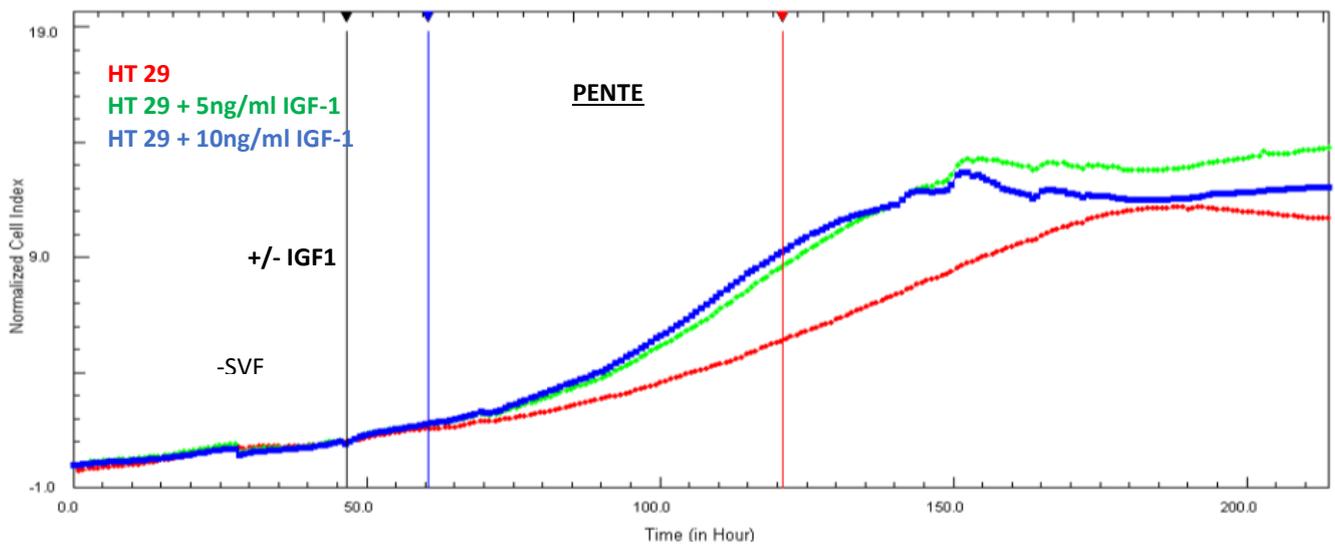


Figure 36 : Chronologie des traitements à l'IGF-1 des cellules dans les expériences de croissance cellulaire par xCELLigence. Les cellules sont ensemencées à 200 000 cellules par puits dans des plaques 6 puits puis traitées au 5-FU à 10 μ M durant 24h ou 48h. Par la suite, les cellules sont ensemencées dans les plaques



Normalisation au traitement IGF-1

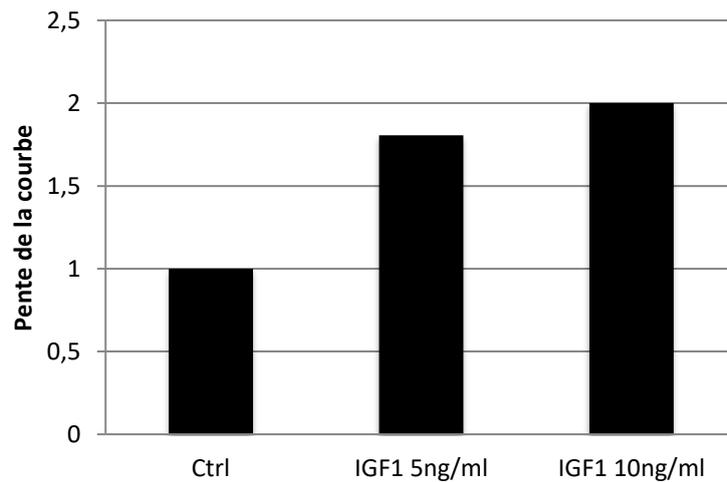
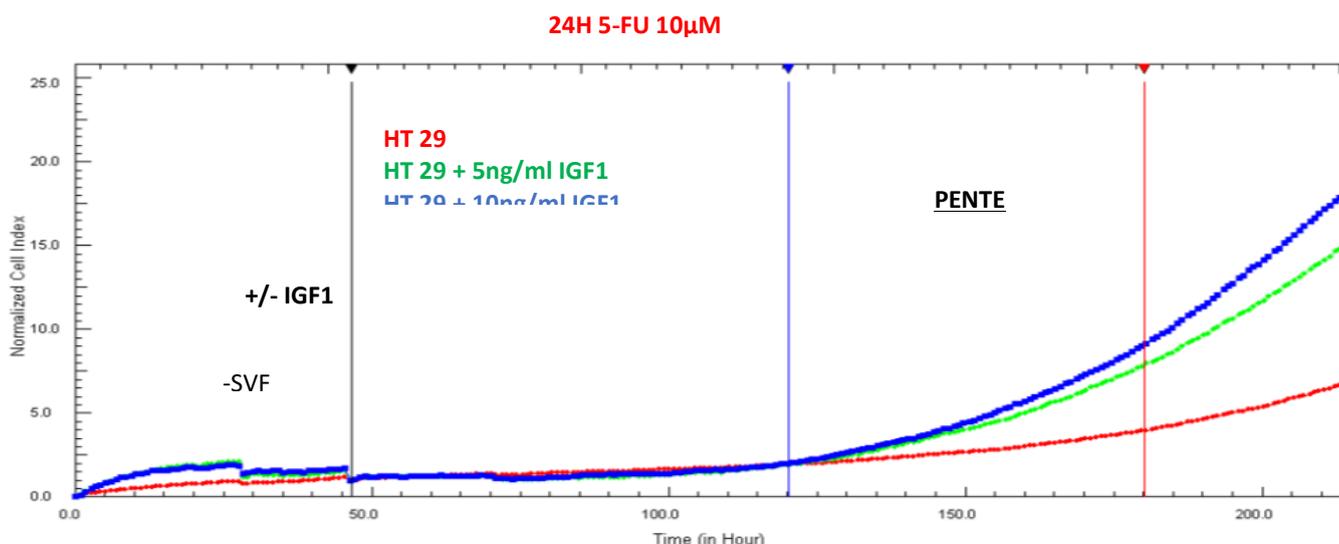


Figure 37 : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 en temps réel mesuré par xCELLigence. Les cellules sontensemencées à 5000 cellules par puits, après 36h le milieu de culture est remplacé par un milieu sans SVF durant 12h. L'IGF1 est +/- ajouté dans les puits des plaques à 5 ou 10ng/ml. Histogrammes représentant le calcul de la pente des courbes entre 60 heures et 120 heures.



Normalisation au traitement IGF-1

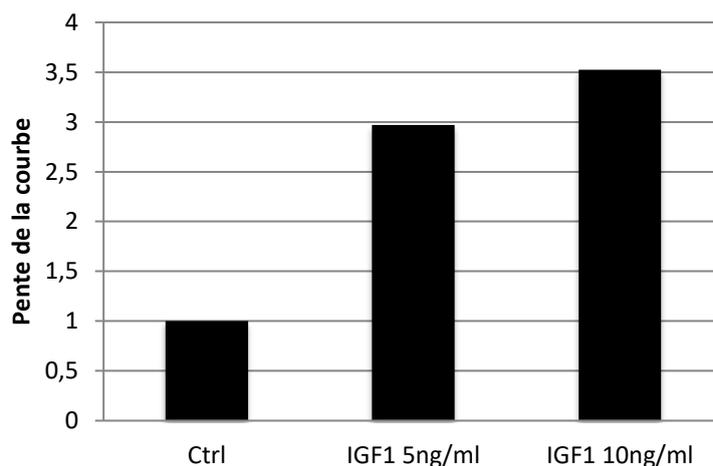


Figure 38 : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 en temps réel mesuré par xCELLigence. Les cellules sontensemencées à 5000 cellules par puits suite à un traitement à 10 μ M de 5-FU durant 24h, après 36h le milieu de culture est remplacé par un milieu sans SVF durant 12h. L'IGF1 est +/- ajouté dans les puits des plaques à 5 ou 10ng/ml. Histogrammes représentant le calcul de la pente des courbes entre 120 heures et 180 heures, (n=3).

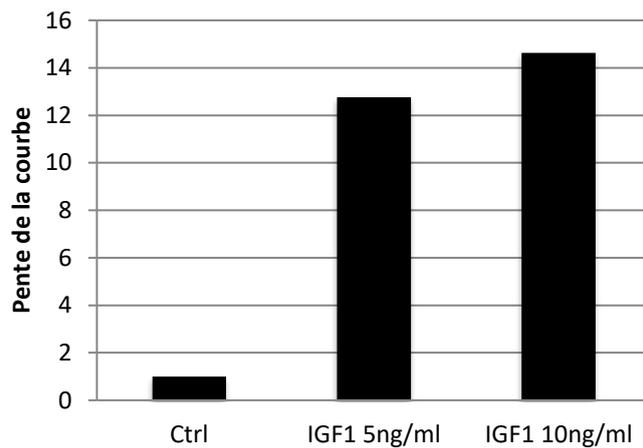
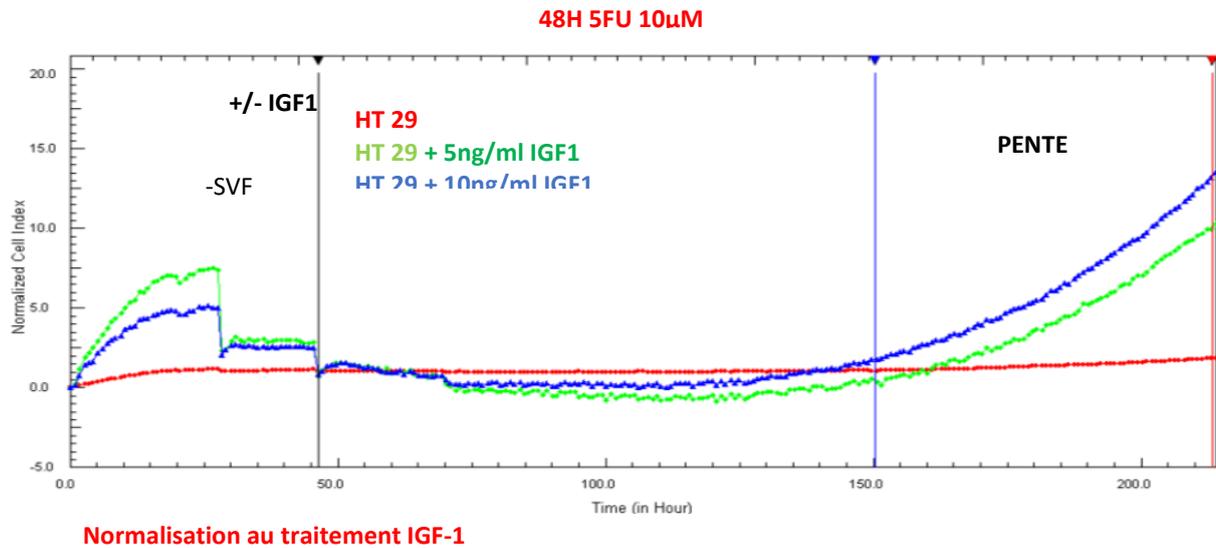


Figure 39 : Courbes de croissance cellulaire des cellules CCR HT-29 en temps réel mesuré par xCELLigence. Les cellules sontensemencées à 5000 cellules par puits suite à un traitement à 10 μ M de 5-FU durant 48h, après 36h le milieu de culture est remplacé par un milieu sans SVF durant 12h. L'IGF1 est +/- ajouté dans les puits des plaques à 5 ou 10ng/ml. Histogrammes calcul de la pente des courbes entre 150 heures et 215 heures, (n=3).

IV.2.2 Expression du récepteur IGF1-R en réponse au traitement 5-Fluorouracile

Nous avons voulu vérifier l'expression protéique de l'IGF1-R (figure 40) suite aux résultats de croissance cellulaire obtenus, où on constate que les cellules ayant reçues un traitement au 5-FU 10 μ M durant 24 ou 48h, montrent une croissance cellulaire plus importante, suite à la stimulation par l'IGF-1. Pour cela, les cellules sont +/- traitées à 10 et 50 μ M de 5-FU, durant 24h, 48h ou 72h, puis nous avons extrait les protéines afin de réaliser un western blot de la protéine IGF1- R et du KU80 comme protéine contrôle. Cette expérience a été reproduite trois fois et les résultats obtenus dans les lignées HT-29 et HCT-116 sont représentés dans la figure 39. Le premier blot représente les résultats obtenus dans les cellules HT-29, les extraits protéiques ont été déposés dans un ordre croissant de durée du traitement au 5-FU, 24h, 48h et 72h, et dans un ordre croissant de concentration du traitement au 5-FU, de 0, 10 μ M et 50 μ M. Tout d'abord, on constate un maintien de l'expression de la protéine dans toutes les conditions de l'expérience dans les deux lignées cellulaires. Par la suite, on constate que l'expression de la protéine IGF1-R diminue légèrement lorsque les cellules sont traitées à 10 et 50 μ M de 5-FU comparé aux cellules contrôles non traitées au 5-FU et cela dans tous les temps de l'expérience. Cette expérience nous a permis de montrer que l'expression de l'IGF1-R est maintenue même suite à un traitement à forte dose de 5-FU à 50 μ M. La réponse des cellules CCR traitées au 5-FU et l'IGF-1 est donc en partie expliquée par le maintien de l'expression robuste du récepteur IGF-1R.

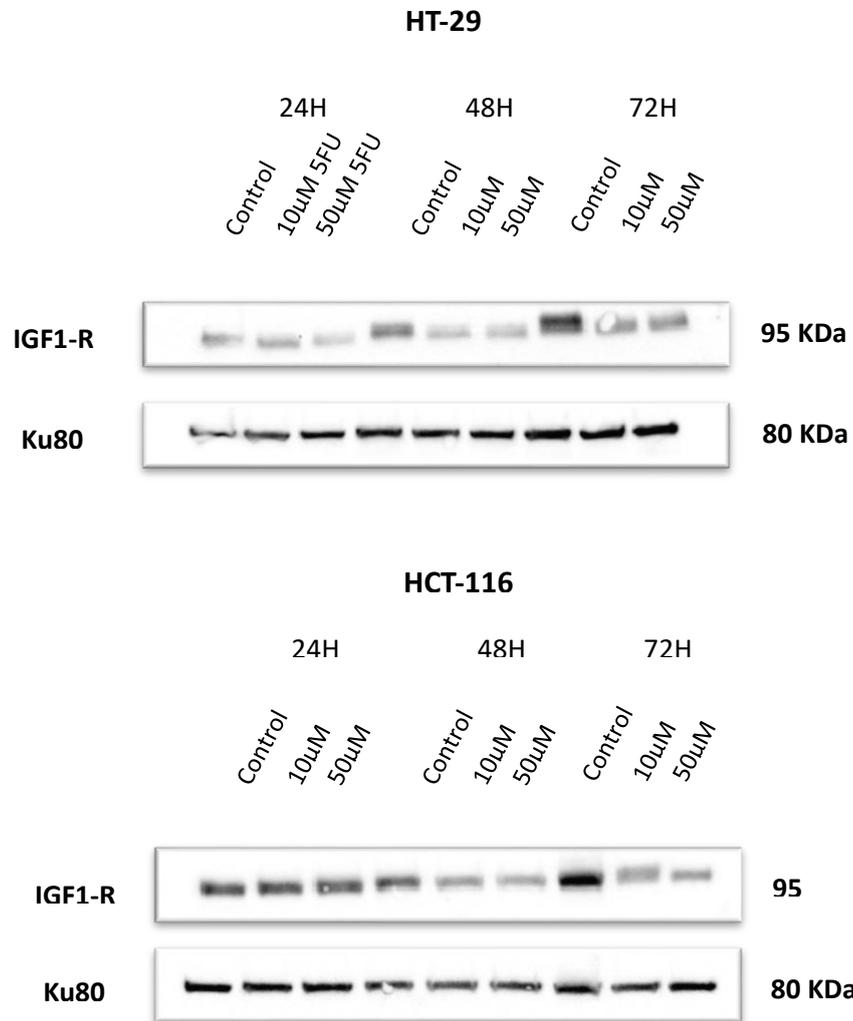


Figure 40 : Caractérisation de l'IGF1-R et de l'IGF1-R précurseur dans les cellules CCR HT-29 et HCT-116 suite à un traitement au 5-FU 10 et 50μM durant 24h, 48h et 72h. La protéine KU80 comme control interne. Images représentatives de western blot obtenues pour la FBL puis quantifiées (n=3).

V. DISCUSSION

V.1 PARTIE I – FIBRILLARINE DANS LE CANCER COLORECTAL

Le rôle de la biogenèse des ribosome durant la progression tumorale a gagné de plus en plus d'attention durant les dernières années de recherche, particulièrement car il a été démontré que les ribosomes sont quantitativement surexprimés dans divers types de cancers [210], en raison de la surexpression d'oncogènes ou de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs entraînant une augmentation soutenue de l'activité de l'ARN Pol I [162], ainsi l'augmentation de la biogenèse des ribosomes a été démontrée comme une étape clé dans la tumorigenèse [205]. Et de manière plus importante, en démontrant que les ARN ribosomiques sont sujets à des modifications chimiques dans les cellules cancéreuses et sont donc différents des cellules normales [211]. Ces modifications chimiques des ARNr, telle que la 2'-O-méthylation, induisent une modulation de la nature des ARNr conduisant à des différences structurales et fonctionnelles des ribosomes dans leur capacité de traduction dans le contexte tumoral. Ceci a donné naissance au concept de ribosomes spécialisés [212]. Cette augmentation de la RiBi s'accompagne d'une dérégulation de plusieurs facteurs clés de ce processus, parmi ces facteurs, l'enzyme méthyltransférase Fibrillarine, qui a été démontrée comme dérégulée dans plusieurs cancers tel que le cancer du sein [206]. La régulation post-transcriptionnelle des ARNr est affectée lorsque la FBL est dérégulée. En effet, une surexpression de la FBL est associée à des profils de 2'-O-méthylation différents favorisant la progression tumorale [211], [213]. Ce projet de thèse, avait pour objectif d'apporter des informations sur le rôle de la FBL dans la progression du cancer colorectal, particulièrement dans les processus de prolifération cellulaire, migration et invasion cellulaire, jusque-là non étudiés, ainsi que son rôle dans le contexte d'un traitement à la molécule chimiothérapeutique de 5-Fluorouracile à de faibles doses. En effet, l'utilisation de cette molécule dans le traitement de stades précoces ou avancés de cancers à de fortes doses induit des effets indésirables ainsi qu'une chimiorésistance récurrente chez les patients, ce qui est un enjeu clinique majeur [94]. Il est donc nécessaire de combiner l'utilisation du 5-FU à de faibles doses avec d'autres stratégies de ciblage thérapeutiques pour renforcer son effet chimiothérapeutique sur les cellules cancéreuses. Par conséquent, nous avons développé une stratégie combinant l'inhibition de la FBL dans les cellules CCR avec un traitement de faibles doses de 5-FU (10 μ M et 50 μ M), et nos résultats montrent que lorsque la FBL est inhibée on constate un ralentissement de la croissance cellulaire de la migration et invasion cellulaire, ainsi qu'une réponse de la molécule de 5-FU plus marquée.

V.1.1 Validation des modèles cellulaires de l'inhibition de la Fibrillarine

Afin de sélectionner les lignées cellulaires sur lesquelles les expériences de ce projet allaient être menées, nous avons vérifié l'expression de la FBL dans un panel de lignée cellulaire de cancer colorectal. Le but de cette expérience était tout d'abord de vérifier si la FBL était exprimée dans les lignées de CCR. Les résultats de l'expression de la FBL dans les lignées CCR (figure 23), montrent en effet que la protéine FBL est exprimée à différents niveaux dans les lignées CCR. De manière intéressante, nous avons constaté que l'expression de la FBL était

doublée dans la lignée cellulaire HCT-116 P53-/- comparée à la lignée HCT-116 de type sauvage et qui exprime la protéine suppresseur de tumeur P53. Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus dans notre équipe, qui démontrent que l'expression de la FBL est négativement contrôlée par P53 (p53 acts as safeguard). Par la suite, nous avons choisi de travailler avec les deux lignées cellulaires HT-29 et HCT-116, qui sont deux lignées adhérentes issues de tissus épithéliaux, très utilisées dans les études en cancérologie et qu'on retrouve dans la littérature scientifique, ce qui nous permet de comparer les résultats obtenus.

Pour étudier l'impact de la FBL dans les processus de prolifération cellulaire, migration et invasion cellulaire, nous avons développé un modèle cellulaire dans lequel l'expression de la FBL est inhibée, pour cela dans un premier temps nous avons utilisé un modèle siARN ciblant la FBL. Les résultats obtenus à l'issue de ces expériences de siARN (figure 24) ont montré parfois une bonne inhibition de la FBL, notamment dans les cellules HT-29, néanmoins ces résultats n'ont pas été confirmés dans les cellules HCT-116, et n'ont pas pu être reproduits par la suite dans les deux lignées cellulaires. De plus, dans les conditions de contrôles (siCTRL), nous avons constaté une variabilité dans les résultats obtenus. Les expériences de siARN ciblant la FBL ont montré des réponses très variables et instables dans l'inhibition de la FBL, or, il est nécessaire d'avoir un modèle cellulaire stable, afin d'assurer la reproductibilité des résultats. L'instabilité de ce modèle peut probablement être due au fait que l'inhibition de la FBL par la technique de siARN doit se faire avant chaque expérience, or cette technique nécessite plusieurs étapes et différentes concentrations de réactifs, ce qui augmente la marge d'erreur dans chaque expérience, en plus des paramètres biologiques qui peuvent varier. Pour cela, nous avons cherché et mis au point un autre modèle cellulaire d'inhibition de la FBL, grâce à la technique du shARN. L'utilisation de cette technique d'inhibition de l'expression génique nécessite la manipulation de particules virales. Pour cela, nous avons les techniques d'expérimentation et les équipements nécessaires au sein de notre équipe. Les résultats obtenus à l'issue des différentes expériences de mise au point montrent une nette inhibition de la FBL dans les deux populations de cellules nommées shARN-FBL67 et shARN-FBL68, dans les lignées cellulaires HT-29 et HCT-116. Cette inhibition a été mesurée et quantifiée au niveau de l'ARN par RTqPCR (figure 26), ainsi qu'au niveau protéique par western blot (figure 2). L'inhibition de la FBL grâce à cette technique a montré une stabilité et reproductibilité dans les résultats obtenus. Ces résultats fiables sont dû principalement à la robustesse de la technique. En effet, l'induction du shARN ciblant la FBL nécessite un traitement à la doxycycline, qui après quelques expériences de mise au point, a été choisie à 0.5µg/ml durant 96h, où on observe la meilleure inhibition de la FBL comparée aux différents contrôles. Ainsi, cette concentration et ce temps de traitement ont été fixés pour l'ensemble des expériences de ce projet.

V.1.2 Caractérisation des ARN ribosomiques des cellules CCR

La méthyltransférase Fibrillarine a pour rôle la méthylation des riboses des ARN ribosomiques et intervient dans les étapes précoces de la biogénèse des ribosomes durant le « processing » des ARNr. Pour cela nous avons voulu vérifier l'intégrité ainsi que la qualité des ARNr suite à l'inhibition de la FBL dans les cellules CCR. Les résultats de gel d'agarose (figure 34) montrent que la qualité des ARNr semble bien conservée après l'inhibition de la FBL. Les ARN utilisées lors de ces expériences de gel d'agarose ont été extraits directement suivant le traitement de

96h à la dox, or il est difficile de savoir si l'inhibition de la FBL a un impact imminent sur les ARNr. Afin de d'investiguer davantage, il faudrait réaliser des expériences de RiboMeth-seq. Cette technique permet de faire les profils de 2'-O-méthylation des ARNr, elle est basée sur le séquençage pour la cartographie et la quantification les modifications chimiques des ARNr. Il faudrait notamment conduire des expériences de Northern blot en utilisant des sondes spécifiques des régions 5'ETS et 3'ETS afin de vérifier la qualité des ARNr suite à l'inhibition de la FBL.

V.1.3 Mesure de la synthèse protéique totale par le test Sunset

Les résultats obtenus grâce à cette technique nous permettent d'avoir une image de la quantité de protéine produites par une cellule à un instant donné (figure 35). Nous avons donc pu comparer la quantité de protéines totales dans les cellules exprimant la FBL et celle où elle est inhibée, et l'inhibition de la FBL ne semble pas affecter la quantité de protéines totales dans les cellules CCR à 24h et 48h après l'inhibition de la FBL. Néanmoins ces résultats étaient attendus, car la littérature nous montre que même avec des profils de méthylation d'ARNr différents, les ribosomes restent fonctionnels [211].

V.1.4 Rôle de Fibrillarine dans la croissance cellulaire

Les expériences de croissance cellulaire par xCELLigence suivi en temps réel nous ont permis de comparer la croissance cellulaire de cellules CCR exprimant la FBL et les cellules où la FBL est inhibée. Nous avons constaté que l'inhibition de la FBL ralentit la croissance cellulaire des CCR, mais que, à la fin de l'expérience, cette croissance cellulaire revient au même niveau que les cellules exprimant la FBL. Il est à noter que suivant les expériences de mise au point du modèle cellulaire de l'inhibition de la FBL (figure 25. 26), l'inhibition optimale de la protéine est obtenue après 96 heures de traitement, aussi, les expériences de croissance cellulaire par xCELLigence, peuvent durer jusqu'à plus de 150 heures, or, nous ne disposons pas d'informations concernant la durée de cette inhibition dans le temps, et donc à quel moment les cellules de ce modèle cellulaire réexpriment la FBL après ce traitement de 96 heures à la dox. A l'heure actuelle, il faudrait développer encore plus les expériences afin de définir les limites de ce modèle cellulaire et de mieux interpréter les résultats qui en découlent, notamment en surveillant la réexpression de la FBL suite à son inhibition, et par la suite, maintenir l'expression du shARN-FBL par un traitement continu à la dox si nécessaire. Néanmoins, ces résultats nous permettent de corréliser l'inhibition de la FBL à une diminution de la croissance cellulaire des cellules CCR. Dans cette même expérience, nous avons aussi analysé l'effet de la molécule 5-FU sur la croissance cellulaire des cellules CCR, ces cellules ont reçues soit une dose de 10 μ M ou 50 μ M, ces doses ont été choisies selon un calcul correspondant aux doses administrées chez les patients traités au 5-FU [214]. L'effet de cette molécule sur la croissance cellulaire n'est plus à démontrer, néanmoins on peut constater que la molécule de 5-FU diminue nettement la croissance cellulaire des cellules CCR, avec un effet dose-dépendant (figure 28). En élaborant cette expérience de croissance cellulaire, nous nous sommes posé la question d'un éventuel effet synergique de l'inhibition de la FBL ainsi que de la molécule de 5-FU dans la diminution de la croissance cellulaire des cellules cancéreuses. Et les résultats obtenus nous encouragent dans ce sens. En effet, l'inhibition de la FBL combinée

au traitement à la molécule de 5-FU a un effet puissant sur la croissance cellulaire (figure 28). Les résultats du test MTS nous ont permis de soutenir les résultats de croissance cellulaire obtenus par xCELLigence. En effet, on constate une diminution de la viabilité cellulaire dans les cellules où l'expression de la FBL est inhibée comparativement aux cellules qui expriment la FBL, néanmoins, ces cellules gardent une viabilité cellulaire élevée qui augmente au cours du temps, comme nous avons pu le constater dans ces expériences MTS (figure 27). Ces résultats de viabilité reflètent l'activité métabolique des cellules qu'on peut corrélérer à la croissance cellulaire réduite après l'inhibition de la FBL (figure 28). Par conséquent, nous avons voulu savoir si cette diminution de la viabilité cellulaire et de la croissance cellulaire était liée à une mort cellulaire accrue des cellules étudiées, et pour cela nous avons étudié la mort cellulaire grâce à un comptage des cellules mortes et vivantes au bleu Trypan. Les résultats de comptage cellulaire par bleu Trypan nous ont permis de constater que toutes les populations de notre modèle cellulaire expriment un fort taux basal de cellules vivantes qui est supérieur à 90%, donnant de bonnes conditions pour réaliser les différentes expériences de ce projet (figure 32). Ces expériences de comptage cellulaire nous ont aussi permis de confirmer une différence de viabilité cellulaire entre les cellules exprimant la FBL et celles où la FBL est inhibée (figure 32). En effet, on constate qu'il y a moins de cellules vivantes dans les populations de cellules shARN-FBL + dox comparées aux populations shARN-FBL - dox. Néanmoins, cette inhibition de la FBL n'induit pas une mort cellulaire accrue, comme on peut le constater sur la figure 32, il n'y a pas de différence de mort cellulaire entre les cellules shARN-FBL +/- dox. Ainsi, toutes ces données combinées entre elles, nous permettent de conclure que dans ce modèle cellulaire, l'inhibition de la FBL réduit la croissance cellulaire sans impacter la mort cellulaire.

Ces résultats obtenus indiquent que la FBL semble être impliquée dans le processus de croissance cellulaire ainsi que la progression tumorale. Parallèlement des études dans la levure montrent qu'une inhibition de la modification chimique 2'-O-méthylation sur différents sites des ARNr, impacte directement la traduction et la croissance cellulaire chez la levure [215]. Chez les zebrafish, une altération de la 2'-O-méthylation sur un seul site entraîne des déformations morphologiques et une létalité embryonnaire [216]. De plus, les travaux de notre équipe dans le cancer du sein montrent un rôle clair de la FBL dans la progression tumorale mammaire [213]. En effet, dans cette étude on montre que les cellules surexprimant la FBL montrent un taux de prolifération cellulaire deux fois plus élevé, comparé aux cellules contrôles, ces cellules formaient significativement plus de colonies en agar et une concentration significativement plus élevée de doxorubicine était nécessaire pour atteindre 50 % d'effet inhibiteur dans les cellules surexprimant la FBL par rapport aux cellules contrôles. De plus, une expression élevée de l'ARNm de la FBL était significativement associée à un faible taux de survie sans rechute et à un faible taux de survie spécifique au cancer du sein [213]. Ces données démontrent en effet un rôle de la FBL dans la prolifération et la progression des cellules cancéreuses du sein. Dans cette même étude, on montre que l'expression du niveau de la FBL ainsi que les profils de 2'-O-méthylation sont directement régulés par p53. En effet, p53 se lie directement sur un élément de réponse du gène de la *FBL*. Ainsi, ces données sont renforcées par une expression inversement proportionnelle de la FBL en réponse à une inhibition de la p53 par siARN et une inactivation de p53 altère directement les profils de méthylation des ARNr [213]. Et ces résultats ont aussi été obtenus dans la lignée de cellule

de cancer colorectal HCT-116. Des résultats similaires aux nôtres ont aussi été obtenus dans le cancer de la prostate. En effet, le rôle de la FBL dans la prolifération cellulaire a aussi été démontré dans le cancer de la prostate [207]. Dans cette étude, les chercheurs ont étudié les altérations de la structure nucléolaire, et montrent que les programmes d'expression génique dans la néoplasie prostatique sont activés par l'oncogène MYC. En effet, la surexpression de l'oncogène MYC dans le cancer de la prostate, et qu'on retrouve dans plusieurs cancers, induit une augmentation du volume et du nombre de nucléoles. La FBL étant une cible de MYC en régulant directement son expression en se liant à son promoteur. Les résultats de cette étude montrent que la FBL dans la prolifération des cellules de cancer de la prostate après l'inhibition de l'expression de la FBL est inhibé dans quatre lignées cellulaires de cancer de la prostate, cette étude montre aussi une inhibition de 80% dans les expériences de formation de colonies [207]. Les chercheurs ont aussi observé une diminution de l'expression des ARNr 28S, 18S et 5.8S après l'inhibition de la FBL, alors que l'expression de l'ARNr 45S est restée inchangée. Ces résultats sont très cohérents vu le rôle de la FBL dans la maturation des ARNr et sachant que la FBL n'a aucun effet dans l'initiation de la transcription du précurseur 45S. Dans cette même étude, l'ARNm et la protéine de la FBL étaient surexprimés dans des échantillons de tissus de cancer de la prostate comparés à des tissus sains. Et ces niveaux élevés de la FBL ont été corrélés à la surexpression de MYC [207]. L'ensemble de ces données renforce l'hypothèse que la FBL ait un rôle dans la prolifération cellulaire durant le développement tumoral. Mais de manière encore plus intéressante, une autre étude sur des cellules HeLa, montre notamment un rôle de la FBL dans le processus de prolifération cellulaire [217]. En effet, après inhibition de la FBL, les cellules HeLa ont montré une diminution de la prolifération cellulaire, en plus de déformations de la structure nucléaires 72h après l'inhibition de la FBL, tandis que l'inhibition de la nucléoline, n'a montré aucun effet sur la morphologie nucléaire des cellules HeLa, ce qui indique un rôle spécifique de la FBL [217]. L'ensemble de ces résultats encouragent vivement d'envisager la FBL comme une cible thérapeutique dans les trois cancers étudiés, le cancer du sein, le cancer de la prostate ainsi que le cancer colorectal, couplée à de faibles doses de molécule chimiothérapeutique tel que le 5-Fluorouracile. L'existence de molécules ciblant la biogenèse des ribosomes encouragent dans ce sens, comme précédemment détaillés dans le chapitre « Ciblage de la Biogenèse des ribosomes dans les cancers », à savoir, CX-5461, CX-3543 et BMH-21 qui sont de nouvelles thérapies prometteuses qui agissent par différents mécanismes pour inhiber l'activité de transcription de l'ARN polymérase I. En effet, les cellules tumorales sont dépendantes d'une production accrue de ribosomes et d'une activité de traduction accrue pour soutenir leur croissance dérégulée. De ce fait, les cellules cancéreuses sont plus sensibles que les cellules normales aux traitements qui inhibent la fonction ou la production des ribosomes. Pour toutes ces raisons, il est intéressant de cibler particulièrement la FBL pour son rôle clé dans la biogenèse des ribosomes, à travers la maturation des ARNr ainsi que leur méthylation. Mais aussi, car elle est surexprimée dans plusieurs cancers précédemment discutés. Et son rôle dans la prolifération et la progression cellulaire tumorale commence à se dessiner de plus en plus. En effet, la surexpression de la FBL et l'altération des profils de méthylation conduisent à une augmentation de la production de ribosomes ainsi qu'à leur hétérogénéité et par conséquent, une traduction préférentielle de gènes clés de la tumorigenèse tels que IGF-1R, C-myc, VEGF-A. Enfin, la FBL peut être ciblée pour contourner la résistance aux thérapies actuelles conduisant à une diminution de l'effet génotoxique.

V.1.5 Etude de la croissance cellulaire en 3D

Ce modèle d'étude de formation d'agrégats cellulaires en 3 dimensions, aussi appelé sphéroïde, est un modèle qui imite et qui se rapproche le plus des conditions *in vivo* des tissus et amas de tumeurs, l'organisation spatiale des cellules des sphéroïdes montre des cellules à l'intérieur et d'autres exposées à la surface. Et ce modèle nous a permis d'étudier l'impact de l'inhibition de la FBL dans des cellules de CCR dans une configuration en 3 dimensions. Comme constaté dans les modèles d'études de croissance en 2 dimensions, nous avons constaté une croissance des sphéroïdes au cours du temps dans les différentes populations de cellules étudiées. Dans les cellules HT-29, nous n'avons constaté aucune différence de volumes des sphéroïdes entre les cellules exprimant la FBL et celles où elle est inhibée. Nous avons pu observer une différence de diamètre entre les cellules HCT-116 shARN-FBL +/- Dox, mais ce résultat n'a pas pu être reproduit dans les expériences qui ont suivies.

V.1.6 Rôle de la Fibrillarine sur la migration et l'invasion cellulaire des cellules CCR

Nous nous sommes intéressés à une des caractéristiques des cellules tumorales lors du développement tumoral qui est la migration cellulaire. En effet ce processus peut aboutir à un phénotype cellulaire métastatique, qui est le stade final du développement d'un cancer. Et pour rappel, il y a 12% de survie pour les patients atteints de cancer colorectal métastatique, c'est pour cela que nous nous sommes intéressés aux phénomènes de migration et invasion cellulaire.

Les résultats de migration cellulaire des cellules CCR nous montrent une remarquable diminution de la migration cellulaire lorsque la FBL est inhibée comparées aux cellules qui expriment la FBL (figure 29). Cette diminution reste du moins temporaire, car les deux courbes de migration cellulaire qu'on observe, finissent par se rejoindre à la fin de l'expérience. De la même manière que dans les expériences de prolifération cellulaire, on pourrait se demander est-ce que cet effet de réduction de la migration cellulaire n'est pas remis à niveau des cellules exprimant la FBL, à cause d'une réexpression de la FBL dans le modèle shARN-FBL traité à la dox. Une autre partie de l'expérience consistait à étudier la combinaison de l'inhibition de la FBL couplé au traitement à la molécule de 5-FU à 10 μ M et 50 μ M. Les résultats obtenus montrent un effet encore plus remarquable, puisque la migration cellulaire est complètement inhibée. On pourrait davantage explorer une gamme de concentration de la molécule de 5-FU plus faible en combinaison avec l'inhibition de la FBL, afin de diminuer la toxicité de la chimiothérapie tout en observant des résultats réduisant ou inhibant la migration cellulaire des cellules de cancer colorectal.

Les résultats d'invasion des cellules CCR nous montrent un effet de l'inhibition de la FBL (figure 30). En effet, nous avons observé une réduction de l'invasion des cellules avec une FBL inhibée, comparées aux cellules exprimant la FBL, cet effet reste néanmoins temporaire mais non négligeable. Dans cette expérience, nous avons notamment étudié l'effet de la molécule de 5-FU sur la migration cellulaire des cellules CCR, avec un effet très léger. En revanche, comme constaté durant les expériences de migration cellulaire, la combinaison de l'inhibition de la

FBL avec la molécule de 5-FU à 10 μ M présente un résultat remarquable sur l'invasion des cellules CCR, en maintenant cette réduction tout au long de l'expérience. Ces résultats nous montrent que les cellules HT-29 et HCT-116 ont des capacités invasives, c'est-à-dire que celles-ci sont capables en plus de se déplacer, mais aussi de dégrader la matrice extracellulaire et l'inhibition de la FBL semble avoir un effet sur ce processus.

Ces données encouragent l'hypothèse que la FBL soit impliquée dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire, néanmoins aucune donnée de la littérature n'indique son implication dans ces processus. Mais de la même manière que la prolifération cellulaire, on pourrait supposer que la dérégulation de l'expression de la FBL dans les cellules tumorales entraînant une modification des profils de 2'-O-méthylation des ARNr, ceux-ci modifiant la traduction des ribosomes en favorisant la traduction de gènes impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire, favorisant l'apparition de cellules tumorales avec un phénotype invasif et agressif. Dans de futures expériences, il faudra étudier l'expression de gènes liés à la migration et l'invasion cellulaire dans un contexte où la FBL est inhibée. En effet, la migration cellulaire est un processus physiologique sain qu'on retrouve dans les cellules durant l'embryogenèse durant le mécanisme de gastrulation qui permet de former les trois feuillets embryonnaires, ou bien dans les cellules germinales primordiales (PGCs), ainsi que dans les cellules immunitaires durant les phénomènes d'inflammation et de cicatrisation [218]. Néanmoins, des cellules comme les cellules épithéliales, normalement non motiles peuvent réactiver la migration cellulaire au cours du processus de tumorigenèse à travers une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un passage d'un type cellulaire épithélial à un type mésenchymateux moins différencié, qui est considérée comme un événement clé dans le processus tumoral [219]. Dans les conditions physiologiques, les cellules épithéliales forment des jonctions serrées avec les cellules voisines, ce qui leur permet de former une monocouche cellulaire, ces jonctions serrées sont possibles grâce à des protéines telles que la E-cadhérine. Ainsi, la perte d'expression de E-cadhérine est considérée comme un marqueur de l'EMT [220]. Il serait très intéressant de vérifier l'expression de cette protéine dans le cadre de l'inhibition de la FBL, afin de mieux comprendre son rôle et sa possible implication dans la migration cellulaire des cellules de cancer colorectal et voir s'il existe une corrélation entre la surexpression de la FBL dans les cancers et la protéine E-cadhérine. Une autre étape clé dans le processus de migration cellulaire est une augmentation de la motilité des cellules, ce qui leur permet de quitter la tumeur primaire afin d'envahir les tissus et organes voisins. Cette étape est possible grâce au remodelage du cytosquelette d'actine, notamment à travers la dérégulation de protéines impliquées dans l'organisation des filaments d'actine, telles que Arp2 et Arp3 « actin related protein ». De manière intéressante, on retrouve ces protéines surexprimées dans le cancer colorectal [221][222]. Il serait par conséquent judicieux de vérifier la régulation de Arp2 et Arp3 dans le contexte d'inhibition de la FBL dans le cancer colorectal.

V.2 PARTIE II 5-FLUOROURACILE, CANCER COLORECTAL ET RIBOSOMES

Les ARNr jouent un rôle central dans le processus de traduction qui contrôle et régule l'expression génique et contribue au développement des cancers [223]. Et la molécule de 5-FU altère tous les ARN, notamment les ARNr. Un travail de recherche initié au sein de notre équipe portant sur l'incorporation du 5-FU dans les ARNr a montré que les ribosomes matures de cellules cancéreuses, ceux de xéno greffes de cancer colorectal ainsi que ceux des tumeurs humaines accumulent du 5-FU. Les expériences menées ont montré que ces ribosomes « fluorés » étaient fonctionnels et engagés dans la traduction d'ARNm. Cette traduction s'est avérée sélective en favorisant la traduction d'ARNm contenant une longue région 5'UTR très structurée tel que l'ARNm de l'IGF-1R qui est un facteur de survie cellulaire impliqué dans la tumorigenèse. Dans cette partie des résultats, nous avons étudié l'expression de l'IGF1-R en réponse au traitement au 5-FU, en étudiant ses effets sur la croissance cellulaire des cellules CCR, ainsi que sur l'expression de la protéine IGF1-R et de son précurseur [141].

Les résultats obtenus à l'issue des différentes expériences montrent une prolifération cellulaire plus forte lorsque les cellules CCR sont exposées à l'IGF-1 à une concentration de 5 et 10ng/ml, et qui sont préalablement traitées à la molécule de 5-FU à 10 et 50µM. Les cellules seraient donc davantage sensibles à la stimulation de l'IGF-1 après une exposition au 5-FU. Ces résultats confirment les données montrant une reprogrammation traductionnelle des ribosomes ayant incorporés les molécules de 5-FU, et donc favorisant la traduction de certains ARN messagers tels que celui de l'IGF-1R impliqué dans la survie cellulaire [224]. Et pour cela, nous avons vérifié l'expression protéinique du récepteur IGF-1R et les résultats obtenus montrent un maintien de l'expression du récepteur ainsi que de son précurseur suite à une exposition à des doses de 10 µM et 50 µM de 5-FU durant 24h, 48h et 72h.

Les données publiées dans notre étude [224], montrent que les ribosomes « fluorés » favorisent la traduction de certains ARNm comme celui de l'*IGF-1R*, un gène qui serait impliqué dans la survie cellulaire et la résistance [225], notamment dans le cancer colorectal [226]. En effet, même si la molécule de 5-FU induit une diminution de la synthèse protéique globale, la traduction de l'ARNm de l'IGF-1R est maintenue dans les cellules traitées au 5-FU après 24h et 48h, alors qu'on observe une baisse de la traduction d'ARNm de ménages tels que l'Actine et la GAPDH. Au niveau protéique, on observe une augmentation de l'IGF-1R comparé à ces mêmes gènes de ménage (Actine, GAPDH et H3) après 24h et 48h de traitement à la molécule de 5-FU. Comme discuté dans notre article (*Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance*), il est surprenant de constater que les ribosomes ayant incorporés le 5-FU soit encore fonctionnels du fait qu'il y a une stricte régulation et un contrôle-qualité lors de la maturation et de l'assemblage des ribosomes. Les résultats obtenus dans cette étude, laissent supposer que l'incorporation du 5-FU se fait dans des régions clés du ribosome où se font les interactions avec les ARNm ou bien des régions de contact avec les facteurs de traduction, ou bien même les sites A, P et E du ribosome, provoquant ainsi une traduction préférentielle de certains ARNm comparée à d'autres. Néanmoins, ces résultats de reprogrammation traductionnelle induits par le 5-FU ont déjà

été démontrés dans une autre étude au sein de notre équipe. En effet, dans cette étude [227] en utilisant la technique de profils de ribosomes, les résultats ont montré que les faibles doses de 5-FU (10 μ M durant 24 heures) induisent une reprogrammation traductionnelle dans les cellules de cancer colorectal.

Dans cette même étude, nous démontrons notamment l'implication de la molécule de 5-FU dans la survie cellulaire des cellules CCR à travers la voie IGF-1/IGF-1R, et cela à travers l'inhibition de l'IGF-1R par un inhibiteur de tyrosine kinase (NVP-AEW541). L'inhibition de l'activité de l'IGF-1R induit une forte diminution de la survie cellulaire dans les cellules co-traitées à la molécule de 5-FU ainsi que l'inhibiteur de l'IGF-1R comparée aux cellules ayant reçues seulement le traitement au 5-FU. Ces données démontrent une implication de la voie IGF-1/IGF-1R dans la survie cellulaire des cellules CCR traitées au 5-FU, ainsi, le maintien de la synthèse de l'IGF-1R contribue à ce mécanisme. Néanmoins, il serait intéressant d'envisager le ciblage de la voie IGF-1/IGF-1R dans le cancer colorectal afin d'améliorer les effets de la molécule de 5-FU. Et ces résultats ont avant tout montré un nouveau mécanisme dans le contrôle de l'expression génique à travers la reprogrammation traductionnelle de molécules chimiothérapeutique qui contribuent à la survie cellulaire ainsi qu'à la tolérance induite par médicaments.

VI. Perspectives et conclusion

Ce projet de thèse avait pour but de caractériser le rôle de la méthyltransférase fibrillarine, une enzyme impliquée dans la biogenèse des ribosomes, dans le cancer colorectal. Jusque-là, aucune étude n'avait exploré cette voie de recherche dans le cancer colorectal. Nous avons donc voulu vérifier si la Fibrillarine était impliquée dans des processus de tumorigenèse tels que la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion cellulaire. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression de la fibrillarine dans plusieurs lignées cellulaires de cancer colorectal, et nous avons confirmé que la fibrillarine était bien exprimée dans ces lignées-là. Puis nous avons mis au point un modèle cellulaire dans lequel l'expression de la fibrillarine était inhibée, afin de voir son implication dans les processus de développement tumoral. Ce modèle cellulaire a donc été mis au point dans les lignées HT-29 et HCT-116 dans lesquelles nous avons inhibé l'expression de la fibrillarine grâce à une infection avec un shARN ciblant la fibrillarine, ainsi qu'un contrôle shNS (non silencing), induit suite à un traitement à la doxycycline à une concentration de 0.5µg/ml durant 96 heures. Nous avons vérifié la stabilité de ce modèle avec plusieurs outils. Tout d'abord, en mesurant l'expression de la fibrillarine au niveau ARNm par RTqPCR, puis au niveau protéique par Western blot. Et dans un second temps, en étudiant la viabilité cellulaire des différentes populations de ce modèle par comptage cellulaire au bleu de trypan ainsi qu'un test MTS afin de vérifier l'activité métabolique. Ces techniques nous ont permis de confirmer une diminution de l'expression de la fibrillarine, comparée aux différents contrôles, qui n'induit pas une forte mort cellulaire. L'intégrité des ARNr a aussi été vérifiée grâce aux gels d'agarose, nous montrant que ces ARNr ne sont pas dégradés suite à l'inhibition de la fibrillarine, mais davantage d'expériences sont nécessaires afin de vérifier la qualité ainsi que la quantité des ARNr suite à l'inhibition de la fibrillarine dans le cancer colorectal, telles que des expériences de Northern blot en utilisant des sondes spécifiques des régions 5'ETS et 3'ETS afin. La synthèse protéique totale n'a pas non plus été affectée par l'inhibition de la fibrillarine dans ce modèle d'étude. Il serait notamment intéressant de vérifier la réexpression de la fibrillarine suite à son inhibition et donc la durée de son inhibition dans ce modèle cellulaire. De manière globale, les résultats obtenus à l'issue des différentes expériences menées dans ce projet de thèse, nous montrent que l'inhibition de la fibrillarine réduit la croissance cellulaire, la migration et l'invasion des cellules HT-29 et HCT-116. Ces résultats sont très encourageants notamment du fait qu'on retrouve des résultats similaires de l'implication de la fibrillarine dans la prolifération cellulaire dans d'autres types de cancers, comme le cancer du sein et de la prostate. Il serait aussi très intéressant d'étudier plus en détails l'arrêt de la croissance cellulaire en étudiant par exemple le cycle cellulaire après inhibition de la FBL. Néanmoins, très peu de résultats concernant son implication dans la migration et l'invasion cellulaire. Cet effet de l'inhibition de la fibrillarine est d'autant plus marqué lorsqu'il est couplé à un traitement chimiothérapeutique avec la molécule de 5-fluorouracile à de faibles doses. Il serait aussi très intéressant d'étudier l'implication des autres membres du complexe de la fibrillarine tels que Nop56 et Nop58, néanmoins, leur expression ne semble pas être affectée dans le contexte de l'inhibition de la fibrillarine (données non montrées). Mais nous savons que le SNORD16, le petit ARN nucléolaire de la boîte C/D qui guide la fibrillarine dans sa fonction de méthylation des ARNr durant la biogenèse des ribosomes est surexprimé dans le cancer colorectal. C'est aussi un marqueur moléculaire dans le cancer colorectal, en effet, la surexpression de SNORD16 est corrélée à une faible survie globale des patients ainsi qu'à une invasion des cellules cancéreuses. (Small

Nucleolar RNA, C/D Box 16 (SNORD16) Acts as a Potential Prognostic Biomarker in Colon Cancer). Il serait aussi judicieux de mener des expériences de caractérisation des profils ribosomiques obtenus afin d'étudier la traduction dans un contexte où la fibrillarine est inhibée.

D'autres part, j'ai aussi contribué durant mon doctorat à un travail de recherche initié au sein de notre équipe, concernant l'incorporation de la molécule de 5-fluorouracile dans les ARNr des ribosomes fonctionnel et montré que cela favorise la traduction de certains ARNm tel que celui de l'IGF-1R impliqué dans la survie cellulaire. Grâce à nos expériences, nous avons montré que les cellules CCR avaient une prolifération cellulaire plus forte suite à la stimulation par la molécule IGF-1 après avoir préalablement été traitées à la molécule de 5-FU. Par conséquent, l'altération qualitative des ribosomes par la molécule de 5-FU est un facteur qui favoriserait la progression tumorale des cellules de cancer colorectal à travers la potentialisation de l'activation de l'IGF-1R.

Davantage de données montrent l'implication de la biogenèse des ribosomes dans le cancer colorectal ces dernières années. Et les études sur des modèles cellulaires et animaux ont contribué à montrer que les altérations conduisant à une augmentation quantitative de la biogenèse des ribosomes sont liées à la progression tumorale du cancer colorectal. Aussi, les études cliniques ont mis en évidence plusieurs facteurs de la biogenèse des ribosomes comme étant des biomarqueurs du cancer colorectal humain. En outre, plusieurs études sont en cours afin de trouver de nouvelles molécules inhibitrices ciblant la biogenèse des ribosomes, suivant diverses stratégies de « drug discovery », de la réorientation des médicaments au développement du criblage à haut débit. Ces stratégies peuvent identifier des molécules pour cibler non seulement l'augmentation de la biogenèse des ribosomes observée dans les cellules CRC, mais également les ribosomes modifiés par le cancer. Ainsi, nous pouvons envisager une nouvelle phase dans la prise en charge des patients atteints de cancer colorectal où la caractérisation des voies de la biogenèse des ribosomes, associée à l'analyse qualitative des ARNr, aidera à créer des molécules anticancéreuses personnalisées avec beaucoup moins de génotoxicité.

VII. Références bibliographiques

- [1] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer Review Douglas," *Cell*, vol. 100, no. 7, pp. 57–70, 2000.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] K. Curtius, N. A. Wright, and T. A. Graham, "An evolutionary perspective on field cancerization," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 19–32, 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.102.
- [4] R. D. Williams and J. W. Dickey, "Physiology of the colon and rectum," *Am. J. Surg.*, vol. 117, no. 6, pp. 849–853, 1969, doi: 10.1016/0002-9610(69)90074-9.
- [5] M. E. V. Johansson, H. Sjövall, and G. C. Hansson, "The gastrointestinal mucus system in health and disease," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 6, pp. 352–361, 2013, doi: 10.1038/nrgastro.2013.35.
- [6] R. S. Sellers and D. Morton, "The colon: From banal to brilliant," *Toxicol. Pathol.*, vol. 42, no. 1, pp. 67–81, 2014, doi: 10.1177/0192623313505930.
- [7] J. Walter and R. Ley, "The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes," <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1146/annurev-micro-090110-102830>, vol. 65, pp. 411–429, Sep. 2011, doi: 10.1146/ANNUREV-MICRO-090110-102830.
- [8] R. Sender, S. Fuchs, and R. Milo, "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body," *PLoS Biol.*, vol. 14, no. 8, Aug. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1002533.
- [9] H. Tilg, T. E. Adolph, R. R. Gerner, and A. R. Moschen, "The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer," *Cancer Cell*, vol. 33, no. 6, pp. 954–964, 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.004.
- [10] M. Song, W. S. Garrett, and A. T. Chan, "Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention HHS Public Access," *Gastroenterology*, vol. 148, no. 6, pp. 1244–1260, 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.035.
- [11] F. Shanahan, D. Van Sinderen, P. W. O'Toole, and C. Stanton, "Feeding the microbiota: transducer of nutrient signals for the host," *Gut*, vol. 66, no. 9, pp. 1709–1717, Sep. 2017, doi: 10.1136/GUTJNL-2017-313872.
- [12] Y. Cao *et al.*, "Long-term use of antibiotics and risk of colorectal adenoma," *Gut*, vol. 67, no. 4, pp. 672–678, Apr. 2018, doi: 10.1136/GUTJNL-2016-313413.
- [13] J. L. Drewes, F. Housseau, and C. L. Sears, "Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy," 2016, doi: 10.1038/bjc.2016.189.
- [14] N. L. Le Douarin and M. Teillet, "The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo.," *undefined*, 1973.
- [15] W. El-Diery, D. Metz, D. H. Scoville, T. Sato, X. C. He, and L. Li, "REVIEWS IN BASIC AND CLINICAL GASTROENTEROLOGY Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling," 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.079.
- [16] A. Haegbarth *et al.*, "Protein Tyrosine Kinase 6 Negatively Regulates Growth and Promotes Enterocyte Differentiation in the Small Intestine," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 13, p. 4949, Jul. 2006, doi: 10.1128/MCB.01901-05.
- [17] Y. S. Kim and S. B. Ho, "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress," *Curr. Gastroenterol. Rep.*, vol. 12, no. 5, pp. 319–330, Oct. 2010, doi: 10.1007/S11894-010-0131-2.
- [18] L. G. Van Der Flier and H. Clevers, "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 71, pp. 241–260, 2009, doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
- [19] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [20] B. R. Parry, B. K. Tan, S. Parry, and H. S. Goh, "Colorectal cancer in the young adult.," *Singapore Med. J.*, vol. 36, no. 3, pp. 306–308, 1995.
- [21] E. Dekker, P. J. Tanis, J. L. A. Vleugels, P. M. Kasi, and M. B. Wallace, "Colorectal cancer," *The*

- Lancet*, vol. 394, no. 10207. Lancet Publishing Group, pp. 1467–1480, Oct-2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
- [22] F. A. OORT *et al.*, “Colonoscopy-controlled intra-individual comparisons to screen relevant neoplasia: faecal immunochemical test vs. guaiac-based faecal occult blood test,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 31, no. 3, pp. 432–439, Feb. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2036.2009.04184.X.
- [23] D. MJ *et al.*, “Use of faecal markers in screening for colorectal neoplasia: a European group on tumor markers position paper,” *Int. J. cancer*, vol. 128, no. 1, pp. 3–11, Jan. 2011, doi: 10.1002/IJC.25654.
- [24] E. J. Kuipers, T. Rösch, and M. Bretthauer, “Colorectal cancer screening - Optimizing current strategies and new directions,” *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 10, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 130–142, Mar-2013, doi: 10.1038/nrclinonc.2013.12.
- [25] J. Weitz, M. Koch, J. Debus, T. Höhler, P. R. Galle, and M. W. Büchler, “Colorectal cancer,” in *Lancet*, 2005, vol. 365, no. 9454, pp. 153–165, doi: 10.1016/S0140-6736(05)17706-X.
- [26] K. W. Jasperson, T. M. Tuohy, D. W. Neklason, and R. W. Burt, “Hereditary and Familial Colon Cancer,” *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, p. 2044, 2010, doi: 10.1053/J.GASTRO.2010.01.054.
- [27] K. Wells and P. E. Wise, “Hereditary Colorectal Cancer Syndromes,” *Surg. Clin. North Am.*, vol. 97, no. 3, pp. 605–625, 2017, doi: 10.1016/j.suc.2017.01.009.
- [28] F. C. Da Silva, P. Wernhoff, C. Dominguez-Barrera, and M. Dominguez-Valentin, “Update on hereditary colorectal cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 36, no. 9, pp. 4399–4406, 2016, doi: 10.21873/anticancer.10983.
- [29] W. M. Grady, “Genetic testing for high-risk colon cancer patients,” *Gastroenterology*, vol. 124, no. 6, pp. 1574–1594, 2003, doi: 10.1016/S0016-5085(03)00376-7.
- [30] R. Mundade, T. F. Imperiale, L. Prabhu, P. J. Loehrer, and T. Lu, “Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer,” *Oncoscience*, vol. 1, no. 6, pp. 400–406, 2014, doi: 10.18632/oncoscience.59.
- [31] K. B. Geiersbach and W. S. Samowitz, “Microsatellite instability and colorectal cancer,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 135, no. 10, pp. 1269–1277, 2011, doi: 10.5858/arpa.2011-0035-RA.
- [32] D. J. Weisenberger *et al.*, “CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer,” *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 7, pp. 787–793, 2006, doi: 10.1038/ng1834.
- [33] Poulouse, “乳鼠心肌提取HHS Public Access,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [34] L. Shen *et al.*, “Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 47, pp. 18654–18659, 2007, doi: 10.1073/pnas.0704652104.
- [35] E. R. Fearon and B. Vogelstein, “A genetic model for colorectal tumorigenesis,” *Cell*, vol. 61, no. 5. Cell, pp. 759–767, 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-I.
- [36] M. S. Pino and D. C. Chung, “The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer,” *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2059–2072, 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- [37] J. Schneikert and J. Behrens, “The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development,” *Gut*, vol. 56, no. 3. pp. 417–425, Mar-2007, doi: 10.1136/gut.2006.093310.
- [38] B. Rubinfeld, I. Albert, E. Porfiri, C. Fiol, S. Munemitsu, and P. Polakis, “Binding of GSK3 β to the APC- β -Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly,” *Science (80-.)*, vol. 272, no. 5264, pp. 1023–1026, May 1996, doi: 10.1126/SCIENCE.272.5264.1023.
- [39] S. Cottrell, W. F. Bodmer, D. Bicknell, and L. Kaklamanis, “Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas,” *Lancet*, vol. 340, no. 8820, pp. 626–630, Sep. 1992, doi: 10.1016/0140-6736(92)92169-G.
- [40] M. B *et al.*, “Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 4, pp. 1603–1608,

- Feb. 1999, doi: 10.1073/PNAS.96.4.1603.
- [41] P. Polakis, "Wnt signaling and cancer," *Genes Dev.*, vol. 14, no. 15, pp. 1837–1851, Aug. 2000, doi: 10.1101/GAD.14.15.1837.
- [42] P. J. Morin *et al.*, "Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC," *Science (80-)*, vol. 275, no. 5307, pp. 1787–1790, 1997, doi: 10.1126/science.275.5307.1787.
- [43] J. P. Morton and O. J. Sansom, "MYC- γ mice: From tumour initiation to therapeutic targeting of endogenous MYC," *Mol. Oncol.*, vol. 7, no. 2, pp. 248–258, 2013, doi: 10.1016/j.molonc.2013.02.015.
- [44] R. J. Leary *et al.*, "Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 42, pp. 16224–16229, 2008, doi: 10.1073/pnas.0808041105.
- [45] N. Z. A. Hassan *et al.*, "Integrated analysis of copy number variation and genome-wide expression profiling in colorectal cancer tissues," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0092553.
- [46] M. Elbadawy, T. Usui, H. Yamawaki, and K. Sasaki, "Emerging roles of C-myc in cancer stem cell-related signaling and resistance to cancer chemotherapy: A potential therapeutic target against colorectal cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 9, 2019, doi: 10.3390/ijms20092340.
- [47] M. Gabay, Y. Li, and D. W. Felsher, "MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 4, no. 6, 2014, doi: 10.1101/cshperspect.a014241.
- [48] S. Nait Slimane *et al.*, "Ribosome Biogenesis Alterations in Colorectal Cancer," *Cells*, vol. 9, no. 11, pp. 1–25, 2020, doi: 10.3390/cells9112361.
- [49] S. J. Cohen, R. B. Cohen, and N. J. Meropol, "Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer - More than skin deep," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 23, pp. 5374–5385, 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.02.194.
- [50] F. Ciardiello and G. Tortora, "A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor," *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. 10, pp. 2958–2970, 2001.
- [51] Z. Wang, *ERBB Receptor Signaling Promotes Ependymoma*.
- [52] N. Normanno *et al.*, "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer," *Gene*, vol. 366, no. 1, pp. 2–16, 2006, doi: 10.1016/j.gene.2005.10.018.
- [53] P. I. H. A. and B. T., "Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas," *Tumour Biol.*, vol. 21, no. 2, pp. 105–115, 2000, doi: 10.1159/000030116.
- [54] M. M and B. M., "RAS oncogenes: the first 30 years," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 459–465, Jun. 2003, doi: 10.1038/NRC1097.
- [55] A. AA, "Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, no. 14, pp. 1062–1074, Jul. 2001, doi: 10.1093/JNCI/93.14.1062.
- [56] A. T. Baines, D. Xu, and C. J. Der, "Inhibition of Ras for cancer treatment: The search continues," *Future Med. Chem.*, vol. 3, no. 14, pp. 1787–1808, Oct. 2011, doi: 10.4155/FMC.11.121.
- [57] C. S. Karapetis *et al.*, "K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer," <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0804385>, vol. 359, no. 17, pp. 1757–1765, Jul. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0804385.
- [58] C. Tan and X. Du, "KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer," *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, no. 37, pp. 5171–5180, 2012, doi: 10.3748/wjg.v18.i37.5171.
- [59] F. Bibeau *et al.*, "Impact of Fc γ R1IIa-Fc γ R1IIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1122–1129, Mar. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.18.0463.
- [60] A. K. Rustgi, "BRAF: a driver of the serrated pathway in colon cancer," *Cancer Cell*, vol. 24, no. 1, pp. 1–2, Jul. 2013, doi: 10.1016/J.CCR.2013.06.008.

- [61] J. Chen *et al.*, “BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-802.
- [62] E. Oikonomou and A. Pintzas, “Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies,” *Anticancer Res.*, vol. 26, no. 2 A, pp. 1077–1084, 2006.
- [63] Y. Samuels *et al.*, “Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells,” *Cancer Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 561–573, 2005, doi: 10.1016/J.CCR.2005.05.014.
- [64] K. M. Ryan, A. C. Phillips, and K. H. Vousden, “Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 332–337, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0955-0674(00)00216-7.
- [65] C. Kandoth *et al.*, “Mutational landscape and significance across 12 major cancer types,” *Nature*, vol. 502, no. 7471, pp. 333–339, 2013, doi: 10.1038/NATURE12634.
- [66] T. Takayama, K. Miyanishi, T. Hayashi, Y. Sato, and Y. Niitsu, “Colorectal cancer: genetics of development and metastasis,” *J. Gastroenterol.*, vol. 41, no. 3, pp. 185–192, 2006, doi: 10.1007/S00535-006-1801-6.
- [67] I. López, L. L. Oliveira, P. Tucci, F. Álvarez-Valín, R. A. Coudry, and M. Marín, “Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer,” *Gene*, vol. 499, no. 1, pp. 81–87, May 2012, doi: 10.1016/J.GENE.2012.02.011.
- [68] B. Iacopetta, “TP53 mutation in colorectal cancer,” *Hum. Mutat.*, vol. 21, no. 3, pp. 271–276, 2003, doi: 10.1002/HUMU.10175.
- [69] S. Lee, J. Rauch, and W. Kolch, “Molecular Sciences Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity,” doi: 10.3390/ijms21031102.
- [70] U. Degirmenci, M. Wang, and J. Hu, “Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy,” *Cells*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/CELLS9010198.
- [71] T. Reya and H. Clevers, “Wnt signalling in stem cells and cancer,” *Nat. 2005 4347035*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–850, Apr. 2005, doi: 10.1038/nature03319.
- [72] J. L. Bos *et al.*, “Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers,” *Nature*, vol. 327, no. 6120, pp. 293–297, 1987, doi: 10.1038/327293A0.
- [73] H. Davies *et al.*, “Mutations of the BRAF gene in human cancer,” *Nature*, vol. 417, no. 6892, pp. 949–954, Jun. 2002, doi: 10.1038/NATURE00766.
- [74] Y. Xu and B. Pasche, “TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16 Spec No 1, no. SPEC, Apr. 2007, doi: 10.1093/HMG/DDL486.
- [75] S. J. Baker, S. Markowitz, E. R. Fearon, J. K. V. Willson, and B. Vogelstein, “Suppression of Human Colorectal Carcinoma Cell Growth by Wild-Type p53,” *Science (80-)*, vol. 249, no. 4971, pp. 912–915, 1990, doi: 10.1126/SCIENCE.2144057.
- [76] S. Olivier, A. M. Mir, J. C. Michalski, and T. Lefebvre, “Signalisation et prédispositions métaboliques liées au cancer colorectal,” *Medecine/Sciences*, vol. 27, no. 5, pp. 514–520, 2011, doi: 10.1051/medsci/2011275017.
- [77] H. Brenner, M. Kloor, and C. P. Pox, “Colorectal cancer,” in *The Lancet*, 2014, vol. 383, no. 9927, pp. 1490–1502, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- [78] C. C. Compton and F. L. Greene, “The Staging of Colorectal Cancer: 2004 and Beyond,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 54, no. 6, pp. 295–308, 2004, doi: 10.3322/canjclin.54.6.295.
- [79] E. M. B. Van Heijningen *et al.*, “Features of adenoma and colonoscopy associated with recurrent colorectal neoplasia based on a large community-based study,” *Gastroenterology*, vol. 144, no. 7, pp. 1410–1418, 2013, doi: 10.1053/J.GASTRO.2013.03.002.
- [80] E. J. Kuipers *et al.*, “Colorectal cancer,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 1, Nov. 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
- [81] T. Heikkinen *et al.*, “Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: Short-term outcomes of a randomised trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 6, no. 7, pp. 477–484, 2005, doi: 10.1016/S1470-2045(05)70221-7.
- [82] S. Trastulli *et al.*, “Robotic resection compared with laparoscopic rectal resection for cancer:

- Systematic review and meta-analysis of short-term outcome,” *Color. Dis.*, vol. 14, no. 4, 2012, doi: 10.1111/j.1463-1318.2011.02907.x.
- [83] H. Brenner, M. Kloor, and C. P. Pox, “Colorectal cancer,” *Lancet*, vol. 383, no. 9927, pp. 1490–1502, 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- [84] E. J. R. De Graaf *et al.*, “Transanal endoscopic microsurgery versus total mesorectal excision of T1 rectal adenocarcinomas with curative intention,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1280–1285, 2009, doi: 10.1016/j.ejso.2009.05.001.
- [85] R. J. Heald and R. D. H. Ryall, “Recurrence and Survival After Total Mesorectal Excision for Rectal Cancer,” *Lancet*, vol. 327, no. 8496, pp. 1479–1482, 1986, doi: 10.1016/S0140-6736(86)91510-2.
- [86] K. M. Ramji *et al.*, “Comparison of clinical and economic outcomes between robotic, laparoscopic, and open rectal cancer surgery: early experience at a tertiary care center,” *Surg. Endosc.*, vol. 30, no. 4, pp. 1337–1343, 2016, doi: 10.1007/s00464-015-4390-8.
- [87] J. Tey *et al.*, “Palliative radiotherapy for gastric cancer: A systematic review and meta-analysis,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 15, pp. 25797–25805, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15554.
- [88] W. Van Gijn *et al.*, “Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 12, no. 6, pp. 575–582, 2011, doi: 10.1016/S1470-2045(11)70097-3.
- [89] R. Sauer *et al.*, “Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 16, pp. 1926–1933, Jun. 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.40.1836.
- [90] D. Sebag-Montefiore *et al.*, “Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial,” *Lancet (London, England)*, vol. 373, no. 9666, pp. 811–820, 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60484-0.
- [91] E. Pérez-Herrero and A. Fernández-Medarde, “Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 93, pp. 52–79, 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
- [92] B. A. Chabner and T. G. Roberts, “Chemotherapy and the war on cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 65–72, 2005, doi: 10.1038/nrc1529.
- [93] P. G. Johnston and S. Kaye, “Capecitabine: A novel agent for the treatment of solid tumors,” *Anticancer. Drugs*, vol. 12, no. 8, pp. 639–646, 2001, doi: 10.1097/00001813-200109000-00001.
- [94] D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston, “5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 330–338, 2003, doi: 10.1038/nrc1074.
- [95] J. E. Wright *et al.*, “Selective Expansion of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Pools and Modulation of 5-Fluorouracil Antitumor Activity by Leucovorin in Vivo,” *Cancer Res.*, vol. 49, no. 10, pp. 2592–2596, 1989.
- [96] “Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. *J. Clin. Oncol.* 10, 896–903 (1992).
- [97] A. A. Adjei, “A review of the pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 48, no. 3, pp. 265–277, 1999, doi: 10.1046/j.1365-2125.1999.00010.x.
- [98] P. M. Hoff, J. Cassidy, and H. Schmoll, “The Evolution of Fluoropyrimidine Therapy: From Intravenous to Oral,” *Oncologist*, vol. 6, no. S4, pp. 3–11, 2001, doi: 10.1634/theoncologist.6-suppl_4-3.
- [99] J. Schüller *et al.*, “Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 45, no. 4, pp. 291–297, 2000, doi: 10.1007/s002800050043.
- [100] H. Hurwitz *et al.*, “A randomized, phase II trial of standard triweekly compared with dose-

- dense biweekly capecitabine plus oxaliplatin plus bevacizumab as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: XELOX-A-DVS (dense versus standard)," *Oncologist*, vol. 17, no. 7, pp. 937–946, Jul. 2012, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2012-0071.
- [101] L. M. Wagner, "Fifteen years of irinotecan therapy for pediatric sarcoma: where to next?," *Clin. Sarcoma Res.*, vol. 5, no. 1, p. 20, Dec. 2015, doi: 10.1186/S13569-015-0035-X.
- [102] Y. Pommier, "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond," *Nat. Rev. Cancer* 2006 610, vol. 6, no. 10, pp. 789–802, Oct. 2006, doi: 10.1038/NRC1977.
- [103] C. Bailly, "Irinotecan: 25 years of cancer treatment," *Pharmacol. Res.*, vol. 148, no. August, 2019, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104398.
- [104] F. Li, T. Jiang, Q. Li, and X. Ling, "Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer?," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 7, no. 12, p. 2350, 2017.
- [105] T. Alcindor and N. Beauger, "Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy," *Curr. Oncol.*, vol. 18, no. 1, pp. 18–25, 2011, doi: 10.3747/co.v18i1.708.
- [106] H. Ehrsson, I. Wallin, and J. Yachnin, "Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans," *Med. Oncol.*, vol. 19, no. 4, pp. 261–265, 2002, doi: 10.1385/MO:19:4:261.
- [107] V. De Falco *et al.*, "How we treat metastatic colorectal cancer," *ESMO open*, vol. 4, p. e000813, 2020, doi: 10.1136/esmoopen-2020-000813.
- [108] Y. H. Xie, Y. X. Chen, and J. Y. Fang, "Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 5, no. 1. Springer Nature, 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.
- [109] E. Van Cutsem, A. Cervantes, B. Nordlinger, and & D. Arnold, "Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up †," 2014, doi: 10.1093/annonc/mdu260.
- [110] R. Vera *et al.*, "Current controversies in the management of metastatic colorectal cancer," *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2015 764, vol. 76, no. 4, pp. 659–677, Jun. 2015, doi: 10.1007/S00280-015-2808-6.
- [111] Y. T. Lee, Y. J. Tan, and C. E. Oon, "Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 834, pp. 188–196, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2018.07.034.
- [112] J. Mendelsohn, M. Prewett, P. Rockwell, and N. I. Goldstein, "CCR 20th Anniversary Commentary: A Chimeric Antibody, C225, Inhibits EGFR Activation and Tumor Growth," *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 2, pp. 227–229, Jan. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2491.
- [113] C. L. Arteaga and J. A. Engelman, "ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics," *Cancer Cell*, vol. 25, no. 3, pp. 282–303, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.CCR.2014.02.025.
- [114] T. Sasaki, K. Hiroki, and Y. Yamashita, "The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 546318, 2013, doi: 10.1155/2013/546318.
- [115] H. Taniguchi *et al.*, "Panitumumab versus cetuximab in patients with wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer who received prior bevacizumab therapy: A combined analysis of individual patient data from ASPECCT and WJOG6510G. ," *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 4_suppl, pp. 745–745, Feb. 2018, doi: 10.1200/JCO.2018.36.4_SUPPL.745.
- [116] S. Qin *et al.*, "Efficacy and tolerability of first-line cetuximab plus leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: The open-label, randomized, phase III TAILOR trial," *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 30, pp. 3031–3039, Oct. 2018, doi: 10.1200/JCO.2018.78.3183.
- [117] Eton & Lepore, "NIH Public Access," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.025.ERBB.
- [118] C. Garbe and T. K. Eigentler, "Vemurafenib," pp. 77–89, doi: 10.1007/978-3-319-91442-8.
- [119] I. Proietti *et al.*, "BRAF inhibitors: Molecular targeting and immunomodulatory actions," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 7, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3390/cancers12071823.
- [120] S. Kopetz *et al.*, "Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-

- Mutated Colorectal Cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 34, pp. 4032–4038, Dec. 2015, doi: 10.1200/JCO.2015.63.2497.
- [121] P. Saharinen, L. Eklund, K. Pulkki, P. Bono, and K. Alitalo, "VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis," *Trends Mol. Med.*, vol. 17, no. 7, pp. 347–362, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.MOLMED.2011.01.015.
- [122] K. K. H. Goey *et al.*, "Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab versus observation in metastatic colorectal cancer: Updated results and molecular subgroup analyses of the phase 3 CAIRO3 study," *Ann. Oncol.*, vol. 28, no. 9, pp. 2128–2134, 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx322.
- [123] P. A. Tang *et al.*, "Phase II clinical and pharmacokinetic study of aflibercept in patients with previously treated metastatic colorectal cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 21, pp. 6023–6031, Nov. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3252.
- [124] J. Tabernero *et al.*, "Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study," *Lancet Oncol.*, vol. 16, no. 5, pp. 499–508, May 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(15)70127-0.
- [125] D. M. Pardoll, "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 252–264, Apr. 2012, doi: 10.1038/NRC3239.
- [126] L. Hirsch, L. Zitvogel, A. Eggermont, and A. Marabelle, "PD-Loma: a cancer entity with a shared sensitivity to the PD-1/PD-L1 pathway blockade," *Br. J. Cancer*, vol. 120, no. 1, pp. 3–5, Jan. 2019, doi: 10.1038/S41416-018-0294-4.
- [127] S. L. Topalian *et al.*, "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 26, pp. 2443–2454, Jun. 2012, doi: 10.1056/NEJMOA1200690.
- [128] A. J. Franke *et al.*, "Immunotherapy for Colorectal Cancer: A Review of Current and Novel Therapeutic Approaches," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 111, no. 11, pp. 1131–1141, 2019, doi: 10.1093/jnci/djz093.
- [129] K. M. Bever and D. T. Le, "An Expanding Role for Immunotherapy in Colorectal Cancer," *J. Natl. Compr. Cancer Netw.*, vol. 15, no. 3, pp. 401–410, Mar. 2017, doi: 10.6004/JNCCN.2017.0037.
- [130] D. B. Longley and P. G. Johnston, "Molecular mechanisms of drug resistance," *J. Pathol.*, vol. 205, no. 2, pp. 275–292, Jan. 2005, doi: 10.1002/PATH.1706.
- [131] A. Bardelli and S. Siena, "Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1254–1261, Mar. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.24.6116.
- [132] W. A. Hammond, A. Swaika, and K. Mody, "Pharmacologic resistance in colorectal cancer: A

- review," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 8, no. 1, pp. 57–84, 2016, doi: 10.1177/1758834015614530.
- [133] M. M. Gottesman, T. Fojo, and S. E. Bates, "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters," *Nat. Rev. Cancer* 2002 21, vol. 2, no. 1, pp. 48–58, 2002, doi: 10.1038/nrc706.
- [134] D. Salonga *et al.*, "Colorectal Tumors Responding to 5-Fluorouracil Have Low Gene Expression Levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, and Thymidine Phosphorylase," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 4, 2000.
- [135] "The Role of Thymidylate Synthase Induction in Modulating p53-regulated Gene Expression in Response to 5-Fluorouracil and Antifolates | Cancer Research." [Online]. Available: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/62/9/2644> . [Accessed: 04-Feb-2022].
- [136] C. Esposito *et al.*, "The S492R EGFR ectodomain mutation is never detected in KRAS wild-type colorectal carcinoma before exposure to EGFR monoclonal antibodies," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 14, no. 12, p. 1143, Dec. 2013, doi: 10.4161/CBT.26340.
- [137] A. Sood *et al.*, "pten gene expression and mutations in the pik3ca gene as predictors of clinical benefit to anti epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with kras wild type metastatic colorectal cancer," *Clin. Colorectal Cancer*, vol. 11, no. 2, p. 143, 2012, doi: 10.1016/J.CLCC.2011.12.001.
- [138] A. Sartore-Bianchi *et al.*, "Multi-Determinants Analysis of Molecular Alterations for Predicting Clinical Benefit to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies in Colorectal Cancer," *PLoS One*, vol. 4, no. 10, p. e7287, Oct. 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0007287.
- [139] X. Sagaert, A. Vanstapel, and S. Verbeek, "Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far?," *Pathobiology*, vol. 85, no. 1–2, pp. 72–84, 2018, doi: 10.1159/000486721.
- [140] S. V. Sharma *et al.*, "A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations," *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 69–80, 2010, doi: 10.1016/J.CELL.2010.02.027.
- [141] G. Therizols *et al.*, "Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance," *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, 2022, doi: 10.1038/s41467-021-27847-8.
- [142] D. Kressler, E. Hurt, and J. Baßler, "Driving ribosome assembly," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1803, no. 6, pp. 673–683, 2010, doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.10.009.
- [143] J. Pelletier and N. Sonenberg, "The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 88. Annual Reviews Inc., pp. 307–335, 2019, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111042.
- [144] M. Aubert, M. F. O'Donohue, S. Lebaron, and P. E. Gleizes, "Pre-Ribosomal RNA Processing in Human Cells: From Mechanisms to Congenital Diseases," *Biomolecules*, vol. 8, no. 4. NLM (Medline), Oct-2018, doi: 10.3390/biom8040123.
- [145] D. Drygin, W. G. Rice, and I. Grummt, "The RNA Polymerase I Transcription Machinery: An Emerging Target for the Treatment of Cancer," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 50, no. 1, pp. 131–156, 2010, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105844.
- [146] H. Khatler, A. G. Myasnikov, S. K. Natchiar, and B. P. Klaholz, "Structure of the human 80S ribosome," *Nature*, vol. 520, no. 7549, pp. 640–645, 2015, doi: 10.1038/nature14427.
- [147] R. Nazar, "Ribosomal RNA Processing and Ribosome Biogenesis in Eukaryotes," *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)*, vol. 56, no. 8, pp. 457–465, Aug. 2004, doi: 10.1080/15216540400010867.
- [148] J. Pelletier, G. Thomas, and S. Volarevi, "Ribosome biogenesis in cancer: New players and therapeutic avenues," *Nature Reviews Cancer*, vol. 18, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 51– 63, 20-Dec-2017, doi: 10.1038/nrc.2017.104.
- [149] S. T. Mullineux and D. L. J. Lafontaine, "Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand?," *Biochimie*, vol. 94, no. 7, pp. 1521–1532, 2012, doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.001.
- [150] S. Sharma and D. L. J. Lafontaine, "'View From A Bridge': A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification," vol. 40, no. 10, 2015, doi: 10.1016/j.tibs.2015.07.008.

- [151] J. Erales *et al.*, "Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 49, pp. 12934–12939, Dec. 2017, doi: 10.1073/pnas.1707674114.
- [152] J. Baßler and E. Hurt, "Eukaryotic Ribosome Assembly," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 88, no. 1, pp. 281–306, 2019, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-110817.
- [153] D. Ruggero and P. P. Pandolfi, "Does the ribosome translate cancer?," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 179–192, Mar-2003, doi: 10.1038/nrc1015.
- [154] D. Ruggero, "Translational control in cancer etiology," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 2, 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a012336.
- [155] P. K. Vogt, "PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 7, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 482–484, 2001, doi: 10.1016/S1471-4914(01)02161-X.
- [156] K. J. Campbell and R. J. White, "MYC Regulation of Cell Growth through Control of Transcription by RNA Polymerases I and III," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 4, no. 5, Jan. 2014, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A018408.
- [157] D. Treré, C. Ceccarelli, L. Montanaro, E. Tosti, and M. Derenzini, "Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 52, no. 12, pp. 1601–1607, 2004, doi: 10.1369/jhc.4A6454.2004.
- [158] K. Burger *et al.*, "Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 16, pp. 12416–12425, 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.074211.
- [159] X. Zhao and Y.-T. Yu, "Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo," doi: 10.1093/nar/gkl1084.
- [160] F. Catez, N. Dalla Venezia, V. Marcel, C. Zorbas, D. L. J. Lafontaine, and J. J. Diaz, "Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 159, no. November 2018, pp. 74–81, 2019, doi: 10.1016/j.bcp.2018.11.014.
- [161] D. Ruggero, "Revisiting the nucleolus: From marker to dynamic integrator of cancer signaling," *Science Signaling*, vol. 5, no. 241. Sci Signal, 11-Sep-2012, doi: 10.1126/scisignal.2003477.
- [162] M. J. Bywater *et al.*, "Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 1, pp. 51–65, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.019.
- [163] D. Drygin *et al.*, "Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 4, pp. 1418–1430, 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1728.
- [164] D. Drygin *et al.*, "Anticancer activity of CX-3543: A direct inhibitor of rRNA biogenesis," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 19, pp. 7653–7661, 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1304.
- [165] K. Peltonen *et al.*, "A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity," *Cancer Cell*, vol. 25, no. 1, pp. 77–90, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2013.12.009.
- [166] D. Awad *et al.*, "Inhibiting eukaryotic ribosome biogenesis," *BMC Biol.*, vol. 17, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s12915-019-0664-2.
- [167] B. Pertschy *et al.*, "Diazaborine Treatment of Yeast Cells Inhibits Maturation of the 60S Ribosomal Subunit," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 14, pp. 6476–6487, 2004, doi: 10.1128/MCB.24.14.6476-6487.2004.
- [168] A. Bastide and A. David, "The ribosome, (slow) beating heart of cancer (stem) cell," *Oncogenesis*, vol. 7, no. 4, p. 34, 2018, doi: 10.1038/s41389-018-0044-8.
- [169] S. Rennoll and G. Yochum, "Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer," *World J. Biol. Chem.*, vol. 6, no. 4, p. 290, 2015, doi: 10.4331/WJBC.V6.I4.290.
- [170] J. Van Riggelen, A. Yetil, and D. W. Felsher, "MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 4, pp. 301–309, 2010, doi: 10.1038/nrc2819.
- [171] T. Oskarsson and A. Trumpp, "The Myc trilogy: Lord of RNA polymerases," *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 215–217, Mar. 2005, doi: 10.1038/ncb0305-215.
- [172] M. Mu *et al.*, "A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing," vol. 31, no. 21,

- pp. 6148–6156, 2003, doi: 10.1093/nar/gkg794.
- [173] K. I. Zeller, T. J. Haggerty, J. F. Barrett, Q. Guo, D. R. Wonsey, and C. V. Dang, “Characterization of Nucleophosmin (B23) as a Myc Target by Scanning Chromatin Immunoprecipitation *,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 48285–48291, Dec. 2001, doi: 10.1074/JBC.M108506200.
- [174] C. Grandori *et al.*, “c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 311–318, Mar. 2005, doi: 10.1038/ncb1224.
- [175] S. Kharde, F. R. Calviño, A. Gumiero, K. Wild, and I. Sinning, “The structure of Rpf2–Rrs1 explains its role in ribosome biogenesis,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 14, p. 7083, Aug. 2015, doi: 10.1093/NAR/GKV640.
- [176] J. D. Watson, S. K. Oster, M. Shago, F. Khosravi, and L. Z. Penn, “Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 40, pp. 36921–36930, Oct. 2002, doi: 10.1074/jbc.M201493200.
- [177] X. L. Wu *et al.*, “RRS1 silencing suppresses colorectal cancer cell proliferation and tumorigenesis by inhibiting G2/M progression and angiogenesis,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 47, pp. 82968–82980, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20897.
- [178] M. Rohmoser *et al.*, “Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 Controls Nucleolar Localization and Assembly of the PeBoW Complex Required for Maturation of the 60S Ribosomal Subunit,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 10, pp. 3682–3694, May 2007, doi: 10.1128/mcb.00172-07.
- [179] W. Xie *et al.*, “Transcriptional regulation of PES1 expression by c-Jun in colon cancer,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042253.
- [180] W. Xie, L. Qu, L. Meng, C. Liu, J. Wu, and C. Shou, “PES1 regulates sensitivity of colorectal cancer cells to anticancer drugs,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 431, no. 3, pp. 460–465, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.145.
- [181] A. Killian *et al.*, “Contribution of the BOP1 gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis,” *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 45, no. 9, pp. 874–881, Sep. 2006, doi: 10.1002/GCC.20351.
- [182] E. H. Lips *et al.*, “Integrating chromosomal aberrations and gene expression profiles to dissect rectal tumorigenesis,” *BMC Cancer*, vol. 8, Oct. 2008, doi: 10.1186/1471-2407-8-314.
- [183] “Block of proliferation 1 promotes cell migration and invasion in human colorectal cancer cells via the JNK pathway,” 2020, doi: 10.1002/jcla.23283.
- [184] J. Qi *et al.*, “New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals,” *Gut*, vol. 65, no. 10, pp. 1690–1701, 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2014-307900.
- [185] L. C. Sun and H. X. Qian, “Screening for implicated genes in colorectal cancer using whole-genome gene expression profiling,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 17, no. 6, pp. 8260–8268, Jun. 2018, doi: 10.3892/MMR.2018.8862.
- [186] K. E. Sloan, A. S. Warda, S. Sharma, K. D. Entian, D. L. J. Lafontaine, and M. T. Bohnsack, “Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function,” *RNA Biology*, vol. 14, no. 9. Taylor and Francis Inc., pp. 1138–1152, Sep-2017, doi: 10.1080/15476286.2016.1259781.
- [187] M. F. Burke, M. K. Logan, and M. D. Hebert, “Identification of additional regulatory RNPs that impact rRNA and U6 snRNA methylation,” *Biol. Open*, vol. 7, no. 8, 2018, doi: 10.1242/BIO.036095.
- [188] J. Y. He *et al.*, “Small Nucleolar RNA, C/D Box 16 (SNORD16) Acts as a Potential Prognostic Biomarker in Colon Cancer,” *Dose-Response*, vol. 18, no. 2, 2020, doi: 10.1177/1559325820917829.
- [189] V. Marcel *et al.*, “Ribosomal RNA 2’O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer,” *NAR Cancer*, vol. 2, no. 4, Dec. 2020, doi: 10.1093/narcan/zcaa036.
- [190] U. Rodriguez-Corona, M. Sobol, L. C. Rodriguez-Zapata, P. Hozak, and E. Castano, “Fibrillarin

- from Archaea to human.," *Biol. cell*, vol. 107, no. 6, pp. 159–174, 2015, doi: 10.1111/boc.201400077.
- [191] M. Y. Shubina, Y. R. Musinova, and E. V Sheval, "Nucleolar Methyltransferase Fibrillarin: Evolution of Structure and Functions.," *Biochemistry. (Mosc.)*, vol. 81, no. 9, pp. 941–950, Sep. 2016, doi: 10.1134/S0006297916090030.
- [192] D. Tollervey, H. Lehtonen, R. Jansen, H. Kern, and E. C. Hurt, "Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly," *Cell*, vol. 72, no. 3, pp. 443–457, Feb. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90120-F.
- [193] P. Shaw and J. Brown, "Update on the Nucleolus Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics," doi: 10.1104/pp.111.188052.
- [194] Y. Sasano, Y. Hokii, K. Inoue, H. Sakamoto, C. Ushida, and T. Fujiwara, "Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarin during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*," *Biochimie*, vol. 90, no. 6, pp. 898–907, 2008, doi: 10.1016/j.biochi.2008.02.001.
- [195] F. J. Medina, A. Cerdido, and M. E. Fernández-Gómez, "Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli," *Exp. Cell Res.*, vol. 221, no. 1, pp. 111–125, 1995, doi: 10.1006/EXCR.1995.1358.
- [196] L. Loza-Muller, U. Rodríguez-Corona, M. Sobol, L. C. Rodríguez-Zapata, P. Hozak, and E. Castano, "Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active promoters in *Brassica oleracea*," *Front. Plant Sci.*, vol. 6, no. NOVEMBER, p. 976, Nov. 2015, doi: 10.3389/FPLS.2015.00976/BIBTEX.
- [197] Z. Kiss-László, Y. Henry, and T. Kiss, "Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA.," *EMBO J.*, vol. 17, no. 3, p. 797, Feb. 1998, doi: 10.1093/EMBOJ/17.3.797.
- [198] S. Massenet, E. Bertrand, and C. Verheggen, "Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs," *RNA Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 680–692, Jun. 2017, doi: 10.1080/15476286.2016.1243646.
- [199] S. Kass, K. Tyc, J. A. Steitz, and B. Sollner-Webb, "The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing," *Cell*, vol. 60, no. 6, pp. 897–908, Mar. 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90338-F.
- [200] D. A. Adamiak, J. Milecki, M. Popena, R. W. Adamiak, Z. Dauter, and W. R. Rypniewski, "Crystal structure of 2'-O-Me(CGCGCG)₂, an RNA duplex at 1.30 Å resolution. Hydration pattern of 2'-O-methylated RNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 22, pp. 4599–4607, 1997, doi: 10.1093/NAR/25.22.4599.
- [201] X. Liang, Q. Liu, and M. J. Fournier, "Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing," *RNA*, vol. 15, no. 9, pp. 1716–1728, Sep. 2009, doi: 10.1261/RNA.1724409.
- [202] T. H. King, B. Liu, R. R. McCully, and M. J. Fournier, "Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 425–435, Feb. 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00040-6.
- [203] A. Baudin-baillieu, C. Fabret, X. H. Liang, D. Piekna-Przybylska, M. J. Fournier, and J. P. Rousset, "Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 22, p. 7665, Oct. 2009, doi: 10.1093/NAR/GKP816.
- [204] S. Weingarten-Gabbay *et al.*, "Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes," *Science*, vol. 351, no. 6270, Jan. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAD4939.
- [205] M. J. Bywater *et al.*, "Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 1, pp. 51–65, 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.019.
- [206] V. Marcel *et al.*, "P53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and

- rRNA Methylation in Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 24, no. 3, pp. 318–330, 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.013.
- [207] C. M. Koh *et al.*, “Alterations in nucleolar structure and gene expression programs in prostatic neoplasia are driven by the MYC oncogene,” *Am. J. Pathol.*, vol. 178, no. 4, pp. 1824–1834, 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2010.12.040.
- [208] Y. W. Choi *et al.*, “Identification of Differentially Expressed Genes Using Annealing Control Primer-based GeneFishing in Human Squamous Cell Cervical Carcinoma,” *Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 5, pp. 308–318, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.CLON.2007.02.010.
- [209] D. Martínez-Maqueda, B. Miralles, and I. Recio, “HT29 Cell Line,” *Impact Food Bioact. Heal. Vit. Ex Vivo Model.*, pp. 113–124, Jan. 2015, doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_11.
- [210] “Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pubmed/29192214>. [Accessed: 31-Mar-2020].
- [211] J. Eroles *et al.*, “Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 49, pp. 12934–12939, 2017, doi: 10.1073/pnas.1707674114.
- [212] S. Xue and M. Barna, “Specialized ribosomes: A new frontier in gene regulation and organismal biology,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 13, no. 6, Nat Rev Mol Cell Biol, pp. 355–369, 2012, doi: 10.1038/nrm3359.
- [213] V. Marcel, F. Catez, and J.-J. J. Diaz, “No Title,” *Oncogene*, vol. 34, no. 44, Nature Publishing Group, pp. 5513–5523, 2015, doi: 10.1038/onc.2015.25.
- [214] F. Casale *et al.*, “Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients,” *Pharmacol. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 173–179, Aug. 2004, doi: 10.1016/J.PHRS.2004.01.006.
- [215] X. hai Liang, Q. Liu, and M. J. Fournier, “rRNA Modifications in an Intersubunit Bridge of the Ribosome Strongly Affect Both Ribosome Biogenesis and Activity,” *Mol. Cell*, vol. 28, no. 6, pp. 965–977, Dec. 2007, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.10.012/ATTACHMENT/186B5466-8498-444F-A4E7-C9032F0241EF/MMC1.PDF.
- [216] S. Higa-Nakamine *et al.*, “Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 1, p. 391, Jan. 2012, doi: 10.1093/NAR/GKR700.
- [217] M. A. Amin *et al.*, “Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 360, no. 2, pp. 320–326, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.BBRC.2007.06.092.
- [218] S. R. Gross, “Actin binding proteins,” <http://dx.doi.org/10.4161/cam.23176>, vol. 7, no. 2, pp. 199–213, 2013, doi: 10.4161/CAM.23176.
- [219] J. P. Their, “Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 6, pp. 442–454, 2002, doi: 10.1038/NRC822.
- [220] P. Navarro, M. Gómez, A. Pizarro, C. Gamallo, M. Quintanilla, and A. Cano, “A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis,” *J. Cell Biol.*, vol. 115, no. 2, pp. 517–533, 1991, doi: 10.1083/JCB.115.2.517.
- [221] T. Otsubo *et al.*, “Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal carcinogenesis,” *Mod. Pathol.*, vol. 17, no. 4, pp. 461–467, Apr. 2004, doi: 10.1038/MODPATHOL.3800062.
- [222] K. Iwaya *et al.*, “Correlation between liver metastasis of the colocalization of actin-related protein 2 and 3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma,” *Cancer Sci.*, vol. 98, no. 7, pp. 992–999, Jul. 2007, doi: 10.1111/J.1349-7006.2007.00488.X.
- [223] N. Robichaud, N. Sonenberg, D. Ruggero, and R. J. Schneider, “Translational control in cancer,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 11, no. 7, 2019, doi: 10.1101/cshperspect.a032896.
- [224] G. Therizols *et al.*, “Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favours cancer cell drug-tolerance,” *bioRxiv*, no. June, 2020, doi: 10.1101/2020.06.04.131201.
- [225] O. Larsson, A. Girnita, and L. Girnita, “Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 92, no. 12, p. 2097, Jun. 2005, doi: 10.1038/SJ.BJC.6602627.
- [226] M. Höpfner, A. P. Sutter, A. Huether, V. Baradari, and H. Scherübl, “Tyrosine kinase of insulin-

like growth factor receptor as target for novel treatment and prevention strategies of colorectal cancer COLORECTAL CANCER," *World J Gastroenterol*, vol. 12, no. 35, pp. 5635–5643, 2006.

- [227] Z. Bash-Imam *et al.*, "Translational reprogramming of colorectal cancer cells induced by 5-fluorouracil through a miRNA-dependent mechanism," *Oncotarget*, vol. 8, no. 28, pp. 46219–46233, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.17597.

VIII. Publications

Review

Ribosome Biogenesis Alterations in Colorectal Cancer

Sophie Nait Slimane ¹, Virginie Marcel ¹ , Tanguy Fenouil ², Frédéric Catez ¹ ,
Jean-Christophe Saurin ³, Philippe Bouvet ¹ , Jean-Jacques Diaz ^{1,*} and Hichem C. Mertani ^{1,*} 

¹ Cancer Initiation and Tumor Cell Identity, Cancer Research Center of Lyon, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm U1052, CNRS UMR5286 Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; sophie.NAITSILIMANE@lyon.unicancer.fr (S.N.S.); virginie.marcel@lyon.unicancer.fr (V.M.); frederic.catez@lyon.unicancer.fr (F.C.); pbouvet@ens-lyon.fr (P.B.)

² Institute of Pathology EST, Hospices Civils de Lyon, Site-Est Groupement Hospitalier- Est, 69677 Bron, France; tanguy.fenouil@chu-lyon.fr

³ Gastroenterology and Genetic Department, Edouard Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, 69008 Lyon, France; jean-christophe.saurin@chu-lyon.fr

* Correspondence: JeanJacques.DIAZ@lyon.unicancer.fr (J.-J.D.); hichem.mertani@lyon.unicancer.fr (H.C.M.); Tel.: +33-4-78782819 (J.-J.D. & H.C.M.)

Received: 27 September 2020; Accepted: 25 October 2020; Published: 27 October 2020



Abstract: Many studies have focused on understanding the regulation and functions of aberrant protein synthesis in colorectal cancer (CRC), leaving the ribosome, its main effector, relatively underappreciated in CRC. The production of functional ribosomes is initiated in the nucleolus, requires coordinated ribosomal RNA (rRNA) processing and ribosomal protein (RP) assembly, and is frequently hyperactivated to support the needs in protein synthesis essential to withstand unremitting cancer cell growth. This elevated ribosome production in cancer cells includes a strong alteration of ribosome biogenesis homeostasis that represents one of the hallmarks of cancer cells. None of the ribosome production steps escape this cancer-specific dysregulation. This review summarizes the early and late steps of ribosome biogenesis dysregulations described in CRC cell lines, intestinal organoids, CRC stem cells and mouse models, and their possible clinical implications. We highlight how this cancer-related ribosome biogenesis, both at quantitative and qualitative levels, can lead to the synthesis of ribosomes favoring the translation of mRNAs encoding hyperproliferative and survival factors. We also discuss whether cancer-related ribosome biogenesis is a mere consequence of cancer progression or is a causal factor in CRC, and how altered ribosome biogenesis pathways can represent effective targets to kill CRC cells. The association between exacerbated CRC cell growth and alteration of specific steps of ribosome biogenesis is highlighted as a key driver of tumorigenesis, providing promising perspectives for the implementation of predictive biomarkers and the development of new therapeutic drugs.

Keywords: ribosome; colorectal; rDNA; rRNA; translation; targeting; human; cancer

1. Introduction

In 2018, colorectal cancer (CRC) was ranked the third most frequent cancer world-wide, after lung and prostate cancers in men and lung and breast cancers in women, by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [1]. CRC is the most frequent form of gastrointestinal cancer and represents around 10% of all cancers, affecting 1.8 million new individuals each year [1]. The CRC mortality rate is slightly higher in men than in women and results in almost 880,000 deaths per year, making it the second-leading cause of cancer-related deaths [2,3]. CRC is a major health burden, as indicated by the steady increase in the incidence rate of age-standardized CRC cases over the period of 1990–2017 [4] and by more alarming data showing a significant rise in CRC cases in patients under 50 years of age [5].

CRC staging at diagnosis is mostly performed using the TNM system (Tumor–Node–Metastasis) and has a strong prognostic value, with the higher stage being associated with the poorest survival [3]. The 5-year post-operative overall survival rate is 90% in patients diagnosed with localized CRC, 70% in patients with regionalized CRC, and 14% in patients with metastatic CRC [6]. Patients with metastatic CRC have a median overall survival of 30 months [5], often resulting from deleterious metastatic liver and/or lung invasion [7]. Various approaches have been developed to curb the mortality rate of CRC, in particular to improve the early detection using different analyses such as fecal blood tests and colonoscopy, in-depth enquiry into family history, blood analysis for tumor markers [8,9], and analysis of tumor gene expression [10,11]. These practices are also reinforced by a broad panel of imaging methods [12]. Once diagnosed, clinico-pathological characterization of CRC samples is decisive for patient management and treatment choice (chemotherapy and/or irradiation as neoadjuvant or adjuvant treatment), and especially after tumor surgical resection, for assessing follow-up outcome [13,14]. Neoadjuvant chemotherapy with more or less irradiation (for rectal carcinoma) can be performed to downstage CRC before resection [3]. Targeted therapies with relative efficacy are also used to treat CRC tumors with specific molecular alterations [15]. Indeed, the choice of drugs (systemic chemotherapy or targeted treatment) against CRC is largely influenced by the molecular profile determined for each tumor [14]. The molecular characterization of colorectal tumors is based on the analysis of genetic mutations and also on the DNA microsatellite status (i.e., stable/MSS versus unstable/MSI) [16]. Frequent genetic driver mutations occur in CRC cells, enabling the development of specific cytotoxic and/or cytostatic molecules [15,17]. Among the genetic mutations, the *Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog (KRAS)* gene mutated in 40% and the *BRAF* gene mutated in 10% of CRC patients are useful predictive markers for metastatic disease [2,18,19]. Metastatic patient treatment including anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies is validated for RAS-wild-type tumors (most frequently occurring in the left colon or rectum), whereas vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody treatment is proposed for RAS-mutant tumors (most frequently involving the right colon) [20–22]. Colorectal carcinogenesis follows a step-by-step process of gene alterations often initiated by inactivating mutations in the tumor suppressor *adenomatous polyposis coli (APC)* gene [22]. Somatic APC mutations are present in almost 80% of sporadic human CRC and frequently occur within the coding sequence, resulting in a truncated defective protein [23]. This early-stage mutation is associated with the presence of polyps with low-grade intra-epithelial neoplasia [23–25]. The consequence of APC inactivation results in aberrant stimulation of the wingless/int1 (WNT) signaling pathway in colonic epithelial cells, leading to a cascade of oncogenic events ultimately forming an invasive colorectal carcinoma [25]. The hyper-stimulation of large components of the WNT signaling pathway was also demonstrated using integrative genomic analyses in large clinical CRC studies [26]. Colonic and rectal tumor progression is further promoted by inactivating mutations in the *TP53* gene, activating mutations of *KRAS* leading to constitutive activation of the epidermal growth factor (EGF) pathway, and inactivating mutations of *SMAD4* resulting in the shut-down of the proliferation inhibitory canonical pathway of transforming growth factor (TGF)- β [27–30]. More recently, epigenetic alterations including histone modifications, DNA sequence methylation, and expression of non-coding long/micro/circular RNAs has gained attention in CRC studies [31], in particular for understanding the microsatellite instability (MSI)/highly mutated subgroup [10]. However, the strong genetic and phenotypic heterogeneity of CRC samples still represents a challenge for CRC patient stratification, adapting treatment strategies, and managing chemoresistance [32]. Consequently, the identification of reliable diagnostic biomarkers and/or relevant targetable pathways associated with specific CRC subtypes is critically needed.

Among the innovative pathways of interest susceptible of improving CRC patient management, regulation of translation and ribosome biogenesis remain to be revisited based on the recent discoveries in the field. Indeed, extensive data indicate that regulation of translation, and particularly the initiation phase, is of utmost importance for the survival and growth of rapidly dividing cancer cells by providing an adapted quantitative but also qualitative cancer proteome [33–36]. The process of protein synthesis

strictly depends on the elaborate multi-step biogenesis of ribosomes with a precise spatial and functional organization to adjust cell needs [37–39]. Our general view on ribosome activity has evolved over the past ten years and the ribosome is no longer considered to be a basic platform for protein synthesis, but also a major regulating switch for gene expression at the translational level in normal [40] and cancer cells [35]. The aim of this review is to present all aspects of ribosome biogenesis alterations reported in human colorectal cancers and explore the possibility of developing neo/adjuvant therapies based on direct or indirect targeting of ribosome production in CRC.

2. Ribosome Biogenesis

Human ribosomes are ribonucleoprotein (RNP) complexes comprised of seventy-nine ribosomal proteins (RP) and four ribosomal RNAs (rRNA) [37–39,41]. In eukaryotes, ribosome biogenesis is a sequential and highly complex process finely tuned by a spatial and oriented regulation that starts in the nucleus and ends in the cytoplasm [37–39,42]. At several stages of cell life, ribosome biogenesis per se could account for more than half of the total energy of the cell [37–39]. Therefore, a stringent control of ribosome biogenesis is mandatory to adjust the amount of ribosomes to maintain cell protein synthesis demands according to microenvironmental changes, including nutrient and oxygen availability [38,39].

The mature translating ribosome found in the cytoplasm is organized in two subunits, usually called the large 60S subunit and the small 40S subunit. In humans, the 60S subunit contains the 28S, 5S, and 5.8S rRNAs and 47 RPs, while the 40S subunit contains the 18S rRNA and 33 RPs [37–39]. The 28S, 5.8S, and 18S rRNAs are synthesized by the RNA polymerase (RNA pol) I, whereas the 5S is synthesized by the RNA polymerase III [37–39]. The 28S, 18S, and 5.8S rRNAs arise from a single pre-rRNA precursor encoded by about 400 rDNA genes localized in the sub-telomeric regions of the acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 21, and 22 and organized in tandems. The 5S rRNA is encoded by different clusters of rDNA genes also tandemly organized but exclusively localized on chromosome 1 [37–39]. The first steps of ribosome biogenesis take place in particular nuclear domains called the nucleoli. Nucleoli are highly dynamic and transient nuclear domains formed around the nucleolar organizer regions (NOR) of the acrocentric chromosomes when ribosome biogenesis is activated [37–39]. Nucleoli are the densest nuclear domains easily visible in phase contrast microscopy. Their density represents the very high local concentration of proteins required for ribosome biogenesis: seventy-nine RPs, four rRNAs, and more than 250 ribosomal assembly factors [37–39]. Indeed, not only does ribosome biogenesis require the synthesis of rRNAs and their assembly with some RPs at an early step, but also many co- and post-transcriptional maturation steps of rRNA including a series of cleavages and chemical modifications, such as uridine pseudouridylation, base and ribose methylation. Altogether, these maturation processes ensure the correct tri-dimensional ribosome structure necessary for its main function, translating mRNAs into proteins [37–39,43]. As a consequence, alterations of the numerous regulators and actors of the ribosomal machinery, as observed in several pathologies and notably in cancer, dramatically impact the rate and quality of protein synthesis, and ultimately, the production of the relevant proteome from a given transcriptome.

3. An Overview of Ribosome Biogenesis in Human Cancers

Numerous studies mainly focusing on the control of rDNA gene expression have highlighted the link between dysregulation of expression of the rDNA genes and cancer. Hyperproliferative cancer cells are by definition cells with perturbed energy homeostasis and increased activity in protein synthesis [34–36,44], and thus, an increase in ribosome biogenesis participates in maintaining such a high rate of protein synthesis [45–48].

3.1. Regulation of Ribosome Biogenesis by Oncogenes and Tumor Suppressors

Cancer cells are characterized by constitutive activation of growth signals which alter the activity of major cell cycle regulating transcription factors [49,50], and the increase in ribosome biogenesis in cancer cells has been extensively linked to the sustained activation of RNA polymerases I and III by these

cell cycle transcription factors [51,52]. However, in addition to regulating rDNA gene transcription, some oncogenic transcription factors have been shown to coordinate the overall ribosome biogenesis process. For example, the proto-oncogene MYC represents an active hub toward tumorigenesis [50]. Indeed in cancer cells, MYC plays a major role in the production of ribosomes, through the direct activation of rRNA synthesis but also of a gene network which includes genes encoding all rRNA processing factors, RPs, and factors implicated in the translation machinery [53–56]. The direct binding of MYC to rDNA activates RNA pol I-mediated synthesis of the 47S rRNA precursor [57]. MYC also activates RNA pol II transcription of genes coding for ribosomal assembly factors and for RPs, as well as that of RNA pol III of 5S rRNA [58]. Therefore, the increase in ribosome biogenesis by MYC is not solely restricted to the activation of rDNA transcription but is also mediated by MYC-induced upregulation of RP gene expression. The crucial causal tumorigenic impact of these coordinated transcriptional activations has been elegantly demonstrated in mouse models exhibiting haploinsufficiency for RP genes [59]. As an example, increased expression of RPL14 and RPL28 induced by MYC over-expression in vivo is a major event in lymphoma progression, leading to impaired translation of the cell cycle regulator cDK11, genomic instability, and defective mitosis that directly contribute to lymphomagenesis [59,60]. Interestingly, the combination of chemical inhibitors of ribosome biogenesis and of the mechanistic targeting of the rapamycin (mTOR) signaling pathway, the main driver of lymphomagenesis [61], has proven to be very powerful at inhibiting tumor growth of MYC-driven B-cell lymphoma in vivo in mouse models [62]. Thus, the uncontrolled activity of MYC observed in many types of cancers exacerbates ribosome biogenesis and promotes aberrant translation that sustains tumor progression [63,64]. Additional oncogenes such as mTOR, PI3K, and Akt were also shown to activate rRNA synthesis partly by directly interacting with the formation of the rDNA preinitiation complex (PIC) [63]. Conversely, tumor suppressors including TP53, PTEN, and RB are very potent ribosome biogenesis suppressors [51,52], regulating various levels from rDNA transcription and processing to RPs and accessory factor expression [64].

3.2. Regulation of Ribosome Biogenesis by RPs in Cancers

The causal tumorigenic effect of overexpressed *RPL15* and *RPL35* was similarly demonstrated in immune-deficient NOD SCID mouse models of human breast cancer metastasis to the lung and ovary [65]. *RPL15* and *RPL35* are assembled at an early stage during the processing of the pre-60S subunit and their stoichiometry is crucial for the structure and function of the human ribosome [37–39]. Circulating tumor cells (CTCs) from human breast cancer patients that promote metastasis formation were characterized by high *RPL15/RPL35* expression associated with increased expression of regulators of translation (i.e., eukaryotic initiation factor 2F targets), *RP* expression, and global protein synthesis [65]. Importantly, this study also showed that in metastatic breast cancer patients expressing sex hormone receptors, characterization of CTCs with high *RPL15/RPL35* expression could discriminate patients with the worse overall survival [65]. This study suggests that increased protein synthesis induced by *RPL15/RPL35* high expression in CTCs contributes to breast cancer progression. However, the impact of high *RPL15/RPL35* expression on ribosome biogenesis remains to be examined, as well as the correlation between inhibition of ribosome biogenesis and a prolonged survival of metastatic breast cancer patients. Similarly, we showed that ribosome biogenesis is increased in a model of MCF-7 mammary cancer cell progression [66] and the work by Prakash et al. [67] demonstrated that genetic inhibition of ribosome biogenesis reduced lung breast cancer metastasis seeding in a model of syngeneic mice [67].

The study of RP expression and activity has gained growing attention in cancer research. Notably, because of the observation that inherited RP gene mutations producing dysfunctional ribosomes are associated with tissue-specific human pathologies named ribosomopathies and with a strong cancer predisposition [68]. Interestingly from the clinical point of view and in the context of translational research, it was demonstrated a long time ago that alterations in ribosome biogenesis occurring in cancer cells could easily be visualized by silver staining of the AgNOR representing several

argyrophilic nucleolar proteins that are master regulators of ribosome biogenesis, including, for example, nucleolin (NCL), fibrillarin (FBL), and nucleophosmin (B23) [64,69]. A plethora of studies performed in a large variety of tumor cells from human biopsies unambiguously showed that AgNOR distribution reflected unusual morphology, hypertrophy, and/or an abnormally elevated number of nucleoli that could be a pathological gold standard for cancer cell recognition in routine diagnosis [46,64,70]. However, although it is well-known that nucleoli-derived features (i.e., AgNOR) are a hallmark of cancer cell transformation, these are also present in numerous non-cancerous conditions, justifying why they cannot be used as a diagnostic tool. Albeit, some of these features are used as prognostic tools for some cancers, such as hepatocarcinoma [71] or clear cell and papillary carcinoma, the most frequent kidney cancers [72]. Moreover, a recent report on computer-assisted scoring systems, such as the index of nuclear disruption (iNO score), highlighted that such tools may help to establish a fine description of nucleoli exploitable for cancer diagnosis [73].

4. Regulation and Roles of Ribosome Biogenesis in Human CRC

This section presents the current knowledge regarding ribosome biogenesis regulation in intestinal physiology and CRC. The various steps and actors of ribosome biogenesis that are dysregulated in CRC could provide original targets or biomarkers to improve management of CRC patients.

4.1. Regulation of Ribosome Biogenesis in Intestinal Stem Cells

The growth and regeneration of the gastrointestinal tract is uninterrupted throughout life and leads in adulthood to the replenishment of 1–10 billion epithelial cells per day and is entirely renewed in ~4–7 days [74]. This constant renewing of gastrointestinal tissue relies on intense stem cell self-renewal, differentiation, and proliferation activities that are sustained by the activation of all the machineries involved in cell growth, division, and protein synthesis, including ribosomes [75]. In mouse organoids, intestinal stem cell differentiation towards enterocytes is accompanied by an increased ribosome biogenesis signature at the transcriptional level [76], and chemical inhibition of ribosome biogenesis using the rDNA transcription inhibitor CX-5461 induces the disruption of the epithelial lining, most likely by stem cell targeting [77]. In addition to contributing to the normal renewing of the gastrointestinal tract, it appears that ribosome biogenesis also promotes colorectal tumorigenesis. In a mouse model of WNT-driven colorectal tumorigenesis, evidence has been provided that defective Notchless-dependent ribosome biogenesis blocked epithelial cell proliferation, imposed cell cycle arrest, and promoted enterocyte differentiation [78]. In humans, evidence of a link between dysregulated ribosome biogenesis and CRC arose from the demonstration that cells from chronic ulcerative diseases associated with a major risk of developing CRC exhibited hypertrophic nucleoli with upregulation of rDNA transcriptional activity [79]. In addition, it was demonstrated that the non-cancerous tissue surrounding colorectal tumor cells constitutes a field of cancerization strongly enriched in a ribosome biogenesis signature, and which is considered to be an early molecular event in human CRC progression [80]. Thus, it appears that dynamic and controlled activation of ribosome biogenesis ensures the homeostatic equilibrium of normal gastrointestinal cells and colorectal cancer cells defined by faulty homeostasis display ribosome biogenesis alterations [47]. These alterations could impact the early stages of ribosome biogenesis (i.e., RNA polymerases activation, rDNA transcription), but also the later steps in ribosome production (rRNA processing, rRNA modifications, rRNA export), extending the possibilities of new ribosome biogenesis-centered targeted therapies in CRC.

4.2. Regulation of Early Stages of Ribosome Biogenesis in CRC

Several studies have revealed that ribosome biogenesis could be the integrator and/or final effector of major altered signaling pathways which are often observed in colorectal tumorigenesis. These dysregulations impact every stage of ribosome biogenesis. The tumor suppressors *TP53* and *RB* and the oncogenes *MYC* and *KRAS* have been shown to mainly modulate the early steps of ribosome biogenesis (i.e., rDNA transcription),

whereas other factors such as nucleolin, RRS1, pescadillo, or BOP1 mostly alter the late stages of ribosome biogenesis (i.e., pre-rRNA cleavage and ribosomal subunits' maturation).

A series of studies illustrated that ribosome biogenesis plays a key role in the initial steps of colorectal tumorigenesis. As described above, activation of ribosome biogenesis mostly relies on hyperactivation of RNA polymerase. Frequent overexpression and/or mutations of co-factors or subunits constituting rRNA polymerases have been described in human CRC and are associated with colorectal tumorigenesis by activating ribosome production [81–84]. The very first step of rDNA transcription induced by RNA pol I in cooperation with UBF and SL1 factors leads to the production of the 47S pre-rRNA and constitutes the rate-limiting step in ribosome biogenesis [85] (Figure 1).

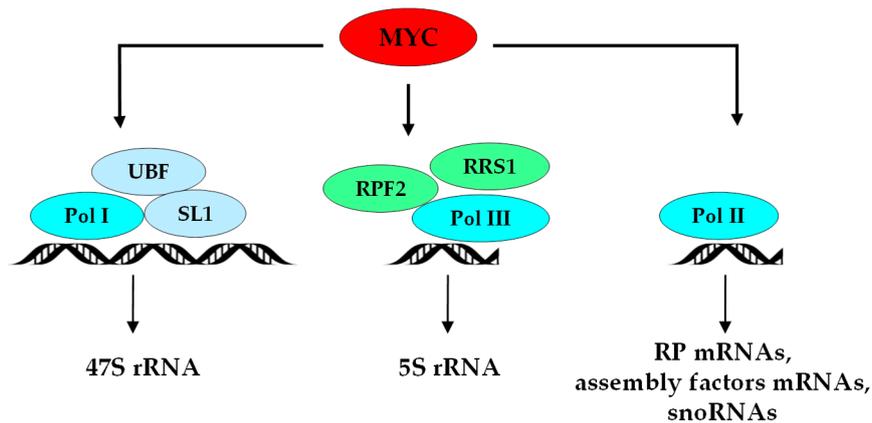


Figure 1. Regulation of early transcriptional steps of ribosome biogenesis in CRC. MYC is overexpressed in colorectal tumor cells, binds to rDNA sequences, and in cooperation with UBF and SL1 factors, leads to the hyperactivation of RNA pol I-mediated synthesis of the 47S rRNA precursor [84]. MYC, in cooperation with RPF2 and RRS1, activates RNA pol II-mediated transcription of genes coding for ribosomal assembly factors and RPs, as well as RNA pol III-mediated synthesis of 5S rRNA [57]. Overexpression of the three rRNA polymerases and the associated factors is frequent in CRC [80–83]. Together with RPF2 (protein ribosome production factor 2 homolog), RRS1 cooperates with POL III and drives 5S rRNA synthesis, while POL II activates ribosomal proteins and assembly factors mRNAs and snoRNAs synthesis.

Then, 47S pre-rRNA is cleaved at both ends of the molecule to generate the 45S pre-rRNA which is further cleaved into 5.8S, 18S, and 28S pre-RNAs species [86]. Recently, it was shown that the level of expression of the 45S pre-rRNA is a CRC prognostic marker significantly associated with poor overall survival in two independent cohorts of eighty primary CRC patients [87]. Moreover, the pharmacological (UBF-interacting Ca^{2+} chelators) or genetic (siRNA) inhibition of 45S pre-rRNA synthesis in nine human CRC cell lines was associated with p53 protein stabilization, cell cycle arrest, and apoptosis, suggesting that inhibition of rRNA synthesis promotes the tumor suppressive response and thus might be an early step in colorectal tumorigenesis [87]. Although the increased expression of the 45S pre-rRNA is synergistic to increased protein synthesis in CRC cells, the rate of synthesis of other rRNA precursors was not determined in this study [87]. Whether the high expression of the 45S pre-rRNA is associated with the production of a specific translome that would drive colorectal tumorigenesis remains an open question.

4.3. MYC and RAS Regulations of Ribosome Biogenesis in CRC

CRC cells often display a significant increase in MYC expression and/or activity [88], which directly and indirectly stimulates the expression of all components required for protein synthesis, including rDNA, mRNAs, and tRNAs as well as processing and maturation factors contributing to enhanced ribosome production [82–85,89]. Indeed, in human CRC, most of the essential factors involved in ribosome biogenesis are overexpressed due to high MYC expression levels, as exemplified by the MYC-target

gene, *aryl hydrocarbon receptor*, which is co-upregulated with *MYC* in CRC and promotes HCT-116 CRC cell proliferation by activation of a ribosome biogenesis transcriptional signature [90].

Although it is well documented that ribosome biogenesis can be controlled by growth factor receptors through MAPK/RAS/signaling [52,91] and that constitutive activation of KRAS represents a major determinant of some CRC subtypes, only few studies have explored the contribution of the oncogenic RAS pathway in ribosome biogenesis-mediated colorectal tumorigenesis. Human colorectal cancer cell lines with constitutive KRAS activation display a gene signature enriched in ribosome biogenesis and translation factors [92]. A recent report showed that the cysteine protease calpain-2 is involved in the inhibition of 47S pre-rRNA biogenesis as well as in the disruption of nucleolar integrity in human CRC DLD-1 cells [93]. The inhibitory effect of calpain-2 on 47S pre-rRNA synthesis is abrogated in a cellular model of DLD-1 cells transfected with the constitutively activate KRAS (G13D) mutant [93], indicating that KRAS regulation of ribosome biogenesis could be a major event in CRC. During colorectal tumorigenesis, consecutive to *APC* loss, the tumor suppressor *TP53* gene is frequently lost or mutated, accelerating the onset of tumor formation partly through the loss of inhibition of ribosome biogenesis [45,94]. Activation of the tumor suppressor RB is also a strong contributor to the inhibition of RNA pol I activity at the PIC complex, inducing a rapid reduction in ribosome biogenesis [95].

4.4. Nucleolin and Regulatory Protein Homolog *RRS1* in CRC

Nucleolin (NCL) is a multifunctional RNA-binding protein which activates rRNA transcription and pre-rRNA processing [96]. Recently, a novel interaction partner of NCL was discovered, the long non-coding RNA cytoskeleton regulator RNA (CYTOR), which is functionally involved in human CRC tumorigenesis [97]. The CYTOR–NCL interaction activates the nuclear factor (NF)- κ B pathway in CRC, and CYTOR and NCL, both overexpressed in human CRC, are associated with poor patient prognosis [97]. It would be of great interest to examine ribosome biogenesis status in these tumors. Additional experiments are now required to validate NCL as a potential target of ribosome biogenesis in CRC.

In eukaryotes, the ribosome biogenesis regulatory protein homolog (*RRS1*) cooperates with RNA pol III and the protein ribosome production factor 2 homolog (RPF2) to drive 5S rRNA synthesis and also participates in the maturation steps of the pre-60S particle [98]. The biological role of *RRS1* was shown by experimental depletion of *RRS1* in mouse embryonic fibroblasts, resulting in impaired ribosome biogenesis-associated nucleolar stress (see Section 4.6) and senescence [99]. The expression of *RRS1* is significantly upregulated in a clinical CRC cohort, associated with tumor aggressiveness and poor overall survival [100]. *RRS1* expression is correspondingly overexpressed in The Cancer Genome Atlas (<http://cancergenome.nih.gov>) database. The silencing of the *RRS1* gene in two CRC cell lines, HCT-116 and RKO, inhibited cell proliferation, and induced cell cycle arrest and apoptosis. These effects were also demonstrated in vivo on subcutaneously implanted colorectal tumor cells, indicating a key role for the ribosome biogenesis factor *RRS1* in promoting tumorigenic properties [100]. Although the consequences of *RRS1* overexpression on the regulation of ribosome biogenesis per se was not determined, other reports showing that high *RRS1* is oncogenic in breast [101,102], thyroid [103], and liver [104] cancers, clearly indicate that *RRS1* represents a new promising target to be considered in CRC therapy.

4.5. Late Stages of Ribosome Biogenesis in CRC

As stated above, pre-rRNA processing is characterized by an elaborate succession of cleavage, folding, protein associations, and chemical modifications of rRNAs [39,105]. One important step of pre-rRNA cleavage involves the formation of the trimeric complex PeBoW composed of three proteins, the Pescadillo homolog 1 (PES1), the block of proliferation (BOP1), and the WD-repeat domain 12 protein (WDR12) [106]. In mammalian cells, the PeBoW complex is essential for ITS-2 processing of the 32S pre-rRNA into 28S and 5.8S rRNAs, and is mandatory for the formation and assembly of the 60S subunit [106–110]. Additionally, two RNA helicases from the DEAD-box helicase family,

DDX21 and DDX27, associate with the PeBoW complex and participate in structural rearrangements that accompany the formation of the pre-60S subunit [111]. The activity and distribution of the PeBoW complex is synchronized with cell cycle progression, and perturbations in its organization were reported to be key mediators of nucleolar stress, cell cycle arrest, and p53-dependent apoptosis [109,110].

4.5.1. PES1 and Interacting Partners in CRC

PES1 is a MYC target gene [112] that is significantly increased in clinical samples of human CRC tumor cells vs. normal adjacent epithelial cells or normal colon [113]. The suppression of *PES1* in various human CRC cell lines significantly reduced their proliferation and colony-forming ability on soft agar, as well as their growth in vivo following xenotransplantation in immune-deficient mice [113]. Xie et al. also showed that increased *PES1* expression in CRC cells was associated with resistance to chemotherapeutic treatments (i.e., etoposide, 5-FU, doxorubicin, vincristine) and provided protection against DNA-induced damage [114]. The regulation of *PES1* transcription in HCT-116 cells is mediated via the activation of the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway, indicating that inhibition of colorectal tumorigenesis by JNK inhibitors could also be mediated by a downregulation of *PES1* leading to a decrease in ribosome biogenesis [113].

PES1 and DDX21 form with the G protein nucleolar 3 (*GNL3*), a complex involved in late processing steps of the 32S pre-rRNA to 28S rRNA, before the incorporation of the latter into the 60S particle [115]. *GNL3* is overexpressed in CRC tumor cells compared to normal colon tissue and is significantly associated with poor patient overall survival [116]. The overexpression of *GNL3* in HT29 CRC cells activates the WNT signaling pathway, cell proliferation, colony formation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), migration, invasion, and in vivo tumor growth, whereas its suppression by siRNA reverses these effects [116]. This study indicates that the contribution of *GNL3* to colorectal tumorigenesis could be mediated by altered ribosome production [116] and further analyses of ribosome biogenesis and protein synthesis rates under high *GNL3* expression is now required.

The long non-coding RNA, circular antisense non-coding RNA in the *INK4* locus (*circANRIL*) is a newly identified negative regulator of *PES1* activity, which binds to the C-terminal domain of *PES1* and inhibits its action on the cleavage of the 32S pre-rRNA [117]. *circANRIL* appears to play a broader role in ribosome biogenesis since it is also an interacting partner of the nucleolar protein NOP14 which is essential for the formation of the 40S subunit [117]. In human embryonic kidney HEK-293 cells, the overexpression of *circANRIL* impairs ribosome biogenesis, induces an accumulation of premature 32S and 36S rRNAs, inhibits cell proliferation, and increases cell death [117]. Interestingly, using primary cultures of human smooth muscle cells and macrophages as a model of atherosclerosis, the authors demonstrated that impaired ribosome biogenesis and nucleolar stress-induction due to high levels of *circANRIL*, confers a protective response against atherosclerosis [117]. This mechanism of regulation of ribosome biogenesis through circular lncRNA provides exciting opportunities for investigating ribosome biogenesis in a different yet complementary context to its implication in the regulation of translation in CRC [118].

In addition to the role of *PES1* and its partner in regulating ribosome biogenesis, an extra-ribosomal role for *PES1* was recently described as a direct activator of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), resulting in telomere length maintenance and senescence in breast and liver cancer cells [119]. It would be interesting to examine the possible association between the high hTERT activity in CRC [120] and *PES1*. Hence, the central position of *PES1* within a protein-rRNA network integrating ribosome biogenesis, telomerase activity, proliferation, and apoptosis, makes it a target of choice for the future developments of targeted CRC therapies.

4.5.2. Contribution of BOP1 to CRC Tumorigenesis

The PeBoW component BOP1 was also shown to mediate activation of ribosome biogenesis and particularly during the processing of the 47S pre-rRNA to mature 18S and 28S rRNA activated by MYC [121]. It has been reported that the number of copies of the *BOP1* gene present on the

8q24 chromosomal region is amplified in ~40% of human primary CRC and associated with consecutive overexpression of *BOP1* mRNA [122]. Interestingly, the *BOP1* gene is close to the *MYC* oncogene, but its overexpression is more frequent and independent of *MYC* amplification, suggesting that *BOP1* overexpression may be a major cause of 8q24 chromosomal region amplification in human colorectal tumorigenesis [122]. Another study confirmed the gain in the 8q24 chromosomal region of the *BOP1* gene and its increased protein expression in frozen micro-dissected human rectal cancer cells [123]. In addition, liver metastases formed in immune-deficient SCID/NOD mice after spleen injection of various CRC cell lines with constitutively activated Wnt/ β -catenin pathway, show a specific enrichment in *BOP1* expression [124]. In human CRC clinical samples, *BOP1* is overexpressed in cancer cells compared to normal adjacent epithelial cells and represents a biological marker associated with tumor progression and formation of distant metastases [125]. Very interestingly, the experimental ablation of *BOP1* in the human DLD-1 CRC cell line resulted in altered chromosomal segregation and aberrant mitosis that induce chromosomal instability (CIN) distinctive of CRC cells [126], indicating the importance of *BOP1* in maintaining intestinal cell physiology. The overexpression of *BOP1* in SW480 CRC cells stimulated extracellular matrix invasion and two-dimensional (2D)-migratory properties and was accompanied by the activation of the EMT program [124]. In immune-deficient SCID/NOD mice, the splenic injection of SW620 CRC cells lacking *BOP1* resulted in a significant decrease in the number of liver metastases [124]. Similarly, the overexpression of *BOP1* in the HCT-116 CRC cell line stimulated their migratory and invasive properties concomitant to the activation of matrix metalloproteases MMP2 and MMP9, whereas *BOP1* ablation in HT29 blocked their migratory and invasive capacities [125]. Moreover, the lncRNA colon cancer-associated transcript 2 gene (*CCAT2*) was recently related with *BOP1* activation, chemoresistance to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and with colorectal tumorigenesis [127]. Microarray and mass spectrometric analyses determined that ribosome biogenesis and translation factors were upregulated in *CCAT2*-overexpressing CRC cells, however the precise status of rRNA synthesis remains to be characterized [127]. The mechanism through which *BOP1* activates colorectal tumorigenesis is mediated by the increased expression of active *aurora kinase B* [127], and phenotypic changes associated with migration and invasion are mediated by the activation of the JNK signaling pathway [124,125].

The contribution of *BOP1* to colorectal tumorigenesis could be further explored in CRC cells that have lost p53 activity, since the inactivation of *BOP1* in mouse TP53-KO 3T3 fibroblasts is associated with increased sensitivity to camptothecin cytotoxic treatment [128]. This highlights the potential usefulness of combining molecules derived from camptothecin like irinotecan frequently used to treat CRC with drugs that would target the PeBoW complex and/or ribosome biogenesis.

4.5.3. WD12: The Third PeBoW Constituent Deserving Further Attention in CRC

Likewise, WD repeat domain 12, the third stable constituent of the PeBoW complex that participates in 32S rRNA processing was shown to drive tumor progression in glioblastoma cell lines and is a clinical marker associated with poor prognosis in glioblastoma patients [129]. Sun and Qian screened the NCBI GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and identified *WDR12* as a key factor upregulated in CRC cells vs. normal adjacent tissue [130]. Therefore, the role of *WDR12*-mediated alterations in ribosome biogenesis in human colorectal tumorigenesis warrants further investigations.

4.6. Regulation of Ribosome Biogenesis by Ribosomal Proteins in CRC

The formation of mature ribosomes is dependent on the orderly assembly of seventy-nine RPs [37,38]. In addition to their function in rRNA processing, some RPs also play extra-ribosomal roles during development, immune responses, and tumorigenesis [131]. The quantitative variations in RP expression levels described in CRC were mainly associated with extra-ribosomal effects leading to what is recognized as the nucleolar or ribosomal stress [132]. The nucleolar stress is caused by genetic mutations or altered expression levels of RP which are consequently not incorporated in ribosomes but bind to the E3 ubiquitin ligase, MDM2, thereby inducing stabilization of p53 and apoptosis

activation [52,133]. Diseases associated with RP gene mutations are known as ribosomopathies and are often linked to cancer predisposition [46,68,94,131,134–137]. Here, we examine the expression and rRNA processing activity of some RPs and how it could be related to experimental and clinical CRC.

Indeed, some RPs are not only implicated in ribosome structural building but are also critical in rRNA processing [37,38]. For instance, RPS20 is involved in maturation of the small pre-40S particle, in cytoplasmic export of the 20S rRNA precursor and in 18S rRNA processing [135,138]. Genetic analysis and exome sequencing indicated that *RPS20* expression is dependent on an inactivating germline mutation that strongly predisposes humans to some forms of nonpolyposis CRC [139]. The authors demonstrated that experimental inactivation of *RPS20* in HeLa cells recapitulated late pre-rRNA processing and 18S rRNA maturation defects initially characterized in nonpolyposis CRC clinical samples, providing a causal link between disturbed ribosome biogenesis and CRC predisposition [139].

RPL14 controls the processing of the 45S pre-rRNA and 12S rRNA leading to the production of the mature 5.8S rRNA, and RPS17 controls the late processing stage of the 21S rRNA to nuclear 18S pre-rRNA [140]. Interestingly, RPL14 and RPS17 both potentially contribute to colorectal tumorigenesis [141]. Indeed, *RPL14* and *RPS17* are two of the few genes activated in CRC and associated with microsatellite instability (MSI) markers and inactivation of mismatch repair genes [141]. However, whether MSI in human CRC is dependent on a dysregulation of ribosome biogenesis through upregulation of *RPL14* and *RPS17* is unknown.

Additional RPs, RPS6 and RPS7, both involved in 5'ETS cleavage to generate the 30S rRNA [140], contribute to human colorectal tumorigenesis in vitro [25,26]. RPS6 expression is upregulated in CRC [132], stimulates cell proliferation, colony formation, and mediates resistance to the MEK1/2 kinase inhibitor selumetinib of a large panel of human CRC cells [142]. RPS7 is also overexpressed in human CRC cells and mainly appears to exert extraribosomal activation of genes linked to tumor hypoxia and glycolysis [141]. The impact of overexpressed RPS6 and RPS7 on CRC ribosome biogenesis has so far not been examined and warrants further investigation.

RPS24, which is necessary for the formation of the 18S rRNA [140], is also an RP gene significantly overexpressed in human CRC [143]. RPS24 has been shown to stimulate proliferative and migratory capacities of CRC cell lines HT-29 and HCT-116 [144], and determining the status of ribosome biogenesis will be pivotal in understanding the role of RPS24 in colorectal tumorigenesis.

RPL15 acts as a ribosomal assembly factor essential for the formation of the 60S subunit [145] and is also directly involved in pre-rRNA processing at the internal transcribed spacer 1 (ITS1) site of the 47S pre-rRNA [146,147]. *RPL15* is significantly upregulated in LoVo, HCT-116, SW-480, and SW-620 CRC cell lines compared to non-transformed epithelial cells, and screening of the ONCOMINE 3.0 database (www.oncomine.org) indicated that *RPL15* is overexpressed in CRC and associated with disease progression [148]. *RPL15* inhibition by siRNAs induced a striking reduction of the pre-60S subunit and is associated with cell cycle arrest at the G1-G1/S phase and apoptosis in HCT-116 CRC cells [148]. It would be interesting to define the translational regulation associated with increased synthesis of RPL15 and 60S subunit in colorectal tumorigenesis in order to find novel CRC targets. Similarly to CRC, high levels of *RPL15* expression were found in human gastric cancer and shown to be involved in gastric tumor progression [149]. These data indicate that some RPs represent new potential targets to counteract the hyperactivation of ribosome biogenesis in CRC. The implication of PeBoW complex, RPs, and ribosome biogenesis processing factors upregulated in CRC is summarized in Figure 2.

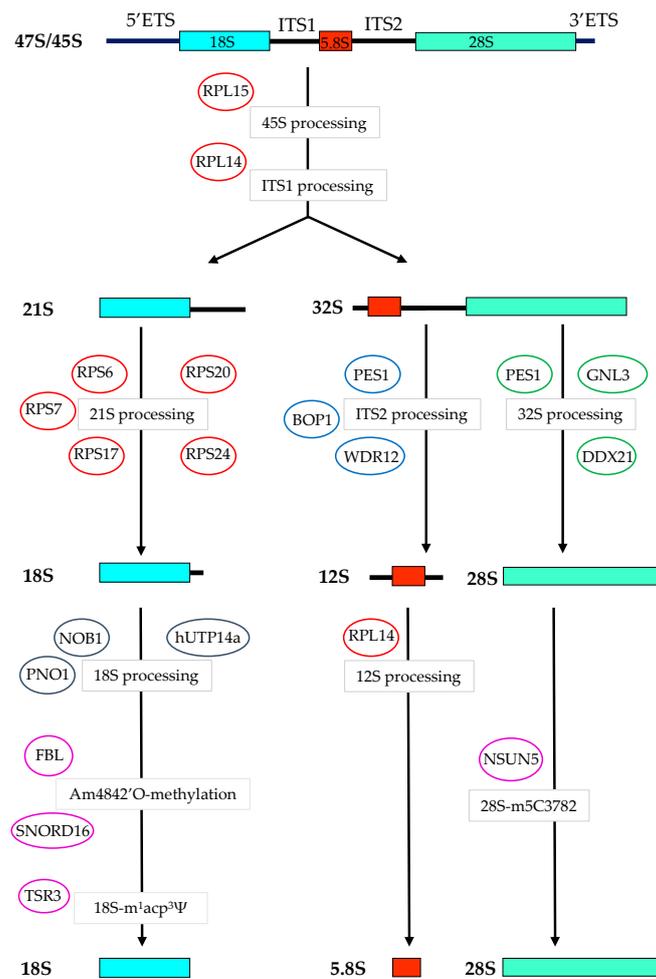


Figure 2. Schematic representation of ribosome biogenesis factors upregulated in colorectal cancer cells and their known sites of regulation of pre-rRNA processing pathways. The production of mature 18S, 5.8S, and 28S result from the synthesis and processing of a single 47S rRNA precursor characterized by noncoding 5' and 3' external transcribed spacers (ETS) and internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). In colorectal cancer cells, overexpression of the 45S rRNA is a biomarker of poor prognosis [87]. RPL15 is involved in pre-rRNA processing at the internal transcribed spacer 1 (ITS1) site of the 47S pre-rRNA and is overexpressed in CRC [148]. RPL14 controls the processing of the 45S pre-rRNA and 12S rRNA and is highly expressed in CRC [140]. RPS6, RPS7, RPS17, RPS20, and RPS24 are involved in the formation of the 18S rRNA and are overexpressed in CRC respectively, in References [132,139,141,142,150]. Pescadillo homolog 1 (PES1), block of proliferation (BOP1), and WD-repeat domain 12 protein (WDR12) are involved in the formation of the 12S rRNA and overexpressed in CRC respectively, in References [113,122,130]. PES1 is also involved with DDX21 and GNL3 in the processing of the 32S to the 28S rRNA and GNL3 is overexpressed in CRC [116]. RPL14, which is overexpressed in CRC [141], further activates the processing of the 12S rRNA to mature 5.8S. 18S pre-rRNA processing is activated by NIN1 (RPN12) binding protein 1 homolog (NOB1) in cooperation with “partner of NOB1” (PNO1) which is overexpressed in CRC [151]. 18S pre-rRNA processing is also activated by human U3 protein (UTP) 14a (hUTP14a), and is overexpressed and constitutes a marker of poor prognosis in CRC [152]. Base and nucleotide modifications are important modifications that control late steps of rRNA maturation. The human nucleolar enzyme NSUN5 catalyzes the C⁵ methylation of cytosine residue C₃₇₈₂ of the 28S rRNA (18S-m₅C₃₇₈₂) and is upregulated in CRC and associated with disease progression [153]. The C/D-Box small nucleolar RNA 16 (SNORD16) guides fibrillarlin (FBL) to methylate the 2'O-ribose on the 18S-Am484 site and constitutes a molecular marker of CRC and a driver of colorectal tumorigenesis [154]. The ribosome biogenesis protein TSR3 induces the 1-methyl-3α-amino-α-carboxyl-propyl pseudouridine (m¹acp³Ψ) modification on uridine U1248 of the 18S rRNA and is overexpressed in CRC and associated with colorectal tumorigenesis [155].

4.7. Ribosome Biogenesis Processing Factors in CRC

Several studies have shown that human CRC progression is associated with the dysregulation of proteins besides RPs but also involved in ribosomal processing. These factors play an important role in the correct processing of rRNAs and ribosome assembly alongside RPs to achieve the production of a functional ribosome [156]. For example, the NIN1 (RPN12) binding protein 1 homolog, also known as NOB1, is an endonuclease which cleaves the 3' end of the 18S rRNA and controls the final maturation step of 18S rRNA [39]. Additionally, the cleavage of the 3' end of the 18S rRNA by NOB1 is potentiated by the specific binding of the ribosomal biogenesis factor named “partner of NOB1” or PNO1, which induces a conformational change of NOB1 that increases its binding affinity and activity on the 18S rRNA (Figure 2) [157]. The expression of PNO1 was recently investigated in human CRC by microarray assays, RT-qPCR, and tissue microarray (TMA), and was shown to be overexpressed in cancer cells vs. adjacent normal tissue and associated with poor patient prognosis [151]. The overexpression of *PNO1* in HT-29 and HCT-8 CRC cells prevented apoptosis and stimulated their proliferation in vitro. Moreover, the knock-down of *PNO1* in HCT-116 and RKO cells significantly reduced tumor growth in vivo [151]. In this study, the link between the oncogenic effects of PNO1 and disturbed ribosome biogenesis was subsequently demonstrated by polysome profiling of rRNAs from *PNO1*-ablated HCT-116 cells, and indicated a significant decrease in the amount of 18S rRNA, 40S subunit, 60S subunit, and mature 80S ribosome [151]. The ablation of *PNO1* also resulted in the reduction of global protein synthesis and restored p53 functionality [151]. Further exciting work should now clarify the translational mRNA targets regulated by high levels of PNO1/NOB1 expression in CRC cells and determine their clinical relevance.

Human U3 protein (UTP) 14a (hUTP14a) is a nucleolar protein associated with U3 snoRNA and the DEAH-box RNA helicase DHX37, and that is required for 18S rRNA processing and 40S subunit synthesis [158]. hUTP14a has been shown to participate in the formation of a nucleolar complex that inhibits MYC degradation, thereby promoting its activity during colorectal tumorigenesis [152]. In parallel, nucleolar hUTP14a binds to p53 and RB and stimulates their degradation [159]. It was reported that the nucleolar hUTP14a is significantly overexpressed in CRC TMA sections compared to adjacent normal epithelia, and the co-overexpression of both MYC and hUTP14a is a marker of poor prognosis in CRC [152]. The formation of a stable complex between hUTP14a and MYC supports the proliferation of HCT-116 CRC cells, whereas suppression of *hUTP14a* inhibits HCT-116 cell proliferation in vitro and in vivo after skin implantation in immune-deficient NOD/SCID mice [152]. Further analysis of high *hUTP14a* expression on ribosome biogenesis and general translation regulations should determine whether hUTP14a is a potentially meaningful target in human CRC.

The Shwachman-Bodian Diamond syndrome (SBDS) protein plays a dynamic structural and functional role in the late processing of the large 60S ribosomal precursor by association with the 28S rRNA, and is involved in the production of mature 80S ribosome [160]. Using CRC TMA sections, it has been shown that SBDS is overexpressed in tumor cells compared to normal adjacent cells and high SBDS expression is associated with an unfavorable prognosis [161]. The suppression of *SBDS* induced a significant p53-mediated decrease in HCT-116 cell growth and invasion [161] and further investigations may shed light on the link between SBDS expression and ribosome biogenesis dysregulation in colorectal tumorigenesis. Ribosome biogenesis processing factors that are upregulated and that could potentially be targeted in CRC are indicated in Figure 2.

4.8. Chemical Modifications of rRNA in CRC

rRNAs constitute the translational platform on which the mRNA decoding and peptidyl transferase activities are physically connected and functionally controlled [43]. Several types of base or nucleotide modifications accompany various late steps of eukaryotic rRNA biosynthesis and stabilize the three-dimensional (3D) structure of functional ribosomes [43]. However, evidence that altered chemical modifications affect a targeted set of translated mRNAs during development and disease has provided further insight into the impact of qualitative rRNA modifications on ribosome function [40].

The addition of a methyl group to the 2'-hydroxyl group of a ribose (2'-O-ribose methylation) catalyzed by fibrillarin (FBL) on 106 possible sites and the isomerization of uridine to pseudouridine (Ψ) catalyzed by dyskerin (DKC1) on 97 possible sites, are the most frequent 18S, 5.8S, and 28S rRNA chemical modifications [43]. Interestingly, the level of ribose methylation and uridine pseudouridylation at individual sites within the decoding and peptidyl transferase centers has been linked to major mRNA-specific translational defects that could drive tumorigenesis [40,43,162]. We have previously shown that the level of 2'-O-ribose-methylation at some given sites is sensitive to variation in *FBL* expression and influences the preferential translation of oncogenic Internal Ribosome Entry Sites (IRES)-containing mRNAs, like the IGF-IR in MCF-7 breast and in colorectal HCT-116 cancer cells [163]. The level of 2'-O-ribose methylation on human rRNAs in HCT-116 cells with suppressed *FBL* has been established and has resulted in the identification of sites of 2'-O-ribose-methylation vulnerability on the 18S, 5.8S, and 28S rRNAs, that are strongly dependent on FBL activity [164]. This work provides a great opportunity to further study the impact of rRNA 2'-O-ribose-methylation in experimental colorectal tumorigenesis and in human clinical CRC samples.

The C/D-Box small nucleolar RNAs (SNORD) are a conserved family of non-coding snoRNAs which guide, for example, the enzyme FBL to specific 2'-O-ribose methylation sites on rRNAs [165,166]. In human HeLa cells, SNORD16 is the snoRNA which directly interacts with the 18S rRNA and guides FBL to methylate the 2'-O-ribose on the 18S-Am484 site [167]. It was recently shown that SNORD16 is a molecular marker of human CRC and a driver of colorectal tumorigenesis [154]. SNORD16 overexpression is significantly correlated with age, cancer cell invasion, patient history of colon polyps, and is associated with a poor patient overall survival [154]. HCT-116 and SW-620 cells transduced with lentiviral-*SNORD16* exhibited significant increases in cell proliferation, colony formation, and migratory and invasive capacities [154]. Although not determined in this study, the impact of SNORD16 on colorectal tumorigenesis is likely to be mediated through altered rRNA 2'-O-ribose methylation profiles and a translational reprogramming which could provide new targets when developing CRC therapies.

Base methylations represent another type of rRNA chemical modification which occurs in late stages of ribosome biogenesis and which are mostly involved in maintaining the ribosome translational fidelity [43]. The human nucleolar enzyme NSUN5 is the methyl transferase involved in cytosine methylation on C⁵ position of residue C₃₇₈₂ of the 28S rRNA (18S-m₅C₃₇₈₂) and this chemical modification is necessary for stabilizing the peptidyl (P) transferase site [168]. Interestingly, the expression of *NSUN5* is upregulated in human CRC and associated with disease progression [153]. Experiments using HT29 and RKO CRC cell lines demonstrated that *NSUN5* expression promoted cell proliferation by controlling the expression and activity of major cell cycle regulators in vitro as well as in vivo [153]. The alteration of the level of 18S-m₅C₃₇₈₂ in CRC samples was however not determined, nor was the translational profile mediated by overexpressed *NSUN5* [153]. Future experiments with CRC cells overexpressing *NSUN5* may provide important insights into the implication of rRNA base modifications in colorectal tumorigenesis.

Crucial evidence of the importance of rRNA modifications in CRC was recently unveiled by the discovery of the reduced frequency of a single nucleotide variation in the 18S rRNA, present in 46% of CRC samples of four independent large cohorts (~10,000 patients) compared to patient-matched normal epithelium (n = 708) [155]. The nucleotide alteration was found by screening changes in the average variant allele frequency on rRNAs and occurs on uridine U1248 of the 18S rRNA which can display a chemical modification, a 1-methyl-3 α -amino- α -carboxyl-propyl pseudouridine (m¹acp³ Ψ), thus leading to a decrease in 18S-m¹acp³ Ψ U1248 level in CRC patients [155]. The ribosome biogenesis protein Tsr3 is an enzyme involved in this nucleotide modification which occurs in the peptidyl transferase center [169]. Suppression of Tsr3 in HCT-166 cells reduced the level of m¹acp³ Ψ to the one found in CRC samples [155]. The reduced level of m¹acp³ Ψ is predicted to alter the structure of the P site and resulted in an enrichment in a proliferative and translational gene signature at transcriptional or translational levels, that could drive colorectal tumorigenesis [155]. All these data show that subtle rRNA modifications originally thought to be structural elements of the ribosome can

generate specific ribosomes with preferential translation of mRNAs coding for proliferative factors. Therefore, the targeting of enzymes which catalyze these rRNA chemical modifications may represent a valuable therapeutic tool. The chemical modifications and associated enzymes that are distinctive of CRC are indicated in Figure 2.

5. Targeting Ribosome RNA Synthesis in Colorectal Cancer

The rationale for targeting ribosome biogenesis in cancer is based on experimental and clinical evidence showing that tumorigenesis is associated with quantitative increases in ribosome production and/or production of qualitatively-altered ribosome species [44,45,47,48,52,170–173]. These characteristics have formed the basis for the development of new drugs that disrupt the activation of rRNA synthesis by directly targeting the formation and activity of the RNA pol I transcriptional complex on rDNA [51,174–176]. Effective ribosome biogenesis inhibition in cancer cells has gained considerable attention with the development of the two inhibitors, CX-5461 and CX-3543, which selectively bind to rDNA-enriched G-quadruplex regions and halt ribosome production [51,175]. These new drugs that target rRNA transcription and induce cell cycle arrest could represent a novel approach in the treatment of human CRC. Compared to existing chemotherapy using oxaliplatin, 5-fluorouracil, and camptothecin that target rRNA production in an unselective manner, or actinomycin D that binds GC-rich regions of rDNA [177,178], CX-5461 and CX-3543 appear to kill in particular cancer cells or cancer stem cells that have high activation status of ribosome biogenesis. It is also important to note that, in contrast to most other chemotherapeutic molecules used in CRC treatment, oxaliplatin efficacy depends more on the activation of nucleolar ribosome stress than on the induction of a DNA damage response (DDR), further indicating the relevance of targeting ribosome biogenesis in colorectal tumorigenesis [178].

In the p53-wild-type HCT-116 CRC cell line, CX-5461 was shown to inhibit RNA pol I transcriptional activity by disrupting the binding of SL1/TIF-IB transcription factors to the rDNA promoter on the PIC complex, without affecting general transcription and global protein synthesis, thereby promoting nucleolar stress, stabilization of p53, and cell death [179,180]. Interestingly, the cytotoxic effect of CX-5461 in HCT-116 CRC cells is potentiated by cellular DDR induced by ionizing radiation treatment [181]. The recent demonstration in HCT-116 cells, that CX-5461 induces a prominent intracellular DNA damage through inhibition of topoisomerase II activity, indicates that DDR could be the major mechanism of CRC cell death induction [182]. Similarly, in p53 mutant HT-29 and COLO-205 CRC cell lines, CX-5461 treatment is inducing apoptosis [179], but possibly through a mechanism that triggers replication stress and DDR activation, as reported in high-grade serous ovarian cancer [183]. CX-5461 is in phase I/II clinical trials for hematological cancers [184], but further investigations are necessary to understand the crosstalk between ribosome biogenesis inhibition and DDR activation induced by CX-5461 treatment of CRC cells.

The other small molecule which inhibits RNA pol I activity, CX-3543, or quarfloxin, is a fluoroquinolone derivative which interferes with the binding of nucleolin on rDNA G-quadruplex regions, thereby inhibiting RNA pol I-driven transcription [185]. CX-3543 induced in vitro apoptosis of various human CRC cell lines, including p53 mutant COLO-205, HCC-2998, HCT-15, and KM12 cells, and p53-wild-type HCT-116 cells, and inhibited in vivo HCT-116 tumor xenograft growth [185,186]. CX-3543 has entered a phase II clinical trial in patients with low to intermediate grade neuroendocrine tumors [186,187]. Besides, the demonstration that it also causes a strong inhibition of MYC expression in CRC cells [186] should stimulate more comprehensive work to assess its impact on colorectal tumorigenesis. It has also been shown that induction of HCT-116 and DLD1 colorectal cancer cell death induced by CX-5461 and CX-3543 treatment in vitro and in tumor xenografts is mediated by the activation of a robust DNA damage response [181]. This type of genotoxic cell response indicates that CX-5461 and CX-3543 could be very potent in killing CRC cells with a defective homologous recombination pathway. This defect is generally due to mutations in DNA damage repair enzymes or in *BRCA1/2* genes and is frequently observed in the sub-group of CRC with MSI [10]. Patients with high

MSI CRC show a positive response to immunotherapeutic treatment [188], and it will be meaningful to investigate whether CX-5461 and CX-3543 potentiate immunotherapies in CRC.

Another molecule interfering with rDNA transcription is BMH-21. BMH21 is a DNA intercalator molecule which impairs RNA pol I activity by binding to rDNA GC-rich regions and simultaneously disengages RNA pol I from rDNA chromatin and activates its proteasome-mediated degradation [188,189]. BMH-21 activates a rapid p53-dependent cytotoxic effect with little associated DNA damage in many human cancer cell lines, including HCT-116 CRC cells, and is also very potent in inhibiting HCT-116 xenograft growth in mice [190]. Very interestingly, it was recently reported that CRC patient-derived xenografts contain a sub-population of cancer stem cells characterized by high expression levels of the RNA pol I subunit A (PolR₁A) and elevated biosynthetic capacities [191]. Besides, PolR₁A is shown as one of the prerequisites for in vivo tumor growth [191]. CRC stem cells with high expression of PolR₁A were classified at the top of tumor stem cell hierarchy and ip injection of BMH-21 induced a significant decrease in PolR₁A-high stem cell and in tumor xenograft growth [191]. In addition, it appears that the FDA-approved antimalarial drug amodiaquine was recently shown to block rDNA transcription and proliferation of various human CRC cells lines by a mechanism very close to the induction of ribosome biogenesis stress and cell death by BMH-21 [192]. Similarly, the natural plant-derived product alkaloid haemanthamine was shown to specifically inhibit pre-rRNA processing, leading to the accumulation of the 47S pre-rRNA and impeding the formation of the mature 28S and 5.8S species [193]. Interestingly, haemanthamine was reported to trigger p53-associated nucleolar stress and apoptosis in CRC HCT-116 [193], arguing in favor of its use in CRC treatment. Collectively, these data indicate that inhibitors of ribosome biogenesis belonging to the CX-5436 family [194], BMH-21 and its derivatives [195], and plant alkaloids [193] hold great potential for CRC treatment and evidence of their efficacy in clinical phase I/II for human CRC treatment are eagerly awaited.

6. Conclusions

Evidence that the ribosome biogenesis pathway is altered in CRC has markedly increased in recent years. Studies using cellular and animal models largely contributed to establishing that the alterations leading to quantitative increase in ribosome production were linked to colorectal tumorigenesis initiation and/or progression. At present, clinical studies have also highlighted several regulators of ribosome biogenesis as novel biomarkers of human CRC, reinforcing the role of ribosome biogenesis in CRC. However, while few studies initiated the long process of demonstrating that the ribosome biogenesis pathway is an innovative target in CRC management, pre-clinical studies on animal models with various chemical or natural inhibitors of ribosome biogenesis are now needed to determine their objective effectiveness and to address their potential benefit(s) for CRC patients. Moreover, research is ongoing in many laboratories worldwide to unravel new ribosome biogenesis inhibitors following various drug discovery strategies, from drug-repurposing to development of high-throughput screening. These strategies may identify molecules to target not only the increase in ribosome biogenesis observed in CRC cells but also the cancer-modified ribosomes, the recent discovery of which is owing to the tremendous progress that has recently been made to obtain high-resolution structural ribosomal features. It is compelling to find out that several molecules that were initially discovered with potent anti-CRC effects (i.e., catalpol, calcimycin, flavonoid derivatives, oxaliplatin) are target ribosome biogenesis [196]. Thus, a new phase in CRC patient management is envisioned, where characterization of ribosome biogenesis pathways together with qualitative analysis of rRNAs, will help to create personalized anticancer molecules with much less genotoxicity.

Funding: S.N.S. is a PhD fellowship recipient from the French National Ligue Contre le Cancer.

Acknowledgments: We thank Brigitte Manship for fully editing the manuscript. We apologize to the many colleagues whose work was not cited in this review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)]
2. Brenner, H.; Kloor, M.; Pox, C.P. Colorectal cancer. *Lancet* **2014**, *383*, 1490–1502. [[CrossRef](#)]
3. Kuipers, E.J.; Grady, W.M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T.; Sung, J.J.; Boelens, P.G.; Van De Velde, C.J.H.; Watanabe, T. Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Safiri, S.; Sepanlou, S.G.; Ikuta, K.S.; Bisignano, C.; Salimzadeh, H.; Delavari, A.; Ansari, R.; Roshandel, G.; Merat, S.; Fitzmaurice, C.; et al. The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *4*, 913–933. [[CrossRef](#)]
5. Keum, N.N.; Giovannucci, E. Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 713–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jemal, A.; Center, M.M.; DeSantis, C.; Ward, E.M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2010**, *19*, 1893–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Vatandoust, S.; Price, T.J.; Karapetis, C.S. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 11767–11776. [[CrossRef](#)]
8. Kuipers, E.J.; Rösch, T.; Bretthauer, M. Colorectal cancer screening—Optimizing current strategies and new directions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 130–142. [[CrossRef](#)]
9. Uttley, L.; Whiteman, B.L.; Woods, H.B.; Harnan, S.; Philips, S.T.; Cree, I.A. Building the Evidence Base of Blood-Based Biomarkers for Early Detection of Cancer: A Rapid Systematic Mapping Review. *EBioMedicine* **2016**, *10*, 164–173. [[CrossRef](#)]
10. Dienstmann, R.; Vermeulen, L.; Guinney, J.; Kopetz, S.; Tejpar, S.; Tabernero, J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 79–92. [[CrossRef](#)]
11. Sepulveda, A.R.; Hamilton, S.R.; Allegra, C.J.; Grody, W.; Cushman-Vokoun, A.M.; Funkhouser, W.K.; Kopetz, S.E.; Lieu, C.; Lindor, N.M.; Minsky, B.D.; et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from The American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 1453–1496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. García-Figueiras, R.; Baleato-González, S.; Padhani, A.R.; Marhuenda, A.; Luna, A.; Alcalá, L.; Carballo-Castro, A.; Álvarez-Castro, A. Advanced imaging of colorectal cancer: From anatomy to molecular imaging. *Insights Imaging* **2016**, *7*, 285–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Singh, M.P.; Rai, S.; Pandey, A.; Singh, N.K.; Srivastava, S. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
14. Gbolahan, O.; O’Neil, B. Update on systemic therapy for colorectal cancer: Biologics take sides. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Xie, Y.H.; Chen, Y.X.; Fang, J.Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 1–30. [[CrossRef](#)]
16. Walther, A.; Johnstone, E.; Swanton, C.; Midgley, R.; Tomlinson, I.; Kerr, D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 489–499. [[CrossRef](#)]
17. Sveen, A.; Kopetz, S.; Lothe, R.A. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: Strength in complexity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 11–32. [[CrossRef](#)]
18. Van Schaeuybroeck, S.; Allen, W.L.; Turkington, R.C.; Johnston, P.G. Implementing prognostic and predictive biomarkers in CRC clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 222–232. [[CrossRef](#)]
19. Punt, C.J.A.; Koopman, M.; Vermeulen, L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 235–246. [[CrossRef](#)]
20. Misale, S.; Di Nicolantonio, F.; Sartore-Bianchi, A.; Siena, S.; Bardelli, A. Resistance to Anti-EGFR therapy in colorectal cancer: From heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 1269–1280. [[CrossRef](#)]
21. Taieb, J.; Jung, A.; Sartore-Bianchi, A.; Peeters, M.; Seligmann, J.; Zaanani, A.; Burdon, P.; Montagut, C.; Laurent-Puig, P. The Evolving Biomarker Landscape for Treatment Selection in Metastatic Colorectal Cancer. *Drugs* **2019**, *79*, 1375–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Powell, S.M.; Zilz, N.; Beazer-Barclay, Y.; Bryan, T.M.; Hamilton, S.R.; Thibodeau, S.N.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **1992**, *359*, 235–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fearnhead, N.S.; Britton, M.P.; Bodmer, W.F. The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 721–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fodde, R.; Smits, R.; Clevers, H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 55–67. [[CrossRef](#)]
25. Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Velculescu, V.E.; Zhou, S.; Diaz, L.A.; Kinzler, K.W. Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *340*, 1546–1558. [[CrossRef](#)]
26. Yaeger, R.; Chatila, W.K.; Lipsyc, M.D.; Hechtman, J.F.; Cercek, A.; Sanchez-Vega, F.; Jayakumaran, G.; Middha, S.; Zehir, A.; Donoghue, M.T.A.; et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 125–136.e3. [[CrossRef](#)]
27. Lièvre, A.; Blons, H.; Laurent-Puig, P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 3033–3043. [[CrossRef](#)]
28. Winder, T.; Lenz, H.J. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2010**, *36*, 550–556. [[CrossRef](#)]
29. Zhai, Z.; Yu, X.; Yang, B.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Li, X.; Sun, H. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: Clinical implications, challenges and solutions for treatment resistance. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *64*, 107–115. [[CrossRef](#)]
30. Tang, J.; Feng, Y.; Kuick, R.; Green, M.; Green, M.; Sakamoto, N.; Kurosu, Y.; Lin, J.; Cho, K.R.; Fearon, E.R. Trp53 null and R270H mutant alleles have comparable effects in regulating invasion, metastasis, and gene expression in mouse colon tumorigenesis. *Lab. Invest.* **2019**, *99*, 1454–1469. [[CrossRef](#)]
31. Jung, G.; Hernández-Illán, E.; Moreira, L.; Balaguer, F.; Goel, A. Epigenetics of colorectal cancer: Biomarker and therapeutic potential. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *17*, 111–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Inamura, K. Colorectal cancers: An update on their molecular pathology. *Cancers* **2018**, *10*, 26. [[CrossRef](#)]
33. Rosenwald, I.B. The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. *Oncogene* **2004**, *23*, 3230–3247. [[CrossRef](#)]
34. Silvera, D.; Formenti, S.C.; Schneider, R.J. Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 254–266. [[CrossRef](#)]
35. Truitt, M.L.; Ruggero, D. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 288–304. [[CrossRef](#)]
36. Robichaud, N.; Sonenberg, N.; Ruggero, D.; Schneider, R.J. Translational control in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2010**, *1803*, 673–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pelletier, J.; Sonenberg, N. The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88*, 307–335. [[CrossRef](#)]
39. Baßler, J.; Hurt, E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88*, 281–306. [[CrossRef](#)]
40. Xue, S.; Barna, M. Specialized ribosomes: A new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 355–369. [[CrossRef](#)]
41. Ban, N.; Beckmann, R.; Cate, J.H.D.; Dinman, J.D.; Dragon, F.; Ellis, S.R.; Lafontaine, D.L.J.; Lindahl, L.; Liljas, A.; Lipton, J.M.; et al. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *24*, 165–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Henras, A.K.; Plisson-Chastang, C.; O'Donohue, M.F.; Chakraborty, A.; Gleizes, P.E. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2015**, *6*, 225–242. [[CrossRef](#)]
43. Sloan, K.E.; Warda, A.S.; Sharma, S.; Entian, K.D.; Lafontaine, D.L.J.; Bohnsack, M.T. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 1138–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vaklavas, C.; Blume, S.W.; Grizzle, W.E. Translational dysregulation in cancer: Molecular insights and potential clinical applications in biomarker development. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ruggero, D.; Pandolfi, P.P. Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 179–192. [[CrossRef](#)]
46. Ruggero, D. Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*. [[CrossRef](#)]

47. Pelletier, J.; Thomas, G.; Volarević, S. Ribosome biogenesis in cancer: New players and therapeutic avenues. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2018**, *18*, 51–63. [[CrossRef](#)]
48. Penzo, M.; Montanaro, L.; Treré, D.; Derenzini, M. The Ribosome Biogenesis—Cancer Connection. *Cells* **2019**, *8*, 55. [[CrossRef](#)]
49. Bradner, J.E.; Hnisz, D.; Young, R.A. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell* **2017**, *168*, 629–643. [[CrossRef](#)]
50. Dang, C.V. MYC on the path to cancer. *Cell* **2012**, *149*, 22–35. [[CrossRef](#)]
51. Drygin, D.; Rice, W.G.; Grummt, I. The RNA polymerase I transcription machinery: An emerging target for the treatment of cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 131–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gaviraghi, M.; Vivori, C.; Tonon, G. How Cancer Exploits Ribosomal RNA Biogenesis: A Journey beyond the Boundaries of rRNA Transcription. *Cells* **2019**, *8*, 1098. [[CrossRef](#)]
53. Van Riggelen, J.; Yetil, A.; Felsher, D.W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 301–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ji, H.; Wu, G.; Zhan, X.; Nolan, A.; Koh, C.; de Marzo, A.; Doan, H.M.; Fan, J.; Cheadle, C.; Fallahi, M.; et al. Cell-type independent MYC target genes reveal a primordial signature involved in biomass accumulation. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26057. [[CrossRef](#)]
55. Gabay, M.; Li, Y.; Felsher, D.W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a014241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Destefanis, F.; Manara, V.; Bellosta, P. Myc as a regulator of ribosome biogenesis and cell competition: A link to cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4037. [[CrossRef](#)]
57. Arabi, A.; Wu, S.; Ridderstråle, K.; Bierhoff, H.; Shiue, C.; Fatyol, K.; Fahlén, S.; Hydbring, P.; Söderberg, O.; Grummt, I.; et al. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 303–310. [[CrossRef](#)]
58. Campbell, K.J.; White, R.J. MYC regulation of cell growth through control of transcription by RNA polymerases I and III. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a018408. [[CrossRef](#)]
59. Barna, M.; Pusic, A.; Zollo, O.; Costa, M.; Kondrashov, N.; Rego, E.; Rao, P.H.; Ruggero, D. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* **2008**, *456*, 971–975. [[CrossRef](#)]
60. Ruggero, D. The role of Myc-induced protein synthesis in cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8839–8843. [[CrossRef](#)]
61. Drakos, E.; Rassidakis, G.Z.; Medeiros, L.J. Mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway signalling in lymphomas. *Expert Rev. Mol. Med.* **2008**, *10*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Devlin, J.R.; Hannan, K.M.; Hein, N.; Cullinane, C.; Kusnadi, E.; Ng, P.Y.; George, A.J.; Shortt, J.; Bywater, M.J.; Poortinga, G.; et al. Combination therapy targeting ribosome biogenesis and mRNA translation synergistically extends survival in MYC-driven lymphoma. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 59–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Stefanovsky, V.Y.; Pelletier, G.; Hannan, R.; Gagnon-Kugler, T.; Rothblum, L.I.; Moss, T. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 1063–1073. [[CrossRef](#)]
64. Derenzini, M.; Montanaro, L.; Trerè, D. Ribosome biogenesis and cancer. *Acta Histochem.* **2017**, *119*, 190–197. [[CrossRef](#)]
65. Ebright, R.Y.; Lee, S.; Wittner, B.S.; Niederhoffer, K.L.; Nicholson, B.T.; Bardia, A.; Truesdell, S.; Wiley, D.F.; Wesley, B.; Li, S.; et al. Deregulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis. *Science* **2020**, *367*, 1468–1473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Belin, S.; Beghin, A.; Solano-González, E.; Bezin, L.; Brunet-Manquat, S.; Textoris, J.; Prats, A.C.; Mertani, H.C.; Dumontet, C.; Diaz, J.J. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7147. [[CrossRef](#)]
67. Prakash, V.; Carson, B.B.; Feenstra, J.M.; Dass, R.A.; Sekyrova, P.; Hoshino, A.; Petersen, J.; Guo, Y.; Parks, M.M.; Kurylo, C.M.; et al. Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–16. [[CrossRef](#)]
68. Sulima, S.; Kampen, K.; De Keersmaecker, K. Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells* **2019**, *8*, 229. [[CrossRef](#)]
69. Derenzini, M.; Farabegoli, F.; Trerè, D. Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells. *Histochem. J.* **1992**, *24*, 951–956. [[CrossRef](#)]
70. Montanaro, L.; Treré, D.; Derenzini, M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 301–310. [[CrossRef](#)]

71. Dagher, J.; Delahunt, B.; Rioux-Leclercq, N.; Egevad, L.; Srigley, J.R.; Coughlin, G.; Dunglinson, N.; Gianduzzo, T.; Kua, B.; Malone, G.; et al. Clear cell renal cell carcinoma: Validation of World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading. *Histopathology* **2017**, *71*, 918–925. [[CrossRef](#)]
72. Schlageter, M.; Terracciano, L.M.; D'Angelo, S.; Sorrentino, P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 15955–15964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Stamatopoulou, V.; Parisot, P.; De Vleeschouwer, C.; Lafontaine, D.L.J. Use of the iNo score to discriminate normal from altered nucleolar morphology, with applications in basic cell biology and potential in human disease diagnostics. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 2387–2406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Van Der Flier, L.G.; Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **2009**, *71*, 241–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Bastide, A.; David, A. The ribosome, (slow) beating heart of cancer (stem) cell. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 34. [[CrossRef](#)]
76. Lindeboom, R.G.; Voorthuisen, L.; Oost, K.C.; Rodríguez-Colman, M.J.; Luna-Velez, M.V.; Furlan, C.; Baraille, F.; Jansen, P.W.; Ribeiro, A.; Burgering, B.M.; et al. Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation. *Mol. Syst. Biol.* **2018**, *14*. [[CrossRef](#)]
77. Stedman, A.; Beck-Cormier, S.; Le Bouteiller, M.; Raveux, A.; Vandormael-Pournin, S.; Coqueran, S.; Lejour, V.; Jarzebowski, L.; Toledo, F.; Robine, S.; et al. Ribosome biogenesis dysfunction leads to p53-apoptosis and goblet cell differentiation of mouse intestinal stem/progenitor cells. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1865–1876. [[CrossRef](#)]
78. Raveux, A.; Stedman, A.; Coqueran, S.; Vandormael-Pournin, S.; Owens, N.; Romagnolo, B.; Cohen-Tannoudji, M. Compensation between Wnt-driven tumorigenesis and cellular responses to ribosome biogenesis inhibition in the murine intestinal epithelium. *Cell Death Differ.* **2020**. [[CrossRef](#)]
79. Brighenti, E.; Calabrese, C.; Liguori, G.; Giannone, F.A.; Trerè, D.; Montanaro, L.; Derenzini, M. Interleukin 6 downregulates p53 expression and activity by stimulating ribosome biogenesis: A new pathway connecting inflammation to cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 4396–4406. [[CrossRef](#)]
80. Guo, H.; Zeng, W.; Feng, L.; Yu, X.; Li, P.; Zhang, K.; Zhou, Z.; Cheng, S. Integrated transcriptomic analysis of distance-related field cancerization in rectal cancer patients. *Oncotarget* **2017**, *8*, 61107–61117. [[CrossRef](#)]
81. Wang, M.; Niu, W.; Hu, R.; Wang, Y.; Liu, Y.; Liu, L.; Zhong, J.; Zhang, C.; You, H.; Zhang, J.; et al. POLR1D promotes colorectal cancer progression and predicts poor prognosis of patients. *Mol. Carcinog.* **2019**, *58*, 735–748. [[CrossRef](#)]
82. Bellido, F.; Sowada, N.; Mur, P.; Lázaro, C.; Pons, T.; Valdés-Mas, R.; Pineda, M.; Aiza, G.; Iglesias, S.; Soto, J.L.; et al. Association Between Germline Mutations in BRF1, a Subunit of the RNA Polymerase III Transcription Complex, and Hereditary Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 181–194.e20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Nguyen, D.Q.; Hoang, D.H.; Nguyen, T.T.V.; Ho, H.D.; Huynh, V.; Shin, J.H.; Ly, Q.T.; Thi Nguyen, D.D.; Ghoda, L.; Marcucci, G.; et al. Ebp1 p48 promotes oncogenic activities in human colon cancer cells through regulation of TIF-90-mediated ribosomal RNA synthesis. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 17612–17621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Liang, X.; Xie, R.; Su, J.; Ye, B.; Wei, S.; Liang, Z.; Bai, R.; Chen, Z.; Li, Z.; Gao, X. Inhibition of RNA polymerase III transcription by Triptolide attenuates colorectal tumorigenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Kusnadi, E.P.; Hannan, K.M.; Hicks, R.J.; Hannan, R.D.; Pearson, R.B.; Kang, J. Regulation of rDNA transcription in response to growth factors, nutrients and energy. *Gene* **2015**, *556*, 27–34. [[CrossRef](#)]
86. Mullineux, S.T.; Lafontaine, D.L.J. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? *Biochimie* **2012**, *94*, 1521–1532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Tsoi, H.; Lam, K.C.; Dong, Y.; Zhang, X.; Lee, C.K.; Zhang, J.; Ng, S.C.; Ng, S.S.M.; Zheng, S.; Chen, Y.; et al. Pre-45s rRNA promotes colon cancer and is associated with poor survival of CRC patients. *Oncogene* **2017**, *36*, 6109–6118. [[CrossRef](#)]
88. Rennoll, S. Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *World J. Biol. Chem.* **2015**, *6*, 290. [[CrossRef](#)]
89. Dai, M.S.; Lu, H. Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105*, 670–677. [[CrossRef](#)]
90. Lafita-Navarro, M.C.; Kim, M.; Borenstein-Auerbach, N.; Venkateswaran, N.; Hao, Y.H.; Ray, R.; Brabletz, T.; Scaglioni, P.P.; Shay, J.W.; Conacci-Sorrell, M. The aryl hydrocarbon receptor regulates nucleolar activity and protein synthesis in MYC-expressing cells. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 1303–1308. [[CrossRef](#)]

91. Uchenunu, O.; Pollak, M.; Topisirovic, I.; Hulea, L. Oncogenic kinases and perturbations in protein synthesis machinery and energetics in neoplasia. *J. Mol. Endocrinol.* **2019**, *62*, R83–R103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Charitou, T.; Srihari, S.; Lynn, M.A.; Jarbou, M.A.; FASTERIUS, E.; Moldovan, M.; Shirasawa, S.; Tsunoda, T.; Ueffing, M.; Xie, J.; et al. Transcriptional and metabolic rewiring of colorectal cancer cells expressing the oncogenic KRASG13D mutation. *Br. J. Cancer* **2019**, *121*, 37–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Telechea-Fernández, M.; Rodríguez-Fernández, L.; García, C.; Zaragoza, R.; Viña, J.R.; Cervantes, A.; García-Trevijano, E.R.; Telechea-Fernández, M.; Rodríguez-Fernández, L.; García, C.; et al. New localization and function of calpain-2 in nucleoli of colorectal cancer cells in ribosomal biogenesis: Effect of KRAS status. *Oncotarget* **2018**, *9*, 9100–9113, Correction in *Oncotarget* **2018**, *9*, 18664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Chakraborty, A.; Uechi, T.; Kenmochi, N. Guarding the “translation apparatus”: Defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, *2*, 507–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Hannan, K.M.; Hannan, R.D.; Smith, S.D.; Jefferson, L.S.; Lun, M.; Rothblum, L.I. Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* **2000**, *19*, 4988–4999. [[CrossRef](#)]
96. Mongelard, F.; Bouvet, P. Nucleolin: A multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 80–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Wang, X.; Yu, H.; Sun, W.; Kong, J.; Zhang, L.; Tang, J.; Wang, J.; Xu, E.; Lai, M.; Zhang, H. The long non-coding RNA CYTOR drives colorectal cancer progression by interacting with NCL and Sam68. *Mol. Cancer* **2018**, *17*. [[CrossRef](#)]
98. Kharde, S.; Calviño, F.R.; Gumiero, A.; Wild, K.; Sinning, I. The structure of Rpf2-Rrs1 explains its role in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 7083–7095. [[CrossRef](#)]
99. Nishimura, K.; Kumazawa, T.; Kuroda, T.; Katagiri, N.; Tsuchiya, M.; Goto, N.; Furumai, R.; Murayama, A.; Yanagisawa, J.; Kimura, K. Perturbation of Ribosome Biogenesis Drives Cells into Senescence through 5S RNP-Mediated p53 Activation. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 1310–1323. [[CrossRef](#)]
100. Wu, X.L.; Yang, Z.W.; He, L.; Dong, P.D.; Hou, M.X.; Meng, X.K.; Zhao, H.P.; Wang, Z.Y.; Wang, F. RRS1 silencing suppresses colorectal cancer cell proliferation and tumorigenesis by inhibiting G2/M progression and angiogenesis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 82968–82980. [[CrossRef](#)]
101. Hua, Y.N.; Song, J.L.; Ma, Z.L.; Wu, L.; Zhang, Z.; Zhang, L.; Li, N.; Cong, S.B.; Hou, L. Effect of RRS1 gene knockdown on BT549 cell line proliferation and apoptosis in breast cancer. *Neoplasma* **2019**, *66*, 28–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Xia, W.; Liu, Y.; Cheng, T.; Xu, T.; Dong, M.; Hu, X. Down-regulated lncRNA SBF2-AS1 inhibits tumorigenesis and progression of breast cancer by sponging microRNA-143 and repressing RRS1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Chen, F.; Jin, Y.; Feng, L.; Zhang, J.; Tai, J.; Shi, J.; Yu, Y.; Lu, J.; Wang, S.; Li, X.; et al. RRS1 gene expression involved in the progression of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Wang, J.; Li, Z.; Zuo, C.; Xie, Q.; Li, H.; Jia, J.; Zhen, Z.; Qi, R.; Li, Z.; Liu, D.; et al. Knockdown of RRS1 by lentiviral-mediated RNAi promotes apoptosis and suppresses proliferation of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 2166–2172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Thomson, E.; Ferreira-Cerca, S.; Hurt, E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 4815–4821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Rohrmoser, M.; Hölzel, M.; Grimm, T.; Malamoussi, A.; Harasim, T.; Orban, M.; Pfisterer, I.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Eick, D. Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 Controls Nucleolar Localization and Assembly of the PeBoW Complex Required for Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 3682–3694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Lapik, Y.R.; Fernandes, C.J.; Lau, L.F.; Pestov, D.G. Physical and functional interaction between Pes1 and Bop1 in mammalian ribosome biogenesis. *Mol. Cell* **2004**, *15*, 17–29. [[CrossRef](#)]
108. Hölzel, M.; Rohrmoser, M.; Schlee, M.; Grimm, T.; Harasim, T.; Malamoussi, A.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Hiddemann, W.; Bornkamm, G.W.; et al. Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 367–378. [[CrossRef](#)]
109. Grimm, T.; Hölzel, M.; Rohrmoser, M.; Harasim, T.; Malamoussi, A.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Eick, D. Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3030–3043. [[CrossRef](#)]

110. Hlzel, M.; Grimm, T.; Rohmoser, M.; Malamoussi, A.; Harasim, T.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Eick, D. The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 789–800. [[CrossRef](#)]
111. Sloan, K.E.; Leisegang, M.S.; Doebele, C.; Ramirez, A.S.; Simm, S.; Safferthal, C.; Kretschmer, J.; Schorge, T.; Markoutsas, S.; Haag, S.; et al. The association of late-acting snoRNPs with human pre-ribosomal complexes requires the RNA helicase DDX21. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 553–564. [[CrossRef](#)]
112. Toyoshima, M.; Howie, H.L.; Imakura, M.; Walsh, R.M.; Annis, J.E.; Chang, A.N.; Frazier, J.; Chau, B.N.; Loboda, A.; Linsley, P.S.; et al. Functional genomics identifies therapeutic targets for MYC-driven cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9545–9550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Xie, W.; Feng, Q.; Su, Y.; Dong, B.; Wu, J.; Meng, L.; Qu, L.; Shou, C. Transcriptional regulation of PES1 expression by c-Jun in colon cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Xie, W.; Qu, L.; Meng, L.; Liu, C.; Wu, J.; Shou, C. PES1 regulates sensitivity of colorectal cancer cells to anticancer drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *431*, 460–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Romanova, L.; Grand, A.; Zhang, L.; Rayner, S.; Katoku-Kikyo, N.; Kellner, S.; Kikyo, N. Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4968–4977. [[CrossRef](#)]
116. Tang, X.; Zha, L.; Li, H.; Liao, G.; Huang, Z.; Peng, X.; Wang, Z. Upregulation of GNL3 expression promotes colon cancer cell proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 2023–2032. [[CrossRef](#)]
117. Holdt, L.M.; Stahringer, A.; Sass, K.; Pichler, G.; Kulak, N.A.; Wilfert, W.; Kohlmaier, A.; Herbst, A.; Northoff, B.H.; Nicolaou, A.; et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat. Commun.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
118. Hao, S.; Cong, L.; Qu, R.; Liu, R.; Zhang, G.; Li, Y. Emerging roles of circular RNAs in colorectal cancer. *Onco. Targets. Ther.* **2019**, *12*, 4765–4777. [[CrossRef](#)]
119. Cheng, L.; Yuan, B.; Ying, S.; Niu, C.; Mai, H.; Guan, X.; Yang, X.; Teng, Y.; Lin, J.; Huang, J.; et al. PES1 is a critical component of telomerase assembly and regulates cellular senescence. *Sci. Adv.* **2019**, *5*. [[CrossRef](#)]
120. Bertorelle, R.; Rampazzo, E.; Pucciarelli, S.; Nitti, D.; De Rossi, A. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 1940–1950. [[CrossRef](#)]
121. Schlosser, I.; Hölzel, M.; Mürnseer, M.; Burtscher, H.; Weidle, U.H.; Eick, D. A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6148–6156. [[CrossRef](#)]
122. Killian, A.; Sarafan-Vasseur, N.; Sesboué, R.; Le Pessot, F.; Blanchard, F.; Lamy, A.; Laurent, M.; Flaman, J.M.; Frébourg, T. Contribution of the BOPI gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis. *Genes Chromosom. Cancer* **2006**, *45*, 874–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Lips, E.H.; van Eijk, R.; de Graaf, E.J.R.; Oosting, J.; de Miranda, N.F.C.C.; Karsten, T.; van de Velde, C.; Eilers, P.H.C.; Tollenaar, R.A.E.M.; van Wezel, T.; et al. Integrating chromosomal aberrations and gene expression profiles to dissect rectal tumorigenesis. *BMC Cancer* **2008**, *8*. [[CrossRef](#)]
124. Qi, J.; Yu, Y.; Öztürk, Ö.A.; Holland, J.D.; Besser, D.; Fritzmann, J.; Wulf-Goldenberg, A.; Eckert, K.; Fichtner, I.; Birchmeier, W. New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals. *Gut* **2016**, *65*, 1690–1701. [[CrossRef](#)]
125. Chen, X.; Zhao, Y. Block of proliferation 1 promotes cell migration and invasion in human colorectal cancer cells via the JNK pathway. *J. Clin. Lab. Anal.* **2020**, *34*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Killian, A.; Le Meur, N.; Sesboué, R.; Bourguignon, J.; Bougeard, G.; Gautherot, J.; Bastard, C.; Frébourg, T.; Flaman, J.M. Inactivation of the RRB1-pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene* **2004**, *23*, 8597–8602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Chen, B.; Dragomir, M.P.; Fabris, L.; Bayraktar, R.; Knutsen, E.; Liu, X.; Tang, C.; Li, Y.; Shimura, T.; Ivkovic, T.C.; et al. The Long Noncoding RNA CCAT2 induces chromosomal instability through BOP1-AURKB signaling. *Gastroenterology* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Sapio, R.T.; Nezdur, A.N.; Krevetski, M.; Anikin, L.; Manna, V.J.; Minkovsky, N.; Pestov, D.G. Inhibition of post-transcriptional steps in ribosome biogenesis confers cytoprotection against chemotherapeutic agents in a p53-dependent manner. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]
129. Li, J.L.; Chen, C.; Chen, W.; Zhao, L.F.; Xu, X.K.; Li, Y.; Yuan, H.Y.; Lin, J.R.; Pan, J.P.; Jin, B.L.; et al. Integrative genomic analyses identify WDR12 as a novel oncogene involved in glioblastoma. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 7344–7355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

130. Sun, L.C.; Qian, H.X. Screening for implicated genes in colorectal cancer using whole-genome gene expression profiling. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 8260–8268. [[CrossRef](#)]
131. Zhou, X.; Liao, W.J.; Liao, J.M.; Liao, P.; Lu, H. Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome. *J. Mol. Cell Biol.* **2015**, *7*, 92–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Mao-De, L.; Jing, X. Ribosomal Proteins and Colorectal Cancer. *Curr. Genomics* **2007**, *8*, 43–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Hein, N.; Hannan, K.M.; George, A.J.; Sanij, E.; Hannan, R.D. The nucleolus: An emerging target for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 643–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Calamita, P.; Gatti, G.; Miluzio, A.; Scagliola, A.; Biffo, S. Translating the game: Ribosomes as active players. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Aubert, M.; O'donohue, M.F.; Lebaron, S.; Gleizes, P.E. Pre-ribosomal RNA processing in human cells: From mechanisms to congenital diseases. *Biomolecules* **2018**, *8*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Turi, Z.; Lacey, M.; Mistrik, M.; Moudry, P. Impaired ribosome biogenesis: Mechanisms and relevance to cancer and aging. *Ageing (Albany NY)* **2019**, *11*, 2512–2540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Kampen, K.R.; Sulima, S.O.; Vereecke, S.; De Keersmaecker, K. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 1013–1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Ferreira-Cerca, S.; Pöll, G.; Gleizes, P.E.; Tschochner, H.; Milkereit, P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol. Cell* **2005**, *20*, 263–275. [[CrossRef](#)]
139. Nieminen, T.T.; O'Donohue, M.F.; Wu, Y.; Lohi, H.; Scherer, S.W.; Paterson, A.D.; Ellonen, P.; Abdel-Rahman, W.M.; Valo, S.; Mecklin, J.P.; et al. Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency. *Gastroenterology* **2014**, *147*. [[CrossRef](#)]
140. Robledo, S.; Idol, R.A.; Crimmins, D.L.; Ladenson, J.H.; Mason, P.J.; Bessler, M. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* **2008**, *14*, 1918–1929. [[CrossRef](#)]
141. Yu, C.; Hong, H.; Zhang, S.; Zong, Y.; Ma, J.; Lu, A.; Sun, J.; Zheng, M. Identification of key genes and pathways involved in microsatellite instability in colorectal cancer. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 2065–2076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Grasso, S.; Tristante, E.; Saceda, M.; Carbonell, P.; Mayor-López, L.; Carballo-Santana, M.; Carrasco-García, E.; Rocamora-Reverte, L.; García-Morales, P.; Carballo, F.; et al. Resistance to selumetinib (AZD6244) in colorectal cancer cell lines is mediated by p70s6K and RPS6 activation. *Neoplasia* **2014**, *16*, 845–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Zou, D.; Zhang, H.; Ke, J.; Li, J.; Zhu, Y.; Gong, Y.; Yang, Y.; Tian, J.; Zhang, Y.; Peng, X.; et al. Three functional variants were identified to affect RPS24 expression and significantly associated with risk of colorectal cancer. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 295–303. [[CrossRef](#)]
144. Wang, Y.; Sui, J.; Li, X.; Cao, F.; He, J.; Yang, B.; Zhu, X.; Sun, Y.; Pu, Y.D. RPS24 knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and proliferation in vitro. *Gene* **2015**, *571*, 286–291. [[CrossRef](#)]
145. Landowski, M.; O'Donohue, M.F.; Buros, C.; Ghazvinian, R.; Montel-Lehry, N.; Vlachos, A.; Sieff, C.A.; Newburger, P.E.; Niewiadomska, E.; Matysiak, M.; et al. Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Genet.* **2013**, *132*, 1265–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Klein, D.J.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 141–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Wlodarski, M.W.; Da Costa, L.; O'donohue, M.F.; Gastou, M.; Karboul, N.; Montel-Lehry, N.; Hainmann, I.; Danda, D.; Szvetnik, A.; Pastor, V.; et al. Recurring mutations in RPL15 are linked to hydrops fetalis and treatment independence in diamond-blackfan anemia. *Haematologica* **2018**, *103*, 949–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Dong, Z.; Jiang, H.; Liang, S.; Wang, Y.; Jiang, W.; Zhu, C. Ribosomal protein I15 is involved in colon carcinogenesis. *Int. J. Med. Sci.* **2019**, *16*, 1132. [[CrossRef](#)]
149. Wang, H.; Zhao, L.N.; Li, K.Z.; Ling, R.; Li, X.J.; Wang, L. Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer* **2006**, *6*. [[CrossRef](#)]
150. Ramon Cajal, S.Y.; Castellvi, J.; Hümmer, S.; Peg, V.; Pelletier, J.; Sonenberg, N. Beyond molecular tumor heterogeneity: Protein synthesis takes control. *Oncogene* **2018**, *37*, 2490–2501. [[CrossRef](#)]
151. Shen, A.; Chen, Y.; Liu, L.; Huang, Y.; Chen, H.; Qi, F.; Lin, J.; Shen, Z.; Wu, X.; Wu, M.; et al. EBF1-mediated upregulation of ribosome assembly factor PNO1 contributes to cancer progression by negatively regulating the p53 signaling pathway. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 2257–2270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

152. Zhang, J.; Ren, P.; Xu, D.; Liu, X.; Liu, Z.; Zhang, C.; Li, Y.; Wang, L.; Du, X.; Xing, B. Human UTP14a promotes colorectal cancer progression by forming a positive regulation loop with c-Myc. *Cancer Lett.* **2019**, *440*, 106–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Jiang, Z.; Li, S.; Han, M.-J.; Hu, G.-M.; Cheng, P. High expression of NSUN5 promotes cell proliferation via cell cycle regulation in colorectal cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 3858–3870. [[PubMed](#)]
154. He, J.Y.; Liu, X.; Qi, Z.H.; Wang, Q.; Lu, W.Q.; Zhang, Q.T.; He, S.Y.; Wang, Z.D. Small Nucleolar RNA, C/D Box 16 (SNORD16) Acts as a Potential Prognostic Biomarker in Colon Cancer. *Dose-Response* **2020**, *18*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Babaian, A.; Rothe, K.; Girodat, D.; Minia, I.; Djondovic, S.; Milek, M.; Spencer Miko, S.E.; Wieden, H.J.; Landthaler, M.; Morin, G.B.; et al. Loss of m1acp3Ψ Ribosomal RNA Modification Is a Major Feature of Cancer. *Cell Rep.* **2020**, *31*. [[CrossRef](#)]
156. Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 640–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Raelijaona, F.; Thore, S.; Fribourg, S. Domain definition and interaction mapping for the endonuclease complex hNob1/hPno1. *RNA Biol.* **2018**, *15*, 1174–1180. [[CrossRef](#)]
158. Choudhury, P.; Hackert, P.; Memet, I.; Sloan, K.E.; Bohnsack, M.T. The human RNA helicase DHX37 is required for release of the U3 snoRNP from pre-ribosomal particles. *RNA Biol.* **2019**, *16*, 54–68. [[CrossRef](#)]
159. Hu, L.; Wang, J.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Kong, R.; Zheng, Z.; Du, X.; Ke, Y. A small ribosomal subunit (SSU) processome component, the human U3 protein 14A (hUTP14A) binds p53 and promotes p53 degradation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3119–3128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Warren, A.J. Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman-Diamond syndrome. *Adv. Biol. Regul.* **2018**, *67*, 109–127. [[CrossRef](#)]
161. Hao, Q.; Wang, J.; Chen, Y.; Wang, S.; Cao, M.; Lu, H.; Zhou, X. Dual regulation of p53 by the ribosome maturation factor SBDS. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
162. Dimitrova, D.G.; Teyssset, L.; Carré, C. RNA 2'-O-Methylation (Nm) Modification in Human Diseases. *Genes (Basel)* **2019**, *10*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Marcel, V.; Ghayad, S.; Belin, S.; Therizols, G.; Morel, A.-P.A.P.; Solano-González, E.; Vendrell, J.; Hacot, S.; Mertani, H.; Albaret, M.; et al. P53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 318–330. [[CrossRef](#)]
164. Sharma, S.; Marchand, V.; Motorin, Y.; Lafontaine, D.L.J. Identification of sites of 2'-O-methylation vulnerability in human ribosomal RNAs by systematic mapping. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. McMahon, M.; Contreras, A.; Ruggero, D. Small RNAs with big implications: New insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2015**, *6*, 173–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Ayadi, L.; Galvanin, A.; Pichot, F.; Marchand, V.; Motorin, Y. RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2019**, *1862*, 253–269. [[CrossRef](#)]
167. Burke, M.F.; Logan, M.K.; Hebert, M.D. Identification of additional regulatory RNPs that impact rRNA and U6 snRNA methylation. *Biol. Open* **2018**, *7*. [[CrossRef](#)]
168. Janin, M.; Ortiz-Barahona, V.; de Moura, M.C.; Martínez-Cardús, A.; Llinàs-Arias, P.; Soler, M.; Nachmani, D.; Pelletier, J.; Schumann, U.; Calleja-Cervantes, M.E.; et al. Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program. *Acta Neuropathol.* **2019**, *138*, 1053–1074. [[CrossRef](#)]
169. Meyer, B.; Wurm, J.P.; Sharma, S.; Immer, C.; Pogoryelov, D.; Kötter, P.; Lafontaine, D.L.J.; Wöhnert, J.; Entian, K.D. Ribosome biogenesis factor Tsr3 is the aminocarboxypropyl transferase responsible for 18S rRNA hypermodification in yeast and humans. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 4304–4316. [[CrossRef](#)]
170. Gilles, A.; Frechin, L.; Natchiar, K.; Biondani, G.; von Loeffelholz, O.; Holvec, S.; Malaval, J.-L.; Winum, J.-Y.; Klaholz, B.P.; Peyron, J.-F. Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer: From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies. *Cells* **2020**, *9*, 629. [[CrossRef](#)]
171. Brighenti, E.; Treré, D.; Derenzini, M. Targeted cancer therapy with ribosome biogenesis inhibitors: A real possibility? *Oncotarget* **2015**, *6*, 38617–38627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

172. Catez, F.; Dalla Venezia, N.; Marcel, V.; Zorbas, C.; Lafontaine, D.L.J.; Diaz, J.J. Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *159*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Bilanges, B.; Stokoe, D. Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies. *Oncogene* **2007**, *26*, 5973–5990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Poortinga, G.; Quinn, L.M.; Hannan, R.D. Targeting RNA polymerase I to treat MYC-driven cancer. *Oncogene* **2015**, *34*, 403–412. [[CrossRef](#)]
175. Ferreira, R.; Schneekloth, J.S.; Panov, K.I.; Hannan, K.M.; Hannan, R.D. Targeting the RNA Polymerase I Transcription for Cancer Therapy Comes of Age. *Cells* **2020**, *9*, 266. [[CrossRef](#)]
176. Son, J.; Hannan, K.M.; Poortinga, G.; Hein, N.; Cameron, D.P.; Ganley, A.R.D.; Sheppard, K.E.; Pearson, R.B.; Hannan, R.D.; Sanij, E. rDNA Chromatin Activity Status as a Biomarker of Sensitivity to the RNA Polymerase I Transcription Inhibitor CX-5461. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*. [[CrossRef](#)]
177. Burger, K.; Mühl, B.; Harasim, T.; Rohmoser, M.; Malamoussi, A.; Orban, M.; Kellner, M.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Hölzel, M.; et al. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12416–12425. [[CrossRef](#)]
178. Bruno, P.M.; Liu, Y.; Park, G.Y.; Murai, J.; Koch, C.E.; Eisen, T.J.; Pritchard, J.R.; Pommier, Y.; Lippard, S.J.; Hemann, M.T. A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 461–471. [[CrossRef](#)]
179. Drygin, D.; Lin, A.; Bliesath, J.; Ho, C.B.; O'Brien, S.E.; Proffitt, C.; Omori, M.; Haddach, M.; Schwaebe, M.K.; Siddiqui-Jain, A.; et al. Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1418–1430. [[CrossRef](#)]
180. Bywater, M.J.; Poortinga, G.; Sanij, E.; Hein, N.; Peck, A.; Cullinane, C.; Wall, M.; Cluse, L.; Drygin, D.; Anderes, K.; et al. Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 51–65. [[CrossRef](#)]
181. Xu, H.; Di Antonio, M.; McKinney, S.; Mathew, V.; Ho, B.; O'Neil, N.J.; Dos Santos, N.; Silvester, J.; Wei, V.; Garcia, J.; et al. CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nat. Commun.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
182. Bruno, P.M.; Lu, M.; Dennis, K.A.; Inam, H.; Moore, C.J.; Sheehe, J.; Elledge, S.J.; Hemann, M.T.; Pritchard, J.R. The primary mechanism of cytotoxicity of the chemotherapeutic agent CX-5461 is topoisomerase II poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 4053–4060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Sanij, E.; Hannan, K.M.; Xuan, J.; Yan, S.; Ahern, J.E.; Trigoso, A.S.; Brajanovski, N.; Son, J.; Chan, K.T.; Kondrashova, O.; et al. CX-5461 activates the DNA damage response and demonstrates therapeutic efficacy in high-grade serous ovarian cancer. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Khot, A.; Brajanovski, N.; Cameron, D.P.; Hein, N.; Maclachlan, K.H.; Sanij, E.; Lim, J.; Soong, J.; Link, E.; Blombery, P.; et al. First-in-human RNA polymerase I transcription inhibitor CX-5461 in patients with advanced hematologic cancers: Results of a phase I dose-escalation study. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 1036–1049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Drygin, D.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Schwaebe, M.; Lin, A.; Bliesath, J.; Ho, C.B.; Proffitt, C.; Trent, K.; Whitten, J.P.; et al. Anticancer activity of CX-3543: A direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7653–7661. [[CrossRef](#)]
186. Yao, Y.X.; Xu, B.H.; Zhang, Y. CX-3543 Promotes Cell Apoptosis through Downregulation of CCAT1 in Colon Cancer Cells. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*. [[CrossRef](#)]
187. Chen, B.J.; Wu, Y.L.; Tanaka, Y.; Zhang, W. Small molecules targeting c-Myc oncogene: Promising anti-cancer therapeutics. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 1084–1096. [[CrossRef](#)]
188. Westdorp, H.; Fennemann, F.L.; Weren, R.D.A.; Bisseling, T.M.; Ligtenberg, M.J.L.; Figdor, C.G.; Schreiber, G.; Hoogerbrugge, N.; Wimmers, F.; de Vries, I.J.M. Opportunities for immunotherapy in microsatellite instable colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65*, 1249–1259. [[CrossRef](#)]
189. Wei, T.; Najmi, S.M.; Liu, H.; Peltonen, K.; Kucerova, A.; Schneider, D.A.; Laiho, M. Small-Molecule Targeting of RNA Polymerase I Activates a Conserved Transcription Elongation Checkpoint. *Cell Rep.* **2018**, *23*, 404–414. [[CrossRef](#)]
190. Peltonen, K.; Colis, L.; Liu, H.; Trivedi, R.; Moubarek, M.S.; Moore, H.M.; Bai, B.; Rudek, M.A.; Bieberich, C.J.; Laiho, M. A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 77–90. [[CrossRef](#)]

191. Morral, C.; Stanisavljevic, J.; Hernando-Momblona, X.; Mereu, E.; Álvarez-Varela, A.; Cortina, C.; Stork, D.; Slebe, F.; Turon, G.; Whissell, G.; et al. Zonation of Ribosomal DNA Transcription Defines a Stem Cell Hierarchy in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Espinoza, J.A.; Zisi, A.; Kanellis, D.C.; Carreras-Puigvert, J.; Henriksson, M.; Hühn, D.; Watanabe, K.; Helleday, T.; Lindström, M.S.; Bartek, J. The antimalarial drug amodiaquine stabilizes p53 through ribosome biogenesis stress, independently of its autophagy-inhibitory activity. *Cell Death Differ.* **2020**, *27*, 773–789. [[CrossRef](#)]
193. Pellegrino, S.; Meyer, M.; Zorbas, C.; Bouchta, S.A.; Saraf, K.; Pelly, S.C.; Yusupova, G.; Evidente, A.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; et al. The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure* **2018**, *26*, 416–425.e4. [[CrossRef](#)]
194. Hannan, R.D.; Drygin, D.; Pearson, R.B. Targeting RNA polymerase i transcription and the nucleolus for cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2013**, *17*, 873–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Peltonen, K.; Colis, L.; Liu, H.; Jäämaa, S.; Moore, H.M.; Enbäck, J.; Laakkonen, P.; Vaahtokari, A.; Jones, R.J.; af Hällström, T.M.; et al. Identification of novel p53 Pathway activating Small-molecule compounds reveals unexpected similarities with known therapeutic agents. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12996. [[CrossRef](#)]
196. Awad, D.; Prattes, M.; Kofler, L.; Rössler, I.; Loibl, M.; Pertl, M.; Zisser, G.; Wolinski, H.; Pertschy, B.; Bergler, H. Inhibiting eukaryotic ribosome biogenesis. *BMC Biol.* **2019**, *17*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance

Gabriel Therizols^{1,2,3}, Zeina Bash-Imam^{1,2,3}, Baptiste Panthu^{4,16}, Christelle Machon^{1,2,3,5,6}, Anne Vincent^{1,2,3}, Julie Ripoll⁷, Sophie Nait-Slimane^{1,2,3}, Mounira Chalabi-Dchar^{1,2,3}, Angéline Gaucherot^{1,2,3}, Maxime Garcia^{1,2,3}, Florian Laforêts^{1,2,3}, Virginie Marcel^{1,2,3}, Jihane Boubaker-Vitre⁸, Marie-Ambre Monet^{1,2,3}, Céline Bouclier⁸, Christophe Vanbelle^{1,2,3}, Guillaume Souahlia^{1,2,3}, Elise Berthel^{1,2,3}, Marie Alexandra Albaret^{1,2,3,17}, Hichem C. Mertani^{1,2,3}, Michel Prudhomme⁹, Martin Bertrand⁹, Alexandre David^{8,10}, Jean-Christophe Saurin^{1,2,3,11}, Philippe Bouvet^{1,2,3,12}, Eric Rivals^{7,13}, Théophile Ohlmann⁴, Jérôme Guitton^{1,2,3,6,14}, Nicole Dalla Venezia^{1,2,3}, Julie Pannequin⁸, Frédéric Catez^{1,2,3,15,18}✉ & Jean-Jacques Diaz^{1,2,3,15,18}✉

Mechanisms of drug-tolerance remain poorly understood and have been linked to genomic but also to non-genomic processes. 5-fluorouracil (5-FU), the most widely used chemotherapy in oncology is associated with resistance. While prescribed as an inhibitor of DNA replication, 5-FU alters all RNA pathways. Here, we show that 5-FU treatment leads to the production of fluorinated ribosomes exhibiting altered translational activities. 5-FU is incorporated into ribosomal RNAs of mature ribosomes in cancer cell lines, colorectal xenografts, and human tumors. Fluorinated ribosomes appear to be functional, yet, they display a selective translational activity towards mRNAs depending on the nature of their 5'-untranslated region. As a result, we find that sustained translation of *IGF-1R* mRNA, which encodes one of the most potent cell survival effectors, promotes the survival of 5-FU-treated colorectal cancer cells. Altogether, our results demonstrate that “man-made” fluorinated ribosomes favor the drug-tolerant cellular phenotype by promoting translation of survival genes.

¹Inserm U1052, CNRS UMR5286 Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France. ²Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France. ³Université de Lyon 1, F-69000 Lyon, France. ⁴CIRI-Inserm U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon F-693643, France. ⁵Laboratoire de chimie analytique, Faculté de pharmacie de Lyon, 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon, France. ⁶Laboratoire de biochimie et de pharmaco-toxicologie, Centre hospitalier Lyon-Sud - HCL, F-69495 Pierre Bénite, France. ⁷LIRMM, UMR 5506, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France. ⁸IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France. ⁹Department of Digestive Surgery, CHU Nîmes, Univ Montpellier, Nîmes, France. ¹⁰IRMB-PPC, Univ Montpellier, INSERM, CHU Montpellier, CNRS, Montpellier, France. ¹¹Department of Endoscopy and Gastroenterology, Pavillon L, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France. ¹²Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France. ¹³Institut Français de Bioinformatique, CNRS UMS 3601 Évry, France. ¹⁴Laboratoire de toxicologie, Faculté de pharmacie de Lyon, Université de Lyon, 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon, France. ¹⁵Institut Convergence PLAsCAN, F-69373 Lyon, France. ¹⁶Present address: Inserm U1060, CARMEN, F-69310 Pierre Bénite, France. ¹⁷Present address: Department of Translational Research and Innovation, Centre Léon Bérard, 69373 Lyon, France. ¹⁸These authors jointly supervised this work: Frédéric Catez, Jean-Jacques Diaz.
✉email: frederic.catez@lyon.unicancer.fr; jean-jacques.diaz@lyon.unicancer.fr

Partial response to chemotherapy leads to disease resurgence. Upon treatment, a subpopulation of cancer cells, called drug-tolerant persistent cells, displays a transitory drug tolerance that leads to treatment resistance^{1,2}. Though drug-tolerance mechanisms remain poorly understood, they have been linked to non-genomic processes, including epigenetics, stemness and dormancy^{2–4}.

Translation regulation plays a major role in controlling gene expression and contributes to disease emergence including cancer^{5,6}. Within ribosomes, ribosomal RNAs (rRNAs) play a central role in the translation process, by monitoring codon:anticodon recognition, coordinating ribosomal subunit activity and catalyzing peptide-bond formation through their ribozyme activity. rRNAs contain over 200 naturally occurring chemical modifications, which stabilize rRNA structures and create additional molecular interactions not provided by non-modified nucleotides^{7–9}. Chemical modifications of rRNAs were shown to directly contribute to translational regulation^{6,10,11}. We, and others, showed that rRNA chemical modifications contribute to the fine-tuning of ribosome functions and to the modulation of ribosome translational activity of ribosomes in cancer cells^{12–15}. 5-fluorouracil (5-FU) is the most widely used chemotherapy in cancer treatment. 5-FU efficacy is partial and often associated with resistance¹⁶. While discovered and used as an inhibitor of DNA replication, 5-FU alters all RNA pathways^{16–20}. Indeed, 5-FU treatment results in 5-fluorouridine (5-Urd) incorporation into various types of cellular RNAs including the precursor of rRNA¹⁶. However, the consequences of 5-FUrd incorporation into ribosomal RNA precursor on ribosome production and functioning have so far not been analyzed, neither has its impact on cellular phenotype. Here, we show that 5-FU is incorporated into rRNAs of mature ribosomes in several models including cancer cell lines, colorectal mouse xenografts, and human colorectal tumor samples. 5-FU containing ribosomes appear to be functional, yet, they display a selective translational activity towards mRNA subsets depending on the nature of their 5'-untranslated region. We find that upon 5-FU treatment, translation of the mRNA of the pro-survival *IGF-1R* gene is sustained, and promotes the survival of 5-FU-treated colorectal cancer cells. Altogether, our results demonstrate that fluorinated ribosomes favor the drug-tolerant cellular phenotype by promoting the translation of survival genes.

Results

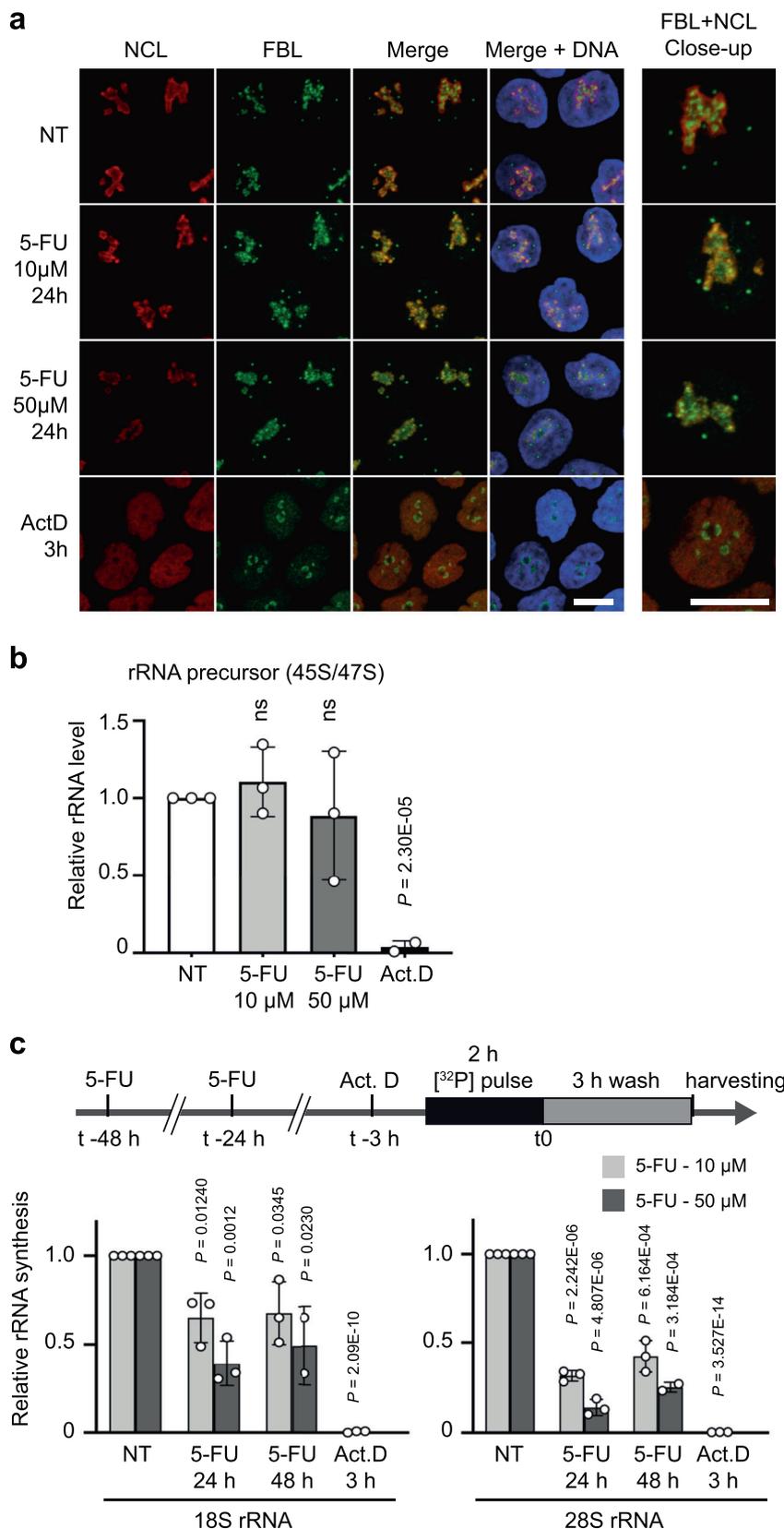
Ribosome production is partially maintained upon 5-FU treatment. Previous work indicated that at a high concentration, 5-FU alters ribosome biogenesis without inhibiting pre-rRNA synthesis^{20,21}. To further investigate this, we treated colorectal cancer HCT116 cells with clinically relevant concentrations of 5-FU (10–50 μ M)^{22,23}, which resulted in growth inhibition and cell death²⁴ and Supplementary Fig. 1a). Within this concentration range, 5-FU treatment resulted in enlarged nucleoli, absence of nucleolar cap formation and absence of dispersion of nucleolar markers, as opposed to cells treated with the RNA Pol I inhibitor actinomycin D (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1b, c). Such nucleolar restructuring reveals an alteration of ribosome biogenesis albeit without pre-rRNA synthesis inhibition, and was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) (Supplementary Fig. 1d). Consistently, 47S/45S pre-rRNA levels, analyzed by Northern blotting and RNA fluorescent in situ hybridization (FISH), were unchanged following 5-FU treatment confirming that 5-FU did not affect RNA Pol I activity (Fig. 1b and Supplementary Figs. 1e, 2a, b).

Northern blot analysis also confirmed that ribosome maturation at post-transcriptional steps was altered, and revealed that

the pre-rRNA processing was impaired at the cleavage stage at site 2 (Supplementary Fig. 2a–c). Yet, despite this effect, the late pre-rRNA intermediates leading to 18S and 28S rRNA were still detected (Supplementary Fig. 2c) suggesting that ribosome production was in part maintained. This was confirmed by [³²P] pulse-chase experiments that showed that ribosomes are produced at significant levels for up to 48 h under 5-FU treatment (Fig. 1c and Supplementary Fig. 2d). Thus, at a clinically relevant concentration of 5-FU, each step of ribosome processing is able to proceed, despite the stringent quality control, thus allowing ribosome production to be maintained at a substantial level.

5-FU incorporates into ribosomes. 5-FU was previously shown to be converted to 5-FUTP and incorporated into RNAs¹⁶. We therefore wondered whether ribosomes produced and exported to the cytoplasm in treated cells contained 5-FUrd within their rRNAs. To test this, we developed a quantitative liquid chromatography–mass spectrometry—high-resolution mass spectrometry (LC-MS-HRMS) approach that allowed us to determine the number of 5-FUrd incorporated into rRNA of cytoplasmic ribosomes purified at high stringency on a 500 mM KCl sucrose cushion (Fig. 2a, see methods for details²⁵). We found that HCT116 ribosomes contained significant amounts of 5-FUrd, ranging from 7 to 14 5-FUrd molecules per ribosome following 24 h of treatment with 5–100 μ M of 5-FU (Fig. 2b). We performed two experiments to rule out that the 5-FUrd signal came from nonribosomal RNA. First, we measured 5-FUrd from gel-purified 18S and 28S rRNA (Supplementary Fig. 3a) to isolate 18S and 28S rRNA from the other cellular RNAs by cutting out the corresponding bands from the gel. Second, because direct purification of ribosomes on a 500 mM KCl sucrose cushion might result in minor mRNA contamination, we measured 5-FUrd from ribosomal subunits dissociated with puromycin (Supplementary Fig. 3b, c). Our data show that puromycin treatment of the ribosomal subunit fully dissociated a small number of subunits that were still assembled after direct purification on the 500 mM KCl sucrose cushion (Supplementary Fig. 3b). Yet the number of 5-FUrd per ribosome was identical in ribosomal subunits separated with puromycin compared to ribosomal subunits directly purified on the 500 mM KCl sucrose cushion (Supplementary Fig. 3c), indicating that the data obtained by our method reflects 5-FUrd incorporation into rRNA. Next, we extended the analysis to additional cancer cell lines: (i) CRC cells characterized by different molecular profiles reflective of the pathology displaying the different combination of *KRAS*, *BRAF* and *TP53* mutations, as well as the microsatellite instability (MSI) and CIN statuses (Supplementary Table 1) and (ii) cell lines from triple-negative breast cancer and (iii) pancreatic cancer. 5-FUrd was incorporated into rRNA of cytoplasmic ribosomes purified from all tested cell lines after 24 h of treatment with 10 μ M 5-FU (Fig. 2c). Altogether, these data demonstrate that upon 5-FU treatment, ribosomes containing fluorinated rRNA are fully assembled and exported to the cytoplasm, revealing that presence of 5-FUrd is tolerated by the quality control systems of the cell.

Next, we investigated whether fluorinated ribosomes could be found within tumors in vivo. First, we analyzed rRNA from HCT116 xenografts established in nude mice. 5-FU treatment efficacy was evidenced by a decrease in tumor growth (Supplementary Fig. 3d). 5-FUrd was detected in mature rRNA purified from tumor cells collected after the last treatment at levels close to those observed in cultured cells (Fig. 2d). We extended this observation to xenografts similarly established with HT29 and SW480 cell lines (Fig. 2e, f). Thus, 5-FU incorporation into ribosomes can be replicated in a common



xenografted animal model. Finally, we analyzed rRNA of colorectal tumor cells from patients treated with 5-FU-based therapies, using large RNA quantities to optimize detection (Supplementary Fig. 3e). Of the 5 samples tested from 5-FU-treated patients, 5-FUrd was detected in rRNA from 2 patients (3.80 and 4.50 5-FUrd per ribosome respectively; Fig. 2g), a

patient receiving no 5-FU served as a negative control. Altogether, these data show that 5-FUrd is largely incorporated into rRNA of cells treated with 5-FU, and that 5-FU-based chemotherapy leads to the production of fluorinated ribosomes within tumor cells both in animal models and in humans.

Fig. 1 Ribosome production is maintained in 5-FU-treated cells. HCT116 cells were treated with 5-FU at 10 μ M or 50 μ M for 24 h or 48 h or with actinomycin D (Act.D) for 3 h as a reference of rRNA synthesis inhibition. **a** Morphology of nucleoli analyzed by immunofluorescent detection of nucleolar markers nucleolin (NCL, red) and fibrillarin (FBL, green). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar = 10 μ M. Images are representative of three independent experiments. **b** Pre-rRNA synthesis analyzed by detection of 47 S/45 S rRNA precursor levels by Northern blotting. Data are expressed as mean values \pm s.d. of independent experiments ($n = 3$). **c** Rate of 28 S and 18 S rRNAs production analyzed by isotope pulse labelling. Radioactivity was measured for each rRNA and normalized against ethidium bromide. Data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 3$). Results of unpaired two-tailed *t* test are indicated as nonsignificant (ns) or with the *P* value. Source data are provided as a Source Data file.

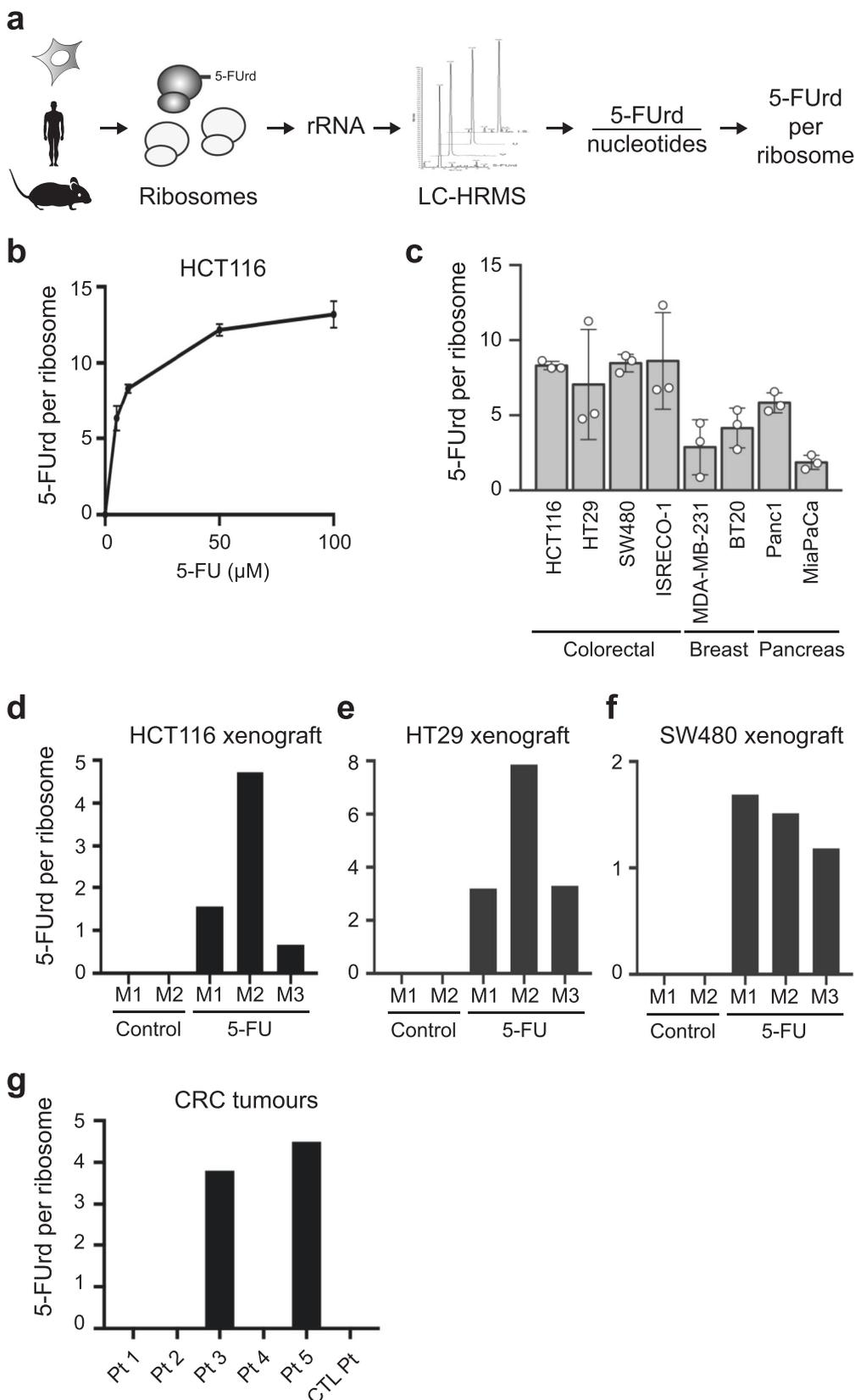
Altered translation by fluorinated ribosomes. Because rRNAs and their post-transcriptional chemical modifications play a central role in ribosome functioning, and because 5-FU induces changes in translational regulation^{24,26,27}, we postulated that fluorinated ribosomes may display modified translational activity. To investigate this, we first considered whether fluorinated ribosomes could be recruited onto mRNA during translation, by analyzing the rRNA 5-FUrd content in actively translating ribosomes isolated by sucrose gradient (Fig. 3a and Supplementary Fig. 4). 5-FU was readily detected in actively translating ribosomes (i.e. polysomal ribosomes), demonstrating that fluorinated ribosomes can engage in translation (Fig. 3a). Next, we evaluated whether the incorporation of 5-FU into rRNA impacts the translational capacity of ribosomes. We used our recently developed *in vitro* hybrid translation assay^{14,28}, in which only ribosomes have been exposed to 5-FU, in order to evaluate the activity of purified fluorinated ribosomes in a controlled setting (Fig. 3b). To gain insight into the changes in ribosome activity the translational capacity of fluorinated ribosomes was assessed using a set of luciferase reporter mRNAs, representing different functional mRNAs and whose translation relies on different 5'UTR: (i) mRNAs of two housekeeping genes containing short 5'UTR from globin and GAPDH mRNAs, (ii) mRNA of two cancer-promoting genes containing long and structured 5'UTR from IGF-1R and *c-Myc* mRNAs, and (iii) mRNA of two viral genes containing long and structured uncapped 5'UTR from cricket paralysis virus (CrPV) and encephalomyocarditis virus (EMCV), which initiate translation through an internal ribosome entry site (IRES). The results showed first that fluorinated ribosomes were not impaired for translation. Second that they displayed a selective translation initiation efficacy that differed from that of control ribosomes, and varied according to the nature of the 5'UTR upstream of the reporter mRNA used (Fig. 3c). Indeed, globin and GAPDH were less efficiently translated, a result that is consistent with lower overall protein synthesis in 5-FU treated cells²⁴, and Supplementary Fig. 5a). Moreover, reporter mRNAs containing IGF-1R and *c-Myc* 5'-UTR were more efficiently translated by fluorinated ribosomes. These differences suggest that translation efficiency varies according to the nature of the 5'UTR, indicating that the initiation step of translation differs for fluorinated ribosomes compared to normal ribosomes. To consolidate this hypothesis, translation was tested on a mRNA carrying the CrPV intergenic IRES, an element that directly binds to the ribosome and initiates translation without any cellular translation initiation factors (eIFs). Fluorinated ribosomes displayed a decrease in translational activity on CrPV mRNA, strongly supporting that fluorinated ribosomes are structurally or functionally different (Fig. 3d). This defect in translation initiation from the CrPV intergenic IRES was not strictly related to cap-independent initiation mechanisms since fluorinated ribosomes were more efficient at translating an EMCV IRES containing mRNA, another cap-independent translation initiation model (Fig. 3d).

Next, we focused on IGF-1R 5'UTR which is one of the longest 5'UTR in the human genome and contains several regulatory elements, the activity of which could be influenced by 5-FU,

including an IRES element^{29,30}. First, we mapped the IRES element of IGF-1R 5'UTR by conducting a series of deletions (Supplementary Fig. 5b, c) and localized it in the last 84 nucleotides (region 954-1040), and then verified that no IRES activity was carried out by the 1-953 region, an observation consistent with the previous studies²⁹. When evaluated in 5-FU treated cells, the IRES activity of IGF-1R 5'UTR was increased both when the full-length 5'UTR or only the minimal IRES (region 954-1040) were used (Fig. 3e). In contrast no effect was observed for the 1-953 region (Δ IRES). In addition, *c-MYC* 5'UTR IRES activity was not impacted (Supplementary Fig. 5d), suggesting that the activity of some IRES elements is not impacted by 5-FU and that regulation of *c-MYC* translation involves another mechanism. To determine whether the IRES element could play a dominant role in IGF-1R translation regulation, we tested the same construct using a monocistronic assay, where the 5'UTR is directly placed at the 5' of the reporter mRNA and capped (Fig. 3f). We found that both the full-length 5'UTR and the minimal IRES had significant increased translational activity upon 5-FU treatment, and that the activity of the 1-953 region of IGF-1R 5'UTR and that of GAPDH 5'UTR were not significantly affected by 5-FU, although we observed a tendency towards a decrease at high 5-FU concentrations (Fig. 3f).

Altogether, these experiments demonstrate that 5-FU incorporation into rRNA modifies the ability of ribosomes to initiate mRNA translation from different 5'UTR. Taken together, they highlight that fluorinated ribosomes might contribute to 5-FU-induced translational reprogramming that we previously observed²⁴.

IGF-1R promotes 5-FU drug tolerance. The data above suggest that fluorinated ribosomes favor translation of selected mRNAs, including genes such as IGF-1R and *c-Myc*, that may promote early cell survival and lead to resistance^{4,31,32}. We focused on IGF-1R, a gene that plays a major role in tumorigenesis and whose contribution to cell survival has been largely demonstrated in various models including colorectal cancer^{31,33-35}. Because 5-FU treatment induces a decrease in global protein synthesis²⁴, Supplementary Fig. 5a), we initially evaluated whether IGF-1R mRNA translation was also impacted by 5-FU treatment in HCT116 cells. IGF-1R mRNA translation efficacy was assessed by measuring the recruitment of cytoplasmic mRNA into the heavy polysome fraction of control and 5-FU-treated cells (Fig. 4a and Supplementary Fig. 6). Our data show that the fraction of IGF-1R mRNAs associated with heavy polysomes was maintained in 5-FU treated cells, while that of actin and GAPDH mRNAs decreased, indicating that translation of IGF-1R mRNA is selectively favored compared to housekeeping mRNAs, a result consistent with *in vitro* translation data obtained with reporter mRNAs (Fig. 3c). At the protein level, IGF-1R increased compared to relatively stable levels of Actin, GAPDH and Histone H3 proteins after 24 h and 48 h of 5-FU treatment (Fig. 4b, c). Next, to determine whether the IGF-1/IGF-1R pathway contributes to the survival of CRC cells exposed to 5-FU, cells were first treated with 5-FU for 24 h or 48 h, and were subsequently treated with



IGF-1. Cell proliferation was monitored over 5 days, and revealed that, while IGF-1 had no impact on control cells, it improved the growth of cells treated with 5-FU (Fig. 4d, e, and Supplementary Fig. 7a). To further validate our findings, HCT116 cells were co-treated with 5-FU and the IGF-1R kinase inhibitor NVP-AEW541³⁶, and cell response was monitored by viability assay

(Fig. 4f). Inhibition of IGF-1R induced a stronger decrease in cell survival when cells were co-treated with 5-FU compared to untreated cells demonstrating that 5-FU treated cells relied more on an active IGF-1/IGF-1R pathway than untreated cells, and that the IGF-1/IGF-1R pathway is necessary for optimal cell tolerance to 5-FU. Overall, our results unveil that the IGF-1/IGF-1R

Fig. 2 5-FU is incorporated in ribosomes of cell lines and tumours. **a** Schematic representation of 5-FUrd incorporation into ribosomes determined using liquid chromatography—mass spectrometry—high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS). **b**, HCT116 cells were treated for 24 h with 5 to 100 μM 5-FU and 5-FUrd incorporation was determined as in **a**. Data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 3$). **c**, Indicated cell lines were treated for 24 h with 10 μM of 5-FU and incorporation of 5-FUrd into rRNA was determined as in **a**. Data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 3$). **d–f**, **d**, HCT116, **e**, HT29 or **f**, SW480 cells were xenografted into nude mice, and mice were treated with 50 mg/kg of 5-FU twice a week (5-FU) or with PBS (Control). Incorporation of 5-FUrd into rRNA was determined as in **a**, from gel-purified rRNA. Data are values for individual animals (noted M1 to M3) ($n = 1$). **g**, rRNA were purified from total RNA extracted from colorectal cancer samples. Incorporation of 5-FUrd into rRNA was determined as in **a**. Pt = sample from 5-FU treated patient, CT Pt = sample from patient not treated with 5-FU. $n = 1$ for each sample. Source data are provided as a Source Data file.

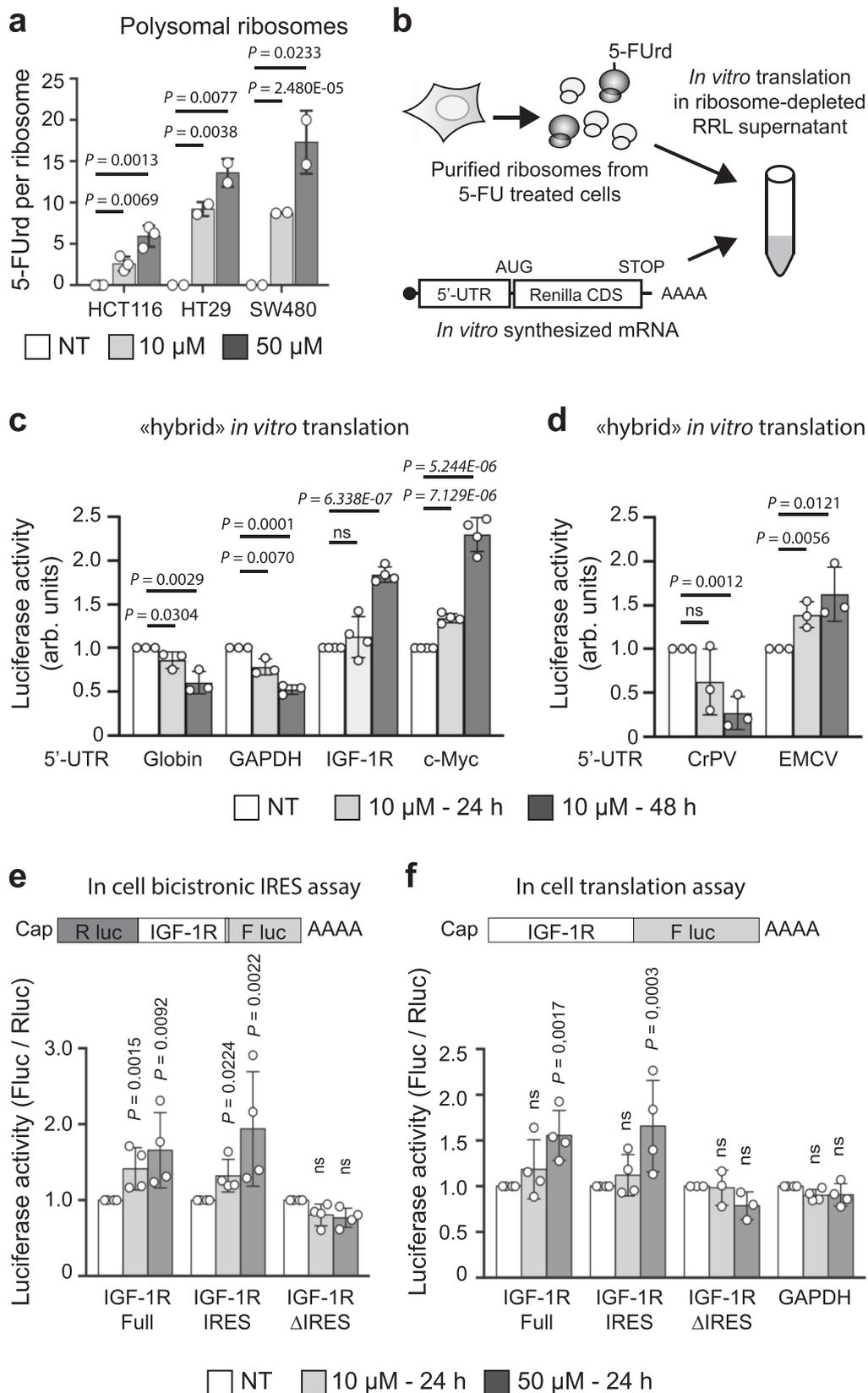
pathway plays a role in the survival of a cell subpopulation upon 5-FU treatment, and strongly support that the 5-FU driven maintenance of IGF-1R synthesis contributes to this mechanism.

5-FU treatment leads to translational upregulation of cell survival-associated mRNAs. Next, we wondered whether the changes in translation induced by 5-FU could promote cellular functions associated with cell survival or drug tolerance. The impact of 5-FU on cellular mRNA translation was evaluated by polysome profiling on cells treated with 10 μM or 50 μM 5-FU for 24 h (Supplementary Fig. 8a, Supplementary Fig. 9). Briefly, mRNAs associated with actively translating ribosomes (i.e. polysomes) were purified (Supplementary Fig. 8b) and analyzed by RNA-Seq to compare the polysomal level of each transcript between 5-FU treated and untreated cells (Fig. 5a, b, Supplementary Data 1). We found that 5-FU treatment altered translation for a fraction of mRNA, representing about 7 % and 10 % of analyzed mRNAs, in 10 μM and 50 μM 5-FU treated cells respectively (Fig. 5a, b), with a majority of translationally altered mRNA being upregulated (10 μM , 702 up vs. 275 down; 50 μM : 937 up vs. 477 down, corresponding to 72% and 66% respectively). An increased number of differentially translated mRNAs was observed between 10 μM and 50 μM 5-FU conditions (977 vs 1414), most of these mRNAs being common to these two conditions, indicating a dose-dependent response (Fig. 5c). A Gene Ontology (GO) enrichment analysis performed on all translationally altered mRNAs (Fig. 5d, Supplementary Fig. 8c and Supplementary Data 2) revealed similar GO-term enrichment for 10 μM and 50 μM treated cells. As expected, enrichment in p53 pathway, DNA damage response and apoptosis were significantly represented, which reflects the well-known cytotoxic activity of 5-FU. Next, a clustering of GO terms, which groups GO terms related to the same functions (Fig. 5e, f), revealed that in response to 50 μM 5-FU, the translationally downregulated mRNAs mainly correspond to gene classes reflecting cell proliferation, such as cell cycle or cell and organelle biogenesis; an observation also consistent with a stress-induced proliferation arrest (Fig. 5e, Supplementary Data 3). Interestingly, a majority of translationally altered mRNAs were upregulated both in 10 μM and 50 μM 5-FU conditions (Fig. 5a, b). These translationally upregulated mRNAs are associated with biological functions promoting cell-survival such as metabolism, cell communication, signal transduction and unexpectedly cell phenotype changes (e.g., development, morphogenesis or cell differentiation) (Fig. 5f and Supplementary Data 3). This observation highlights that, at the translational level, while a stress response associated with cell cycle arrest and cell death is observed, pro-survival-associated pathways are concomitantly upregulated. Therefore, we specifically searched for genes that may contribute to cell survival. To this end, we set-up a list of genes promoting cell survival and tumor progression including genes associated with either mutations or copy number alterations in CRC, or associated with negative regulators of apoptosis and positive regulators of cell cycle functions. Interestingly, more mRNAs encoding survival proteins were found in

the translationally upregulated mRNA category than in the translationally downregulated one, both in 10 μM and 50 μM 5-FU conditions (10 μM , 27 up vs. 18 down; 50 μM : 38 vs 30, Supplementary Data 4). Indeed, the cellular functions of the translationally upregulated mRNAs survival genes were mainly negative regulators of apoptosis, positive regulators of cell cycle and cell signaling factors (Supplementary Data 5). Altogether, these data indicate that 5-FU treatment results in an unexpected increase in translation of mRNAs encoding proteins with cell survival functions, which could contribute to the observed drug tolerance of a subset of cells.

Discussion

In this study, we reveal that the pyrimidine analogue 5-FU is incorporated into ribosomes *in vitro* and *in vivo*, including in human tumors. We used a LC-HRMS method that we recently developed²⁵ in order to quantitate the level of incorporation of 5-FUrd into a defined RNA molecule. This approach allowed us to demonstrate that 5-FUrd is incorporated into ribosome at significant levels, showing that cells can tolerate the production of non-natural ribosomes. This finding was unexpected because ribosome assembly and maturation require multiple rRNA-rRNA and rRNA-protein interactions and rRNA folding that could be limited or inhibited by the presence of 5-FUrd, and because these steps are under stringent quality-control that induces the degradation of improperly folded and assembled rRNAs³⁷, as evidenced by the decrease in the level of the late pre-rRNA species that we report in this study. It can be anticipated that 5-FUrd would be enriched only in rRNA regions of the mature ribosomes where its presence does not significantly inhibit rRNA maturation and folding. As a result, cytoplasmic functional ribosomes contained up to 15 molecules of 5-FUrd per ribosome, a number likely underestimated since only a fraction of the ribosome population was renewed within the time frame of our experiment. We were able to observe 5-FUrd in rRNA of 2 of 5 human CRC samples, highlighting that 5-FU incorporation into tumor ribosomes can occur in patients. We ruled out that the lack of detection of 5-FUrd in 3 of the samples was due the threshold of sensitivity of our assay. It is possible that incorporation takes place only in some tumors, depending on tumor cell metabolism or other molecular traits that remain to be determined. In addition, other parameters might influence 5-FU incorporation and detection such as the chemotherapy regimen or the delay between treatment and surgery. For these reasons, and because our analysis was performed on a small number of samples, we cannot at this stage extrapolate the frequency of incorporation. Most importantly, it remains to establish whether there is a link between 5-FU incorporation into tumor cell ribosomes, tumor response to therapy and disease outcome. While the addition of fluorine into rRNA results in a non-natural modification, and could be anticipated as deleterious, we found that fluorinated ribosomes are functional as they engage in translation. However, their activity is altered and displays a selective ability to initiate mRNA translation according to the nature of its 5'UTR. The



finding that fluorine appears to modify the functioning of rRNA is not unexpected since chemical modifications of rRNA including 2'-O-methylation and pseudouridylation were shown (i) to contribute to translational regulation and efficiency^{13-15,38}, and (ii) to establish molecular interactions that cannot be provided by non-modified ones^{7,9}. The effect we observe on

translation initiation suggests that 5-FUrd incorporation is enriched at or close to regions of the ribosome that are critical for the interaction of the ribosome with mRNAs or translation factors, or in the functional domains of the ribosome, such as the A, P and E sites. Thus, if present in particular regions of the ribosome, even a limited number of 5-FUrd molecule could greatly influence the

Fig. 3 Fluorinated ribosomes display altered translational properties. **a** HCT116, HT29 and SW480 cells were treated for 24 h with either 10 μ M or 50 μ M 5-FU, and translationally active ribosomes were purified from the polysomal fraction. Incorporation of 5-FUrd was measured by LC-HRMS. Data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 3$). **b** Schematic representation of the hybrid in vitro translation assay used in **c** and **d**. **c** and **d** Ribosomes were purified from HCT116 cells treated with 10 μ M 5-FU for 24 h or 48 h, and their translational activity was evaluated using the hybrid in vitro translation assay. Translation efficacy was evaluated on luciferase reporter mRNA containing the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the indicated gene. CDS = coding sequence. Values are units of Renilla luciferase activity normalized against the untreated (NT) condition. **c**, Evaluation on capped mRNA containing the 5'UTR of actin, GAPDH, IGF-1R and c-Myc genes. **d** Evaluation on uncapped mRNA containing the IRES element from the cricket paralysis virus (CrPV) and the encephalomyocarditis virus (EMCV). Data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 3$). **e** IRES activity of IGF-1R 5'UTR and deletions was evaluated by transfection of a bicistronic reporter vector represented on top of the figure. IRES activity is monitored as the ratio of firefly luciferase (Fluc) activity over Renilla luciferase (Rluc) activity. HCT116 cells were transfected for 24 h and then treated for 24 h with either 10 μ M or 50 μ M 5-FU. Data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 4$). **f** Translation initiation activity of IGF-1R 5'UTR and deletions and of GAPDH 5'UTR was evaluated by co-transfection of a reporter vector represented on top of the figure with a renilla reporter vector for normalization. Translation activity is monitored as the ratio of firefly luciferase (Fluc) activity over Renilla luciferase (Rluc) activity. HCT116 cells were transfected for 24 h and then treated for 24 h with either 10 μ M or 50 μ M 5-FU. Data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 4$). Results of unpaired two-tailed *t* test are indicated as nonsignificant (ns) $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), and $p < 0.0001$ (****). Source data are provided as a Source Data file.

ribosome behavior. For instance, in the case of IRES-dependent translation, 5-FUrd may be selectively enriched in rRNA regions close to RPS25, RPL40 or RACK1 proteins that were shown to participate in IRES-dependent translation^{39–41}, or within 18 S rRNA regions proposed to support IRES translation, such as the expansion segment ES⁷⁴² or the 959–964 region, which was proposed to interact with IGF-1R mRNA⁴³. New tools will be required to finely map the location of 5-FUrd within rRNA and improve our understanding of its impact on ribosome functioning at the atomic level.

We previously described a major translational reprogramming induced by 5-FU in colorectal cancer cells, that we have linked to a miRNA-based mechanism²⁴. Here we describe the 5-FU induced translational reprogramming by RNA-Seq-based poly-some profiling. Upon 5-FU exposure, the majority of translationally altered mRNAs are upregulated, indicating that 5-FU allows maintenance or increased translation of these mRNAs. The fluorination of rRNA that we describe herein represents an additional mechanism by which 5-FU contributes to translational reprogramming of treated cells²⁴. In addition to miRNA-based translation regulation, IRES-dependent translation appears as another mechanism, which 5-FU can modulate. IRES-dedicated genome-wide assay will be necessary to evaluate which IRES elements might be sensitive to 5-FU⁴⁴. It is likely that other mechanisms are involved, such as 5-FUrd incorporation into mRNAs and tRNAs.

We determined that the 5-FU altered translational machinery contributes to maintaining the expression level of the *IGF-1R* gene, thus promoting cell survival. This suggests that the cytotoxic efficiency of 5-FU may be improved if fluorinated ribosome production is prevented, an approach that could be effectively tested using the recently developed ribosome biogenesis inhibitors, for which anti-cancer activities are being unveiled^{45–47}.

Drug tolerance is a critical phase as it represents a window of opportunity for genomic and non-genomic events to take place and provides cells with a drug-resistant phenotype. We show that sustained IGF-1R synthesis is a significant factor for cell survival upon 5-FU treatment. Surprisingly, our data indicate that 5-FU sensitized cells to IGF-1/IGF-1R pathway, as 5-FU treated cells were more sensitive to IGF-1 or IGF-1R inhibitors than untreated ones. It is not clear whether this is directly related to changes in translational regulation, nevertheless, it suggests that targeting the IGF-1/IGF-1R pathway may improve 5-FU efficacy. This data also supports that the IGF-1/IGF-1R pathway might contribute to drug tolerance. In addition, several mRNAs coding for proteins carrying anti-apoptotic functions, metabolic functions and cellular differentiation functions were

translationally upregulated in 5-FU treated cells, and may contribute to cellular treatment escape. Indeed, metabolic adaptation and phenotypic plasticity, have been associated with cellular drug tolerance, and the ability of a small number of cells to survive drug pressure in a quiescent or slow-proliferative state^{4,48}. Our data further support that translation control could represent a non-genomic mechanism contributing to drug tolerance, and will require single-cell analysis^{49,50}. 5-FU is the most widely used chemotherapy, and there is a high demand for improving its efficacy. Our data highlight the potential benefits of understanding drug-tolerance mechanisms in response to 5-FU, which has so far not been fully described. In addition, while our study focused on a base analogue incorporated into RNA, other compounds binding to RNAs such as platin derivatives or any drug that might interfere with RNA metabolism should now also be considered as modifiers of ribosome structure and activity⁵¹, and may also contribute to altering translational regulation in treated cells.

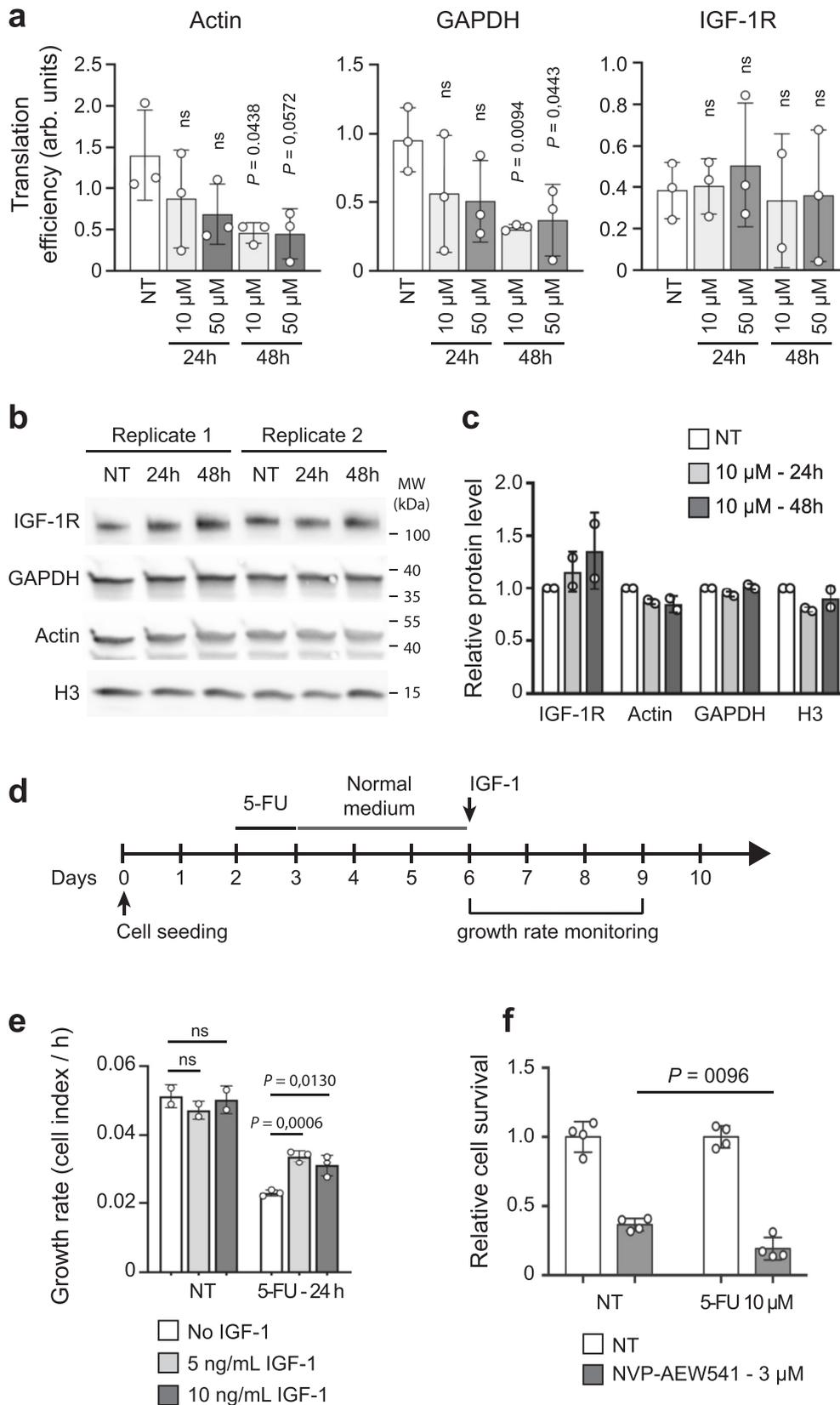
Altogether, our study extends the spectrum of gene expression mechanisms that help cells survive a drug challenge, by adding translational regulation to epigenetics, stress response, metabolism adaptation and stemness or dormancy phenotypes^{1,2,4,52–54}. These findings also reveal that exposure to drugs can result in the production of “man-made” biological complexes, the functioning of which cannot be anticipated, and that require further studies to fully comprehend drug response and propose new therapeutic strategies.

Methods

Cell lines, cell culture, and 5-FU treatment. Cells were maintained in Dulbecco Minimum Essential Medium—GlutaMax (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) at 37 °C with 5% CO₂. The following cell lines were obtained from ATCC: HCT116 (ATCC CCL-247), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), BT20 (ATCC HTB-19), HT29 (ATCC HTB-38), SW480 (ATCC CCL-228) Panc1 (ATCC CRL-1469) and MiaPaCa (ATCC CRL-1420). The following cell lines were obtained from the authors: ISRECO1 (Cajot, J. F., et al. Cancer Res. (1997) 57, 2593–2597). The following cell lines were authenticated by 21 PCR-single-locus-technology (Eurofins, Ebersberg, Germany): HCT116, HT29, MDA-MB-231, MiaPaCa, Panc1. ISRECO1 cell line was not authenticated by PCR-single-locus-technology as this cell line genetic pattern is not described in databases. Cells were routinely tested against mycoplasma infection.

Cells were plated 48 h before 5-FU treatment. 5-FU was kindly provided by the Centre Léon Bérard (Lyon, FRANCE) and was purchased from Sanofi-Aventis. The stock solution was diluted immediately before use in DMEM.

Western Blot. Western blot was performed as previously reported⁵⁵. Briefly, cells were counted and a defined number of cells were lysed in lysis buffer A (20 mM HEPES-KOH pH 7.2, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP40, 10% Glycerol) supplemented with protease inhibitor (Complete EDTA free, Roche). A volume corresponding to 100,000 cells was loaded on a polyacrylamide gel, and



proteins were subjected to SDS-PAGE, and blotted onto poly-vinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore). Membranes were blocked in Tris-buffered saline solution containing 0.05% Tween 20 and 5% nonfat milk and incubated with primary antibodies: mouse monoclonal antibodies against GAPDH [6C5] (AM4300, Invitrogen) and rabbit monoclonal antibodies against IGF-1R (#9750, Cell Signalling) and actin (ab179467, Abcam) and anti-Histone H3 (ab17911, Abcam)

diluted at 1:2000. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies Antirabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074, Cell Signalling Technologies) and Antimouse IgG, HRP-linked Antibody (#7076, Cell Signalling Technologies) diluted at 1:5000 were used for the detection of immunoreactive proteins by chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, BioRad). Imaging and densitometric measurements of the bands were performed using Image lab software (BioRad).

Fig. 4 IGF-1R contributes to survival and recovery of 5-FU treated CRC cells. **a** HCT116 cells were treated with 10 μ M or 50 μ M 5-FU for 24 h or 48 h or untreated (NT). Translation efficiency of actin, GAPGH and IGF-1R mRNAs. Each mRNA was quantified from cytoplasmic and polysomal fractions. Translation efficiency are shown as the ratio of polysomic mRNA over the cytoplasmic mRNA. Each dot represents an individual biological sample measured in duplicate and data are expressed as mean \pm s.d of independent experiments ($n = 3$). **b, c** HCT116 cells were treated with 10 μ M 5-FU for 24 h or 48 h or untreated (NT). **b** Cells were counted and an equivalent number of cells were loaded in each well. IGF-1R, Actin, GAPDH and H3 proteins were detected by western blot. **c** Level of IGF-1R, Actin, GAPDH and H3 proteins quantified from the western blot in **b**. Signals of each protein was normalized to the untreated (NT) value. Each dot represents an individual biological sample and data are expressed as mean \pm s.d of independent experiments ($n = 2$). **d, e** HCT116 cells were treated with 10 μ M 5-FU for 24 h or 48 h or NT, and not stimulated (No IGF-1) or stimulated with 5 or 10 ng/mL of IGF-1. Cell growth was monitored in real-time over 5 days. **d** Schematic representation of the experiment. **e** Growth rate measured over 72 h (day 6 to day 9). Each dot represents a technical replicate and data are expressed as mean \pm s.d. **f** HCT116 cells were untreated (NT) or treated with 10 μ M of 5-FU alone or with 5 μ M of IGF-1R inhibitor NVP-AEW541 alone or with 10 μ M of 5-FU for 48 h. Cell survival was assessed using MTS at 72 h post-treatment. Each dot represents a technical replicate and data are expressed as mean \pm s.d. of independent experiments ($n = 4$). Results of unpaired two-tailed *t* test are indicated as nonsignificant (ns) $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), and $p < 0.0001$ (****). Source data are provided as a Source Data file.

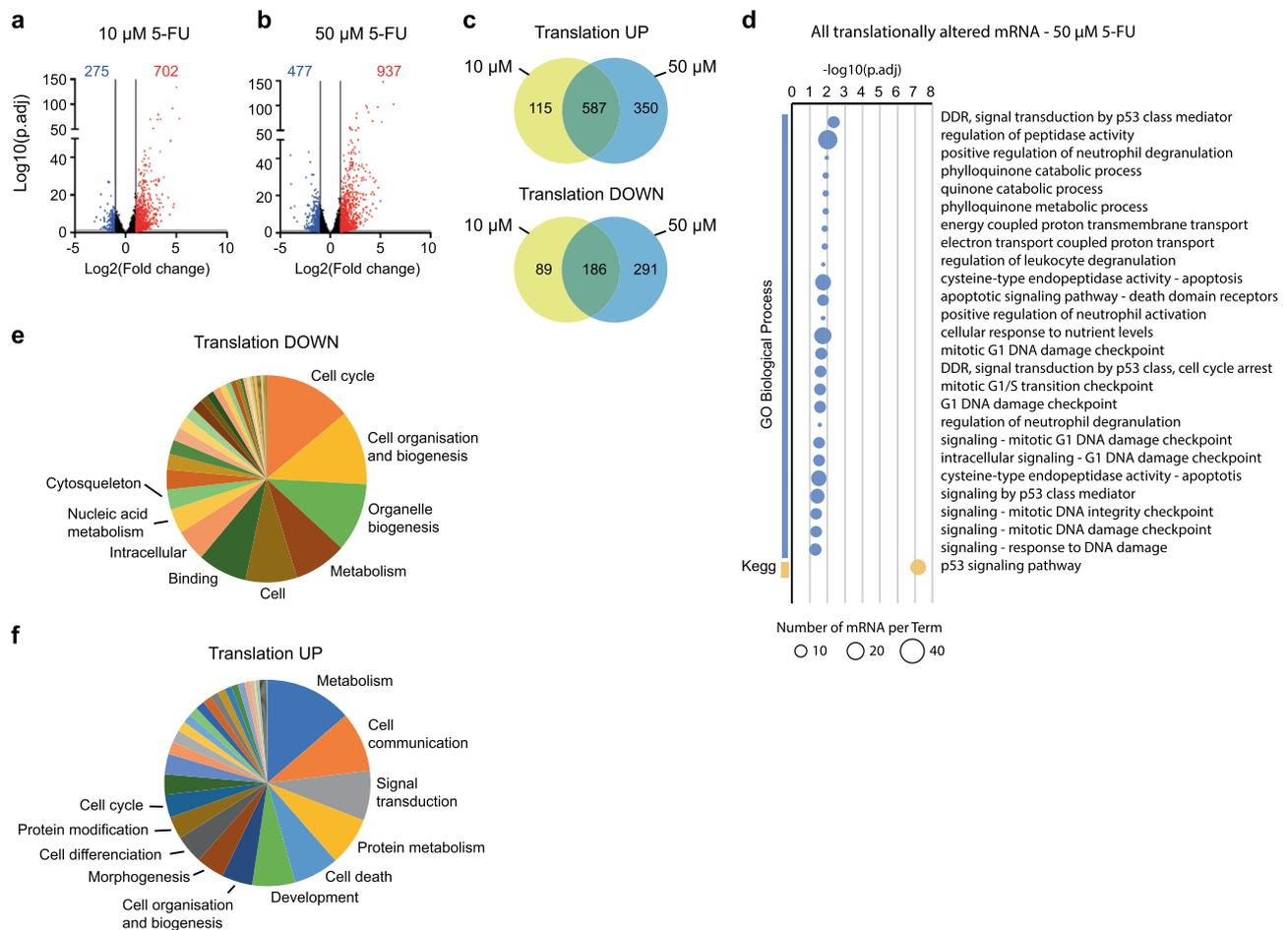


Fig. 5 Alteration of specific mRNA translation by 5-FU. HCT116 cells were untreated (NT) or treated with 10 μ M or 50 μ M 5-FU for 24 h and mRNA translation was assessed by RNA-sequencing of polysome-associated mRNAs. **a-b**, mRNA association with polysomes was compared between 10 μ M (**a**) or 50 μ M (**b**) 5-FU treated and untreated cells, and significance was tested using a two-sided Wald test from DESeq2 R package. Adjustments for multiple comparisons were made using Benjamini and Hochberg correction method. *P* values for individual mRNA are available in Supplementary Data 2. The data show all analyzed mRNAs. mRNAs whose polysomal level either increased (red) or decreased (blue) by more than twofold between untreated and 5-FU treated cells are colored ($p_{\text{adj}} < 0.05$). The threshold $\pm 1 \log_2(\text{FC})$ is indicated by vertical lines. The number of significantly altered mRNAs is indicated on top of the graphs. **c** Same datasets as in (**a**) and (**b**). Venn diagrams showing the comparison of translationally upregulated and downregulated mRNAs in 10 μ M and 50 μ M 5-FU treated cells. **d** Gene ontology analysis of all translationally altered mRNAs upon treatment with 50 μ M 5-FU. The data show enriched GO terms for biological processes category (GO-Term-BP) and KEGG pathways. Analysis performed using gprofiler⁶³. **e-f**, Significantly enriched GO terms were clustered in sub-groups according to GOSlim2 classification and using with the CateGORizer webservice⁶⁴. The pie charts summarize the list of functional sub-groups in order of decreasing importance respectively for translationally downregulated genes (**e**) and translationally upregulated genes (**f**). The colours were chosen by order of importance, and do not represent the same groups in (**e**) and (**f**). Source data are provided as a Source Data file.

Purification of cytoplasmic ribosomes. Except otherwise stated, cytoplasmic ribosome purification from cells was performed as previously described⁵⁶. Briefly, cytoplasmic fractions were obtained by mechanical lysis of cells using a Precellys tissue homogenizer (Ozyme) and centrifugation at 12,000 g for 10 min to pellet mitochondria. To purify ribosomes, cytoplasmic fractions were adjusted to 500 mM KCl by adding an appropriate volume of 3 M KCl, and loaded onto a 1 M sucrose cushion in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl and 2 mM DTT, and centrifuged for 2 h at 240,000 g. The pellet containing the ribosomes was quickly washed with and resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂ and 25 mM KCl.

For puromycin treatment, cells were fractionated as described above. The cytoplasmic fraction was loaded onto a 25 mM KCl, 1 M sucrose cushion in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂ and 2 mM DTT, and centrifuged for 2 h at 240,000 g. The pellet containing the ribosomes was quickly washed and was resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂ and 25 mM KCl. Suspended ribosomes were treated with 1 µg/mL puromycin (Sigma) for 10 min at 4 °C and 15 min at 37 °C. Upon puromycin dissociation, the suspension was adjusted to 500 mM KCl with a 3 M KCl solution, and loaded onto a 1 M sucrose cushion in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl and 2 mM DTT, and centrifuged for 2 h at 240,000 g. The pellet containing the ribosomes was quickly washed and was resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂ and 25 mM KCl.

Ribosome purification from polysomal fraction. Cells were seeded at 10⁷ cells/15 cm dish and treated with 5-FU 48 h later as indicated. Cells were then incubated for 5 min with 25 µg/mL Emetin (Sigma) and washed twice with cold 1X PBS before harvesting. Cytosolic lysates were prepared as described above. 3 mg of cytosolic proteins was loaded onto a 10–40 % sucrose gradient, sedimented by ultracentrifugation for 2 h at 240,000 g at 4 °C on a SW-41 rotor (Beckman). Fractions were collected and absorbance profiles were generated at 245 nm using an ISCO UA-6 detector. Polysomal fractions were pooled and concentrated in an Amicon Ultra-15 unit with a 100 kDa cut-off. KCl concentration was adjusted to 500 mM using a 4 M stock solution. The ribosome suspension was reduced to 600 µL on an Amicon Ultra-15 filtration unit, and loaded onto a 1 M sucrose cushion in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl and 2 mM DTT, and centrifuged for 2 h at 240,000 g. The pellet containing the ribosomes was resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂ and 25 mM KCl.

rRNA purification. For purified ribosomes, RNA was extracted using the TriPure Reagent (Roche) according to the manufacturer's instruction. Purified rRNAs were resuspended in water and quantified by spectrophotometry. For xenograft and human tumour samples, rRNAs were purified as described previously²⁴. Briefly, 10 µg of total RNA was denatured in 50% formamide at 70 °C for 10 min, and separated on a 0.8% low-melting agarose gel in 0.5X TAE buffer. 18 S and 28 S rRNA were gel-purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit and NT1 buffer (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instruction.

5-FU analysis by LC-HRMS. Purified rRNA (1 to 3 µg) was digested overnight at 37 °C with 270 units of Nuclease S1 (Promega) using the supplied buffer. Next, nucleotides were dephosphorylated by directly adding to the mix 5U of calf intestine phosphatase (New England Biolabs) in 100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.025% Triton® X-100. Digestion was carried out overnight at 37 °C, the digested mix was then stored at –80 °C. For LC-HRMS analysis, on the day of the analysis, 300 µL of a mixture of methanol/water (70/30; v/v) was added and the samples were vigorously vortexed following the addition of labelled internal standard. Samples were centrifuged for 5 min. at 13,000 g, the supernatants were separated and evaporated to dryness under nitrogen at 37 °C. The residues were then resuspended in water before injection into the mass spectrometer device. Analysis was carried out on a liquid chromatography coupled with a high-resolution mass spectrometer (Q-Exactive Plus Orbitrap -Thermo Scientific). Data acquisition was performed alternatively in negative and positive modes with the full scan mode (FS) at a resolution of 70,000 or 140,000 and with the parallel reaction monitoring mode (PRM) at a resolution of 17,500. Chromatographic separation of nucleosides was achieved on a Hypercarb® column (2.1 mm×100 mm; 5 µm) (ThermoScientific). The level of 5-FU per ribosome was calculated as the ratio of measured [5-FUrd] over the measured [A], [C] and [G], divided by the relative quantity of each nucleotide per ribosome.

Translatome analysis by polysome profiling. Cells were seeded at 10⁶ cells/15 cm dish and treated with 5-FU 48 h later as indicated. Cells were then incubated for 5 min with 25 µg/mL Emetin (Sigma) and washed twice with cold 1X PBS before harvesting. Cytosolic lysates were prepared by incubation of cells 10 min in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1X Complete™ EDTA free protease inhibitor (Roche) and 10 u/mL RNaseOut™ (Invitrogen)) followed by addition of 0.5 % NP-40. Nuclei were pelleted by centrifugation 5 min at 750 g and mitochondria were pelleted by centrifugation at 12,000 g for 10 min. Four mg of cytosolic proteins was loaded onto a 10–50 %

sucrose gradient, sedimented by ultracentrifugation for 2 h at 240,000 g at 4 °C on a SW-41 rotor (Beckman). Fractions of 750 µL were collected and absorbance profiles were generated at 245 nm using an ISCO UA-6 detector.

RNAs were extracted from the fractions containing 2 to 9 ribosomes per RNA. 150 µL of each fraction was collected and pooled and RNA were extracted using TRIzol™ LS reagent (Invitrogen) following manufacturer instruction and suspended in RNase-free water. For sequencing, RNA samples were processed using Stranded mRNA Prep kit (Illumina) according to manufacturer's protocol. Briefly, mRNA molecules containing polyA tails were capture by oligo(dT) magnetic beads. Then, purified mRNA was fragmented and copied into first-strand complementary DNA (cDNA) using reverse transcriptase and random primers. In a second strand cDNA synthesis step, dUTP replaced dTTP to achieve strand specificity. In the final steps, adenine and thymine bases were added to fragment ends and adapters were ligated. The resulting library was purified and selectively amplified for sequencing. Next-generation sequencing was performed on NextSeq 500 System (Illumina) using high output 2x75bp Flowcell and NextSeq System Suite v2.2.0 (Illumina).

Bioinformatic analysis of translomic data. Translatome libraries read quality were assessed using FastQC v0.11.9 (Babraham Institute, Cambridge, UK). Reads were filtered according to quality threshold Q35 and were trimmed of 4 and 2 bases at their start and end, respectively, using Cutadapt v3.2⁵⁷. With Cutadapt we set the minimal length of trimmed reads at 50 nucleotides; all trimmed reads shorter than 50 were removed from the analysis. High-quality reads were then aligned using STAR v2.7.7⁵⁸, on the Homo sapiens reference genome, version GRCh38.dna.primary_assembly_release v100, and annotated with GRCh38.100.gtf Ensembl annotation file. Quantification of mapped reads was performed using HTSeq-count v0.13.5⁵⁹, using the following parameters: strand = reverse, mode = intersection-nonempty, typesearch = exon, id_attributes = gene_id, additional_attributes = gene_name, and ignoring chimeric reads. Statistical differential analyses were performed between the control and each 5-FU conditions (10 or 50 µM) using the Wald test from DESeq2 R package⁶⁰. For each dataset, the read counts were filtered with a minimum of 1 count per million per biological sample after size factors estimation (method RLE for Relative Log Expression normalisation), and then dispersion was estimated (using DESeq2). P value adjustment that corrects for multiple tests to lower the risk of false discovery was performed with the method of Benjamini and Hochberg⁶¹. Genes with corrected p values below 0.05 were kept. Gene identifications were performed with biomaRt R package⁶². Functional annotations were performed with gProfiler⁶³ using a g:SCS threshold < at 0.80, and Ensembl release v103. Go terms were then clustered using CateGOrizer⁶⁴ according to the Goslim2 classification in multiple mode, which is well suited for the general-purpose analyses.

Gene ontology classification of mRNA of Survival genes was performed using the “functional annotation clustering” tool of the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) version 6.8, using default parameters⁶⁵.

Immunofluorescence analysis. Cells were grown on glass coverslips, fixed in 4% of paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) before permeabilization with 0.5% Triton X-100 in PBS. Fibrillar, Dyskerin and Nucleolin were detected using the anti-FBL rabbit polyclonal antibody (ab5821, Abcam) diluted at 1:2,000, anti-DKC1 rabbit polyclonal (sc-48794, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:500 and anti-NCL mouse monoclonal antibody [4E2] (ab13541, Abcam) at 1:4,000. Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A-11001, ThermoFisher Scientific), Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A-11008, ThermoFisher Scientific), Goat anti-Mouse IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (A-21422, ThermoFisher Scientific), and Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (A-21428, ThermoFisher Scientific) were used at 1:1000. Coverslips were mounted using the Fluoromount G mounting medium (EMS). Images were acquired on a Zeiss LSM 780 confocal microscope using a 63X Plan Apochromat immersion objective (NA 1.4), as a Z-stack (voxel size: 0.0634 × 0.0634 × 0.3155 µm). Final images were prepared by maximum intensity projection to display all nucleoli, using Zeiss ZEN Black software. As indicated, level images of actinomycin D treated cells was adjusted to correct for NCL dispersion. Images were cropped using ImageJ (<https://imagej.net>)⁶⁶.

[³²P] pulse-chase labelling. Labelling of newly synthesised RNAs was performed as described previously²¹. Briefly, cells were grown in DMEM containing 10% FBS, and 5-FU containing medium for 24 h or 48 h or actinomycin D at 50 ng/mL for 3 h. Phosphate deprivation was performed by incubating cells for 1 h with phosphate-free DMEM (Invitrogen) containing 10% dialysed FBS. For labelling, cells were incubated with phosphate-free-DMEM containing 10% dialysed FBS and 14 µCi/mL [³²P]-orthophosphate (Perkin Elmer) for 2 h. The medium was then replaced by isotope-free medium and cells were harvested directly in TriPure Reagent (Roche) 3 h post-labelling. Total RNA was extracted using TriPure Reagent standard procedure and dissolved in formamide. 1 µg of total RNA was denatured at 75 °C for 10 min and separated in a 1% agarose-formaldehyde-tricine/triethanolamine gel. The gel was dried for 2 h at 80 °C under a vacuum. Labeled

rRNAs were visualised by autoradiography using ImageQuant TL software (GEHealthCare) on a Typhoon PhosphorImager, (GE HealthCare). Isotope signal was normalised to ethidium bromide signal for 28 S and 18 S rRNA bands, and quantified using ImageJ (build bad6864e55 - <https://imagej.net>).

Preparation of mRNA-associated polysomes. This was performed as described in²⁴. Briefly, cells were seeded at 10^7 cells/15 cm dish and treated with 5-FU 48 h later as indicated. Cells were then incubated for 5 min with 25 µg/mL emetin (Sigma) and washed twice with cold 1X PBS before harvesting. Cytosolic lysates were prepared as described above. Three mg of cytosolic proteins was loaded onto a 10–40 % sucrose gradient, sedimented by ultracentrifugation for 2 h at 240,000 g at 4 °C on a SW-41 rotor (Beckman). Fractions were collected and absorbance profiles were generated at 245 nm using an ISCO UA-6 detector. Fractions corresponding to the second half of the polysomes (heaviest polysomes) were pooled and RNAs were extracted with TriPure Reagent as described by the manufacturer (Roche).

Quantitative RT-PCR. Two hundred and fifty nanogram of total RNA were reverse transcribed using the M-MLV RT kit and random primers (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out using the Light cycler 480 II real-time PCR thermocycler (Roche). Expression of mRNAs was quantified using LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche). The primers were obtained by oligonucleotide synthesis (Eurogentec) and are described in Supplementary Table 2.

Xenograft tumour model. Mice were 7 weeks old female Hsd: Athymic Nude-Foxn1tm (Envigo). 1.5×10^6 HCT116 cells were subcutaneously injected into nude mice flank ($n = 5$). At day 14, tumours had reached an average of 160 mm³. Mice received three injections (days 14, 18, and 22) with either vehicle ($n = 2$) or 5-FU (50 mg/kg, $n = 3$). 4 h after the last treatment, mice were sacrificed and tumours were collected for subsequent analysis. Total RNA was isolated using the TRI REAGENT protocol (SIGMA T9424) followed by a clean-up step (RNeasy Micro, QIAGEN). rRNA were gel-purified as described above. Animal experiments were performed within French guidelines for experimental animal studies, under DSV agreement A34-172-13. The maximal authorized tumour burden was 1500 mm³, and was not exceeded during the course of the study.

Colorectal human tumour samples. Patient tumours were collected and snap frozen. Total RNA was isolated using the TRI REAGENT protocol (SIGMA T9424) followed by a clean-up step (RNeasy Micro, QIAGEN). rRNAs were gel-purified as described above. Human samples were used under clinical agreement #NCT01577511 under the authority of Nîmes Carrémeau University Hospital. All patients signed an informed consent.

In vitro hybrid translation. Hybrid in vitro translation assay was performed as described previously (35) and is summarized hereafter. After centrifugation of 1 mL of RRL for 2 h 15 min at 240,000 g, 900 µL of ribosome-free RRL (named S100) was collected, frozen and stored at -80 °C. The extent of ribosome depletion from reticulocyte lysate was checked by translating 27 nM of in vitro transcribed capped and polyadenylated globin-Renilla mRNA in the S100 RRL and validated when no luciferase activity could be detected. In parallel, transfected cells were lysed in hypotonic buffer R (HEPES 10 mM pH 7.5, CH₃CO₂K 10 mM, (CH₃CO₂)₂Mg 1 mM, DTT 1 mM) and potter homogenised (around 100 strokes). Cytoplasmic fraction was obtained by 13,000 g centrifugation for 10 min at 4 °C. The ribosomal pellet was then obtained by ultracentrifugation for 2 h 15 min at 240,000 g in a 1 M sucrose cushion and was rinsed three times in buffer R2 containing HEPES 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 1.1 mM, β-mercaptoethanol 7 mM and resuspended in 30 µL of buffer R2 to reach a ribosomal concentration exceeding 10 µg/µL for optimal and long-term storage at -80 °C. The reconstituted lysate was then assembled by mixing 5 µL of S100 RRL with a scale from 0.25 to 4 µg of ribosomal pellet. Typically, the standard reaction contained 5 µL of ribosome-free RRL with 1 µg ribosomal pellet in a final volume of 10 µL. Upon reconstitution, the translation mixture was supplemented with 75 mM KCl, 0.75 mM MgCl₂ and 20 µM amino-acid mix.

For in vitro translation assays, p0-Renilla vectors containing the β-globin, GAPDH 5'UTR, CrPV, DCV or EMCV IRESs were described previously³⁸. mRNAs were obtained by in vitro transcription, using 1 µg of DNA templates linearized at the AflII sites, 20 U of T7 RNA polymerase (Promega), 40 U of RNasin (Promega), 1.6 mM of each ribonucleotide triphosphate, 3 mM DTT in transcription buffer containing 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine and 10 mM NaCl. For capped mRNAs, the GTP concentration was reduced to 0.32 mM and 1.28 mM of m7GpppG cap analogue (for β-globin mRNA) or m7GpppA (for CrPV mRNA) (New England Biolabs) was added. The transcription reaction was carried out at 37 °C for 2 h, the mixture was treated with DNase and the mRNAs were precipitated with ammonium acetate at a final concentration of 2.5 M. The mRNA pellet was then resuspended in 30 µL of RNase-free water and mRNA concentration was determined by absorbance using the Nanodrop technology. mRNA integrity was checked by electrophoresis on nondenaturing agarose gel.

In cell translation assays. Bicistronic constructs were obtained by cloning of the full-length human IGF-1R 5'UTR followed by 21 nt of the IGF-1R coding sequence (NCBI NM_000875) between the LucR and Luc+ coding sequences in the pIRES vector (REF Marcel 2019). The IGF-1R sequence was produced by gene synthesis and cloned in frame with the Luc+ coding sequence (GenScript®, Netherland). All deletion of the IGF-1R 5'UTR (Supplementary Fig. 5b) were obtained starting from the full-length IGF-1R sequence (GenScript®) using the numbering from the NCBI NM_000875 sequence. Monocistronic constructs were obtained by sub-cloning of the full-length IGF-1R 5'UTR (IGF-1R Full) or the 1-953 (IGF-1R ΔIRES) or 954-1040 (IGF-1R IRES) in pFL-IV-Luc+ vector. pFL-IV-Luc+ vector was obtained by removing the LucR coding sequence from the pIRES vector.

Translation assays were performed as follow: cells were seeded at 1000 cells/well in 96-well plates. Plasmids were transfected 24 h later with X-tremeGENE HP™ reagent (Roche Diagnostics) at 1:10 ratio with 200 ng of DNA according to manufacturer instruction. 24 h after transfection, cells were treated with 5-FU at 10 µM or 50 µM for 24 h. Luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase reagent (Promega) on Spark plate reader (Tecan). Results were obtained from background-subtracted values, and ratios were calculated for each well. Data were normalized to the untreated condition (NT).

Cell growth and viability assays. HCT116 were seeded onto 96-well plates at 3,000 cells/well. 48 h after seeding, cells were treated for 48 h with 10 µM 5-FU alone or in combination with 5 µM NVP-AEW541 (Sigma-Aldrich), or with DMSO as a control, and for an additional 72 h with 5 µM NVP-AEW541 alone, and cell viability was evaluated by MTT assay (Cell Titer Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) according to the manufacturer's protocol. Cell growth was monitored in real-time using the xCELLigence technology (ACEA Biosciences), based on electric impedance generated by cells attached to the well. Signals were normalised against the time obtained with IGF-1 (5 or 10 ng/mL (Peptrotech)) treatment. The growth rate was calculated over 72 h as the slope under the curve.

Statistics and reproducibility. Except for the bioinformatic analysis of translational data detailed above, statistical analysis was performed using the Prism software (version 7.0, GraphPad). A two-tailed unpaired student t-test was used for evaluating significance. IF, FISH and TEM experiments were performed at least 3 times, and images are representative of several fields observed for each experiment.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

RNA sequencing data of transcriptome analysis generated in this study are available at the NCI Gene Expression Omnibus database under accession number [GSE178839](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE178839). Datasets of translational analysis and polysome profiles are available as supplementary data. All data used to generate the figures and tables are provided as supplementary data and in the "Source data" file accompanying this paper. Source data are provided with this paper.

Received: 25 May 2020; Accepted: 10 December 2021;

Published online: 10 January 2022

References

- Nassar, D. & Blanpain, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 47–76 (2016).
- Recasens, A. & Munoz, L. Targeting Cancer Cell Dormancy. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 128–141 (2019).
- Vallette, F., Olivier, C., Lezot, F. & Oliver, L. Dormant, quiescent, tolerant and persister cells: four synonyms for the same target in cancer. *Biochem. Pharmacol.* **162**, 169–176 (2018).
- Pisco, A. O. & Huang, S. Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse: 'What does not kill me strengthens me'. *Br. J. Cancer.* **146**, 1725–1732 (2015).
- Robichaud, N., Sonenberg, N., Ruggero, D. & Schneider, R. J. Translational Control in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a032896 (2019).
- Pelletier, J., Thomas, G., Volarevic, S. & Volarevi, S. Ribosome biogenesis in cancer: New players and therapeutic avenues. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 51–63 (2017).
- Natchiar, S. K., Myasnikov, A. G., Kratzat, H., Hazemann, I. & Klaholz, B. P. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature* **551**, 472–477 (2017).
- Khatter, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K. & Klaholz, B. P. Structure of the human 80S ribosome. *Nature* **520**, 640–645 (2015).
- Polikanov, Y. S., Melnikov, S. V., Soll, D. & Steitz, T. A. Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 342–344 (2015).

10. Truitt, M. L. & Ruggero, D. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 288–304 (2016).
11. Xue, S. & Barna, M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 355–369 (2012).
12. Decatur, W. A. & Fournier, M. J. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 344–351 (2002).
13. Penzo, M. et al. Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation. *FASEB J.* **29**, 3472–3482 (2015).
14. Eralles, J. et al. Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc. Natl Acad. Sci.* **8**, 201707674 (2017).
15. Marcel, V. et al. p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* **24**, 318–330 (2013).
16. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
17. Pettersen, H. S. et al. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res* **39**, 8430–8444 (2011).
18. Pritchard, D. M., Watson, A. J., Potten, C. S., Jackman, A. L. & Hickman, J. A. Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 1795–1799 (1997).
19. Takimoto, C. H., Tan, Y. Y., Cadman, E. C. & Armstrong, R. D. Correlation between ribosomal RNA production and RNA-directed fluoropyrimidine cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 3243–3248 (1987).
20. Greenhalgh, D. A. & Parish, J. H. Effect of 5-fluorouracil combination therapy on rna processing in human colonic carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **61**, 415–419 (1990).
21. Burger, K. et al. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J. Biol. Chem.* **285**, 12416–12425 (2010).
22. Casale, F. et al. Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacol. Res.* **50**, 173–179 (2004).
23. Trump, B. D. L. et al. Pharmacokinetic Pharmacodynamic Anal. Fluorouracil 72-Hour. *Continuous Infus. Dipyridamole* **9**, 2027–2035 (1991).
24. Bash-Imam, Z. et al. Translational reprogramming of colorectal cancer cells induced by 5-fluorouracil through a miRNA-dependent mechanism. *Oncotarget* **8**, 46219–46233 (2017).
25. Machon, C. et al. Study of intracellular anabolism of 5-fluorouracil and incorporation in nucleic acids based on a LC-HRMS method. *J. Pharm. Anal.* **11**, 77–87 (2020).
26. Xi, Y., Nakajima, G., Schmitz, J. C., Chu, E. & Ju, J. Multi-level gene expression profiles affected by thymidylate synthase and 5-fluorouracil in colon cancer. *BMC Genomics* **7**, 1–15 (2006).
27. Kudo, K. et al. Translational control analysis by translationally active RNA capture/microarray analysis (TriP-Chip). *Nucleic Acids Res* **38**, 1–9 (2010).
28. Panthu, B., Decimo, D., Balvay, L. & Ohlmann, T. In vitro translation in a hybrid cell free lysate with exogenous cellular ribosomes. *Biochem J.* **467**, 387–398 (2015).
29. Meng, Z. et al. Alterations in RNA-binding activities of IRES-regulatory proteins as a mechanism for physiological variability and pathological dysregulation of IGF-IR translational control in human breast tumor cells. *J. Cell Physiol.* **217**, 172–183 (2008).
30. Giraud, S., Greco, A., Brink, M., Diaz, J. J. & Delafontaine, P. Translation Initiation of the Insulin-like Growth Factor I Receptor mRNA Is Mediated by an Internal Ribosome Entry Site. *J. Biol. Chem.* **276**, 5668–5675 (2001).
31. Sharma, S. V. et al. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer. *Cell Subpopul. Cell* **141**, 69–80 (2010).
32. Rambow, F. et al. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* **174**, 843–855.e19 (2018).
33. Hopfner, M., Sutter, A. P., Huether, A., Baradari, V. & Scherubl, H. Tyrosine kinase of insulin-like growth factor receptor as target for novel treatment and prevention strategies of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **12**, 5635–5643 (2006).
34. Larsson, O., Girnita, A. & Girnita, L. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Br. J. Cancer* **92**, 2097–2101 (2005).
35. Lovly, C. M. et al. Rationale for co-targeting IGF-1R and ALK in ALK fusion-positive lung cancer. *Nat. Med.* **20**, 1027–1034 (2014).
36. García-Echeverría, C. et al. In vivo antitumor activity of NVP-AEW541 - A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-1R kinase. *Cancer Cell* **5**, 231–239 (2004).
37. Peña, C., Hurt, E. & Panse, V. G. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 689–699 (2017).
38. Jack, K. et al. rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Mol. Cell* **44**, 660–666 (2011).
39. Hertz, M. I., Landry, D. M., Willis, A. E., Luo, G. & Thompson, S. R. Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Mol. Cell Biol.* **33**, 1016–1026 (2013).
40. Majzoub, K. et al. RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* **159**, 1086–1095 (2014).
41. Lee, A. S., Burdeinick-Kerr, R. & Whelan, S. P. A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 324–329 (2013).
42. Quade, N., Boehringer, D., Leibundgut, M., Van Den Heuvel, J. & Ban, N. Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-Å resolution. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
43. Meng, Z., Jackson, N. L., Shcherbakov, O. D., Choi, H. & Blume, S. W. The Human IGF1IRES likely operates through a Shine-Dalgarno-like interaction with the G961 loop (E-site) of the 18S rRNA and is kinetically modulated by a naturally polymorphic polyU loop. *J. Cell. Biochem.* **110**, 531–544 (2010).
44. Weingarten-Gabbay, S. et al. Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* (80-.). **351**, aad4939 (2016).
45. Catez, F. et al. Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics Transcription Nucleus Nucleolus rRNA Processing Assembly Mature Cytoplasm Translation. *Biochem. Pharmacol.* **159**, 74–81 (2019).
46. Peltonen, K. et al. A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* **25**, 77–90 (2014).
47. Devlin, J. R. et al. Combination therapy targeting ribosome biogenesis and mRNA translation synergistically extends survival in MYC-driven lymphoma. *Cancer Disco.* **6**, 59–70 (2016).
48. Shen, S., Vagner, S. & Robert, C. Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors. *Cell* **183**, 860–874 (2020).
49. Marine, J. C., Dawson, S. J. & Dawson, M. A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 743–756 (2020).
50. Lusk, M. R., Murakami, M. A., Manalis, S. R. & Weinstock, D. M. Targeting minimal residual disease: A path to cure? *Nat. Rev. Cancer* **18**, 255–263 (2018).
51. Melnikov, S. V., Söll, D., Steitz, T. A. & Polikanov, Y. S. Insights into RNA binding by the anticancer drug cisplatin from the crystal structure of cisplatin-modified ribosome. *Nucleic Acids Res* **44**, 4978–4987 (2016).
52. Roesch, A. et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1Bhigh cells. *Cancer Cell* **23**, 811–825 (2013).
53. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies. *Ann. Oncol. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**(Suppl 3), iii42–iii50 (2016).
54. Su, Y. et al. Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* **114**, 13679–13684 (2017).
55. Dacheux, E. et al. BRCA1-Dependent Translational Regulation in Breast Cancer Cells. *PLoS One* **8**, e67313 (2013).
56. Belin, S. et al. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* **4**, e7147 (2009).
57. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* **17**, 10–12 (2011).
58. Dobin, A. et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
59. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
60. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
61. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodol.)* **57**, 289–300 (1995).
62. Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **4**, 1184–1191 (2009).
63. Reimand, J. et al. g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res* **44**, W83–W89 (2016).
64. Hu, Z.-L., Bao, J. & Reecy, J. CateGORizer: A Web-Based Program to Batch Analyze Gene Ontology Classification Categories. *Online J. Bioinforma.* **9**, 108–112 (2008).
65. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2008).
66. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

Acknowledgements

We thank Sandra Ortiz (Cancer Research Center of Lyon) for helpful discussions. We thank E. Errazuriz (Centre d’Imagerie Quantitative Lyon-Est) and C. Vanbelle (plateau d’imagerie du CRCL) for technical help. We thank Véronique Pantesco and and Saïd

Assou from the transcriptomic facility of IRMB for RNA-sequencing. We thank Brigitte Manship for editing the manuscript. G.T. and S.N.-S. were recipient of a Ph.D. fellowship from la Ligue Nationale Contre le Cancer and from “La Fondation pour la Recherche Médicale”. M.G. was supported by ANR Grant “INVADE” PC201507. The project was supported by the “Ligue Contre le Cancer, comités départementaux de la Drôme, du Rhône, du Puy-de-Dôme, et de l’Allier”, by Agence Nationale de la Recherche (grant RiboMeth - ANR-13-BSV8-0012, grant PLAsCAN - ANR-17-CONV-0002), by the Institut National du Cancer (INCa, grant FluoRib - PLBIO18-131) and by Programmes d’Actions Intégrées de Recherche (PAIR Sein, RiboTEM, ARC_INCa_LNCC_7625) to J.-J.D. This work is supported by the ERiCAN program of Fondation MSD-Avenir (Reference DS-2018-0015). J.-J.D. is part of the DevWeCan Labex Laboratory. We thank the ATGC bioinformatic platform for hosting computational analyses (support from PIA France Génomique and from Institut Français de Bioinformatique (ANR-11-INBS-0013)). E.R. and J.R. were supported by the GEM Flagship project funded from Labex NUMEV (ANR-10-LABX-0020). E.R., N.D.V., A.V., J.P. and F.C. are CNRS research fellow. A.D., J.-J.D., and V.M. are Inserm research fellows.

Author contributions

G.T., Z.B.-I., B.P., J.G., C.M., A.V., S.N.-S., A.G., M.-A.M., M.G., M.C.-D., F.L., V.M., G.S., E.B., M.-A. A., J.B.V., C.B., J.P., and F.C. performed experiments. G.T., J.G., V.M., C.V., H.C.M., A.D., J.C.S., N.D.V., T.O., J.P., F.C., and J.-J.D. designed experiments. M.P. and M.B. provided human biopsies. J.R. and E.R., performed next-generation sequencing data primary and secondary analyses, and developed scripts for specific analyses. P.B., T.O., J.P., J.G., N.D.V., F.C., and J.-J.D. designed and supervised the study. F.C. and J.-J.D. wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27847-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Frédéric Catez or Jean-Jacques Diaz.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022