



Identification de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer du rein

Wilfried Souleyreau

► To cite this version:

Wilfried Souleyreau. Identification de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer du rein. Cancer. Université de Bordeaux, 2015. Français. ⟨NNT : 2015BORD0422⟩. ⟨tel-01286988⟩

HAL Id: tel-01286988

<https://theses.hal.science/tel-01286988v1>

Submitted on 11 Mar 2016

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.



HAL Authorization

Année 2015

THÈSE

Pour obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Biologie cellulaire et physiopathologies

Identification de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer du rein

Présentée et soutenue publiquement le
18 décembre 2015

Par Wilfried Souleyreau

Membres du Jury

Prof. Andreas Bikfalvi, Professeur Universitaire
Dr Patrick Auguste, Maître de Conférences
Dr Stéphane Pyronnet, Directeur de Recherche
Dr Gilles Pages, Directeur de Recherche
Dr Henri Bernardi, Chargé de Recherche
Dr Hamid Rezvani, Chargé de Recherche

Président
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Résumé

Identification de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer du rein

Le cancer du rein compte parmi les 10 types de cancers les plus fréquents chez l'Homme. Il n'existe aujourd'hui aucun marqueur biomoléculaire dans ce type de cancer, et dans le cas d'un cancer métastatique, l'arsenal thérapeutique aujourd'hui disponible manque d'efficacité. Les différents processus mis en jeu lors de la progression tumorale sont encore mal connus. La connaissance de ces processus pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques, ainsi que de mettre en évidence de marqueurs biomoléculaires pronostiques ou diagnostiques de la maladie.

Dans un premier projet, et afin de mieux comprendre les mécanismes de la progression tumorale et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de nouveaux marqueurs biomoléculaires dans le cancer du rein, un nouveau modèle innovant a été généré à partir d'une lignée tumorale de RCC murine. Ce modèle de réimplantations successives de cellules tumorales issues de tumeur primaire ou de métastases a permis de générer différentes lignées cellulaires montrant une agressivité accrue au cours des passages. En utilisant une stratégie de biologie des systèmes, ce modèle pourra permettre de mettre en évidence des cibles d'études prometteuses qui pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux marqueurs biomoléculaires dans le RCC. L'interleukine-34 est l'exemple d'une cible d'étude dors et déjà été sélectionnée, mettant en évidence la puissance du modèle généré.

Dans un second projet, les rôles de certains membres de la matrice extracellulaire tumorale ont été évalués en utilisant cette même lignée de RCC murine (collagène de type I, fibronectine, matrigel). Cette étude a permis de mettre en évidence le potentiel pro-invasif et pro-métastatique du dépôt de collagène de type I dans les tumeurs. Des récepteurs activés par le collagène sont proposés comme potentiellement impliqués dans les effets induits par le collagène de type I dans le modèle.

Ces deux projets permettent et permettront de mieux comprendre certains mécanismes de la progression tumorale, ainsi que de mettre en évidence des marqueurs biomoléculaires et de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clés : Cancer du Rein, Carcinome Rénal, métastase, Renca, interleukine-34, collagène, fibronectine, matrigel

Summary

Identification of new potential prognosis factor and therapeutically targets in kidney cancer

Kidney cancer is one of the 10 commonest human cancers. To date, no biomolecular markers are available in this type of cancer, and in the case of metastatic cancer, the therapeutic arsenal is still inefficient. The different processes involved in cancer progression are still poorly understood. Understanding those processes could highlight new therapeutic targets, and new prognostic or diagnostic biomolecular markers of this disease.

For a first project, a new innovative model has been generated from a murine RCC cell line as a tool to understand cancer progression mechanisms and to identify new therapeutic target and new biomolecular markers in kidney cancer. This model of sequential reimplantation of cancer cells isolated from primary tumours or metastases allowed us to generate different cell lines showing increased aggressiveness after passages. Using a systems biology strategy, this model will allow us to identify new potential therapeutic targets and new biomolecular markers in RCC. Interleukin-34 is an example of an already selected target, showing the power of the model generated.

For a second project, the role of some members of extracellular matrix (collagen type I, fibronectin, matrigel) was studied using this same murine RCC cell line. This study demonstrated the potential pro-invasive and pro-metastatic roles of collagen type I deposition in tumors. Collagen-activated receptors are proposed as mediators of the effect induced by collagen type I in this model.

Those two projects have and will continue to contribute to a better understanding of cancer progression mechanisms, and will bring out new biomolecular markers and new therapeutic targets.

Key words: Kidney Cancer, Renal Carcinoma, metastasis, Renca, interleukin-34, collagen, fibronectin, matrigel

Team LiliOuin
FTW !!!

Remerciements

Je tiens à remercier Patrick Auguste, qui m'a accueilli en thèse et m'a ainsi permis de mettre un pied dans le monde de la recherche.

Je remercie Andréas Bikfalvi pour son accueil au sein du laboratoire, et qui m'a permis de rester encore un peu au laboratoire afin de continuer à travailler sur le projet de biologie des systèmes.

Merci à Lin, avec qui j'ai eu la joie de travailler sur le projet de Biologie des Systèmes, collègue et amie. Merci pour ton encadrement. Tu sais tout le bien que je pense de toi...
LiliQuin FTW !!! xxx

Je remercie les rapporteurs de ma thèse, Gilles Pages et Stéphane Pyronnet, d'avoir accepté de juger de mon travail, et participer au jury de ma soutenance. Je remercie bien entendu les autres membres de ce jury Henri Bernardi et Hamid Revzani d'avoir accepté de participer à la soutenance.

Il va de soit que je n'en serai pas là aujourd'hui sans le soutien de ma famille, je les remercie d'avoir supporté ces longues années études. Une petite pensée pour mon grand-père qui me demandait souvent « Et l'école comment ça va ? ». Et bien mon papy, jusqu'à maintenant, ça c'est plutôt bien passé.

Je ne saurai oublier les membres officieux de ma famille que sont mes amis proches, Mélanie, Jérémy, Marie, Lin, Julien des soutiens inconditionnels dans les moments difficiles.

Je remercie Raphaël Pineau et son équipe pour le temps consacré aux implantations et au suivi des animaux. Merci d'avoir toujours trouvé un moyen de nous dépanner.

Merci à Francesco Falschiani et Kim Clarke pour leurs reculs et les études transcriptomiques. Thanks a lot. Merci à Jess et Steph pour leur travail passé, présent et futur sur le projet. Je remercie aussi Rodrigue Rossignol et Claude Lalou pour les expériences de métabolisme.

Une pensée pour l'équipe de Thierry Colin, et en particulier Etienne Baratchart et Sébastien Benzekry avec qui nous avons eu de longues discussions parfois incompréhensible sur les mathématiques et la biologie. Je suis heureux d'apparaître à vos côtés sur une publication.

Merci aux membres passés et présents du laboratoire pour leur bonne humeur, leurs sourires, leurs soutiens, les parties de belotes et les apéros. Humainement j'ai passé 4 années extraordinaires et je suis fier de pouvoir dire aujourd'hui que ce labo ne comporte pas seulement des collègues mais aussi des amis, très proches pour certains. Je remercie Pika, Arnaud, Sylvaine et Vivi qui m'ont accueillis en leur qualité de « thésards seniors », ça m'a permis de démarrer avec leur soutien et leur expérience. Ces derniers m'ont répétés très souvent « commence à rédiger ta thèse un an avant ! »... décidément on n'écoute jamais assez les conseils avisés.... Je souhaite toute la réussite possible à Béatrice, Mathilde et Kévin, serrez les dents !! Merci à Chouchou pour son soutien moral dans certaines situations, son aide pour la correction du manuscrit, et sa façon de voir toujours le bon côté des choses, c'est motivant. Merci à Nadège pour son sourire, sa bonne humeur et son écoute tout au long de ces années. Je remercie Céline, mais surtout je souhaite lui adresser toute ma reconnaissance, ce n'est pas évident de vouloir maintenir un certain niveau de sécurité au labo... Merci à Michel Moenner qui malgré son départ du labo a continué à se renseigner sur l'avancé de mes projets, sachez que l'on vous regrette ici. Merci à Babou, May, Fafa, Cathy, Clothilde, Sophie et Sophie, Marie-Claude, et tout ceux que malgré moi j'aurais oublié, qui ont eux aussi fait parti de l'aventure, chacun à leur manière. Le labo ne pourrait pas tourner sans les gestionnaires en or que sont Fred et Karine. Je n'oublie pas Annie.

Sommaire

Liste des illustrations.....	1
Abréviations	1
Introduction	3
I / Le cancer du rein.....	5
A / Epidémiologie, incidence et mortalité du cancer du rein	5
B / Le carcinome à cellule rénale et son histologie	5
B -1 / Classification des principaux RCC.....	5
B-1-a / Carcinome rénal à cellules claires (ccRCC).....	5
B-1-b / Le carcinome rénal à cellules papillaires (pRCC).....	7
B-1-c / Le carcinome rénal à cellules chromophobes (chRCC)	7
B-1-d / Autres types	8
C / Classification TNM et stade clinique	9
D / Distribution des stades cliniques au diagnostic	11
E / Taux de survie au diagnostic.....	11
F / Autres méthodes de classification du cancer du rein	12
F-1 / Le Grade Nucléaire de Fuhrman.....	12
F-2 / UCLA Integrated Staging System (UISS)	13
G / Diagnostic du cancer du rein	13
H / Facteurs pronostiques dans le RCC	13
I / Les biomarqueurs dans le RCC.....	14
J / Thérapies du RCC métastatique	15
II / Les grandes étapes de la progression tumorale, vers la formation de métastases.....	19
A / De l'initiation tumorale à la tumeur primaire	19
A-1 / Acquisition de propriétés cancéreuses	19
A-1-a / Signaux de prolifération soutenus et échappement aux inhibitions de croissance....	19
A-1-b / Résistance à l'apoptose.....	21
A-1-c / Réplication illimité.....	21
A-1-d / Induction de l'angiogenèse, et switch angiogénique.	21
A-1-e / Echappement au système immunitaire.....	22
A-1-f / Dérégulation du métabolisme énergétique	23
A-1-f / Migration et invasion.....	23

B / Invasion locale, première étape de la formation des métastases.....	24
B-1 / Invasion locale.....	24
B-1-a / Dissociation cellulaire des cellules tumorales de la tumeur primaire	24
B-1-a-i / Modulations des jonctions cellules-cellules.....	25
B-1-a-ii / Désolidarisation de la lame basale.....	29
B-2 / Remodelage de la matrice	29
B-2-a / Dégradation de la matrice extracellulaire.....	30
B-2-b / Production d'une nouvelle matrice	31
B-3 / Migration des cellules tumorales.....	32
B-4 / La Transition Epithélio-Mésenchymateuse	35
B-4-a / Epithélium et cellules épithéliales.....	35
B-4-b / Cellules mésenchymateuses et mésenchyme	35
B-4-c / La transition Epithélio-mésenchymateuse.....	36
B-4-c-i / EMT dans le développement : l'EMT de type 1	38
B-4-c-ii / EMT physiologique et pathologiques chez l'adulte : EMT de type 2	39
B-4-c-iii / EMT pathologique et cancer : EMT de type 3	40
B-4-d / Marqueurs de l'EMT utilisés dans l'étude du cancer.....	42
B-4-e / Voies de signalisation pouvant agir sur l'EMT	43
C / Intravasation, survie dans le sang et Extravasation	45
C-1 / Intravasation	45
C-2 / Survie dans le sang.....	46
C-3 / Arrêt des cellules.....	47
C-4 / Extravasation	50
D / Formation de nouvelles tumeurs distantes, les métastases	50
D-1 / Dormance, micrométastase et macrométastase	51
D-2 / Localisation des métastases et tropisme.....	54
D-2-a / Interactions spécifiques.....	55
D-2-b / Rétention mécanique.....	56
III / Le microenvironnement tumoral	58
A / Matrice Extracellulaire et cancer.....	58
A-1 / ECM dans les cancers	60
A-1-a / Les collagènes, et le collagène de type I.....	60
A-1-b / La fibronectine.....	61
A-2 / Principaux récepteurs du collagène et de la FN	62

A-2-a / Les intégrines	62
A-2-b / Récepteurs à Domaine Discoïdine (DDR)	64
B / Le système immunitaire dans le cancer	66
B-1 / Granulocytes neutrophiles	66
B-2 / Axe lymphocytes T et Cellules NK.....	67
B-3 / Monocytes et Macrophages.....	67
B-3-a / L'interleukine-34.....	68
Matériel et méthodes	71
<i>Culture cellulaire</i>	72
<i>Préparation des cultures sur ECM</i>	72
<i>Immunocytochimie</i>	72
<i>Histochimie et immunohistochimie</i>	73
<i>Tests de prolifération</i>	73
<i>Tests d'adhérences</i>	73
<i>Tests de migration/invasion en chambre de Boyden</i>	74
<i>Tests de migration en vidéomicroscopie</i>	74
<i>Test de la cicatrice (« Wound Healing »)</i>	74
<i>Western Blots</i>	75
<i>Immunoprécipitations</i>	76
<i>Extraction des ARN et qRT-PCR</i>	76
<i>Obtention des milieux conditionnés</i>	77
<i>Zymographie</i>	78
<i>Inhibition des voies de Ras-Raf-Mek-Erk et de Src</i>	78
<i>Implantations des cellules</i>	78
<i>Isolement de cellules Renca issues de tumeurs primaires rénales ou de métastases pulmonaires</i> ...	79
<i>Réimplantations en série des cellules Renca-GFP isolées à partir de tumeurs ou de métastases.</i> ...	79
<i>Microarrays et analyses transcriptomiques</i>	79
<i>Tests d'ELISA dirigés contre IL-34</i>	80
<i>Tests statistiques</i>	80
Résultats	81
Projet 1 – Modélisation de la progression tumorale dans le RCC en utilisant une approche de biologie des systèmes	83
Résultats	87
I / Génération de lignées cellulaires de RCC murines agressives, outil clef du projet.....	87

A / Génération des lignées issues de la tumeur primaire : Lignée « Kidney »	87
B : Génération des lignées issues de métastases pulmonaires générées à partir de tumeur primaires : Lignée « Lung »	88
C : Génération de lignées issues de métastases pulmonaires issues d'injection de cellules via la veine caudale : Lignées « Tail »	89
D : Bilan des lignées générées	91
II / Résultats <i>in vivo</i>	93
A / Survie des souris au sacrifice	93
B / Taille et masses des tumeurs à la 6ème génération	94
C / Métastases issues d'implantations orthotopiques à la 6ème génération	95
D / Métastases issues d'injections intraveineuses à la 6ème génération	97
III / Caractérisation <i>in vitro</i> des lignées de 6ème génération	99
A / Morphologie	99
B / Prolifération	100
C / Migrations	102
C-1 / Migrations en chambre de Boyden	102
C-2 / Migration 2D, vidéomicroscopie	103
C-3 : Expériences de migration, test de la cicatrice	104
D / Etude du métabolisme cellulaire	106
E / Expressions de marqueurs de l'EMT	107
F / Analyses transcriptomique à grande échelle en fonction des types de lignées	109
IV – Etude transcriptomique des lignées, et identification d'une cible potentielle	111
A / Analyse transcriptomique	111
B / Expression d'IL-34 augmente progressivement au cours des passages	112
C / Sécrétion d'IL-34 par les cellules <i>in vitro</i>	114
C / Expression IL-34 chez les patients humains, survie et grade	115
D / Expression d'IL-34 dans la tumeur primaire et dans le rein sein	117
E / Présence et localisation de l'IL-34 protéique dans les tissus de patients	118
F / Etude de l'axe CSF-1 / CSF-1R	119
F-1 / Expression de CSF-1 et de son récepteur dans les cellules murines	120
F-2 / Expression du CSF-1 chez les patients humains	121
Discussions et perspectives	125
Quels sont les rôles de l'interleukine-34 sur la progression tumorale ?	125
IL-34 biomarqueur pronostic ?	128
IL-34 cible thérapeutique ?	129

De l'intérêt des différentes lignées générées, un puissant outil développé au laboratoire	130
Projet 2 : Influence de la matrice extracellulaire dans les mécanismes de la progression tumorale du RCC.....	135
I / Influence du collagène de type I, de la fibronectine et du matrigel sur le phénotype des cellules Renca.....	139
A / Morphologies.....	139
B / Jonctions intercellulaires	140
C / Prolifération.....	143
D / Adhérence.....	145
E / Migration et Invasion.....	147
F / Dégradation de la matrice extracellulaire – Zymographie	149
G / Expression de facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT.....	150
II / Exploration des voies activées par les ECM utilisées et identification de récepteurs impliqués.....	153
A / Exploration des voies activées par les différences ECM.....	153
B / Identification des récepteurs activés par le collagène de type I.....	154
C / Stratégie d'inhibition des voies	156
C-1 / Stratégie d'inhibition de la voie des MAP Kinases et de Src	156
C-2 / Stratégie d'inhibition de la voie Src	157
D / Etude de l'interaction des voies Src et MAP Kinases	158
D-1 / Erk est-il régulateur de Src ?.....	158
D-2 / Src est-il régulateur la voie des MAP Kinases ?	159
III / Rôles des voies MAP Kinases et Src.....	161
A / Morphologie	161
B / Jonctions intercellulaire	162
C / Migration et Invasion.....	165
D / Adhérences	167
Discussions et perspectives	171
Le collagène de Type I, facteur de mauvais pronostic participant à la progression tumorale ? ..	171
Src, cible thérapeutique dans le RCC ?	174
Les récepteurs DDR1 et/ou DDR2 ont un rôle dans la progression tumorale dans le RCC.....	176
Les récepteurs DDR1 et/ou DDR2, des cibles thérapeutiques ?	179
Résumé et conclusion générale	181
Références	183
Annexe / Publication	211

Liste des illustrations

Figure 1 : Carcinome rénal à cellules claires.....	6
Figure 2 : Carcinome rénal à cellules papillaires.	7
Figure 3 : Carcinome rénal à cellules chromophobes.....	8
Figure 4 : Principales propriétés caractéristiques acquises par les cellules tumorales selon Hanahan et Weinberg.	18
Figure 5 : Représentation schématique des jonctions cellules-cellules et cellules-ECM.	25
Figure 6 : Schéma de la structure des jonctions intercellulaires entre deux cellules épithéliales.....	26
Figure 7 : Structure de la jonction cellule-cellule dépendante de la E-cadhérine.	27
Figure 8 : Principales étapes de la migration des cellules.	32
Figure 9 : Différence morphologiques de cellules de types mésenchymateuses et amiboïdes in vitro .	33
Figure 10 : Gamme de modulations pouvant être accumulées par une cellule lors de l'EMT.	37
Figure 11 : Contribution de l'EMT dans la progression tumorale.	40
Figure 12 : Schématisation de certains marqueurs et mécanismes de l'EMT.	42
Figure 13 : Exemples de voies pouvant mener à la modulation de l'EMT.	44
Figure 14 : Intravasation de cellules tumorales.	46
Figure 15 : Arrêt et extravasation cellulaire.	48
Figure 16 : Mécanismes de dormance cellulaire et micrométastatique.....	52
Figure 17 : L'ECM, des rôles multiples.	58
Figure 18 : Les intégrines, récepteurs transmembranaires capables de générer des signaux intracellulaires.	63
Figure 19 : Exemples de voies de signalisation pouvant être modulées par les DDRs.	64
Figure 20 : Etablissement des lignées "Kidney", modèle de réimplantations rénales de cellules issues de tumeurs primaires.	87
Figure 21 : Etablissement des lignées "Lung", modèle de réimplantations rénales de cellules issues de métastases pulmonaires.	88
Figure 22 : Etablissement des lignées "Tail", modèle de réimplantations intraveineuses de cellules issues de métastases pulmonaires générées par implantation intraveineuse.	89
Figure 23 : Représentation schématique des étapes franchies par les différentes lignées lors des passages dans les souris.....	90
Figure 24 : Diminution de la survie des souris au cours des différents passages.....	93
Figure 25 : Tumeurs issues d'implantation de cellules parentales ou de cellules « Kidney » et « Lung » de 5ème génération à jour 15.	94
Figure 26 : Photographie de poumons issus d'implantation de cellules parentales ou de cellules « Kidney » et « Lung » de 5ème génération.....	96
Figure 27 : Photographie des poumons et nombre de métastases issus d'injection intraveineuse de cellules parentales ou de cellules « Tail » 5ème génération.....	97
Figure 28 : Morphologie des différents types de cellules générées.....	99
Figure 29 : Prolifération des cellules « Kidney » et « Tail » de 6ème génération comparés aux cellules Renca-GFP parentales.	101
Figure 30 : Migration des cellules en chambre de Boyden des cellules de 6ème génération comparées à la lignée parentale.....	102

Figure 31 : Migration 2D des cellules de 6 ^{ème} génération comparées à la lignée parentale.	104
Figure 32 : Tests de la cicatrice sur les cellules de 6 ^{ème} génération et sur les cellules parentales.	105
Figure 33 : Consommation basale d'oxygène par les cellules de 6 ^{ème} génération	107
Figure 34 : Niveau d'expression relative des facteurs de transcription Snail 1, Twist 1 et Zeb 2 dans les lignées de 6 ^{ème} génération, et leur évolution au cours des passages, comparé aux lignées parentales.	108
Figure 35 : Gènes surexprimés ou sous-exprimés dans les différentes lignées regroupés en fonction des types de lignées	110
Figure 36 : Résultat des microarray montrant l'expression de gènes évoluant en concordance avec la survie des animaux.	111
Figure 37 : Niveau d'expression relative d'IL 34 en fonction de générations et des types de cellules.	113
Figure 38 : Sécrétion d'IL-34 dans le milieu par les cellules de 6 ^{ème} génération et par les cellules parentales.....	114
Figure 39 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression d'IL-34 au sein de la tumeur primaire.	116
Figure 40 : Niveau d'expression d'IL-34 et grade Fuhrman.	117
Figure 41 : Niveaux d'expressions de l'IL-34 dans les reins sains et les tumeurs de patients atteints de RCC.....	118
Figure 42 : Localisation de la protéine IL-34 dans le tissu rénal sein et le tissu tumorale (x20).	119
Figure 43 : Niveau d'expression relative du CSF-1 et de CSF-1R en fonction de générations de cellules lors des premières et secondes séries.	120
Figure 44 : Niveaux d'expressions du CSF-1 dans les reins sains et les tumeurs de patients atteints de RCC.....	121
Figure 45 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression de CSF-1 au sein de la tumeur primaire.	122
Figure 46 : Morphologie des cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.	139
Figure 47 : Etat des jonctions intercellulaires des cellules Renca sur les différentes matrices extracellulaires.....	141
Figure 48 : Diminution de la quantité de β -caténine dans les cellules cultivées sur les différentes matrices.	142
Figure 49 : Prolifération des cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.....	144
Figure 50 : Adhérence des cellules Renca sur différentes matrices extracellulaires.	146
Figure 51 : Migration / Invasion des cellules Renca en fonction de la matrice extracellulaire.....	147
Figure 52 : Zymographie à partir du surnageant de cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.....	149
Figure 53 : Expression de facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT dans les cellules Renca cultivées sur le collagène.....	151
Figure 54 : Cinétique d'activation de voies de signalisation dans les cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.	153
Figure 55 : Présence des récepteurs DDR1 et DDR2 au niveau protéique dans les cellules Renca....	155
Figure 56 : Etat d'activation des récepteurs DDR1 et DDR2	156
Figure 57 : Schéma de la stratégie d'inhibition de Erk dans la voie Ras-Raf-Mek-Erk.....	157
Figure 58 : Inhibition de la voie des MAP Kinases par l'inhibiteur de Mek (U0126).....	157
Figure 59 : Inhibition de Src en utilisant l'inhibiteur Src Inhibitor I.	158

Figure 60 : Etat de la voie de Src suite à l'inhibition de la voie des MAP Kinases par l'inhibiteur U0126.	159
Figure 61 : Etat de la voie des MAP Kinases suite à l'inhibition de Src par l'inhibiteur Src Inhibiteur 1.	160
Figure 62 : Effets de la voie Src sur la morphologie des cellules Renca cultivées sur les différentes matrices.	162
Figure 63 : Effets de la voie Src sur les jonctions intercellulaires des cellules cultivées sur les différentes matrices.	163
Figure 64 : Quantification de la β -caténine après inhibition de la voie des MAP Kinases	164
Figure 65 : Quantification de la β -caténine après inhibition de la voie de Src.....	165
Figure 66 : Migration / Invasion des cellules Renca en fonction de la matrice extracellulaire, soumis à l'inhibition de la voie des MAPK.....	166
Figure 67 : Migration / Invasion des cellules Renca en fonction de la matrice extracellulaire, soumis à l'inhibition de la voie Src.	166
Figure 68 : Effet de l'inhibition de la voie des MAP Kinases sur l'adhérence des cellules Renca sur les différentes matrices extracellulaires.	168
Figure 69 : Effet de l'inhibition de la voie de Src sur l'adhérence des cellules Renca sur les différentes matrices extracellulaires.	169
Figure 70 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression du collagène de type I au sein de la tumeur primaire.	172
Figure 71 : Modèle proposé de participation du collagène de type I et de ses récepteurs DDRs dans le phénomène de métastase dans le modèle Renca.	176
Figure 72 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression de DDR1 et de DDR2 au sein de la tumeur primaire.....	179

Tableau 1: Classification TNM du cancer du rein.....	9
Tableau 2 : Stade clinique du cancer du rein en fonction de la classification TNM	10
Tableau 3 : Taux de survie en fonction du grade de cancer du Rein établi lors du diagnostic, en fonction de la classification TNM (tous types confondus).....	11
Tableau 4 : Grade de Fuhrman, selon Fuhrman et al. 1982.....	12
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en immunocytochimie	72
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie	73
Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot.....	75
Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation	76
Tableau 9 : Liste des amorces utilisées et technologie employée	77
Tableau 10: Recensement des 65 lignées générées selon le type de réimplantation.	91

Abréviations

bhd : Gène de la maladie de Bird-Hogg-Dubé (BHD)

BSA : Albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin)

CAM : Molécule d'adhérence cellulaire (Cell Adhesion Molecule)

ccRCC : Carcinome rénal à cellules claires (clear cell Renal Cell Carcinoma)

chRCC : Carcinome rénal chromophile (chromophobe Renal Cell Carcinoma)

CSF-1 : Facteur de stimulation de colonies (Colony-Stimulating Factor-1)

DDR 1/2 : Récepteur à domaine discoïdine (Discoidin Domain Receptor)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ECM : Matrice Extracellulaire (Extracellular Matrix)

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse (Epithelial to Mesenchymal Transition)

FAK : Kinase des adhérences focales (Focal Adhesion Kinase)

FN : Fibronectine

GFP : Protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)

IL-6 / IL-34 : Interleukine (interleukine-6 / interleukine-34)

LT : Lymphocyte T

MET : Transition mésoenchymato-épithéliale (Mesenchymal to Epithelial Transition)

MMP : métalloprotéinases matricielles (Matrix MetalloProteinase)

NK : "cellules tueuses naturelles" (Natural Killer)

PFA : Paraformaldéhyde

pRCC : Carcinome rénal papillaire (papillary Renal Cell Carcinoma)

PTPR-ξ1 : Protein Tyrosine Phosphatase, récepteur type zeta1

RCC : Carcinome à cellules rénales (Renal Cell Carcinoma)

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

SFK : Kinases de la famille de Src (Src Family Kinases)

SVF : Sérum de Veau Foetal

TAM : Macrophages associés aux tumeurs (Tumor-Associated Macrophages)

TCGA : The Cancer Genome Atlas

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)

vhl : Gène de la maladie de von Hippel-Lindau (VHL)

Introduction

I / Le cancer du rein

A / Epidémiologie, incidence et mortalité du cancer du rein

Chez l'adulte, les cancers du rein représentent 3% des cancers dans les pays occidentaux (*Observatoire Européen du cancer, Agence internationale pour la recherche sur le cancer, Lyon*) ce qui le classe dans les 10 types de cancers les plus diagnostiqués en Europe.

En 2012, 84 400 nouveaux cas étaient détectés en Europe pour 34 700 décès. En France, plus de 11 500 nouveaux cas étaient diagnostiqués dans la même année, pour près de 4 000 décès selon l'institut de veille sanitaire (InVS).

B / Le carcinome à cellule rénale et son histologie

Selon la classification OMS de 2004, différents sous-types de tumeurs malignes à cellules rénales (qui ont une origine épithéliale) sont définis. Parmi ces tumeurs, le carcinome à cellules rénales (RCC) ou adénocarcinome à cellules rénales, est le cancer du rein le plus commun. Il représente 9 cas de cancers du rein sur 10. Il existe plusieurs sous-types de RCC, basés sur des observations histologiques. Le traitement envisagé ainsi que les chances de survie du patient peuvent être déterminés en connaissant le sous-type de RCC. Il permet aussi de déterminer le caractère héréditaire de la maladie.

B -1 / Classification des principaux RCC

B-1-a / Carcinome rénal à cellules claires (ccRCC)

Le ccRCC est le RCC le plus commun avec une fréquence de plus de 7 cas de RCC sur 10 (Cheville, Lohse et al. 2003). La tumeur se développe à partir des cellules des tubules proximaux.

Ces cellules présentent un cytoplasme clair sous le microscope (Figure 1-A) qui provient de l'accumulation de gouttelettes de glycogène, de phospholipides et de lipides

neutres tels que le diester de cholestérol. D'un point de vue macroscopique, le ccRCC se caractérise par un aspect jaunâtre (Figure 1-B).

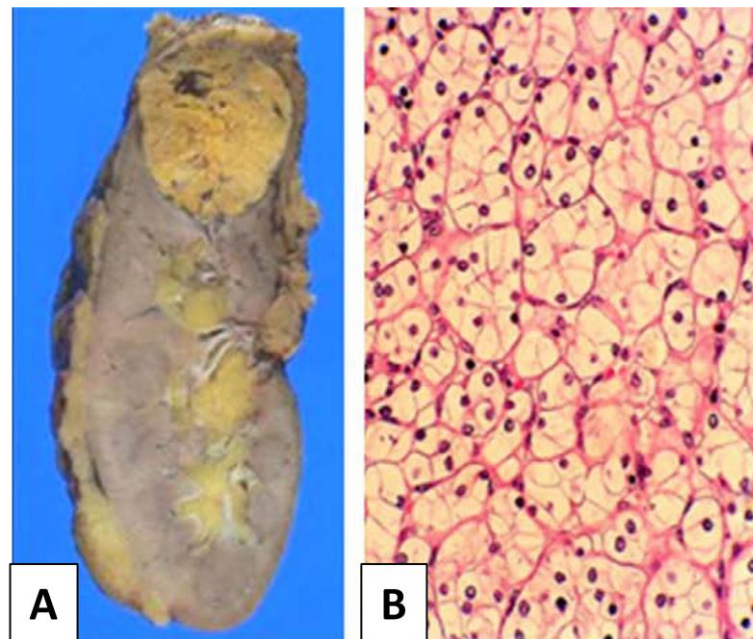


Figure 1 : Carcinome rénal à cellules claires.

A : Aspect macroscopique d'un carcinome rénal à cellules claires. On distingue clairement la couleur jaunâtre de la tumeur, caractéristique du ccRCC. B : Coupe histologique de ce même type de cancer. On reconnaît le cytoplasme clair, caractéristique majeure de ce type de cancer. Adaptation Lopez-Beltran, Scarpelli et al. 2006.

Le gène *vhl* est souvent muté ou supprimé dans ce type de RCC, avec 70 à 75% des cas de ccRCC qui présentent des mutations ou des délétions du gène (Weiss and Lin 2006), ou encore des hyperméthylations de son promoteur. L'inactivation de la protéine VHL est connue pour induire une réponse à l'hypoxie, accompagnée de la synthèse de facteurs de croissance expliquant en partie la croissance tumorale (de Paulsen, Brychzy et al. 2001).

D'une façon générale, tous les ccRCC sont considérés comme malins et font l'objet d'un moins bon pronostic que les autres types de RCC, tels que les carcinomes rénaux à cellules papillaires ou chromophobes.

B-1-b / Le carcinome rénal à cellules papillaires (pRCC)

Le pRCC est le second type de RCC le plus commun, il représente un peu plus de 1 cas de RCC sur 10 (Cheville, Lohse et al. 2003). Il est issu des tubules contournés distaux et a un aspect macroscopique beige (Figure 2-A). Il forme de petites extensions, appelée *papillae*, Il est aussi appelé chromophile en raison de la couleur rosée que prennent les cellules lors de l'analyse histopathologique (Figure 2-B et C).

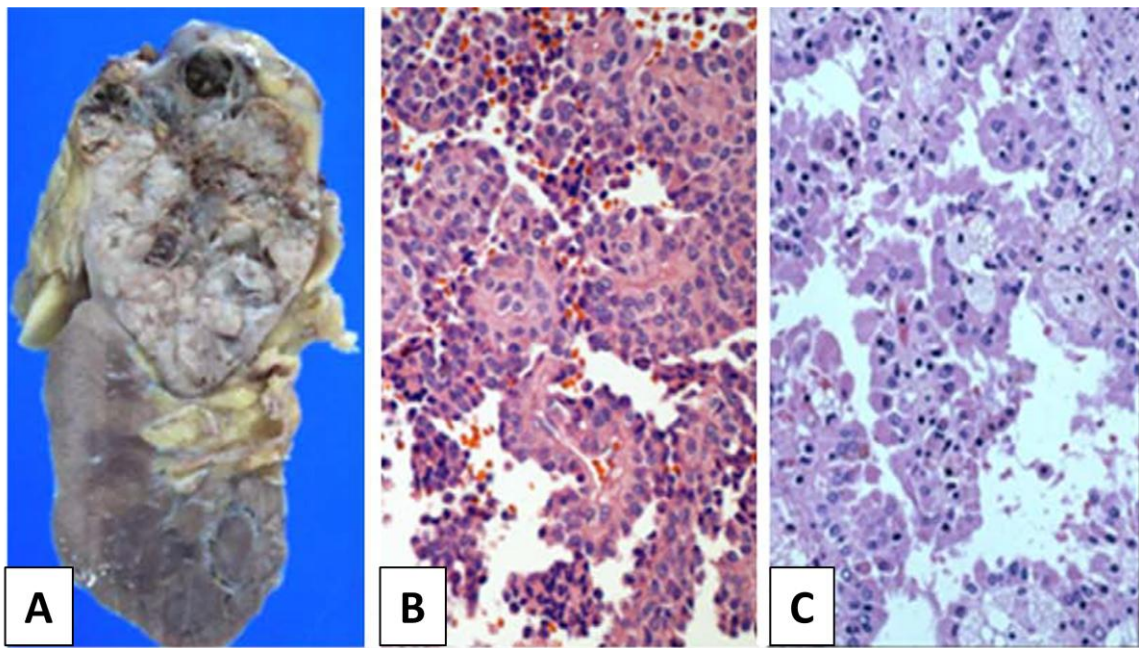


Figure 2 : Carcinome rénal à cellules papillaires.

A : Aspect macroscopique d'un carcinome rénal à cellules papillaires. On distingue clairement la couleur beige de la tumeur, caractéristique du pRCC. B et C : Coupe histologique de deux sous-types de pRCC (B : sous-type 1 ; C : sous-type 2). Adaptation Lopez-Beltran, Scarpelli et al. 2006.

Il existe deux sous-types de pRCC : Le type 1 (Figure 2-B) est souvent associé à une mutation du proto-oncogène MET (Patard, Baumert et al. 2010) et le type 2 (Figure 2-C) est plutôt associé à une mutation de la Fumarate Hydratase (Weiss and Lin 2006).

B-1-c / Le carcinome rénal à cellules chromophobes (chRCC)

Le chRCC représente 5 cas de RCC sur 100 (Cheville, Lohse et al. 2003). Les tumeurs se développent à partir des cellules intercalaires du tube collecteur. Macroscopiquement, la tumeur a une couleur beige qui tend vers une teinte rosée (Figure 3-A). La tumeur est bien arrondie, bien limitée et compacte.

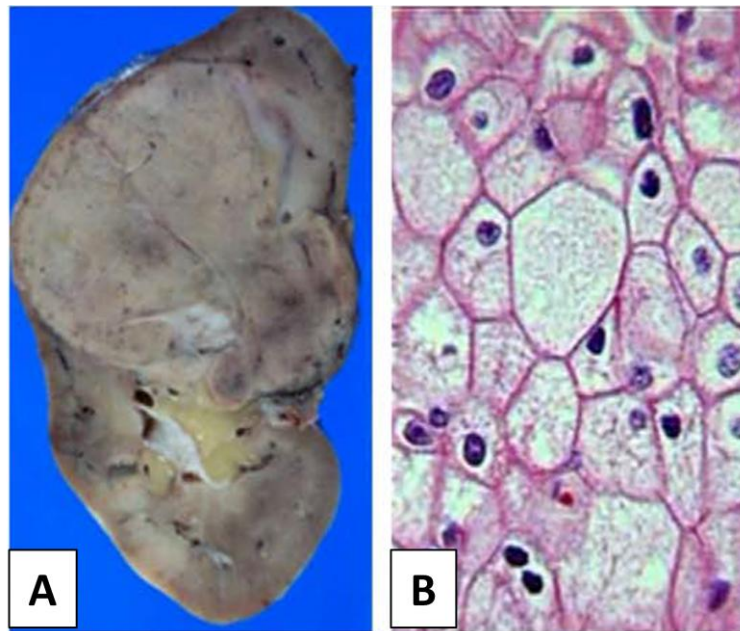


Figure 3 : Carcinome rénal à cellules chromophobes.

A : Aspect macroscopique d'un carcinome rénal à cellules chromophobes. L'aspect compact, bien délimité et bien arrondi de la tumeur est une des caractéristiques macroscopiques du chRCC. B : Coupe histologique de ce même type de cancer. On reconnaît le cytoplasme clair présentant un cytoplasme plus large que le ccRCC et qui un des éléments qui permet de séparer ces deux types de cancers. Adaptation Lopez-Beltran, Scarpelli et al. 2006.

D'un point de vue histologique, les cellules ont un aspect clair, comme pour le ccRCC, mais ont un cytoplasme plus grand, ce qui est un des éléments permettant de le différencier des ccRCC (Figure 3-B). La mutation du gène *bhd* (impliqué dans le syndrome de Birt-Hott-Dubé) est associée à ce type de RCC (Weiss and Lin 2006).

B-1-d / Autres types

Il existe d'autres types de RCC beaucoup plus rares, tels que l'oncocytome (tumeur bénigne), le carcinome des tubes collecteurs ou encore le carcinome tubulo-kistique, qui représentent ensemble moins de 1% des cas de RCC. Ces types de RCC ne sont pas développés ici.

C / Classification TNM et stade clinique

Le développement et l'évolution d'un cancer est caractérisé par différents stades. La connaissance du stade de développement d'un cancer permet d'adapter le traitement, et permet d'évaluer les chances de survie du patient. Le stade clinique d'un cancer peut être déterminé en utilisant la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis, pour Tumeur, Ganglions Lymphatiques, Métastases). Il est le système de stadification clinique classiquement réalisé pour les tumeurs du rein. Il différencie le stade tumoral en fonction de l'évolution locale, régionale et métastatique, et ce, quel que soit le sous-type histologique.

T : Tumeur primitive.

Tx - Non déterminé.

T0 - Absence de tumeur primitive.

T1 - Tumeur limitée au rein, inférieure ou égale à 7 cm de grand axe :

T1a - Tumeur inférieure ou égale à 4 cm de grand axe

T1b - Tumeur supérieure à 4 cm mais inférieure ou égale à 7 cm de grand axe.

T2 - Tumeur limitée au rein supérieure à 7 cm.

T2a - Tumeur supérieure à 7 cm mais inférieure ou égale à 10 cm de grand axe

T2b - Tumeur supérieure à 10 cm de grand axe.

T3 - Tumeur intéressant les veines principales ou envahissant la graisse péri-rénale mais sans atteindre le fascia de Gérota ni la surrénale homolatérale:

T3a - Tumeur envahissant macroscopiquement la veine rénale ou ses branches segmentaires, la graisse périrénale ou la graisse du sinus mais sans atteindre le fascia de Gérota.

T3b - Tumeur envahissant macroscopiquement la veine cave sous-diaphragmatique.

T3c - Tumeur envahissant macroscopiquement la veine cave sus-diaphragmatique ou la paroi de la veine cave.

T4 - Tumeur franchissant le fascia de Gérota ou envahissant la surrénale homolatérale.

N : Ganglions lymphatiques régionaux.

Nx - Non déterminé (ganglions régionaux pas analysés)

N0 - Absence de métastase ganglionnaire.

N1 - Métastase au niveau d'un ganglion unique.

N2 - Métastase au niveau de plusieurs ganglions.

M : Métastase à distance.

M0 - Absence de métastase à distance.

M1 - Métastases à distance.

Tableau 1: Classification TNM du cancer du rein.

La classification TNM permet de jauger de l'état d'avancement de la maladie en se basant sur 3 informations clefs : La taille de la tumeur primaire (T), l'invasion locale des ganglions lymphatiques proches de la tumeur primaire (N), et la présence ou non de métastases (M). Grâce à cette classification, les patients pourront être classés selon le stade de la maladie, ceci aura un impact sur le traitement envisagé et le pronostic vital du patient pourra être évalué. Adaptation Patard, Baumert et al. 2010.

La classification TNM se base sur 3 informations clefs : La taille de la tumeur primaire (T), l'invasion locale des ganglions lymphatiques proches de la tumeur primaire (N), et la présence de métastases (M). Les paramètres évalués sont détaillés dans le Tableau 1.

Une fois la classification TNM établie, un stade clinique est assigné (Stade I à IV). Il permet de déterminer si le cancer est à un stade précoce ou à un stade avancé. Les stades cliniques du cancer du rein sont présentés dans le Tableau 2.

Stade I : (T1, N0, M0)

La tumeur fait 7cm de diamètre ou moins et reste localisée (T1) au rein, c'est-à-dire que les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints (N0) et qu'aucun autre organe distant n'a été envahi (M0).

Stade II : (T2, N0, M0)

La tumeur fait plus de 7 cm de diamètre, mais reste limitée au rein (T2), les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints (N0) et qu'aucun autre organe distant n'a été envahi (M0).

Stade III : (T3, N0, M0 ou T1-2-3, N1, M0)

On regroupe dans le stade III deux types de classifications TNM.

T3, N0, M0 : La tumeur a englobé une veine majeure (telle que la veine rénale ou la veine cave), ou un tissu proche du rein, mais ne pousse pas dans la glande surrénale ou la *fascia* de Gerota (une couche de tissu qui englobe le rein et la glande surrénale) (T3). Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints (N0) et qu'aucun autre organes distant n'a été envahi (M0).

T1-2-3, N1, M0 : Si la tumeur a envahi un ganglion lymphatique voisin de la tumeur (N1), mais n'a pas envahi d'autres organes (M0), le cancer est classé dans le stade III quelque soit la taille de la tumeur primaire (T1 à T3).

Stade IV : (T4, ou N2 ou M1)

Différents types de classement TNM sont regroupés dans le stade IV.

Si la tumeur a envahi la *fascia* de Gerota (T4), ou si plusieurs ganglions lymphatiques régionaux sont envahis (N2), le patient est classifié dans le stade IV. De même, si d'autres organes sont atteints par des cellules tumorales, c'est-à-dire que des métastases sont détectées (M1), le cancer est automatiquement classé dans le stade IV, et ce, quelque soit la taille de la tumeur primaire et l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques.

Tableau 2 : Stade clinique du cancer du rein en fonction de la classification TNM

La classification TNM permet de déterminer le stade clinique de la maladie. Il donne l'état d'avancement de la maladie et est déterminant pour le traitement envisagé.

D / Distribution des stades cliniques au diagnostic

L'incidence du cancer du rein est en augmentation ces dernières années. Cette augmentation pourrait être en partie issue des progrès des méthodes d'imagerie ainsi que l'augmentation des diagnostics fortuits.

Selon le programme du SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) mené aux Etats-Unis, plus de 50% des cancers du rein diagnostiqués sont à un stade localisé (T1-2, NO, MO, ou Stade I/II), 20% sont à un stade localement avancé ou localement invasif (T3-4, N0-1, M0, ou stade III/IV), et les 25% restants sont déjà métastatiques (M1, Stade IV). Ainsi, 50% des cancers montrent des signes d'invasion lors du diagnostic.

E / Taux de survie au diagnostic

En utilisant le stade clinique et en se reportant à la base de données nationale du cancer (National Cancer Data Base) aux Etats-Unis, il est possible d'obtenir une estimation du taux de survie des patients en fonction du stade de leur maladie (Tableau 3).

Stade	Survie à 5 ans
I	81%
II	74%
III	53%
IV	8%

Tableau 3 : Taux de survie en fonction du grade de cancer du Rein établi lors du diagnostic, en fonction de la classification TNM (tous types confondus).

A partir du grade de la maladie lors du diagnostic, il est possible de déterminer les chances de survie à 5ans des patients. Il est intéressant de noter que la survie chute drastiquement au Grade IV, grade où soit des traces d'invasion locale ont été mises en évidence, soit que des métastases ont été identifiées. Ces taux ont été obtenus à partir du National Cancer Data Base (USA) (ces données peuvent potentiellement inclure des décès dues à des causes différentes du cancer du rein lui-même).

En utilisant cette classification, on observe que lorsqu'un cancer du rein de stade I ou II est décelé, c'est-à-dire qu'il reste localisé, les chances de survie des patients restent bonnes (74-81%) (Tableau 3). En revanche, lorsque les cellules tumorales ont envahi fortement au

delà du rein ou que des métastases sont décelées, le taux de survie à 5 ans chute drastiquement à moins de 10% (Tableau 3).

F / Autres méthodes de classification du cancer du rein

Outre le stade clinique, il existe d'autres moyens de classer les cancers et poser des pronostics dans le cancer du rein. Parmi eux, l'un des plus utilisés est le Grade Nucléaire de Fuhrman. Un système plus complexe a aussi été développé par l'Université de Los Angeles.

F-1 / Le Grade Nucléaire de Fuhrman

Le système de grade nucléaire de Fuhrman classe les tumeurs en fonction de la forme et de la taille des noyaux des cellules tumorales (Fuhrman, Lasky et al. 1982). Les paramètres menant à la gradation de Fuhrman sont listés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Grade de Fuhrman, selon Fuhrman et al. 1982

Grade I : Noyaux ronds, d'environ 10µm, avec un nucléole mal visible ou absent.

Grade II : Noyaux ronds, un peu irréguliers, d'environ 15µm avec un nucléole visible mais petit.

Grade III : Noyaux très irréguliers, d'environ 20µm avec un nucléole large et proéminent.

Grade IV : Noyaux bizarres ou multilobés de plus de 20µm avec un nucléole proéminent et une chromatine irrégulière.

Le Grade Nucléaire de Fuhrman possède une forte valeur pronostique, indépendante du stade clinique. Cette classification joue aussi un rôle dans la planification du traitement. On peut séparer les cancers à cellules rénales de bas grade (I et II) qui ont une survie à 5 ans de plus de 70% et les cancers de haut grade (III et IV) qui ont une survie à 5 ans inférieure à 50% (Bretheau, Lechevallier et al. 1995).

Enfin toujours selon Bretheau et Lechevallier, la survenue de métastases en fonction du grade est de 2% pour un grade I, 9% pour un grade II, 17% pour un grade III et 30% pour le grade IV. Le grade nucléaire de Fuhrman est un système simple et reproductible. Il fait aujourd'hui parti des paramètres clinico-pathologiques qui définissent les RCC.

F-2 / UCLA Integrated Staging System (UISS)

Parmi les systèmes plus complexes développés et permettant d'intégrer plus de paramètres, on retrouve le système de stadification intégrée de l'Université de Los Angeles en Californie (UCLA Integrated Staging System). Il est basé sur l'association complexe du stade clinique TNM, de la santé générale du patient et du Grade Nucléaire de Fuhrman. Le pronostic posé par le l'UISS découle de données de survie de patients, et ne prend en compte que les patients décédés de leur cancer du rein. Ce système montre une forte diminution du taux de survie des patients en cas de propagation de la maladie, avec un taux de survie à 5 ans qui peut chuter à 0% pour les groupes de patients à haut risque (Zisman, Pantuck et al. 2001, Han, Bleumer et al. 2003).

G / Diagnostic du cancer du rein

Le RCC peut-être longtemps asymptomatique, ceci implique que s'il n'est pas découvert de façon fortuite, il est souvent diagnostiqué de façon tardive. Cet élément explique que lors du diagnostic, 50% des RCC sont déjà à un stade avancé (Stade III-IV de la stadification clinique TNM). Une détection précoce de petites tumeurs asymptomatiques permet d'améliorer grandement les chances de survie des patients. Néanmoins, il n'existe pas, à ce jour, de marqueurs biologiques permettant une détection précoce du RCC, bien qu'un test soit actuellement proposé se basant sur la détection de l'aquaporine-1 et de la périlipine-2 (Morrissey, Mellnick et al. 2015).

H / Facteurs pronostiques dans le RCC

Le facteur pronostique reflète le potentiel et les caractéristiques d'agressivité de la tumeur et de la maladie. Les méthodes de classification présentées précédemment sont

utilisées pour poser des pronostics, mais elles sont néanmoins plus ou moins invasives et ne prennent pas en compte, certaines données biologiques qui pourraient se révéler utiles.

En analysant le système de stadification clinique, il apparaît que le statut de la tumeur primaire n'est plus pris en compte, ou a moindre échelle, dans les stades cliniques avancés. Ainsi, quelque soit le statut de la tumeur (T), si le patient montre des signes de métastases (M1), le stade IV est automatiquement déclaré. Ainsi, dans des situations métastatiques, la classification anatomique clinique joue un rôle limité et l'impact pronostic de la tumeur primaire disparaît.

Dans le RCC, certaines données cliniques et biologiques peuvent être associées à un mauvais pronostic. Parmi ces paramètres, on note par exemple le nombre et la localisation des métastases, le taux anormalement faible en hémoglobine, un taux de lactate déshydrogénase sérique élevé, ou encore un taux élevé de polynucléaires neutrophiles (Motzer, Bacik et al. 2002, Negrier, Escudier et al. 2002, Volpe and Patard 2010, Hu, Lou et al. 2015)).

De nombreuses études sont menées afin de mettre en évidence l'intérêt pronostic, ou prédictif, du niveau de transcrit ou du niveau protéique de certaines cibles. Comme exemples de biomarqueurs pronostics proposés, il semble qu'un taux élevé d'anhydrase carbonique (CA9) tissulaire soit un facteur de bon pronostic (Bui, Seligson et al. 2003), mais une étude plus récente tend à limiter son impact pronostic (Leibovich, Sheinin et al. 2007). L'expression de la fibronectine dans le tissu tumoral de RCC humain semble être plus important que dans le tissu sain (Waalkes, Atschekzei et al. 2010). La fibronectine est souvent associée à la mobilité et l'invasion, elle pourrait donc être un bon candidat comme marqueur d'agressivité. Enfin, dernièrement il est proposé que l'augmentation d'expression du CSF-1 serait aussi un facteur de mauvais pronostic (Yang, Wu et al. 2015).

I / Les biomarqueurs dans le RCC

Dans le RCC, comme dans la majorité des cancers, on observe une montée en puissance de l'intérêt des biomarqueurs, qui pourraient permettre le diagnostic de la maladie, de prédire sa biologie et son évolution, mais aussi qui pourraient servir de cible thérapeutique.

De même, des prédictions sur la réponse aux thérapies est un enjeu dont l'intérêt est aujourd'hui grandissant.

Il n'existe actuellement aucun biomarqueur validé en clinique pour le RCC, que cela soit afin de détecter la maladie, de prédire son évolution, ou encore pouvant être pris en compte comme facteur pronostique.

J / Thérapies du RCC métastatique

Les traitements médicamenteux anticancéreux sont essentiellement proposés pour des traitements des cancers du rein invasifs. La chirurgie constituant le traitement de référence dans les cancers du rein localisés.

Le cancer du rein a été choisi comme modèle pour l'évaluation de nouvelles voies thérapeutiques : la thérapie ciblée et l'immunothérapie. L'une des raisons à cela est la résistance de ce type de cancer aux thérapies conventionnelles telle que la chimiothérapie (Gamelin, Mertins et al. 1999). Les thérapies ciblées visent à bloquer des mécanismes participants au développement de la tumeur. L'immunothérapie consiste à stimuler et renforcer les défenses naturelles de l'organisme ou de rompre la tolérance immunitaire de l'hôte envers les tumeurs.

Le cancer du rein est un modèle de tumeurs très vascularisées. Notamment à cause de la dérégulation du gène *vhl* induisant une surproduction de VEGF dans les ccRCC. Le ciblage de l'angiogenèse est la thérapie ciblée la plus courante dans le RCC. Les inhibiteurs de la voie du VEGF tels que le sunitinib (Sutent) ou l'axitinib sont par exemple utilisés. L'utilisation d'anticorps bloquants et neutralisant le VEGF (bevacizumab, Avastin®) est un des traitements anti-angiogénique courant et est souvent utilisé en combinaison avec l'immunothérapie. Néanmoins, ces thérapies anti-angiogéniques ne permettent que d'étendre la durée de vie des patients et tendent à engendrer des résistances. Lorsque les traitements anti-angiogéniques ne sont pas efficaces, le traitement recommandé est l'everolimus (Afinitor®) ou le temsirolimus (Torisel®), deux inhibiteurs de mTOR engendrant une inhibition de la synthèse de VEGF.

L'immunothérapie classique a été par ailleurs utilisée dans les traitements anticancéreux, et notamment dans le RCC en utilisant l'interféron- α (INF- α) ou l'interleukine-2 (IL-2) (Negrier, Escudier et al. 1998, Rosenberg 2007). Cette dernière interleukine a la faculté de stimuler la prolifération de cellules immunitaires : les lymphocytes T (LT). Ces cellules de l'immunité ont pour capacité de pouvoir s'activer en détectant les cellules tumorales. En réponse à cette activation, les LT vont activer les cellules tueuses « Natural Killer, NK », qui vont, elles, jouer le rôle de tueuses de cellules tumorales. La rémission complète et durable est observée dans 10 à 20 % des cas (Motzer and Russo 2000, Bukowski 2001), ce qui reste insuffisant. Une nouvelle approche semble montrer des résultats prometteurs en clinique. L'utilisation du nivolumab (Opdivo®), un anticorps bloquant l'interaction entre le récepteur PD-1 (Programmed Death Receptor 1) et ses ligands PD-L1 et PD-L2. Ces ligands sont surexprimés dans certains cancers et inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans le RCC, une étude de phase III démontre que le nivolumab permet une amélioration de la survie de 5 mois pour des patients présentant un RCC avancé et dont le traitement anti-angiogénique a échoué, comparé au traitement à l'everolimus (Motzer, Escudier et al. 2015).

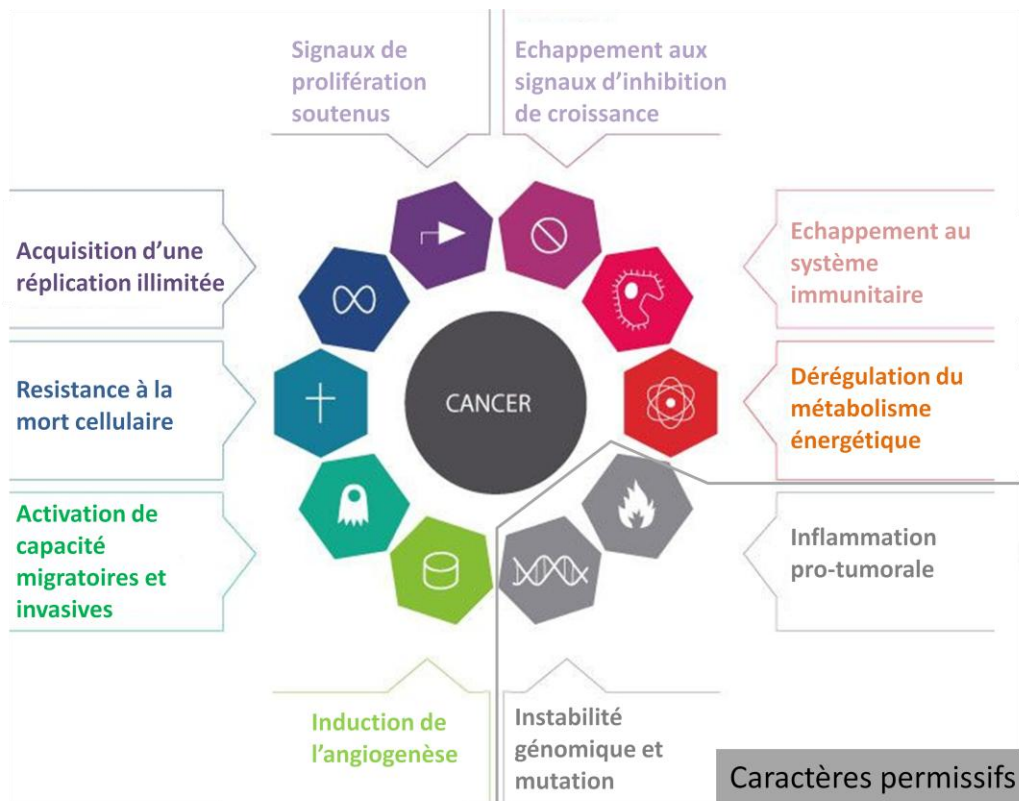


Figure 4 : Principales propriétés caractéristiques acquises par les cellules tumorales selon Hanahan et Weinberg.

Les cellules tumorales acquièrent des caractères lors de la progression tumorale. Ces caractères lui permettent d'évoluer d'une part vers une tumeur massive, mais aussi de favoriser la formation de métastases. Ces caractères sont la mise en place de signaux de prolifération soutenus, un échappement aux signaux d'inhibition de croissance, l'acquisition d'une répliation illimitée, la résistance à la mort cellulaire, l'échappement au système immunitaire, l'induction de l'angiogenèse, la dérégulation du métabolisme énergétique et l'activation de capacités invasives. Ces différentes propriétés sont permises notamment par l'instabilité génomique et les mutations au sein des cellules tumorales, mais aussi par l'inflammation pro-tumorale générée au sein de la tumeur. (Adaptation Fluofarma.com)

II / Les grandes étapes de la progression tumorale, vers la formation de métastases

Le taux de survie dans des cas de RCC non métastatique est plutôt élevé. D'une façon générale, les principales complications dans le RCC proviennent des phases métastatiques de la maladie, et ce, comme dans la majorité des cancers. Les métastases sont la principale cause de décès dans les cancers. La colonisation d'organes distants est responsable de 90% des décès liés aux cancers, tous types de cancers confondus (Sporn 1996). Ces métastases sont issues de cellules ayant quittées la tumeur primaire qui ont acquis des caractéristiques particulières.

A / De l'initiation tumorale à la tumeur primaire

A-1 / Acquisition de propriétés cancéreuses

La transformation progressive d'une cellule normale vers une cellule maligne est entraînée par une accumulation d'altérations génétiques. Certaines mutations, notamment la perte de fonctions de suppresseurs de tumeurs et l'induction d'oncogènes (Fearon and Vogelstein 1990, Solomon, Borrow et al. 1991), facilitent les mutations géniques, empêchant la réparation de l'ADN. L'implication de ces modulations va au delà des premières phases de transformations cellulaires, puisqu'elles vont aussi participer à l'acquisition ou à la perte de propriétés par les cellules tumorales.

Selon Hanahan et Weinberg, certains caractères acquis sont décrits comme des paramètres caractéristiques des cancers (Figure 4). Ces différents éléments majeurs sont considérés comme des capacités fonctionnelles acquises par la majorité, voir l'ensemble des cancers, et ce quelque soit la façon dont elles sont acquises.

A-1-a / Signaux de prolifération soutenus et échappement aux inhibitions de croissance

Dans des conditions physiologiques, les cellules ne peuvent passer d'un état de quiescence à un état de croissance proliférative que sous l'effet de signaux précis. Pour que cette croissance reste physiologique, elle doit être finement contrôlée par le microenvironnement.

Les cellules tumorales contrastent avec ceci puisqu'elles se montrent indépendantes des régulations externes. Parmi les principaux caractères des cellules tumorales, cette indépendance a été la première à émerger clairement, en partie due à la mise en évidence de l'importance des oncogènes dans la recherche en cancérologie.

La modulation des signaux de régulation peut se faire par production de facteurs de croissance par les cellules tumorales, signaux auxquels elles vont pouvoir répondre de façon autocrine (Sporn and Roberts 1985, Walsh, Karnes et al. 1991). Dans le RCC, il a été montré que l'interleukine-6 (IL-6) est un facteur de croissance agissant de façon autocrine (Miki, Iwano et al. 1989, Alberti, Thomachot et al. 2004). L'IL-6 peut être aussi produite par les macrophages présents au sein des tumeurs (Wan, Zhao et al. 2014).

Des récepteurs aux facteurs de croissance sont surexprimés dans de nombreux cancers (Sangwan and Park 2006). Ceci a pour effet de rendre les cellules hypersensibles aux signaux extérieurs, sans qu'il n'y ait de variation dans ces signaux. Ceci peut donc générer, entre autre, une prolifération là où la quantité de facteurs de croissance n'était pas suffisante pour engendrer cette réponse (Der, Krontiris et al. 1982). Des récepteurs peuvent de plus être touchés par des altérations structurelles, pouvant par exemple, les rendre actifs de façon ligand-indépendante, ou à l'inverse, les rendant insensibles à leurs ligands. Lors de cancers, l'expression de certaines intégrines est altérée, en favorisant celles qui pourraient avoir un rôle pro-prolifératif, ou encore pro-métastatique (Madamanchi, Zijlstra et al. 2014).

Enfin, certaines voies de signalisation sont souvent dérégulées dans les cancers, un exemple parmi tant d'autres est l'activation de la voie Ras-Raf-MAPK. Il est estimé que la protéine Ras, un proto-oncogène, est altérée dans plus de 20% des cancers humains. Ce proto-oncogène induit des signaux mitotiques dans les cellules, en l'absence d'une stimulation en amont de la voie (Rajalingam, Schreck et al. 2007). Autre proto-oncogène de la voie impliqué dans des mécanismes similaire, B-raf dont les mutations ou la surexpression engendrent la croissance des cellules tumorales (Tanami, Imoto et al. 2004, Wan, Garnett et al. 2004).

A-1-b / Résistance à l'apoptose

Des défauts dans le mécanisme d'apoptose sont aussi impliqués dans les processus tumoraux. Dans un tissu sain, la taille et la fonction du tissu est maintenue par le contrôle de la prolifération des cellules et par le contrôle de la mort cellulaire. Cette balance entre réplication et mort cellulaire est physiologiquement importante et en cas de dérégulation, peut faire pencher la balance vers l'atrophie d'un organe, ou l'hyperplasie (Foster 2000). L'apoptose sert donc de barrière naturelle au développement d'un cancer (Lowe, Cepero et al. 2004).

De nombreux stress subis par les cellules lors du développement tumoral, ou suite aux thérapies anticancéreuses, ont la faculté de déclencher l'apoptose. Ce mécanisme est souvent contrebalancé par les signaux de survie très élevés induits notamment par l'activité trop importante d'oncogènes.

A-1-c / Réplication illimitée

Le nombre de divisions que peuvent subir les cellules avant d'entrer en sénescence ou en apoptose est limité. Les cellules tumorales ont besoin d'un potentiel réplicatif illimité afin de générer des tumeurs macroscopiques. Les télomères, séquences d'ADN qui protègent les extrémités des chromosomes, ont tendance à se rétrécir dans les cellules non-immortalisées au cours des divisions cellulaires. La taille de cet ADN télomérique contrôle le nombre de réplifications que la cellule peut mener avant que ceux-ci aient perdu leurs capacités protectrices. La maintenance des télomères par l'action des télomérases permet l'acquisition de l'immortalité répllicative des cellules tumorales (Counter, Avilion et al. 1992, Bryan, Englezou et al. 1997, Shammass, Shmookler Reis et al. 2003, Shammass, Koley et al. 2004).

A-1-d / Induction de l'angiogenèse, et switch angiogénique.

Comme tous les tissus, les tumeurs nécessitent des nutriments et de l'oxygène, et doivent évacuer leurs déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone. La formation de vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants, c'est-à-dire l'angiogenèse, est un processus extrêmement régulé dans des conditions physiologiques.

Les tumeurs vont réactiver cette angiogenèse de façon permanente grâce au « switch angiogénique », qui permet de supporter le développement et la croissance tumorale (Hanahan and Folkman 1996). Ce switch angiogénique est gouverné par de nombreux facteurs qui vont être des inducteurs ou des répresseurs de l'angiogenèse. Certains de ces régulateurs sont des protéines secrétées qui vont pouvoir se fixer sur des récepteurs stimulant ou inhibant l'angiogenèse. L'inhibition du VEGF-A est utilisée dans les thérapies anticancéreuses pour inhiber la croissance vasculaire. Les traitements anti-angiogénique sont souvent utilisés aujourd'hui dans les cancers et en particulier dans le RCC.

A-1-e / Echappement au système immunitaire

La surveillance immunitaire, en plus de combattre les agressions extérieures de l'organisme, est aussi responsable de la détection et de l'élimination des cellules cancéreuses. De ce fait, les cellules tumorales vont devoir éviter d'être détectées par le système immunitaire, ou vont devoir résister à l'action du système immunitaire.

Il est proposé que les cellules cancéreuses réussissent à éviter le système immunitaire qui a été stimulé afin de les éradiquer. Par exemple, les tumeurs peuvent sécréter certains facteurs immunosuppresseurs afin de limiter l'action des cellules immunitaires. Le TGF β sécrété par les tumeurs peut empêcher l'action des lymphocytes T cytotoxiques ou des Lymphocytes NK (ou cellules NK pour « Natural Killers ») infiltrés dans la tumeur (Yang, Pang et al. 2010). Une autre stratégie consiste en le recrutement de cellules immunitaires qui agissent directement comme des agent immunosuppresseurs tels que les lymphocytes T régulateur (Nishikawa and Sakaguchi 2010).

L'immunothérapie est utilisée dans le traitement anticancéreux, et notamment dans le RCC. L'interleukine-2 a la faculté de stimuler la production de deux types de cellules immunitaires : les lymphocytes T et les Lymphocytes NK. La détection des cellules tumorales par les lymphocytes T permet l'activation des Lymphocytes NK jouant ainsi le rôle de tueurs de cellules tumorales.

Les rôles de certains membres du système immunitaire dans le contrôle ou la promotion tumorale seront développés dans un chapitre traitant du microenvironnement tumoral.

A-1-f / Dérégulation du métabolisme énergétique

Dans des conditions normales, les cellules transforment le glucose afin de produire de l'énergie. Celui-ci est utilisé lors de la glycolyse pour former du pyruvate. En présence d'oxygène, ce pyruvate est transformé en dioxyde de carbone dans la chaîne mitochondriale via le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique). Ceci aboutit à la production d'ATP. Or, une anomalie dans ce métabolisme a été observée par Otto Warburg (Warburg 1956). Même présence d'oxygène, les cellules tumorales semblent avoir tendance à limiter leur métabolisme énergétique à la glycolyse. Le terme de « glycolyse aérobie » a ainsi été formulé, bien que « l'effet Warburg » soit plus souvent employé.

Ce type de production d'énergie n'est pas efficace pour les cellules. La glycolyse aérobie permet un bilan énergétique 18 fois inférieur à la glycolyse suivie de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Le microenvironnement tumoral est connu pour être soumis à l'hypoxie (Kim, Lin et al. 2009), ce qui pourrait mener les cellules à utiliser des mécanismes indépendants de l'oxygène. Le pyruvate généré au sein des cellules employant cette glycolyse aérobie est ensuite converti en lactate, et peut être évacué de la cellule sous cette forme. De façon intéressante, des sous-populations ont été identifiées au sein des tumeurs. Une première sécréterait le lactate, et une seconde serait capable d'importer ce lactate et de le convertir en pyruvate. Ce lactate peut ainsi être utilisé comme source d'énergie pour le cycle de Krebs (Semenza 2008, Feron 2009).

A-1-f / Migration et invasion

La formation de métastases dépend de la capacité de certaines cellules tumorales à quitter la tumeur primaire. Ceci va nécessiter l'acquisition de caractères invasifs, permettant aux cellules tumorales de s'extraire de la tumeur et d'aller coloniser de nouveaux tissus. De nombreux processus vont permettre l'acquisition de ces nouvelles facultés. Ceux-ci seront

développés ci-après dans un chapitre qui s'intéressera plus en détail aux différents processus menant à la formation de métastases.

B / Invasion locale, première étape de la formation des métastases

Le processus de métastases est un processus inefficace. Une faible proportion de cellules provenant de la tumeur primaire vont former des métastases (Fidler 2002, Joyce and Pollard 2009). De nombreuses étapes encore mal connues sont nécessaires afin de former de nouvelles tumeurs dans un nouvel organe.

B-1 / Invasion locale

Le processus de métastases est initié par l'invasion du tissu environnant par les cellules tumorales. C'est la principale caractéristique qui distingue une tumeur bénigne, qui reste localisée, d'une tumeur maligne. L'acquisition par les cellules tumorales de capacités invasives s'effectue lors de la progression tumorale.

Ce processus d'invasion met en jeu plusieurs processus cellulaires, qui peuvent être divisés en plusieurs grandes étapes : le détachement des cellules de la masse tumorale, l'adhérence et le remodelage de la matrice extracellulaire, et enfin la migration des cellules. Ces mécanismes nécessitent des interactions complexes entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, que cela soit la matrice, mais aussi avec d'autres cellules (tumorales et stromales).

B-1-a / Dissociation cellulaire des cellules tumorales de la tumeur primaire

L'intégrité d'un tissu et d'un organe est principalement due à des interactions qui peuvent être de deux types : des interactions cellules-cellules, et des interactions cellules-matrice extracellulaire (ECM). Il existe trois grands groupes de molécules qui permettent la formation de jonctions ou de contacts avec l'environnement. Il s'agit des récepteurs membranaires (appelées CAM, pour Molécules d'Adhérences Cellulaires, « Cell Adhesion

Molécules »), les ligands de ces récepteurs (qui peuvent être des constituants de l'ECM ou d'autres récepteurs présents à la membrane d'une cellule voisine), ainsi que les intracellulaires qui permettent d'ancrer ces jonctions au cytosquelette de la cellule (Figure 5).

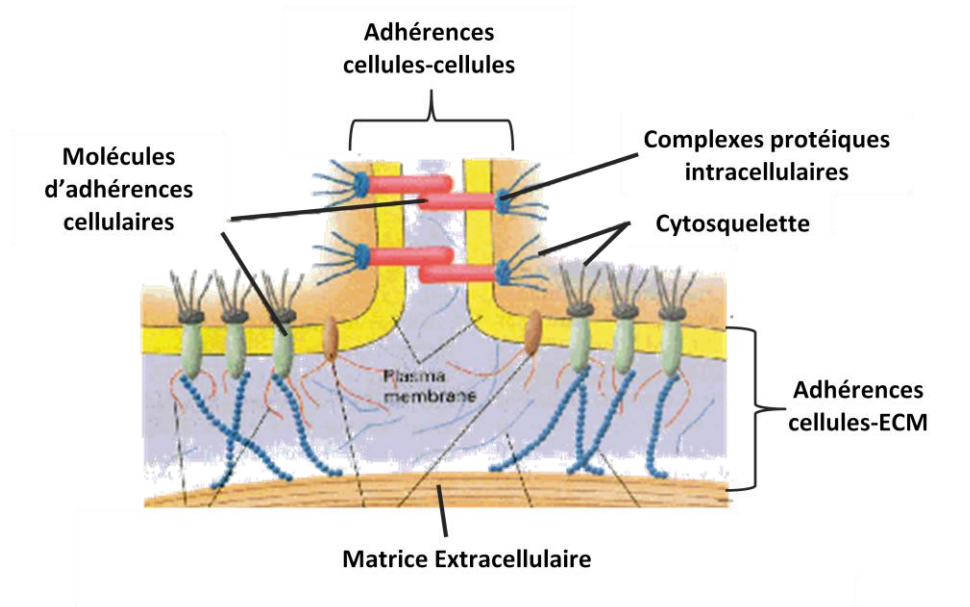


Figure 5 : Représentation schématique des jonctions cellules-cellules et cellules-ECM.

Les cellules peuvent former des jonctions soit entre elles (jonctions ou adhérences cellules-cellules), ou avec la matrice extracellulaire. Ces jonctions sont ensuite stabilisées sur le cytosquelette de la cellule grâce à des complexes protéique intracellulaires. Adaptation Lodish et al. 2000.

La perte ou la modulation des jonctions intercellulaires est un des éléments clefs permettant aux cellules tumorales de s'individualiser de la tumeur primaire.

B-1-a-i / Modulations des jonctions cellules-cellules

Dans un épithélium, les cellules sont jointives les unes aux autres. Ces adhérences cellules-cellules sont essentielles à la fonction du tissu et engendrent des signalisations au sein de la cellule, permettant de réguler entre autre, la prolifération, la survie, la migration, ou encore la polarité cellulaire. Dans un épithélium, les adhérences intercellulaires sont permises par des complexes tels que les jonctions serrées (*zonula occludens*), les jonctions adhérentes (*zonula adherens*) formées en particulier par les cadhérines, ou encore les desmosomes (*macula adherens*) (Figure 6).

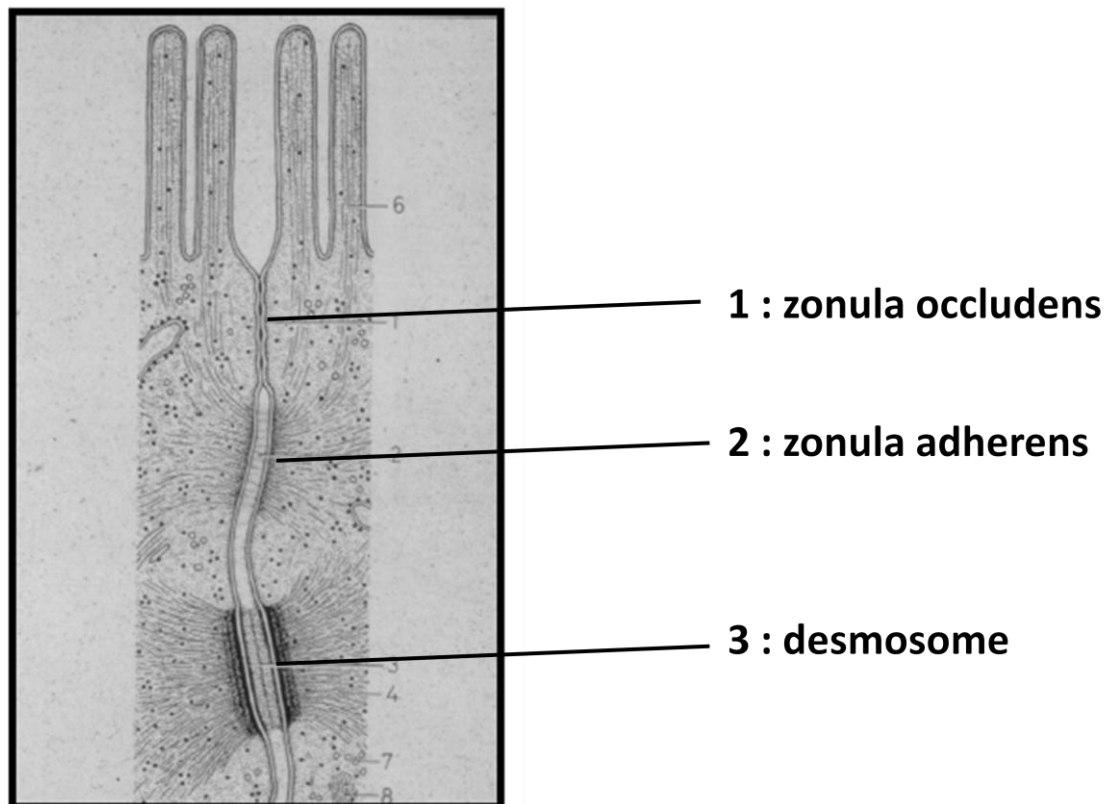


Figure 6 : Schéma de la structure des jonctions intercellulaires entre deux cellules épithéliales.

Les cellules épithéliales sont organisées les unes par rapport aux autres et jointives grâce à plusieurs structures spécialisées, comportant de nombreux partenaires protéiques, qui permettent d'orienter les cellules sur un plan apico-basal. L'intégrité de ces jonctions permet l'étanchéité de l'épithélium. La déstabilisation de ces jonctions engendre la perte de la polarité et surtout le détachement des cellules les unes des autres, engendrant donc une perte du phénotype épithélial des cellules.

La modulation des jonctions intercellulaires est en partie responsable, ou favorise le phénomène d'invasion et donc de métastases, en particulier par la modulation des molécules impliquées dans les jonctions cellules-cellules. Parmi les jonctions cellules-cellules modulées dans le cancer, les jonctions adhérentes sont les plus étudiées. Dans la pluparts, si ce n'est dans tous les cas des cancers épithéliaux invasifs, la perte de jonctions E-cadhérines est impliquée dans le processus de dissociation des cellules (Cavallaro and Christofori 2004).

Dans un épithélium, les cellules sont fortement liées les unes aux autres, notamment grâce aux CAMs. La E-cadhérine est une protéine de la famille des CAMs et est un élément important dans la polarité et l'organisation des cellules les unes par rapport aux autres.

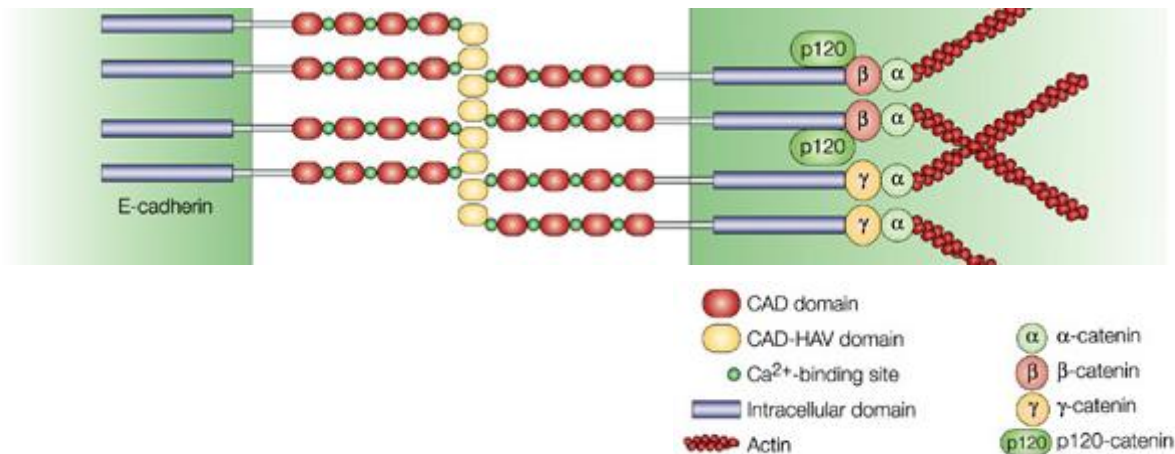


Figure 7 : Structure de la jonction cellule-cellule dépendante de la E-cadhérine.

Les liaisons cadhérines-dépendantes sont des jonctions de type homophiles calcium-dépendantes. La jonction entre deux cadhérines est stabilisée par des complexes protéiques intracellulaires qui font un lien entre le cytosquelette de la cellule et la jonction intercellulaire. Ceci va donc induire une stabilisation des cellules les unes aux autres. Adaptation Cavallaro et Christofori, 2004.

Les E-cadhérines présentes à la membrane plasmique interagissent avec les cadhérines des cellules voisines. Dans la partie intracellulaire, un complexe de protéines est formé permettant la stabilisation des jonctions cellulaires. Ce complexe peut être composé en partie de l' α -caténine, la β -caténine, la p120-caténine et la plakoglobine (γ -caténine). Il permet la jonction entre la E-cadhérine et le cytosquelette d'actine de la cellule, stabilisant d'une part la jonction avec les cellules voisines, et d'autre part, stabilisant le cytosquelette d'actine. (Figure 7). Il en résulte une interdépendance entre le cytosquelette d'actine et les jonctions des cadhérines.

Dans la majorité des cancers d'origine épithéliale, les jonctions cellules-cellules dépendantes de la E-cadhérine sont perdues de façon concomitante avec un phénotype malin et invasif (Birchmeier and Behrens 1994). Bien que la E-cadhérine puisse toujours être retrouvée dans des cellules tumorales, il y a une corrélation entre le niveau d'expression de E-cadhérine dans les tumeurs et l'issue clinique du patient (Hirohashi 1998). La perte des jonctions formées par les E-cadhérines serait une des étapes importante et limitante dans la progression d'un adénome à un adénocarcinome, et dans la formation de métastases.

Dans les cancers invasifs, la modulation des jonctions dépendantes de la E-cadhérine peut se faire de différentes façons. Il existe de nombreux mécanismes pouvant mener à la déstabilisation de ces complexes, que cela soit en touchant directement à la E-cadhérine, par exemple en diminuant son expression, ou alors en modulant les partenaires de la jonction.

- ***Modulation des cadherine***

Dans la majorité des tumeurs, l'expression de la E-cadhérine est diminuée au niveau transcriptionnel. Cette répression peut passer par des facteurs de transcription tels que Snail 1 et Snail 2, qui sont connus pour être des répresseurs de l'expression du gène de la E-cadhérine (Batlle, Sancho et al. 2000, Hajra, Chen et al. 2002). Ces facteurs de transcription sont connus pour participer à la progression tumorale, notamment lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). La diminution d'expression de la E-cadhérine est souvent observée lors de ce processus.

Il a été reporté une dégradation de la E-cadhérine par des metalloprotéinases (MMPs), pouvant ainsi mener à la rupture des jonctions intercellulaires par défaut de présence fonctionnelle de la protéine. Le fragment libéré lors de cette dégradation peut agir par auto-inhibition des molécules non clivées, engendrant une induction de l'invasion du collagène de type 1, en plus de la diminution des agrégations cellulaires (Noe, Fingleton et al. 2001). Ce fragment de 80 kDa est retrouvé dans certains milieux de cultures.

La dégradation ou la suppression de la E-cadhérine participe donc à l'indépendance des cellules tumorales vis-à-vis de la tumeur primaire, et donc à l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules. La surexpression de E-cadhérine dans des cellules invasives, en revanche, limite leur potentiel invasif (Vleminckx, Vakaet et al. 1991, Birchmeier and Behrens 1994).

D'autres mécanismes pouvant affecter directement la E-cadhérine ont été mis en évidence comme pouvant modifier les jonctions, tels que la phosphorylation de la E-cadhérine par des tyrosines kinases de la famille Src (Behrens, Vakaet et al. 1993, Fujita, Krause et al. 2002) ou encore des mutations du gène de la E-cadhérine (CDH-1).

La diminution d'expression de la E-cadhérine est le cas le plus simple. Mais le niveau d'expression et/ou la présence de E-cadhérine à la membrane n'a pas forcément besoin d'être directement modulé. En effet, des changements de la composition du complexe cadherine peuvent entraîner sa déstabilisation.

- ***Modulation des partenaires des cadhérines***

De la même façon que pour la E-cadhérine, la phosphorylation de certains membres du complexe peut amener à leur dégradation et donc à un défaut de leur présence au sein du complexe, c'est le cas par exemple de la β -caténine. L'absence d'expression ou la diminution d'expression de la β -caténine, voir un défaut de sa localisation peut entraîner un défaut de formation du complexe E-cadhérine. En cas de déstabilisation des complexes cadhérines, la β -caténine libre est soit dégradée, soit relocalisée au noyau, engendrant la transcription de gènes.

La perte des jonctions intercellulaires est donc un élément clef permettant aux cellules de devenir indépendantes vis-à-vis de la tumeur primaire. Cette indépendance est notamment permise par la dérégulation du complexe E-cadhérine et va aboutir à des réarrangements au sein des cellules, mais aussi à l'expression de gènes qui peuvent être impliqués dans la progression tumorale.

B-1-a-ii / Désolidarisation de la lame basale

Dans un épithélium sain et fonctionnel, les structures d'adhérences sont organisées afin de mettre en place une architecture cellulaire. Les cellules sont jointives les unes aux autres grâce à des structures décrites précédemment, mais sont aussi liées au tissu par des interactions avec la matrice extracellulaire (ECM). Les cellules épithéliales sont restreintes dans le tissu par une ECM, appelée lame basale, qui participe au maintien de la structure du tissu. La désolidarisation des cellules tumorales de cette lame basale va permettre d'en devenir indépendant. Ceci passe par la modulation de sa composition (production de nouvelle ECM ou dégradation de celle-ci), ou la modulation de la façon dont la cellule va répondre aux signaux générés par l'adhérence à cette matrice. Cette étape va donc aussi permettre à la cellule de se désolidariser de la tumeur primaire.

B-2 / Remodelage de la matrice

Que cela soit pour se désolidariser de la tumeur primaire ou pour engager un processus d'invasion, la tumeur peut moduler le microenvironnement matriciel. La migration des

cellules tumorales dans un tissu dépend de leur capacité à migrer dans l'ECM, ou bien le long de structures tels que les vaisseaux sanguins. Lors de ces processus, les cellules tumorales peuvent avoir besoin de remodeler la composition de l'ECM, en la dégradant et/ou en produisant une nouvelle. Cette dérégulation de l'ECM est un élément clef dans les cancers (Lu, Weaver et al. 2012).

B-2-a / Dégradation de la matrice extracellulaire

La dégradation de l'ECM est un processus important lors de l'initiation de l'invasion locale. En plus de devoir se désolidariser de la tumeur, les cellules tumorales doivent souvent dégrader l'ECM sur laquelle elles reposent. La dégradation de l'ECM dépend essentiellement de l'activité de métalloprotéinases matricielles (MMPs). Cette dégradation de l'ECM va permettre la formation d'espaces dans lesquels les cellules vont pouvoir migrer.

Les MMPs sont des enzymes qui ont la capacité de cliver de nombreux éléments de l'ECM, mais aussi certaines protéines non matricielles, tels que des récepteurs ou protéines d'adhérences. La E-cadhérine est connue pour être dégradée par les MMPs (Gialeli, Theocharis et al. 2011).

L'expression et l'activité des MMPs peuvent être régulés par de nombreux facteurs sécrétés par le tissu environnant, tels que des cytokines, des hormones, des facteurs de croissances, ou encore par la modulation des contacts intercellulaires et cellules-matrice. Dans des conditions physiologiques, et pour éviter une activation trop importante des MMPs, des inhibiteurs des MMPs (TIMPs) sont présents en permanence dans le tissu, ce qui permet d'équilibrer le système. L'équilibre entre les MMPs et les TIMPs peuvent influencer sur le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales dans le carcinome rénal, comme cela a été montré dans le modèle Renca, modèle de RCC murin (Miyake, Hara et al. 1999).

Les tumeurs sécrétant des MMPs à forte dose ont généralement un potentiel invasif élevé, et ont une agressivité importante (Friedl and Wolf 2009). L'expression de certaines MMPs participe à l'évolution des tumeurs vers un stade invasif. L'expression de MMP-2 est directement corrélée au potentiel invasif des cellules tumorales dans le modèle Renca (Miyake, Hara et al. 1999). De même, la dégradation de la lame basale durant l'évolution du cancer, est

associé à l'expression de MMP-2 et MMP-9, dans le cancer colorectal par exemple (Zeng, Cohen et al. 1999). Ceci peut mener au détachement des cellules de la tumeur primaire évoqué précédemment. L'inhibition d'une large gamme de MMPs diminue l'invasion des cellules Renca *in vitro*, et inhibe les métastases aux poumons *in vivo* (Muraishi, Mitani et al. 2001).

S'il a été mis en évidence que les cellules tumorales ont la capacité de dégrader elles-mêmes l'ECM, notamment en produisant des MMPs (Roomi, Monterrey et al. 2009), des cellules stromales de la tumeur ont aussi cette capacité, c'est le cas notamment des fibroblastes, ou des macrophages (Wang, Albo et al. 2002, Stuelten, DaCosta Byfield et al. 2005, Valentin, Stewart-Akers et al. 2009).

La dégradation de l'ECM peut aussi permettre de libérer des facteurs emprisonnés dans celle-ci. Certains éléments matriciels dégradés peuvent aussi lier des récepteurs.

B-2-b / Production d'une nouvelle matrice

La dégradation n'est pas le seul élément important dans le remodelage de l'ECM. La tumeur peut avoir la capacité de produire une nouvelle ECM qui peut être plus favorable à la migration cellulaire ainsi qu'à d'autres étapes de la progression tumorale (Huijbers, Iravani et al. 2010). Cette production de nouvelle ECM au sein de la tumeur peut se faire par les cellules tumorales, ou par les cellules stromales.

L'excès de production et/ou la diminution du renouvellement d'ECM est constaté dans la fibrose (Frantz, Stewart et al. 2010). De la même façon, certains collagènes sont retrouvés en quantité plus abondante dans les tumeurs (Zhu, Risteli et al. 1995, Kauppila, Stenback et al. 1998). Le microenvironnement matriciel nouvellement formé peut participer, à la modulation du phénotype des cellules tumorales en stimulant leur potentiel migratoire et invasif par exemple.

B-3 / Migration des cellules tumorales

Le terme d'invasion est un terme qui comprend deux composantes majeures : la migration et le remodelage de l'ECM. La migration des cellules est un phénomène complexe impliquant de nombreux mécanismes. Les interactions entre l'ECM et les cellules doivent aussi être modulées dynamiquement durant le processus de migration cellulaire.

La motilité des cellules est un élément important du processus de métastases (Stracke, Aznavoorian et al. 1991). Or, les cellules d'un épithélium sont des cellules peu mobiles. Les cellules tumorales doivent donc acquérir cette faculté. Les modulations du microenvironnement tumoral ainsi que les modulations au sein des cellules tumorales vont participer à l'acquisition de cette capacité.

La migration cellulaire est gouvernée par de nombreuses voies de signalisations, de messagers et de récepteurs. Ces partenaires vont de certaines kinases, à la modulation du cytosquelette de la cellule, en passant par des protéines motrices.

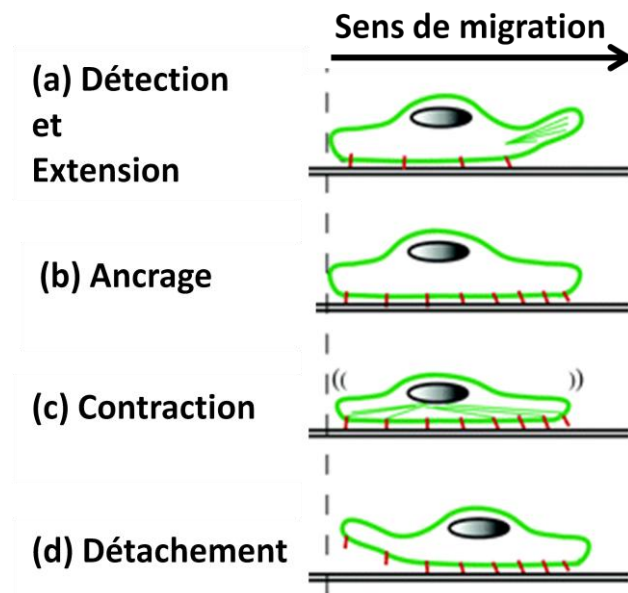


Figure 8 : Principales étapes de la migration des cellules.

Afin de migrer les cellules vont générer des extensions membranaires qui vont servir de senseur pour trouver de nouveaux points d'ancrages (a-b). Une fois ces nouveaux ancres générés, le cytosquelette de la cellule va effectuer une contraction qui va avoir pour effet de tracter le corps cellulaire dans la direction des nouveaux points d'ancrages (c). Le détachement des ancres précédents existants à l'arrière de la cellule (d) va ainsi pouvoir permettre à la cellule de se déplacer.

La motilité des cellules est menée par une série de processus interdépendants mettant en jeu notamment des modifications du cytosquelette, des changements dans les propriétés adhésives des cellules sur leur substrat.

En réagissant à un stimulus migratoire, les cellules vont se polariser et former des protrusions dans la direction de la migration. Ces protrusions prennent leur origine d'extensions de membranes, pouvant être des lamellipodes ou des filipodes. Ceux-ci sont générés par la polymérisation et l'élongation de filaments d'actine (Figure 8-a). De nouveaux points d'ancrages peuvent se former à l'avant de la cellule, qui va pouvoir s'arrimer à l'ECM présente devant elle en utilisant certains récepteurs spécifiques de ces matrices (principalement des intégrines) (Figure 8-b). Une fois ces nouveaux points d'ancrages formés, une contraction du cytosquelette permet de tracter le corps cellulaire (Figure 8-c). Un détachement des structures d'adhérences à l'arrière de la cellule va aboutir à la migration de la cellule (Figure 8-d) (Ridley, Schwartz et al. 2003).

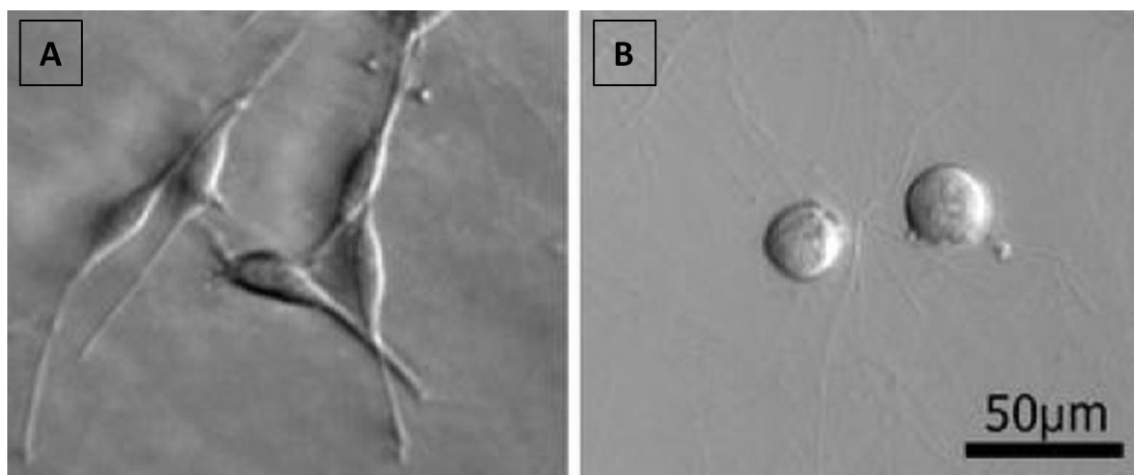


Figure 9 : Différence morphologiques de cellules de types mésenchymateuses et amiboïdes *in vitro*

Les cellules tumorales peuvent adapter leur mode de migration. La morphologie adoptée en fonction des deux types de migration est différente *in vitro*. Les cellules de types mésenchymateuses (A) présentent une morphologie fibroblastoïde présentant des extensions de membranes qui peuvent être des lamellipodes ou des filipodes. Les cellules de types amiboïdes (B) ne présentent pas d'extension de membrane de ce type et restent plutôt ronde. Adaptation Pankova, Rosel et al. 2010.

Un autre type de migration est possible, ne faisant pas intervenir de traction par lamellipodes ou filipodes. Cette migration dite amiboïde est observée lorsque les cellules adhèrent peu à l'ECM (Liu, Le Berre et al. 2015). Cette migration est plutôt décrite pour les cellules immunitaires telles que les leucocytes (Friedl, Borgmann et al. 2001). *In vitro*, selon

le type de migration employé, la morphologie des cellules n'est pas la même. Alors que les cellules mésenchymateuses sont plutôt allongées et de forme fibroblastoïde (Figure 9-A), la cellule amiboïde reste arrondie (Figure 9-B).

Selon les conditions environnementales et en fonction des cellules, la migration va dépendre en partie de l'ECM et des intégrines de ces différentes ECM. De plus, certains récepteurs autres que les intégrines peuvent interagir avec l'ECM et induire une motilité cellulaire. Ces récepteurs peuvent être le CD44 (Hou, Vogel et al. 2002, Marhaba and Zoller 2004), des récepteurs tyrosines kinases tels que les récepteurs à domaine discoïdine par exemple (Hou, Vogel et al. 2002). D'un type cellulaire à un autre, les mécanismes pouvant générer une migration varient, et dépendent à la fois des conditions extérieures et de la cellule elle-même. Deux types cellulaires ne répondront pas de la même façon à un même stimulus.

La vitesse de migration des cellules est limitée par des cycles d'adhérence-dé-adhérences (Lauffenburger and Horwitz 1996). La force des contacts entre les cellules et l'ECM peut aussi interférer avec la vitesse de migration. Une trop grande force de contacts augmente l'ancrage des cellules, et peut limiter la migration des cellules, là où un ancrage moins fort sera plus permissif.

Enfin, la perte des jonctions intercellulaires est un mécanisme pour les cellules permettant de quitter la tumeur primaire mais qui n'est pas toujours essentiel. En effet, les cellules ont la possibilité de migrer individuellement (Wong, Javaid et al. 2014), ou collectivement (Friedl, Hegerfeldt et al. 2004, Wong, Javaid et al. 2014). Ceci nécessite un maintien de certaines jonctions entre les cellules. Ce mécanisme peut permettre notamment à des cellules moins invasives de pouvoir quitter la tumeur primaire en suivant les cellules qui possèdent ces capacités invasives.

La progression tumorale comprend de nombreux processus qui sont acquis par les cellules tumorales. De nombreux caractères sont modulés au sein des cellules d'un carcinome, leur permettant de mener à bien le processus de métastases. Les caractères modulés vont avoir tendance à entraîner la perte progressive du phénotype épithélial par les cellules tumorales, au profit de caractéristiques plutôt mésenchymateuses. Ces processus sont regroupés dans un programme appelé la Transition Epithélio-mésenchymateuse (EMT).

B-4 / La Transition Epithelio-Mésenchymateuse

Comme évoqué précédemment, les cellules initiatrices d'un carcinome sont d'origine épithéliale. Or le comportement des cellules tumorales en phase d'invasion n'est plus celui d'une cellule épithéliale, mais plutôt celui d'une cellule mésenchymateuse.

B-4-a / Epithélium et cellules épithéliales

Un épithélium désigne une barrière naturelle formée par des cellules jointives les unes aux autres. Le contact entre les cellules est extrêmement étroit et permet l'imperméabilité de l'épithélium. Celui-ci repose sur une matrice spécifique, la lame basale.

L'association des cellules les unes aux autres est permise grâce aux jonctions intercellulaires, ces jonctions ont un rôle dans le maintien de certains caractères épithéliaux et permettent de maintenir une polarité au sein des cellules. Cette polarité est fortement dépendante de l'organisation des jonctions intercellulaires. Au pôle basal, la cellule est ancrée sur la lame basale, une ECM particulière, essentiellement par l'intermédiaire d'intégrines. L'ensemble des jonctions formées par les cellules épithéliales sont solidaires du cytosquelette de la cellule et participent à son réarrangement, et donc à la morphologie de la cellule.

L'organisation de la plupart des épithéliums est dit en monocouche, c'est-à-dire que les cellules sont organisées les unes à côté des autres, mais ne peuvent pas se chevaucher, en tout cas, pas dans un état physiologique. De même, les cellules peuvent se déplacer le long de la lame basale, mais en restant dans la couche à laquelle elles appartiennent. Ce phénomène permet entre autre le renouvellement de l'épithélium (van der Flier and Clevers 2009). En culture, les cellules épithéliales ont tendance à avoir de nombreux contacts et de jonctions intercellulaires avec les cellules voisines.

B-4-b / Cellules mésenchymateuses et mésenchyme

Le mésenchyme est un tissu de soutien embryonnaire. Il est à l'origine de diverses formes de tissus chez l'adulte qui permettent de soutenir l'architecture d'un organe et qui assure les échanges entre les tissus. L'organisation du mésenchyme est très différente d'un

épithélium. Les cellules mésenchymateuses n'ont pas de jonctions intercellulaires et la polarité apico-basale présente dans un épithélium est absente de ces cellules.

Outre l'indépendance des cellules les unes par rapport aux autres, une des caractéristiques des cellules mésenchymateuses, est leur capacité à la migration. Cette migration est permise par une plasticité de la cellule lui permettant d'effectuer le cycle d'extension, d'adhérence, de rétractation et de translocation du corps cellulaire, générant ainsi une mobilité cellulaire.

En culture, les cellules mésenchymateuses ont une morphologie caractéristique, dite fibroblastoïde, caractérisée par une morphologie allongée, fusiforme, et une faible quantité voir une absence de jonctions intercellulaires. Cette morphologie a été évoquée précédemment dans la Figure 9.

Lors du développement, lors de processus physiologiques tels que la cicatrisation, ou encore lors de processus pathologiques tels que la fibrose ou la progression tumorale, l'état mésenchymateux peut être un état de transition réversible permettant de former un nouvel épithélium à partir de cellules d'un autre épithélium distant. Cette transition est ainsi appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

B-4-c / La transition Epithélio-mésenchymateuse

L'EMT est un processus durant lequel les cellules épithéliales perdent des caractères épithéliaux, au profit de nouveaux caractères mésenchymateux. Ce processus réversible est dynamique. Il nécessite des modulations fonctionnelles et structurelles très complexes, mettant en jeu de nombreux partenaires. L'EMT est un processus qui n'est pas nécessairement total, c'est-à-dire qu'il regroupe une large gamme de modifications au sein de la cellule, mais qui ne sont pas forcément observées en totalité. Une cellule donnée pourra acquérir des facultés mésenchymateuses telles que la perte de jonction intercellulaires par exemple, sans pour autant acquérir la production d'ECM. Sous l'effet de la même stimulation, un type cellulaire va pouvoir acquérir une palette de caractères différents.

Si l'on devait schématiser la gamme de modulation qu'une cellule peut accumuler lors de l'EMT, nous pourrions borner ces amplitudes par, d'un côté un phénotype purement épithélial, et de l'autre côté un phénotype mésenchymateux complet. La cellule subissant une EMT serait capable de se situer dans tout cet espace sans nécessairement aboutir à un phénotype mésenchymateux complet (Figure 10). Ces phénotypes comportant des propriétés à la fois épithéliales et mésenchymateuses sont appelés métastables (Lee, Dedhar et al. 2006).

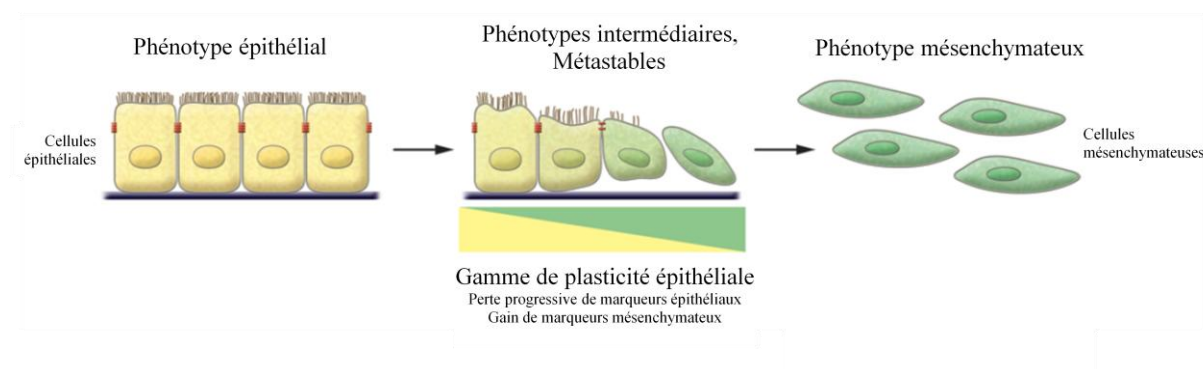


Figure 10 : Gamme de modulations pouvant être accumulées par une cellule lors de l'EMT.

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus qui permet aux cellules épithéliales d'acquérir une large gamme de modulations qui tendent à leur octroyer des facultés moins épithéliales au profit de propriétés plus mésenchymateuses. La modulation du phénotype épithélial n'est pas forcément totale et la gamme de modulations peut aller d'un phénotype purement épithélial à un phénotype purement mésenchymateux. Ces phénotypes intermédiaires peuvent être appelés phénotypes métastables, dans lesquels des propriétés épithéliales et mésenchymateuses sont présents. Adaptation Kalluri et Weinberg 2009.

Les cellules épithéliales qui subissent une EMT peuvent acquérir de nouvelles capacités, telles qu'une augmentation de leurs facultés invasives, ou encore une résistance accrue à l'apoptose. Ceci s'accompagne généralement d'un changement morphologique, tendant vers un aspect fibroblastoïde. La perte de caractères épithéliaux est caractéristique de ce changement, associant par exemple la diminution voir la perte des jonctions intercellulaires et la perte de la polarité baso-apicale. Les cellules peuvent aussi se désorganiser les unes par rapport aux autres, perdant l'organisation stricte typique d'un épithélium, et permettant ainsi un chevauchement des cellules, ou leur déplacement en dehors de l'épithélium (Kalluri and Weinberg 2009, Royer and Lu 2011).

L'EMT est un processus qui peut être induit par de nombreux éléments extérieurs. L'intégration de différents signaux peut aboutir ou non à la modulation de l'EMT. Des

signaux peuvent mener vers un phénotype particulier, et d'autre peuvent contrebalancer ces signaux et donc le phénotype (Morrison, Parvani et al. 2013).

Il est possible de classer l'EMT dans 3 différents sous-types qui ont des fonctions biologiques différentes en termes de conséquences fonctionnelles. Bien que les signaux qui délimitent ces trois sous-types soient encore peu clairs, leurs fonctions et leurs conséquences en font des processus différents. Ainsi le sous-type 1, ou EMT de type 1, fait partie de processus physiologiques qui interviennent lors du développement. Il prend part à l'embryogenèse ou encore à la formation des organes. L'EMT de type 2 est utilisé lors de phénomènes physiologiques tels que la régénération tissulaire, ou dans des phénomènes pathologiques comme la fibrose. Enfin l'EMT de type 3 est associé aux processus d'invasion et de métastases dans les cancers. Malgré l'existence de ces 3 sous-types d'EMT, certains processus semblent être communs aux 3 types (Kalluri and Weinberg 2009).

B-4-c-i / EMT dans le développement : l'EMT de type 1

Lors de l'embryogenèse, de nombreux signaux externes sont impliqués dans l'organisation des futurs tissus. Ces signaux extracellulaires sont capables de convertir une cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse par l'intermédiaire de l'EMT. Si l'EMT est dérégulé lors de ces étapes, le développement ne dépasse en général pas le stade de blastula. Lors de l'embryogenèse, l'EMT est associée à la mise en place du mésoderme lors de la gastrulation, de la migration des cellules de la crête neurale, de la formation de la valve cardiaque ou encore de la fusion du palais chez certains vertébrés (Hay 2005, Yu, Ruest et al. 2009, Lim and Thiery 2012, Theveneau and Mayor 2012).

La gastrulation est une étape qui consiste en la mise en place des tissus fondamentaux chez l'embryon. Elle va aboutir à la formation du mésoderme, troisième feuillet qui se situe entre les deux feuillets préexistants chez l'embryon : l'endoderme et l'ectoderme. Cette étape s'effectue par migration de cellules de l'ectoderme. Ce processus nécessite une EMT et est associé à l'induction de facteurs de transcription tels que Snail 1 et Snail 2. Cette induction est influencée par la sécrétion de facteurs de la famille du TGF β . Snail 1 et 2 vont réprimer l'expression de la E-cadhérine (Cano, Perez-Moreno et al. 2000, Peinado, Portillo et al. 2004, Barrallo-Gimeno and Nieto 2005), aboutissant à l'extinction de la E-cadhérine et donc à la

rupture des jonctions intercellulaires. Dans ces conditions, la β -caténine va se retrouver libre dans le cytoplasme. Si la β -caténine n'est pas prise en charge et détruite, elle va, comme c'est le cas dans la gastrulation, être transloquée dans le noyau grâce à son association avec les facteurs de transcription LEF/TCF. Ceci va leur permettre d'activer la transcription de gènes mésenchymateux favorisant la migration cellulaire (Orsulic, Huber et al. 1999).

Après la gastrulation débute la neurulation, c'est-à-dire l'étape du développement au cours de laquelle se met en place le système nerveux. Cette neurulation se fait en plusieurs étapes. L'une d'entre elles est la migration des cellules de la crête neurale. Ces cellules sont à la jonction du tube neural, et vont envahir différentes régions de l'embryon. Elles présentent donc des capacités migratoires et vont donner une grande diversité de phénotypes cellulaires. Avant la migration, les cellules de la crête neurale doivent subir une EMT afin d'acquérir ces propriétés. Lors de la migration de ces cellules, des facteurs impliqués dans l'EMT sont activés notamment par les voies des BMP (Bone Morphogenetic Protein), membres de la famille du TGF β (Carmona-Fontaine, Matthews et al. 2008), par la voie Wnt (De Calisto, Araya et al. 2005) ou encore la voie de l'acide rétinoïque (Martinez-Morales, Diez del Corral et al. 2011).

B-4-c-ii / EMT physiologique et pathologiques chez l'adulte : EMT de type 2

Chez l'adulte, le phénomène d'EMT est observé dans certains processus, pathologiques ou physiologiques. Parmi les processus physiologiques, l'EMT intervient dans le phénomène de régénération tissulaire, notamment lors de la cicatrisation.

La ré-épithélialisation cutanée engendrée par la cicatrisation, peut être décrite comme une EMT partielle qui est engendrée par des cellules à la fois motiles et cohésives. Ce phénotype intermédiaire entre cellule épithéliale et mésenchymateuse met en évidence la large étendue de phénotypes et de propriétés qui peuvent être acquises par des cellules lors de l'EMT. L'EGF, un inducteur d'EMT, stimule la cicatrisation (Schultz, Rotatori et al. 1991, Ahmed, Maines-Bandiera et al. 2006, Lo, Hsu et al. 2007).

Un autre exemple du rôle de l'EMT chez l'adulte a été décrit dans des études s'intéressant à la cicatrisation de l'ovaire au cours du cycle d'ovulation. Suite à l'expulsion de l'ovul, un processus de cicatrisation ovarien se met en place. Lors de ce phénomène, des cellules de l'épithélium enveloppant l'ovaire sont recrutées. Ce recrutement de cellules épithéliales passe par une EMT en réponse à des stimuli environnementaux, et notamment par l'EGF (Ahmed, Maines-Bandiera et al. 2006).

Des modulations communes en termes de morphologie et de propriétés accompagnent la fibrose. En effet, dans des modèles de fibrose rénale ou hépatique, une proportion de cellules sécrétant l'excès d'ECM, caractéristique de la fibrose, dérivent de progéniteurs épithéliaux (Wynn and Ramalingam 2012).

B-4-c-iii / EMT pathologique et cancer : EMT de type 3

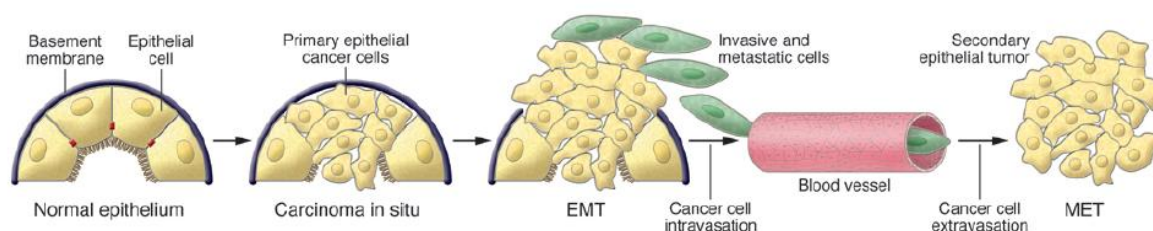


Figure 11 : Contribution de l'EMT dans la progression tumorale.

La progression d'un épithélium vers un carcinome invasif s'effectue grâce à différentes étapes. Le stade de carcinome invasif implique que les cellules épithéliales perdent leur polarité épithéliale et se détachent de la membrane basale ainsi que des cellules voisines. La composition de cette membrane basale est modulée, impliquant l'altération des interactions cellules-matrices, et induisant des signaux différents dans les cellules. Ceci s'accompagne de l'acquisition de facultés invasives, permettant aux cellules d'envahir le tissu voisin, et d'entrer dans la circulation sanguine. L'acquisition par les cellules tumorales de ces facultés se fait grâce à l'EMT. A noter que ce phénomène pourra être renversé afin de reformer des tumeurs épithéliales sur le lieu des métastases. Ceci impliquerait une transition mésenchymato-épithéliale. D'après Kalluri et Weinberg 2009.

L'EMT participe aussi à la dissémination de cellules de carcinomes (Thiery, Acloque et al. 2009). Plus généralement, l'EMT pourrait être impliquée dans le programme de dédifférenciation, menant à un carcinome malin, en induisant une perte de phénotype épithélial au profit de propriétés mésenchymateuses, voir même de cellules souches (Mani, Guo et al. 2008). L'EMT peut avoir un rôle au niveau de différentes étapes du processus de

métastases. Dans les cellules cancéreuses, ce processus a la capacité de leur faire perdre certaines propriétés adhésives, comme par exemple les jonctions intercellulaires. Il permet aussi d'acquérir des propriétés migratoires et protéolytiques. Il s'agit en d'autres termes de capacités invasives nécessaires à la formation de métastases (Figure 11) (Lee, Dedhar et al. 2006).

Dans une tumeur, la perte de marqueurs épithéliaux, tels que la E-cadhérine, est directement corrélée à une progression tumorale et à un mauvais pronostic (Peinado, Portillo et al. 2004). Il en va de même pour le gain de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, la N-cadhérine, ou l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'EMT tels que Snail 1 (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005, Moody, Perez et al. 2005). L'expression de facteurs de transcription tels que Snail 1, Snail 2, Zeb 1 et Zeb 2 dans des modèles tumoraux est impliqué dans la répression de la E-cadhérine, engendrant des pertes de jonctions intercellulaires et un phénotype invasif.

Bien que de nombreux travaux aient montrés que la reproduction de l'EMT au sein des cellules tumorales engendre une augmentation de la capacité invasive des cellules *in vitro*, il existe un certain scepticisme quant à l'importance de l'EMT dans la progression tumorale. Ce scepticisme provient du fait que, histologiquement, les changements morphologiques supportant l'EMT n'étaient pas observés *in vivo*. De plus, les métastases ont d'une façon générale une morphologie similaire à la tumeur primaire, et ce malgré qu'elles devraient avoir subi le processus d'EMT (Tarin, Thompson et al. 2005).

Finalement, ces modulations sont bel et bien présentes au sein de la tumeur primaire. La perte de la E-cadhérine dans les carcinomes hépatocellulaires de haut grade en est un exemple (van Zijl, Zulehner et al. 2009). La localisation nucléaire de la β -caténine, signe de rupture des jonctions E-cadhérines, a de même été mis en évidence (Zulehner, Mikula et al. 2010).

Les ressemblances phénotypiques et morphologiques des métastases avec la tumeur primaire est aussi une des causes du scepticisme à propos de l'EMT. Sur ce point, il semble que cela puisse provenir d'un des mécanismes de la plasticité épithéliale. En effet, le principe de l'EMT dans le développement consiste à former un épithélium à partir d'un épithélium existant dans un autre endroit de l'embryon. Ceci passe donc par une EMT qui permet aux

cellules épithéliales d'aller envahir une autre région de l'embryon, mais surtout nécessite le processus inverse, la transition mésenchymato-épithéliale (MET). La MET peut donc expliquer que les métastases ressemblent à leurs tumeurs mères, du fait de la perte des caractères acquis lors de l'EMT, et leur permettant de reformer des tumeurs cohésives dans leur nouvel organe (Figure 11) (Chaffer, Brennan et al. 2006, Aokage, Ishii et al. 2011).

B-4-d / Marqueurs de l'EMT utilisés dans l'étude du cancer

Il existe une vaste gamme de caractères pouvant être acquis lors de l'EMT. Il existe de ce fait une vaste gamme de paramètres permettant de caractériser l'état d'avancement des cellules vers un phénotype mésenchymateux ou épithélial. Tous les caractères déjà discutés précédemment vont permettre de jauger de l'état des cellules (Figure 12). Ci-après sont exposés les principaux caractères utilisés lors des études présentés dans cette thèse.

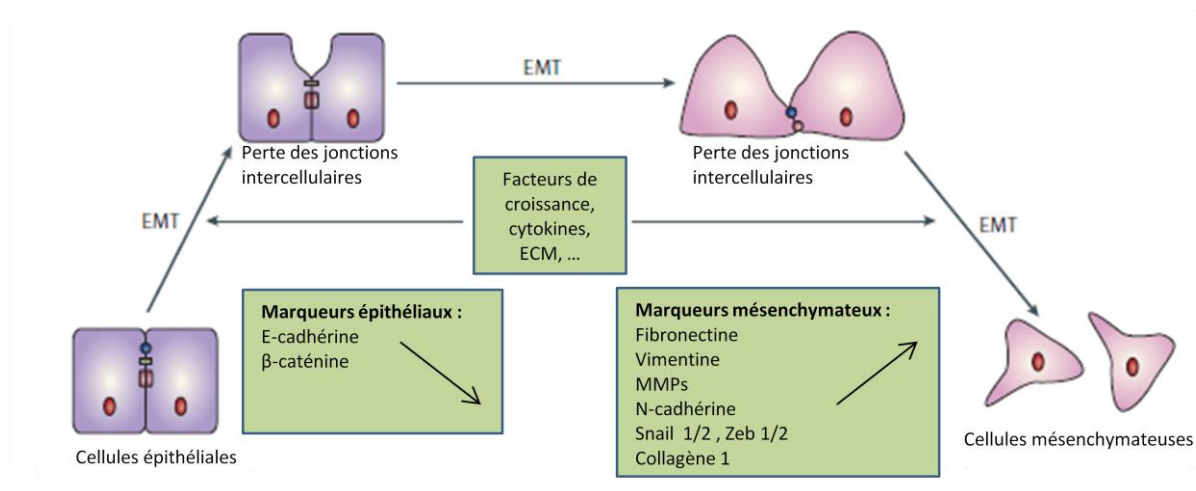


Figure 12 : Schématisation de certains marqueurs et mécanismes de l'EMT.

Lors de l'EMT, certains facteurs tels que l'ECM ou des facteurs solubles vont avoir la capacité d'induire des modulations au sein des cellules. Ces modulations vont de la perte des jonctions intercellulaires à la diminution de certains marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux. Ces éléments jaugent l'état plus ou moins avancé des cellules dans le processus d'EMT. Adaptation Thiery et Sleeman, 2006.

La perte des jonctions intercellulaires, et notamment grâce à la déstabilisation des complexes de jonctions cadhérines, peut s'effectuer par différents moyens tel que la perte d'expressions de membres de la jonction dépendante de la E-cadhérine, ou leur relocalisation. Par exemple, la translocation de la β-caténine dans le noyau, qui lui permet d'agir comme co-

activateur de facteur de transcription, est un marqueur de l'EMT. Sa non localisation à la membrane et la diminution de la forme protéique, sont de même synonymes de rupture du complexe E-cadhérine. De plus, la dérégulation des complexes E-cadhérine peut se faire par l'expression *de novo* de la N-cadhérine, qui n'est pas exprimée dans des cellules épithéliales saines et qui est de ce fait un marqueur de l'EMT (Figure 12).

L'expression de facteurs de transcriptions de l'EMT, tels que Snail 1, Snail 2, Twist 1, Twist 2, Zeb 1 ou encore Zeb 2 est utilisé comme marqueur d'EMT. Ces facteurs sont réactivés lors de l'EMT chez l'adulte (Rosivatz, Becker et al. 2002, Martin, Goyal et al. 2005). Certains de ces facteurs sont capables de moduler l'expression de la E-cadhérine, c'est notamment le cas de Snail 1 ou Zeb 1 (Batlle, Sancho et al. 2000, Singh, Sharma et al. 2011). L'expression de Zeb 2 dans le RCC est de plus associée à un phénotype agressif (Fang, Wei et al. 2013) (Figure 12).

La production et la sécrétion de protéases matricielles, telles que les MMPs, ainsi que **l'expression et le dépôt d'une nouvelle ECM**, tels que la fibronectine ou le collagène (Figure 12) sont de même des paramètres étudiés.

Des marqueurs fonctionnels *in vitro* peuvent servir de marqueurs d'EMT. C'est par exemple le cas de l'augmentation de la migration, et/ou de l'invasion, ainsi que la **modulation de la morphologie des cellules** vers une morphologie plus fibroblastoïde. La résistance accrue à l'apoptose est aussi un marqueur potentiel de l'EMT (Figure 12).

B-4-e / Voies de signalisation pouvant agir sur l'EMT

De nombreux stimuli peuvent induire ou moduler l'EMT. De nombreux ligands et voies de signalisations sont ainsi impliqués. De même, certains récepteurs, telles que les intégrines, ou encore certains récepteurs tyrosines kinases (RTK), peuvent induire l'activation de voies de signalisation. La voie des MAP Kinases ou les voies de Src par exemple. Ces voies sont connues pour participer au développement oncogénique et peuvent avoir un effet sur le statut épithélial des cellules en favorisant l'EMT (Figure 13). La stimulation de la voie de Ras-Raf-MAP Kinases peut induire l'activation de facteurs de transcription tels que Snail 1 (Smith, Burton et al. 2014), pouvant réprimer l'expression de la E-cadhérine (Batlle, Sancho

et al. 2000). La voie Wnt/ β -caténine est aussi connue pour participer à l'EMT, en réprimant la dégradation de la β -caténine cytoplasmique, lui permettant de s'accumuler au noyau (MacDonald, Tamai et al. 2009).

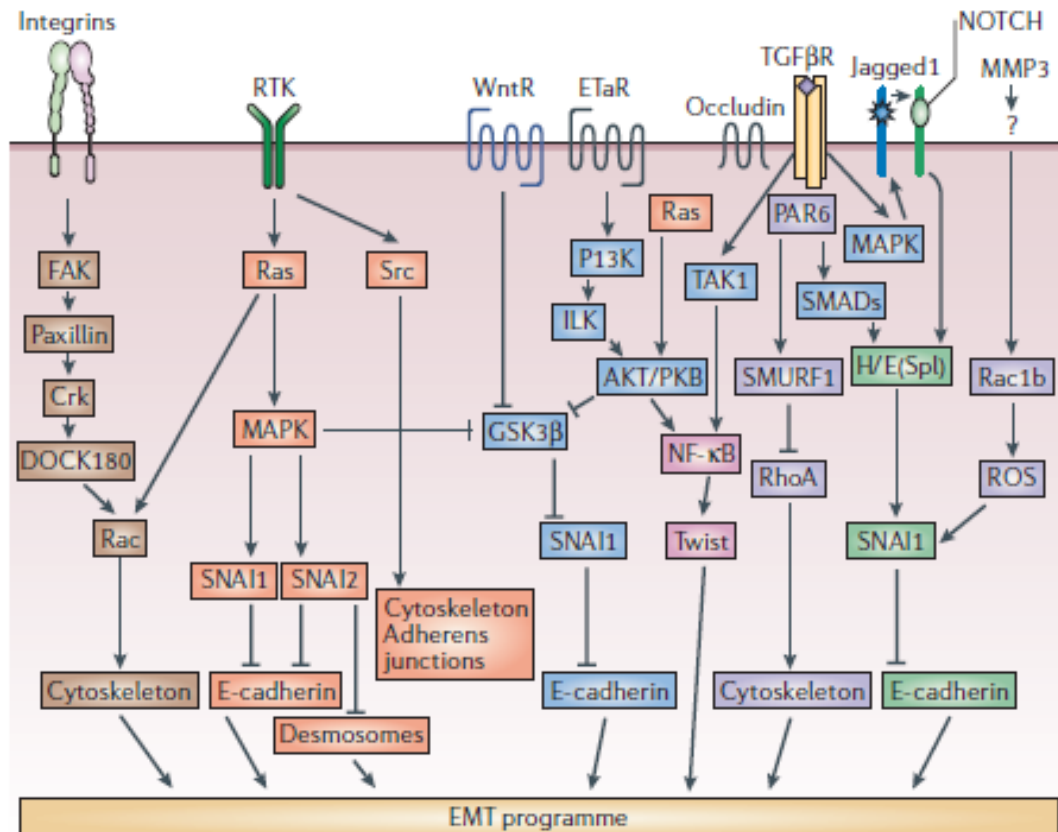


Figure 13 : Exemples de voies pouvant mener à la modulation de l'EMT.

L'EMT peut être modulée par de nombreuses voies de signalisation activées par de nombreux récepteurs. D'après Guo and Giancotti 2004.

L'EMT est donc un processus qui génère des caractères invasifs permettant aux cellules de s'extraire de la tumeur primaire et donc de participer au processus de métastases.

C / Intravasation, survie dans le sang et Extravasation

Lorsque le phénotype des cellules est suffisamment modulé afin de s'extraire de la tumeur primaire et d'entrer dans un processus d'invasion, elles peuvent envahir la tumeur voir même le tissu avoisinant la tumeur primaire. Afin de former des métastases dans de nouveaux organes distants, les cellules vont migrer vers les vaisseaux sanguins, et entrer dans la circulation sanguine.

L'intravasation (entrée dans les vaisseaux sanguins/lymphatiques) et l'extravasation (sortie des vaisseaux) des cellules tumorales sont deux étapes qui vont nécessiter la perturbation des jonctions endothéliales, permettant ainsi le passage des cellules à travers l'endothélium. Cette migration dite transendothéliale est toutefois différente dans les deux cas, du fait que les cellules abordent un coté différent de l'endothélium.

C-1 / Intravasation

Afin d'entrer dans la circulation, les cellules doivent avoir réussi les étapes leur permettant d'envahir le tissu. Ceci leur permet de se déplacer jusqu'aux vaisseaux sanguins, ou lymphatiques, que cela soit au sein de la tumeur, ou proches de la tumeur (Wyckoff, Jones et al. 2000).

Les tumeurs ont la faculté d'induire l'angiogenèse. Ces néo-vaisseaux sont en général des vaisseaux « faiblement matures », possédant des jonctions intercellulaires faibles. Ceci va potentiellement faciliter la migration transendothéliale des cellules tumorales (Kinouchi, Mano et al. 2003, Fakhrehani and Toi 2012).

Certains facteurs produits localement sont capables de diminuer la fonction de barrière de l'endothélium. Le TGF β , ou encore le VEGF sont deux facteurs identifiés comme capables de faciliter l'entrées des cellules tumorales dans le sang mais pouvant aussi contribuer à leur sorti du réseau sanguin (Anderberg, Cunha et al. 2013). Ces deux facteurs sont des éléments qui sont très souvent fortement exprimés dans les tumeurs. Le TGF β étant associé à l'EMT, et le VEGF est un médiateur important de l'angiogenèse dans les cancers. Le VEGF est souvent fortement exprimé dans le RCC (Rini 2009).

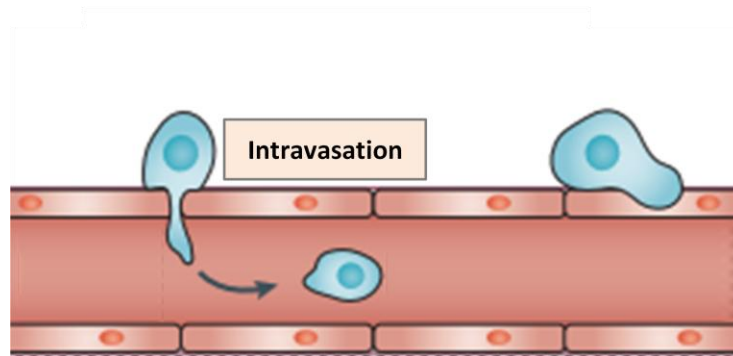


Figure 14 : Intravasation de cellules tumorales.

Les cellules tumorales ayant acquis certaines capacités vont pouvoir traverser l'endothélium afin de rejoindre la circulation générale. Elles se retrouvent ainsi confrontées à un nouvel environnement dans lequel elles vont devoir survivre. Adaptation Reymond, d'Agua et al. 2013.

Afin d'effectuer l'intravasation, les cellules tumorales vont donc transmigrier à travers l'endothélium vasculaire (Figure 14). Cette migration s'effectue en passant entre les jonctions des cellules endothéliales (intravasation paracellulaire). Il semble de plus que les cellules puissent passer au travers des cellules endothéliales (intravasation transcellulaire) (Woodward 2008, Khuon, Liang et al. 2010). Une fois l'endothélium traversé, les cellules se retrouvent dans la circulation sanguine, confrontées à un nouveau microenvironnement (Figure 14).

C-2 / Survie dans le sang

Le réseau sanguin est un environnement sévère pour les cellules tumorales. Les cellules tumorales qui ont traversées l'endothélium se retrouvent dans un environnement totalement différent d'un tissu. Elles sont alors soumises à des forces de cisaillements induites par la circulation sanguine, à l'absence d'adhérence sur les matrices tissulaires classiques, ou encore à la présence de cellules immunitaires.

La majorité des cellules issues d'un tissu, c'est-à-dire des cellules non sanguines, ne survivent pas dans un milieu de ce type, sans ancrage et sans substrat. Les cellules meurent en général à cause de l'absence d'ancrage par anoïkis. Elles sont de plus ciblées par les cellules immunitaires présentes dans le sang. La survie dans le sang est un des paramètres qui contribue à l'inefficacité du processus de métastases car les cellules tumorales qui n'ont pas acquis la faculté de survivre dans le réseau sanguin ne survivront pas à ce nouvel environnement (Zhan, Zhao et al. 2004).

Des caractères acquis lors de la tumorigenèse peuvent participer à cette survie en leur octroyant une résistance à l'anoïkis, ce qui peut contribuer à la survie des cellules dans la circulation sanguine. La dérégulation de certains récepteurs tels que des récepteurs tyrosine kinase (RTK), leur activation autocrine, ou encore leur activation constitutive, peuvent permettre de provoquer l'activation de certaines voies participant à la survie des cellules, par la voie Src par exemple (Demers, Thibodeau et al. 2009).

Les cellules tumorales peuvent circuler en groupe dans le réseau sanguin (Cho, Wendel et al. 2012, Aceto, Bardia et al. 2014). Il est ainsi possible que les jonctions intercellulaire présentes dans ces groupes de cellules augmentent leur survie, ou rendent certaines cellules de la cohorte moins sensibles et non accessible au système immunitaire.

Enfin, point intéressant, il semble que les cellules tumorales puissent commencer à proliférer dans la circulation sanguine sans avoir effectué d'extravasation (Al-Mehdi, Tozawa et al. 2000).

La survie des cellules dans le sang est une des étapes limitante dans le processus de métastases. Certains patients présentant des cellules tumorales circulantes peuvent ne pas montrer de signes de métastases (Nguyen, Bos et al. 2009). Ceci implique que même une fois dans la circulation, les cellules ont encore de nombreuses étapes à franchir afin de former des métastases, que cela soit la capacité de survivre dans la circulation et d'extravaser, ou de survivre et proliférer dans le nouvel organe.

C-3 / Arrêt des cellules

Si la survie des cellules dans le sang est un élément important du processus de métastases, leur sortie du réseau sanguin est nécessaire afin d'envahir de nouveaux tissus. Pour cela, les cellules doivent tout d'abord s'arrêter dans les vaisseaux sanguins de certains organes.

La notion la plus généralement acceptée, en ce qui concerne l'arrêt des cellules et leur sortie de la circulation, est qu'une fraction des cellules s'arrêtent de façon non spécifique en interagissant avec des facteurs coagulant tels que le fibrinogène, la thrombine, ou par

restriction physique au niveau des capillaires sanguins, avant de former des ancrages sur les cellules endothéliales (Ito, Nakanishi et al. 2001, Kienast, von Baumgarten et al. 2010) (Figure 15).

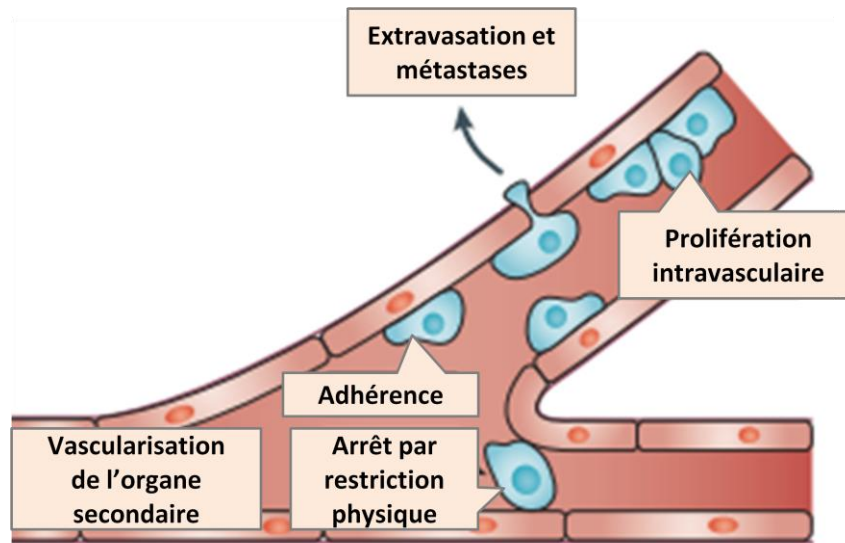


Figure 15 : Arrêt et extravasation cellulaire.

Afin de pouvoir s'extraire de la circulation sanguine, les cellules tumorales doivent s'arrêter au niveau de certains capillaires sanguins. Cet arrêt peut se faire par restriction induite par la taille des cellules par rapport au vaisseau, ou alors par adhésion plus spécifique à certains récepteurs membranaires présents à la surface des cellules endothéliales Adaptation Reymond, d'Agua et al. 2013.

Les facteurs physiques engendrant la restriction des cellules au niveau de certains capillaires ont leur importance dans l'arrêt des cellules tumorales dans les vaisseaux, mais il semble néanmoins exister des interactions plus spécifiques. Celles-ci mettent en jeu des interactions entre des récepteurs et leurs ligands, et permettent une adhérence des cellules plutôt qu'une restriction simplement physique (Figure 15).

Il est ainsi proposé que le mécanisme d'arrêt et d'extravasation des cellules tumorales se rapproche de celui des leucocytes. Dans ce système, certains ligands des E-selectines ont la capacité d'engager un premier attachement des cellules tumorales sur l'endothélium vasculaire, par exemple grâce au récepteur CD44 (Dimitroff, Lee et al. 2001). Cet attachement l'endothélium peut aussi passer par la N-cadherine, exprimée par les cellules endothéliales mais qui est souvent exprimé par les cellules tumorales suite à l'induction de l'EMT (Qi, Chen et al. 2005). Autre exemple, la neuropiline-2, un récepteur non tyrosine kinase, est capable d'interagir avec de nombreux ligands tels que les semaphorines, le VEGF ou bien d'autres facteurs de croissance. La neuropiline-2 exprimée par les cellules tumorales de RCC a aussi la capacité de lier l'intégrine α_5 des cellules endothéliales. Ceci peut faciliter

l'adhésion des cellules tumorales sur l'endothélium, et donc leur arrêt (Cao, Hoepfner et al. 2013). L'expression de la neuropiline-2 est plus élevée dans les tumeurs métastatiques dans le RCC (Cao, Hoepfner et al. 2013).

Ces différentes interactions entre les cellules tumorales et l'endothélium vont permettre l'attachement des cellules sur l'endothélium vasculaire, voir même leur déplacement le long des cellules endothéliales grâce au phénomène de roulement (« rolling »).

Tous les vaisseaux et capillaires ne sont pas identiques les uns aux autres et il peut exister certaines particularités en fonction des organes. Les cellules endothéliales de chaque organe peuvent exprimer des protéines de surfaces différentes, et peuvent donc participer à l'arrêt de certaines populations de cellules tumorales exprimant le ligand adéquat. Les cellules tumorales circulantes peuvent de plus elles-mêmes provoquer des modulations dans l'expression de certains récepteurs endothéliaux tels que les E et P-selectines (Khatib, Auguste et al. 2005). Ces différences inter-organes, et la possibilité pour les cellules de moduler elles-mêmes ces différences pourraient entrer en jeu dans le phénomène de tropisme en ce qui concerne les organes ciblés par les métastases. Ce phénomène sera évoqué plus loin.

Le poumon, cible privilégiée des métastases dans le cancer du rein, possède une circulation qui diffère de la circulation systémique. La concentration en leucocytes dans les capillaires sanguins est 35 à 100 fois plus importante que dans les gros vaisseaux de la circulation systémique (Doerschuk, Beyers et al. 1993). Les capillaires pulmonaires sont trop petits pour permettre le phénomène de « rolling », notamment pour les neutrophiles, ce qui pourrait exclure ce phénomène pour certaines cellules tumorales (Doerschuk, Beyers et al. 1993).

Bien que l'idée générale soit que les cellules tumorales entrent d'abord dans le nouveau tissu, puis entrent en dormance ou en prolifération, certains modèles ont montré que les cellules peuvent engager le processus de prolifération alors qu'elles sont encore dans le système sanguin (mais attachées à l'endothélium) (Al-Mehdi, Tozawa et al. 2000), et donc avant le processus d'extravasation.

C-4 / Extravasation

Une fois arrêtées dans les capillaires sanguins, que cela soit par restriction physique, ou par interactions spécifique, les cellules tumorales vont devoir traverser l'endothélium. Tout comme l'intravasation, cette migration transendothéliale peut se faire par migration paracellulaire ou transcellulaire (Woodward 2008).

Tout comme l'arrêt, l'extravasation des cellules peut être affecté par le type d'endothélium auquel elles sont confrontées. Il a été reporté que les organes distants pouvaient être modulés par la tumeur primaire, sans que des métastases n'aient envahi le tissu. Ainsi dans un modèle de mélanome, la présence de la tumeur primaire engendre la production de certains facteurs tels que des MMPs ou de l'angiopoïétine au niveau pulmonaire. Ceci induit la déstabilisation de l'endothélium vasculaire et favorise donc l'extravasation des cellules tumorales, ainsi que l'infiltration de cellules myéloïdes (Huang, Song et al. 2009).

Une fois l'endothélium traversé, les cellules tumorales sont confrontées à la lame basale endothéliale. Cette membrane constituée d'ECM particulière va devoir être envahit. Ceci va permettre aux cellules de finaliser leur entrée dans le nouvel organe. Elles vont ensuite, une nouvelle fois, être confrontées à un nouveau microenvironnement auquel elles vont devoir s'adapter afin de pouvoir former de nouvelles métastases.

D / Formation de nouvelles tumeurs distantes, les métastases

Tout comme les autres étapes de la formation de métastases, la colonisation métastatique est une étape inefficace. Dans un modèle expérimental de métastases de mélanome, la majorité des cellules tumorales injectées par la veine porte survivent dans le sang et peuvent effectuer l'extravasation au niveau du foie. En revanche, seulement 2% des cellules forment des micrométastases au bout de 3 jours, et seulement 1% de ces micrométastases forment des macrométastases au bout de 13 jours (Luzzi, MacDonald et al. 1998).

Le succès et l'efficacité de la colonisation d'un nouveau tissu va dépendre du microenvironnement de ce tissu, et de l'interaction entre celui-ci et les cellules tumorales. Ce nouveau tissu doit être adéquat aux premières étapes de survie des cellules tumorales qui l'envahissent. Si ce n'est pas le cas, les cellules doivent très rapidement s'y adapter.

Des caractères acquis au sein de la tumeur primaire peuvent être nécessaire pour reformer de nouvelles tumeurs. Les cellules vont devoir, par exemple, entrer dans un nouveau processus de prolifération, moduler son microenvironnement et engendrer une néovascularisation au sein du tissu envahi. Les cellules vont reformer une nouvelle tumeur en utilisant des mécanismes similaires, sinon identiques, à ceux utilisés pour former la tumeur primaire.

Malgré tout, même si la cellule tumorale survie dans son nouveau microenvironnement, de nombreuses étapes doivent encore être franchies avant de former des micrométastases, puis des macrométastases.

D-1 / Dormance, micrométastase et macrométastase

Les patients ayant eu des cancers peuvent développer des métastases des années voir des décennies plus tard, et ce même si la tumeur primaire a été retirée (Karrison, Ferguson et al. 1999). Cette pause peut s'expliquer par le phénomène de dormance, période durant laquelle la maladie est toujours présente mais reste asymptomatique. Ce phénomène de dormance est à ces jours peu compris. Il peut être séparé en deux grands mécanismes. Un premier mécanisme qui va antagoniser l'expansion tumorale issue de la prolifération des cellules cancéreuses (on parlera ici d'une dormance à l'échelle d'une masse tumorale). Le second mécanisme consiste en un arrêt de prolifération des cellules tumorales (on parlera ici d'une dormance à l'échelle cellulaire).

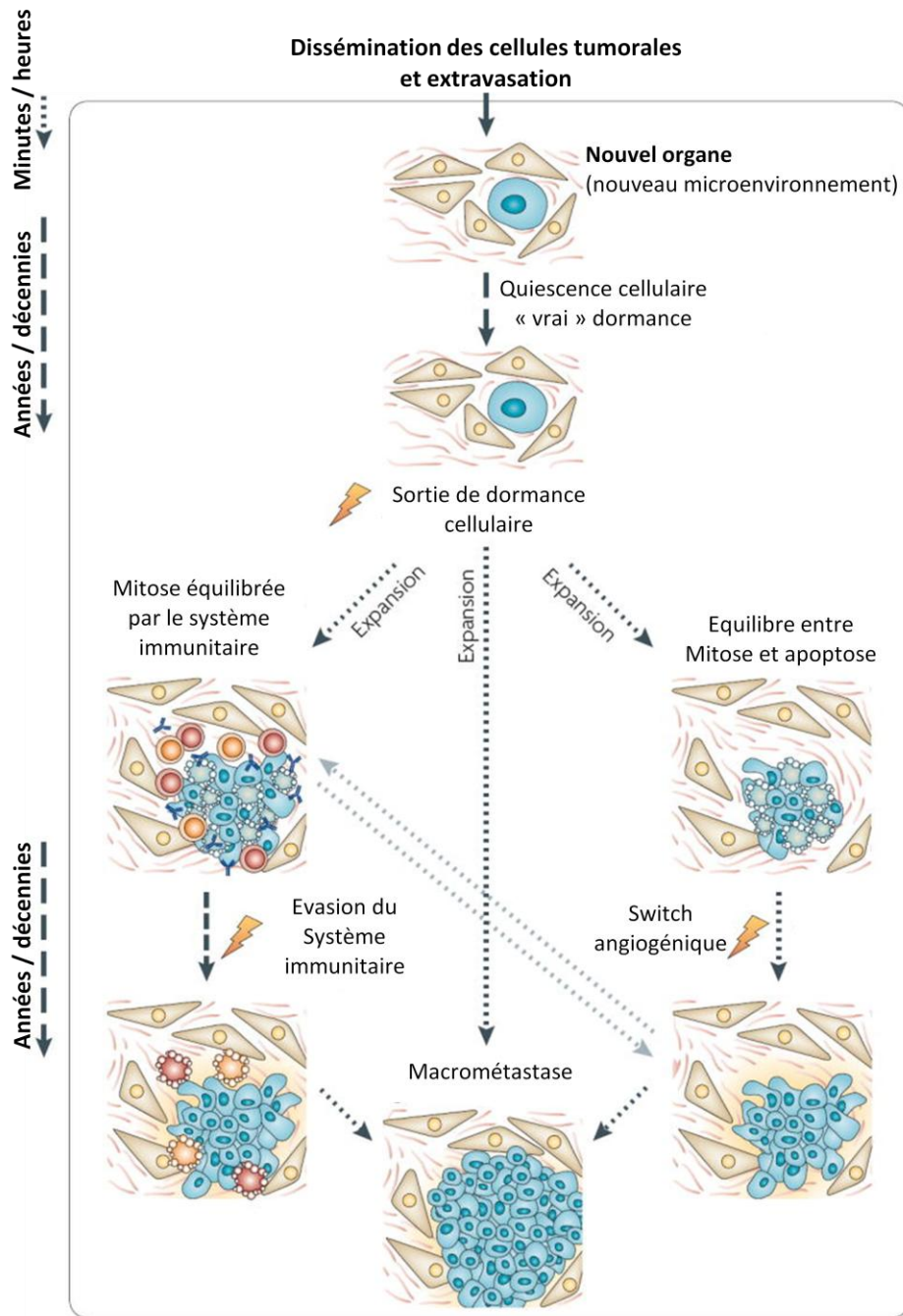


Figure 16 : Mécanismes de dormance cellulaire et micrométastatique

Une fois entrées dans le nouvel organe, les cellules tumorales ne forment pas immédiatement des macrométastases. De nombreuses étapes de dormances peuvent ralentir le processus et expliquer la découverte de macrométastases des décennies après une rémission apparente. La dormance cellulaire, ou vrai dormance, est un processus de quiescence cellulaire. La dormance à l'échelle de micrométastases est en fait un contrebalancement entre la prolifération des cellules tumorales et leur mort, soit à cause d'un manque de nutriment, soit à cause d'un ciblage par le système immunitaire. Une fois de plus, les cellules tumorales vont devoir moduler leur phénotype et/ou leur microenvironnement afin de contrecarrer ces limitations et former des macrométastases. (Adaptation Aguirre-Guiso, 2007).

La dormance à l'échelle cellulaire, appelée aussi « vrai » dormance, est plutôt associée à une entrée en quiescence des cellules tumorales (Figure 16). Cet état peut provenir de l'incapacité des cellules à entrer en phase d'expansion tumorale, mécanisme que la cellule aurait perdu au cours des phases de progression métastatique, ou qu'elle n'aurait tout simplement pas acquise. Une modulation du phénotype des cellules va donc être nécessaire. Cette étape peut aussi s'expliquer par un arrêt de la prolifération des cellules, à cause d'un manque de signaux pro-prolifératifs (Aguirre Ghiso, Kovalski et al. 1999, Aguirre-Ghiso, Liu et al. 2001). Les cellules quiescentes sont souvent réfractaires aux chimiothérapies conventionnelles (Naumov, MacDonald et al. 2002, Naumov, Townson et al. 2003).

Afin de former une micrométastase, une sortie de quiescence des cellules tumorales est nécessaire. Elle peut être induite directement par le microenvironnement, par des interactions avec l'ECM (Aguirre-Ghiso, Liu et al. 2001, Liu, Aguirre Ghiso et al. 2002). En effet, des éléments de l'ECM tels que la périostine, sécrétée par des fibroblastes résidents (Malanchi, Santamaria-Martinez et al. 2012), ou la ténascine-C produite directement par les cellules tumorales ou par les fibroblastes (Oskarsson, Acharyya et al. 2011), peuvent servir de microenvironnement permissif dans le tissu envahi. Les cellules initiatrices de métastases (appelées aussi cellules souches tumorales ou cellules souches métastatiques) doivent donc générer une sorte de niche constituée en partie d'ECM, et capable de soutenir l'initiation de la nouvelle micrométastase.

Une fois la prolifération des cellules initiatrices de métastases engagée, une micrométastase se forme. La dormance à l'échelle micrométastatique se caractérise par le fait que les cellules tumorales se divisent, mais que la micrométastase qui en résulte ne dépasse pas une certaine taille. L'une des raisons serait la limitation en termes de nutriments. Cette limitation est associée, comme dans les tumeurs primaires, à un défaut d'angiogenèse, qui peut ainsi être contrecarrée par un switch angiogénique au sein des micrométastases (Holmgren, O'Reilly et al. 1995, Indraccolo, Stievano et al. 2006) (Figure 16). Les cellules endothéliales en cours de néoangiogenèse peuvent sécréter de la périostine, soutenant ainsi les effets induits par la périostine au sein de la micrométastase (Ghajar, Peinado et al. 2013). Le système immunitaire peut lui aussi expliquer ce phénomène. En effet, celui-ci peut induire la mort de cellules tumorales en concomitance avec leur prolifération, équilibrant ainsi le système (Figure 16).

Une fois encore, le contrôle du microenvironnement par les cellules tumorales va être déterminant afin de pouvoir contrecarrer les limitations l'empêchant de pouvoir former des macrométastases. D'une façon générale, les mécanismes permettant la sortie de dormance sont similaires à la formation de la tumeur primaire. La sortie de dormance, que cela soit à l'échelle de cellule, ou à l'échelle de micrométastase nécessite une modulation du phénotype des cellules tumorales et fait intervenir le microenvironnement. La modulation de l'ECM, le contrôle du système immunitaire, mais aussi le recrutement de cellules mésenchymateuses et endothéliales est donc nécessaire (Aguirre Ghiso, Kovalski et al. 1999, Aguirre-Ghiso, Liu et al. 2001, Joyce and Pollard 2009). Ces mécanismes sont d'ailleurs, tout comme dans la tumeur primaire, interdépendants.

La sortie de dormance et la détection des lésions secondaires peut se faire des années voir des décennies plus tard, et ce, même après un traitement apparemment réussi de la première maladie. La période de dormance pose de nombreuses questions, sur la façon de suivre le patient, sur la durée de ce suivie, sur la gestion du risque de rechute, ou sur l'idée que des patients pourraient tirer profit d'une thérapie plus longue. La connaissance des mécanismes de dormance, et de la sortie de dormance, pourrait permettre de s'attaquer aux cellules tumorales quiescentes. De plus, des thérapies empêchant le sortie de dormance, quelle soit cellulaire ou micrométastatique pourrait permettre de contrôler les risques de récidives.

D-2 / Localisation des métastases et tropisme

Des observations cliniques sur des patients et des études sur les rongeurs ont montré que certains types de cancers forment des métastases spécifiquement dans certains organes. Les cellules tumorales issues d'un organe particulier ne vont former des métastases que dans certains organes, ou tissus. Ce tropisme a mené à la génération de deux grandes théories pouvant expliquer ce phénomène. La première se base sur des facteurs mécaniques, tandis que la seconde se base sur des interactions spécifiques entre le tissu hôte et les cellules tumorales.

D-2-a / Interactions spécifiques

Le constat de ce tropisme n'est pas récent. En 1889, Stephen Paget l'avait déjà observé et avait proposé l'idée du « seed and soil » (Paget 1989). Dans ses observations sur l'établissement de métastases dans le cancer du sein, Stephen Paget avait mis en évidence qu'une majorité de métastases s'établissaient dans le foie, alors qu'une proportion très faible de patientes présentait des métastases au niveau de la rate. Il souligne ce même type d'observation pour des cancers de l'utérus ou une fraction de patientes avaient des métastases hépatiques, mais seulement 1 seul cas sur les 244 présentait des métastases au niveau de la rate, qui, selon lui, reçoit les mêmes volumes de sang. Il en excluait ainsi le facteur hasard et proposait alors que tout comme lorsqu'une plante émet des graines (« seed »), celles-ci peuvent aller dans toutes les directions, mais elles ne vont néanmoins s'implanter et pousser que dans un certain sol (« soil ») favorable à leurs besoins.

Chez l'homme, certaines tumeurs métastasent dans certains organes précis. Par exemple et comme mis en avant par Stephen Paget, le cancer du sein métastase principalement au niveau des poumons, du foie, des os et du cerveau. Le cancer colorectal va plutôt avoir tendance à former des métastases au niveau du foie, alors que le cancer de la prostate va principalement coloniser les os. Le cancer du rein quant à lui, va envahir principalement les poumons et le foie (Mejean and Lebret 2008). Au contraire, certains organes tels que les muscles sont très rarement atteints par les métastases (Seely 1980). Ce constat soulève l'idée de l'existence de conditions particulières qui pourraient être favorables à l'implantation des cellules tumorales.

Les mécanismes sous-jacents sont peu connus, mais ont sûrement une composante microenvironnementale, c'est ce que l'hypothèse de Stephen Paget laisse présager. Il existerait donc des organes favorables à l'implantation, la survie, ou encore la sortie de dormance des cellules tumorales dans certains organes. Au contraire, certains organes ne sont pas ou peu capables d'accueillir les cellules tumorales. Certains organes pourraient ainsi être prédisposés à accueillir les cellules tumorales.

Depuis quelques années, des observations de ces spécificités tissulaires ont été complétées avec des études biologiques comportant des interactions moléculaires entre les cellules et le microenvironnement qui pourraient dicter la spécificité tissulaire des métastases.

Des voies de signalisation, des facteurs de croissance ou encore des chimiokines ont été identifiées comme pouvant participer à la spécificité tissulaire. C'est le cas du couple récepteur CXCR4 dans le cancer du sein et dont le ligand (CXCL12/SDF-1) est fortement exprimé dans les organes ciblés par les métastases (Muller, Homey et al. 2001). De même, l'expression du récepteur CX3CR1 par les cellules pancréatiques induirait l'attraction des cellules tumorales pour les neurones périphériques exprimant le ligand CX3CL1 (Marchesi, Piemonti et al. 2008).

La modulation à distance du microenvironnement par la tumeur primaire a de plus été montrée dans certains modèles animaux. Par exemple, dans un modèle de cancer du sein, la tumeur primaire serait capable de stimuler l'invasion des poumons, cibles de métastases, par des cellules immunitaires de type granulocytes neutrophiles (Kowanetz, Wu et al. 2010, Granot, Henke et al. 2011). Cette idée complique le système et rend les possibilités bien plus intrigantes, puisque le microenvironnement tissulaire d'un autre organe peut ainsi être modulé par la tumeur primaire, et ce, à distance.

Le microenvironnement tissulaire dans lequel les cellules se trouvent une fois entrées dans le nouvel organe est à prendre en compte. Il doit être favorable à l'implantation précoce des cellules tumorales et permettre leur survie. Ce tropisme peut aussi s'expliquer par la spécificité voir la modulation de l'endothélium vasculaire favorisant ainsi l'extravasation et l'entrée dans le nouvel organe, principe évoqué dans les chapitres sur l'arrêt et l'extravasation des cellules tumorales.

D-2-b / Rétention mécanique

A cette première théorie mettant en jeu des interactions spécifiques s'oppose une autre théorie, qui postule que le ou les sites principaux de formation de métastases ne reflètent que le piégeage des cellules tumorales par les capillaires du premier organe qu'elles traversent. Ainsi, si on reprend un exemple de tropisme déjà évoqué, les cellules tumorales provenant de tumeurs coliques iraient se loger dans le foie, par la circulation de la veine porte. Le foie serait donc le premier organe traversé pouvant retenir mécaniquement les cellules tumorales. Par cet angle de vue, le tropisme ne serait donc pas dû à une implantation induite par des interactions spécifiques entre les cellules tumorales et le tissu ciblé. Il proviendrait simplement de la

faculté des cellules tumorales retenues par les capillaires de ces organes, à survivre dans la circulation, envahir le tissu et proliférer dans un nouveau tissu présentant son propre microenvironnement particulier.

Cet angle de vue, bien que persuasif, n'exclue pas totalement la première hypothèse. En effet, il est probable que les deux hypothèses coexistent et participent ensemble à la formation de métastases. Le rôle du microenvironnement ne serait donc pas à exclure. Si l'effet des chimiokines ne serait pas lié directement au tropisme, il favoriserait la migration et l'invasion des cellules tumorales dans le nouveau tissu, ainsi que la prolifération des cellules.

III / Le microenvironnement tumoral

Une tumeur n'est pas seulement constituée de cellules tumorales. Une partie des cellules retrouvées sont des cellules dites stromales qui peuvent contenir des cellules immunitaires, des fibroblastes, ou encore des cellules endothéliales. Dans ce microenvironnement, l'ECM, un autre constituant non cellulaire a son importance. Chacun des composants de ce microenvironnement peut affecter le développement et la progression tumorale.

A / Matrice Extracellulaire et cancer

Chaque tissu est constitué d'ECM qui va permettre de réguler la stabilité du tissu, mais aussi son intégrité et ses fonctions. Lors de la formation d'un tissu ou d'un organe, l'ECM déposé devient spécifique grâce à une composition unique. L'ECM est composée de nombreux constituants aux propriétés biochimiques distinctes, pouvant inclure des protéines, des glycoprotéines, ou encore des polysaccharides. Chacun de ces constituants a des propriétés physiques et biochimiques différentes (Stegemann, Hong et al. 2005, Shekaran and Garcia 2011).

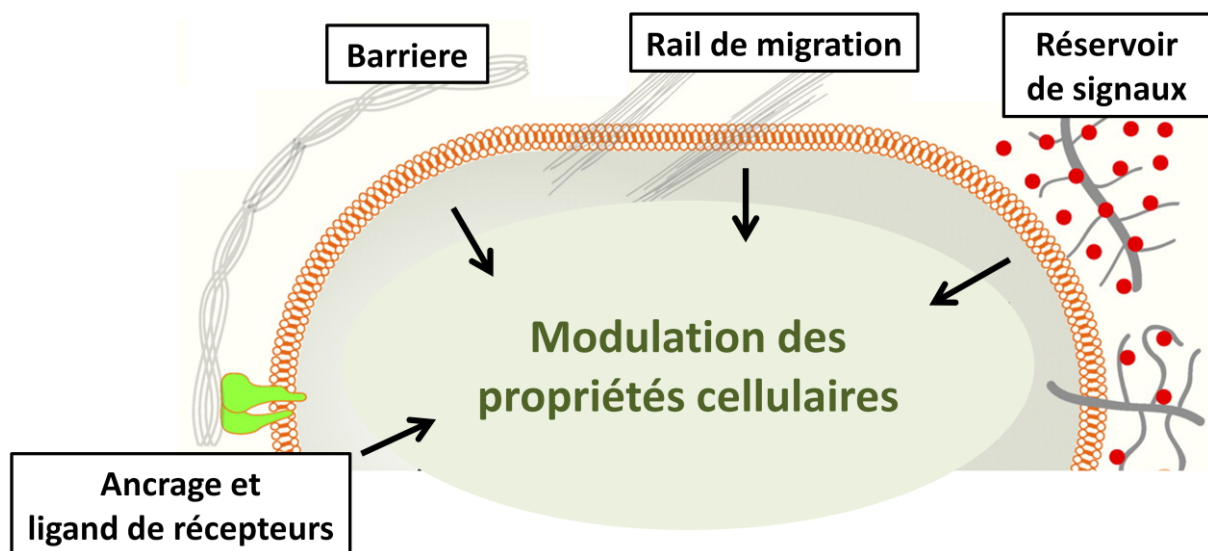


Figure 17 : L'ECM, des rôles multiples.

L'ECM peut jouer différents rôles : elle peut servir d'ancrage ou de ligand à la cellule via des récepteurs membranaires, servir de réservoir de signaux extracellulaires, permettre aux cellules de migrer ou à l'inverse servir de barrière physique aux cellules. Adaptation Lu, Weaver et al. 2012.

En fonction de la composition de cette ECM, la fonction opérée par celle-ci va varier. Les effets sur les cellules vont aussi pouvoir être influencés par sa composition. Cet ECM peut agir comme une barrière, un site d'ancrage, ou encore comme un rail de migration pour les cellules (Figure 17). Ainsi, l'ECM peut avoir un rôle tantôt positif ou tantôt négatif sur la migration cellulaire. L'ECM peut lier de nombreux facteurs de croissance, ce qui va lui permettre d'agir comme un réservoir, lui permettant d'être un régulateur des signaux solubles extracellulaires (Figure 17). L'ECM peut elle-même servir de ligand pour certains récepteurs et peut donc engendrer des signaux intracellulaires (Figure 17).

Lors des cancers, l'ECM est dérégulée. C'est une des caractéristiques des cancers. Cette dérégulation et notamment l'excès de dépôt ou la dégradation de cette ECM a déjà été traitée précédemment dans un chapitre traitant d'une des caractéristiques des cellules tumorales qu'est l'invasion. Le rôle de l'ECM dans le cancer ne s'arrête pas seulement aux propriétés invasives.

Dans un tissu sain, l'ECM joue un rôle de maintien de la polarité cellulaire et de maintien de l'architecture tissulaire. Il permet aussi de prévenir l'invasion des cellules tumorales. En revanche, sa dérégulation peut faciliter la dédifférenciation cellulaire, soutenir et participer à la progression tumorale. L'ECM peut donc jouer des rôles multiples, et un dépôt anormal d'ECM peut ainsi provoquer de nombreuses dérégulations au sein du tissu. Une augmentation du dépôt de collagène ou encore une modulation de la rigidité de l'ECM peut engendrer la survie cellulaire, perturber la polarité tissulaire ou encore la prolifération cellulaire (Wozniak, Desai et al. 2003, Paszek, Zahir et al. 2005).

Des changements dans la composition et la dynamique de l'ECM vont donc affecter directement les cellules tumorales et l'évolution de la maladie. Elle peut moduler les cellules stromales telles que les fibroblastes (ceux-ci étant eux-mêmes responsables du dépôt anormal d'ECM), les cellules endothéliales, ou encore les cellules immunitaires. De ce fait, la dérégulation de l'ECM, évoquée précédemment, peut permettre de générer, voir même d'entretenir un microenvironnement pro-tumoral (Quail and Joyce 2013).

La dérégulation de l'ECM peut affecter les cellules tumorales, en modifiant l'architecture tissulaire ou en favorisant des processus tels que la prolifération, la survie ou encore l'invasion des cellules dans le tissu. Parmi les différents types d'ECM pouvant jouer

un rôle dans le développement et l'évolution tumorale, on retrouve les collagènes et la fibronectine qui en sont les principaux constituants. On peut retrouver d'autres matrices telles que la tenascine-c, ou la périostine, évoquée précédemment et ayant un rôle notamment dans l'établissement de la niche métastatique.

A-1 / ECM dans les cancers

A-1-a / Les collagènes, et le collagène de type I

Le collagène, ou plutôt les collagènes, sont les membres les plus abondants de l'ECM. Le collagène est la protéine la plus abondante dans le corps humain, pouvant atteindre jusqu'à 30% du poids sec (Karsenty and Park 1995, Di Lullo, Sweeney et al. 2002). Le collagène est une famille de protéines composée de 28 membres. Il est synthétisé sous forme monomérique de tropocollagènes qui vont pouvoir s'associer une fois dans le milieu extracellulaire, pouvant ainsi former les polymères. Selon la structure formée par les polymères, les membres de la famille des collagènes sont divisés par catégories : les collagènes fibrillaires et non fibrillaires.

Les collagènes dits fibrillaires, comme leurs noms l'indiquent, forment des structures en fibre. Cette famille comprend entre autre les collagènes de type I, II, III, V et tout récemment XIV et XVII, que l'on retrouve essentiellement dans les tissus conjonctifs.

Parmi les collagènes non fibrillaires on retrouve divers types de collagènes. Les collagènes associés aux fibrilles (FACIT, collagènes IX, XII, XVI, par exemple) vont s'associer à la surface des collagènes fibrillaires et vont pouvoir les relier les uns aux autres, mais aussi avec d'autres membres de l'ECM. Le collagène de Type IV forme des structures en feuillets, formant des réseaux, et est retrouvé au niveau des lames basales des épithéliums (Exposito, Valcourt et al. 2010). Enfin, le collagène XVII (appelé aussi BP180) est membranaire (Powell, Sakuma-Oyama et al. 2005).

Lors de cancer, les collagènes sont souvent dérégulés c'est le cas notamment pour le collagène de type I (Kauppila, Stenback et al. 1998). Le collagène de type I est le collagène le plus abondant dans le corps humain (Karsenty and Park 1995). Il fait partie des collagènes

fibrillaires (Exposito, Valcourt et al. 2010) et son implication dans certaines pathologies a été montrée. Par exemple il peut agir indirectement sur le microenvironnement lors de sa dégradation par les MMP-8 et 9, menant à l'attraction de neutrophiles dans l'inflammation pulmonaire (Weathington, van Houwelingen et al. 2006). De plus, l'activation du récepteur DDR1 par le collagène de type I provoque l'infiltration de macrophages lors de la formation d'athérome (Franco, Britto et al. 2009).

Dans le cancer, le collagène de type I est souvent dérégulé et peut promouvoir l'infiltration de cellules immunitaires, tout en inhibant la capacité des macrophages à s'attaquer aux cellules tumorales (Kaplan 1983). Dans le cancer du pancréas, le collagène de type I induit des propriétés invasives dans les cellules tumorales, notamment *via* l'induction de *Snail* (Armstrong, Packham et al. 2004, Shields, Dangi-Garimella et al. 2011). Son rôle a aussi été montré dans les cancers ovariens, par l'activation des intégrines (Shen, Shen et al. 2012). De plus, l'expression de collagène de type I dans certaines tumeurs primaires est associé à la formation de métastases (Ramaswamy, Ross et al. 2003). Bien que le rôle possible du collagène de type I ait été approché dans de nombreux types de cancers, il semble qu'aucune donnée sur le rôle de ce type de collagène ne soit connu dans le RCC.

A-1-b / La fibronectine

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine formée par l'association en dimère de deux sous-unités très similaires. Malgré que la FN provienne d'un seul et unique gène, la protéine qui en résulte peut exister sous plusieurs formes, résultants d'épissages alternatifs. A partir d'un seul ARNm, de nombreux variants ont été identifiés (French-Constant 1995, Kosmehl, Berndt et al. 1996). Comme la plupart des membres de l'ECM, la FN a la faculté de lier certains autres membres de l'ECM tels que les collagènes fibrillaires, ainsi que de lier et d'activer des récepteurs membranaires. La FN peut donc générer une large variété d'interactions avec les cellules et l'ECM, et joue un rôle dans des processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la différenciation ou encore la croissance (Pankov and Yamada 2002).

Dans le RCC, l'expression de fibronectine corrèle avec une plus forte mortalité, et serait donc un facteur de mauvais pronostic (Waalkes, Atschekzei et al. 2010, Steffens, Schrader et al. 2012).

A-2 / Principaux récepteurs du collagène et de la FN

L'une des fonctions de l'ECM est de transduire un message intracellulaire. Ceci passe par l'association et l'activation de récepteurs, qui peuvent être spécifiques en fonction du type d'ECM. Les intégrines sont les récepteurs à l'ECM les plus étudiés, mais d'autres récepteurs peuvent interagir avec l'ECM.

A-2-a / Les intégrines

Les récepteurs majeurs de l'ECM sont représentés par les intégrines. Ces récepteurs sont des hétérodimères transmembranaires formés par l'association de deux sous unités appelées α et β . Il a été identifié 18 intégrines α et 8 intégrines β . Il existe une multitude de couples α/β possibles, et chaque couple d'hétérodimères peut lier différentes molécules extracellulaires. Par exemple, les couples d'intégrines $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, et $\alpha_{11}\beta_1$ peuvent reconnaître le collagène de type I (Letourneau, Condic et al. 1992, Adams 2001, Tzu and Marinkovich 2008, Schlie-Wolter, Ngezahayo et al. 2013) alors que des couples tels que $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_4$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ peuvent reconnaître la fibronectine (Letourneau, Condic et al. 1992, Altankov, Groth et al. 1997, Tzu and Marinkovich 2008, Schlie-Wolter, Ngezahayo et al. 2013).

Les intégrines ont la capacité d'influer sur de nombreuses voies intracellulaires en liant l'ECM. Par exemple, la majorité des intégrines recrutent et activent la kinase des adhésions focales (FAK). De même, l'activation des membres de la famille de la kinase Src (SFK) est souvent observée, ou encore l'activation de la voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), ainsi que la voie de Ras-Raf-Mek-Erk/Map Kinases, qui seront des médiateurs intracellulaires pouvant engendrer de nombreuses réponses cellulaires, tels que le remodelage du réseau d'actine (Figure 18).

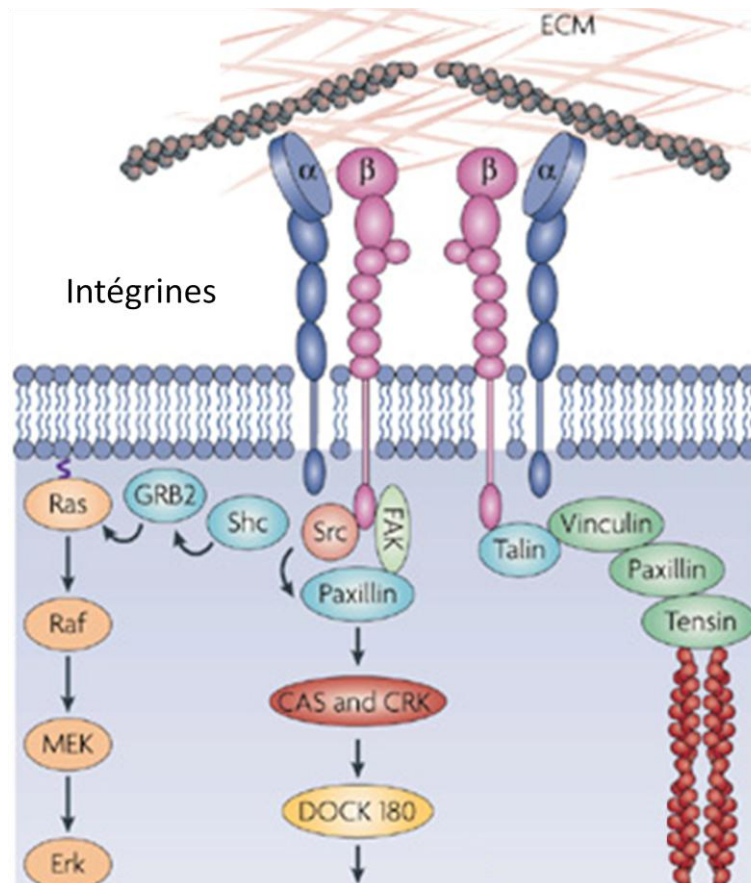


Figure 18 : Les intégrines, récepteurs transmembranaires capables de générer des signaux intracellulaires.

Lorsque les intégrines sont activées par leur substrat, elles vont générer l'activation de certaines voies telles que la voie des MAP Kinases, Src, FAK, générant ainsi une réponse cellulaire. Les intégrines peuvent aussi participer aux réarrangements du cytosquelette d'actine. Adaptation Avraamides, Garmy-Susini et al.2008.

Selon les couples d'intégrines exprimés et l'ECM présente, les effets engendrés peuvent être nombreux. Il peut s'agir de la régulation de la prolifération, de la survie, du contrôle de l'expression de certains gènes, de la réorganisation du cytosquelette d'actine ou encore et la migration (Guo and Giancotti 2004).

Dans les cancers, la modulation d'expression des intégrines a été identifiée. L'expression ou la suppression de certains couples d'intégrines peuvent influencer l'évolution de la maladie. (Plantefaber and Hynes 1989, Zutter, Mazoujian et al. 1990, Bonkhoff, Stein et al. 1993, Danen, Jansen et al. 1995, Melchiori, Mortarini et al. 1995). Le couple d'intégrine $\alpha_3\beta_1$ favorise l'invasion (Melchiori, Mortarini et al. 1995). De même, le couple $\alpha_v\beta_3$ a été identifié comme favorisant la progression tumorale (Danen, Jansen et al. 1995).

A-2-b / Récepteurs à Domaine Discoïdine (DDR)

Les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) sont des récepteurs tyrosine kinases qui reconnaissent les collagènes comme leurs ligands (Vogel, Gish et al. 1997). La famille des DDRs est composée de deux membres, DDR1 et DDR2. Ils possèdent un domaine à activité kinase. Les DDRs sont des récepteurs dimériques qui s'autophosphorylent en liant le collagène, engendrant la régulation de voies de signalisation ainsi que divers processus cellulaires. A ce jour, seules des homo-dimérisations de ces récepteurs ont été montrées.

Il existe certaines spécificités dans la liaison et l'activation des DDRs. En effet, DDR1 et DDR2 peuvent être activés par les collagènes fibrillaires I, II, III et V, alors que le collagène de type IV ne peut activer que DDR1 (Vogel, Gish et al. 1997, Leitingner 2003). Bien que les DDRs préservent la capacité de lier le collagène de type 1 monomérique ou polymérisé (Agarwal, Kovac et al. 2002, Ferri, Carragher et al. 2004, Agarwal, Mihai et al. 2007), il semble que le collagène monomérique possède une moins grande faculté d'activation de DDR2 comparé à la forme polymérisée. Des altérations de l'ECM engendrant le remodelage du collagène pourraient donc entraîner des altérations dans la signalisation des DDRs (Wall, Werner et al. 2005, Bhadriraju, Chung et al. 2009).

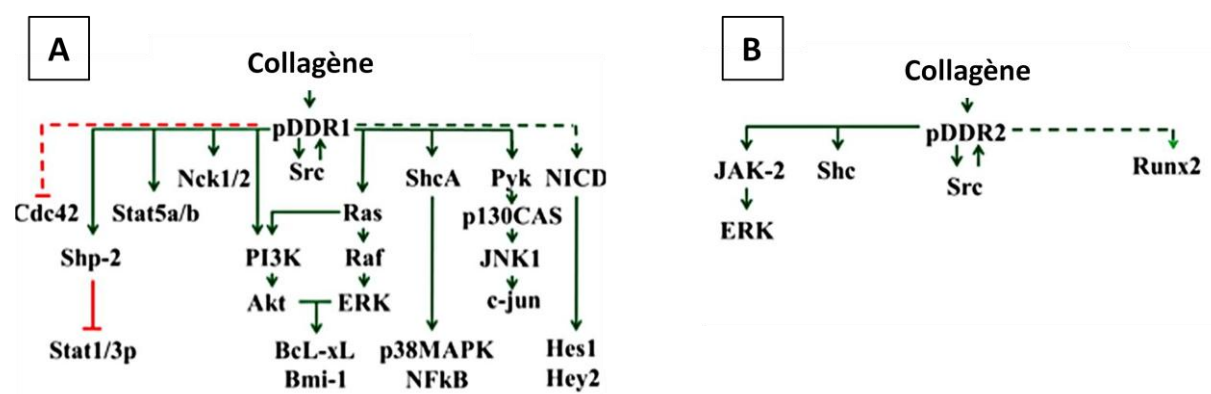


Figure 19 : Exemples de voies de signalisation pouvant être modulées par les DDRs.

Les DDRs sont des récepteurs tyrosine kinases capables, lorsqu'ils sont activés, d'induire des voies de signalisation intracellulaires telles que Src, les MAP Kinases, ou encore la voie de PI3K. Adaptation Valiathan, Marco et al. 2012.

Lors de leur activation, DDRs présentent une dynamique qui diffère des autres RTK. Leur activation va engendrer une autophosphorylation qui va être d'une part délayée, mais qui va aussi être maintenue dans le temps (Vogel, Gish et al. 1997). Cette dynamique fait parti des moyens d'identifier l'implication de ces récepteurs *in vitro*. L'activation des DDRs va

engendrer l'activation de voies de signalisation, telles que les voies de Src et de Ras-Raf-Mek-Erk (MAP Kinases), ou encore la voie Akt (Lu, Trcka et al. 2011, Ruiz and Jarai 2011). DDR2 peut être phosphorylé par Src, stimulant ainsi son autophosphorylation et donc son activation (Yang, Kim et al. 2005) (Figure 19). La phosphorylation de DDR1 par Src est controversée.

Comme de nombreux RTK, les DDRs ont la faculté d'interagir avec les intégrines, pouvant soutenir ou antagoniser leurs effets (Wang, Su et al. 2006, Shintani, Fukumoto et al. 2008, Suh and Han 2011, Xu, Bihan et al. 2012).

Dans le cancer, des mutations de ces récepteurs ou des amplifications de ceux-ci ont été reportés (Hammerman, Sos et al. 2011, Cancer Genome Atlas 2012). Des niveaux d'expression supérieurs ont été recensés dans de nombreux types de cancers. Dans le cancer de la thyroïde, DDR2 est fortement exprimé chez les patients possédant des métastases et est l'un des gènes les plus exprimés dans les patients décédés de la maladie (Rodrigues, Roque et al. 2007). Dans le cancer du foie, le niveau d'ARNm de DDR1 est élevé et a été corrélé avec le grade de la tumeur (Shen, Cicinnati et al. 2010). Les niveaux d'expression des DDRs ont été étudiés dans de nombreux autres types de cancers mais il semble qu'aucune étude n'ait été menée sur le RCC.

Outre leurs niveaux d'expression, le rôle de ces récepteurs a été mis en évidence dans certains cancers. Les DDRs peuvent jouer un rôle dans l'activation de certains gènes ou processus favorables à la progression tumorale tels que la migration, l'invasion, le remodelage de l'ECM, ou encore la croissance. Par exemple, DDR1 joue un rôle dans la migration collective dans le carcinome épidermoïde cutané (Hidalgo-Carcedo, Hooper et al. 2011) et dans l'invasion dans le carcinome hépatocellulaire (Park, Kim et al. 2007). DDR2 participe au mécanisme de métastases dans le cancer du sein (Ren, Zhang et al. 2014). DDR1 peut provoquer l'expression de la N-cadhérine en coopération avec l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, pouvant donc favoriser l'EMT (Shintani, Fukumoto et al. 2008). La surexpression de DDR2 a été montrée dans un modèle de fibrose hépatique (EMT de type 2) (Zhang, Yan et al. 2010), et DDR2 a été montré comme favorisant aussi l'EMT dans le cancer du sein (Ren, Zhang et al. 2014). Ces récepteurs pourraient ainsi se révéler favorable à la progression tumorale dans d'autres types de cancer, tels que le RCC, cancer où aucune étude sur les DDRs ne semble avoir été menée.

L'ECM est l'un des éléments constituant une tumeur et pouvant affecter la progression tumorale. Le système immunitaire fait lui aussi parti du microenvironnement tumorale et peut lui aussi jouer un rôle dans la progression tumorale.

B / Le système immunitaire dans le cancer

Le microenvironnement tumoral est constitué de nombreux types de cellules non tumorales appelées cellules stromales (Tlsty and Coussens 2006). Ces cellules stromales peuvent être directement impliquées dans l'initiation et la progression tumorale. On compte ainsi les cellules endothéliales, les fibroblastes, et certaines cellules de la moelle osseuse (BMDC) tels que des granulocytes ou des macrophages, ou encore des cellules souches mésenchymateuses. Comme évoqué précédemment dans les différentes étapes de la tumorigenèse, le système immunitaire et son contrôle par les cellules tumorales fait partie intégrantes des processus qui peuvent affecter le développement tumoral. L'infiltration de leucocytes au sein des tumeurs est connue depuis bien longtemps.

Afin de former une tumeur primaire et d'effectuer les différentes étapes de la progression tumorale, un contrôle du système immunitaire est nécessaire. Les cellules cancéreuses vont donc devoir échapper à la surveillance du système immunitaire en empêchant sa mobilisation contre la tumeur. Elles peuvent de plus influencer sur le système immunitaire afin de le rendre plus favorable.

B-1 / Granulocytes neutrophiles

Le rôle des granulocytes neutrophiles dans la progression tumorale est aujourd'hui controversé. Lors d'une réponse immunitaire les neutrophiles sont les premières cellules dépêchées sur le lieu de l'infection. Ils seraient notamment impliqués dans les rejets de greffons lors de transplantations (Surquin, Buonocore et al. 2005). Ils pourraient être considérés comme capables aussi de s'attaquer aux cellules tumorales. Dans certains types de cancers, les granulocytes neutrophiles ont tendance à être associés à un mauvais pronostic, ce serait le cas dans le carcinome bronchiolo-alvéolaire (Bellocq, Antoine et al. 1998), de même, un haut ratio neutrophiles/lymphocyte est aussi associé à un mauvais pronostic dans le RCC

(Hu, Lou et al. 2015). Il semble néanmoins qu'un fort niveau de neutrophiles ayant infiltrés la tumeur soit un marqueur de meilleur pronostic dans le carcinome gastrique (Caruso, Bellocco et al. 2002).

Les modèles d'étude murins ne semblent pas vouloir apporter un rôle clair à ces neutrophiles. En effet, deux études similaires dans un modèle de cancer du sein montrent des résultats opposés. L'un d'entre eux tend à prêter un rôle pro-métastatique aux neutrophiles, (Kowanetz, Wu et al. 2010) quand l'autre leur prête un rôle anti-métastatique (Granot, Henke et al. 2011). Ces deux études partent d'une observation commune qui est une accumulation de neutrophiles au sein du poumon lors de la phase pré-métastatique, c'est-à-dire une phase où le poumon ne présente aucune cellule tumorale.

B-2 / Axe lymphocytes T et Cellules NK

Comme évoqué dans les traitements du RCC, l'axe Lymphocyte T / Cellules NK peut avoir un rôle dans le cancer. L'infiltration de ces cellules dans les tumeurs est souvent considérée comme un facteur de bon pronostic (Coca, Perez-Piqueras et al. 1997, Ishigami, Natsugoe et al. 2000). Bien que le rôle des cellules NK ait été plutôt étudié dans l'optique de traitement anti-métastatiques, (Hanna and Burton 1981, Whiteside, Vujanovic et al. 1998), et en particulier dans le modèle de RCC murin Renca (Salup, Herberman et al. 1985), le contrôle des cellules NK semble important pour les cellules tumorales. L'efficacité des traitements à l'interleukine-2, stimulant l'axe Lymphocyte T / Cellules NK dans le RCC métastatique, soutient leur implication dans les processus anticancéreux, et ce, même si leur efficacité n'est pas aussi important qu'espéré.

B-3 / Monocytes et Macrophages

Les macrophages forment la population majeure de leucocytes présents dans le microenvironnement tumorale. Les macrophages sont des monocytes matures, que l'on retrouve dans les tissus. Le monocyte est la forme immature retrouvée essentiellement dans le sang. Les monocytes ont la faculté de pouvoir migrer au sein des tumeurs en réponse à certains facteurs attractants produits par la tumeur. Une fois activés, les macrophages sont une

des sources de facteurs de croissance, de protéases, et de cytokines au sein de la tumeur (Lin and Pollard 2004).

Dans de nombreux cancer, ces macrophages associés aux cancers (TAMs) contribuent grandement à la croissance tumorale et à la formation de métastases. Ils sont de plus associés à un mauvais pronostic dans certains types de cancer tels que le cancer du sein, de la prostate, du poumon, ou encore dans le gliome (Bingle, Brown et al. 2002). De la même façon, la surexpression de facteurs pouvant attirer les macrophages au sein des tumeurs est souvent associée à un mauvais pronostic. C'est notamment le cas de CSF-1 dont la surexpression corrèle avec un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Kacinski 1997), ou dans le cancer de la prostate (Richardsen, Uglehus et al. 2008). La survie et la différenciation des macrophages semblent être médiées par CSF-1. L'un des effets reportés par le rôle de la stimulation des macrophages par le CSF-1 est l'expression du VEGF, provoquant ainsi la stimulation de processus pro-angiogéniques au sein de la tumeur (Curry, Eubank et al. 2008). D'autres facteurs tels que l'EGF, le $TNF\alpha$, le $TGF\beta$, des protéases, ou encore l'IL-6 sont connus pour être produits par les macrophages et peuvent participer à la dégradation de l'ECM, faciliter l'invasion et favoriser l'angiogenèse. Leur rôle peut ainsi passer par la croissance tumorale, l'angiogenèse et la motilité des cellules tumorales (Coussens and Werb 2002, Lin and Pollard 2004). Récemment, une nouvelle interleukine a été découverte comme pouvant activer le même récepteur que le CSF-1 : CSF-1R. Cette interleukine a été appelée Interleukine-34 (IL-34).

B-3-a / L'interleukine-34

En 2008, une nouvelle cytokine appelée Interleukine-34 (IL-34) a été découverte par l'équipe de Lin et al, suite à un criblage de protéines recombinantes. Leur étude menée sur une large gamme de cellules n'a montré que des effets sur les monocytes (Lin, Lee et al. 2008). Elle est capable de recruter des macrophages avec la même efficacité que le CSF-1, et peut lier le même récepteur (CSF-1R) (Lin, Lee et al. 2008) ainsi que le récepteur-type protéine-tyrosine phosphatase ζ (PTP- ζ) (Nandi, Cioce et al. 2013). Ce sont à ce jour les deux seuls récepteurs connus pour l'IL-34. Ce dernier récepteur est exprimé notamment dans le cerveau (Nandi, Cioce et al. 2013). Il peut de plus être par les cellules épithéliales tubulaires rénales (Baek, Zeng et al. 2015).

Bien que liant le même récepteur, leurs effets ne se recourent pas entièrement. L'IL-34 et le CSF-1 stimulent la survie et la croissance, mais n'ont pas les mêmes capacités d'induction de chimiokines sur des macrophages (Chihara, Suzu et al. 2010, Nakamichi, Udagawa et al. 2013). Le site de liaison sur le récepteur ne serait pas non plus le même (Nakamichi, Udagawa et al. 2013). Les effets induits par CSF-1 et IL-34 par le récepteur peuvent donc ne se recouper que partiellement. L'IL-34 peut être substitué au CSF-1 dans la production d'ostéoclastes (Baud'huin, Renault et al. 2010). Tout comme le CSF-1, IL-34 semble pouvoir réguler certaines cytokines présentes dans le sang, tels que l'interleukine 6, ou le TNF α (Eda, Zhang et al. 2010). L'IL-34 peut elle-même être détectée dans le sérum (Moon, Hong et al. 2013), ses effets directs et indirects pourraient ainsi avoir un rôle bien plus large qu'un rôle local dans les tumeurs. L'IL-34 favorise la différenciation de monocytes en macrophages ayant des capacités immunosuppressives (Macrophages de type M2 donc), notamment en limitant la prolifération des lymphocytes T, comme le fait le CSF-1 (Foucher, Blanchard et al. 2013).

Le rôle d'IL-34 dans le cancer reste néanmoins peu connu, bien qu'il puisse être exprimé par les cellules tumorales (Baud'huin, Renault et al. 2010, Segaliny, Mohamadi et al. 2015). Il participerait à la progression tumorale, en recrutant des macrophages et en induisant l'angiogenèse, ainsi qu'en favorisant les métastases pulmonaires (Segaliny, Mohamadi et al. 2015). Certaines cellules tumorales peuvent exprimer le récepteur CSF-1R (Baud'huin, Renault et al. 2010), c'est notamment le cas des cellules de RCC (Menke, Kriegsmann et al. 2012). L'IL-34 peut donc avoir un rôle direct sur les cellules tumorales.

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules de carcinome rénal murin (Renca) et les cellules Renca exprimant la GFP (Renca-GFP) ont été cultivées dans un milieu RPMI (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco), 1mM de pyruvate de sodium, 2 mM Glutamine (Gibco), 100 U/ml de pénicilline (Gibco), 100 µg/ml de streptomycine (Gibco) (milieu complet). Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ en atmosphère humide.

Préparation des cultures sur ECM

Les puits ou les boîtes de cultures ont été tapissées ou non avec du collagène de type I de queue de rat (300µg/ml, BD/Corning), de la fibronectine de plasma bovin (5µg/ml, Sigma), ou du Matrigel réduit en facteurs de croissances (33µg/ml, BD Biosciences) dilués dans un tampon phosphate (PBS) pendant 1 heure à 37°C, puis rincés 3 fois avec du PBS.

Immunocytochimie

Les cellules ont été fixées en utilisant du paraformaldéhyde (PFA, 4%, Chemcruz), puis perméabilisées pendant 5 minutes en utilisant du triton X-100 (Sigma) à 0.1%. Les sites aspécifiques ont été bloqués en utilisant un tampon de blocage contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA, Euromedex) dilué dans du PBS. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage pendant 2 heures à température ambiante et en atmosphère humide. La liste des anticorps utilisés est référencée dans le Tableau 5. Après 3 lavages, les cellules ont été incubées 1 heure avec l'anticorps secondaire fluorescent (Ig de chèvre anti-souris, 1/500ème, Fluoprobes Interchim) et du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, 1µg/ml, Roche) afin de marquer les noyaux. Pour les expériences de marquages de l'actine, de la phalloïdine couplée à la rhodamine a été utilisée (1/500ème, Interchim).

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en immunocytochimie

Antigène	Anticorps primaire, dilution
β-caténine - murin	BD Biosciences (cat 610454), 1/500ème

Histochimie et immunohistochimie

Les tissus ont été fixés en utilisant de la PFA 4%, puis perméabilisés en utilisant du triton X-100 à 0.1%. Les sites aspécifiques ont été bloqués en utilisant un tampon de blocage contenant 1% de BSA dans du PBS. Les tissus ont ensuite été marqués avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C et en atmosphère humide. La liste des anticorps utilisés est référencée dans le Tableau 6. Après rinçages les tissus ont été incubés 2 heures à température ambiante avec les anticorps secondaires soit fluorescent, soit couplé à la peroxydase (HRP). Dans ce dernier cas, une réaction chimique permet de générer une coloration (utilisation du peroxyde d'hydrogène comme substrat), et une contre coloration à l'hématoxyline a été effectuée.

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

Antigène	Anticorps primaires, dilution
IL-34 - humain	Abcam (ab101443), 1/200ème

Tests de prolifération

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes 24 puits à raison de 20.000 cellules dans 500µL de milieu complet par puits. Les cellules ont ensuite été cultivées 72 heures à 37°C et 5% de CO₂, en atmosphère humide. Au bout des 72 heures, les cellules ont été rincées au PBS, décollées à l'aide de trypsine, puis comptées à l'aide d'un compteur de cellules (Beckman Coulter).

Pour les tests de prolifération utilisant le système IncuCyte (Essen BioScience), les cellules ont étéensemencées à 3000 cellules et des clichés ont été effectués toutes les 2 heures. La densité cellulaire a été évaluée en utilisant le logiciel IncuCyte (Essen BioScience).

Tests d'adhérences

Les cellules ont été décollées à l'aide de la trypsine. Après centrifugation, la trypsine résiduelle a été neutralisée par ajout de 5ml de milieu d'adhérence (RPMI, 0,5% de BSA) contenant 0,1mg/ml d'un inhibiteur de trypsine (inhibiteur de la trypsine de la graine de soja, STI, Sigma). Après 3 lavages dans du milieu d'adhérence, les cellules ont été incubées 1 heure dans du milieu d'adhérence afin de renouveler les récepteurs membranaires qui auraient été dégradés par la trypsine.

50 000 cellules ont ensuite été ensemencées dans des puits de boîtes 24 puits préalablement incubés pendant 15 minutes dans du milieu d'adhérence afin de bloquer les sites aspécifiques. Au bout de 10 minutes, 30 minutes ou 1 heure, les cellules qui n'ont pas adhéré ont été retirées et rincées 3 fois en utilisant du PBS. Les cellules adhérentes ont été fixées en utilisant du PFA 4%. Les noyaux de ces cellules ont été marqués au DAPI (1µg/ml) pendant 15 minutes et des champs aléatoires ont été photographiés au microscope inversé à fluorescence (Eclipse TE200, Nikon) en utilisant le logiciel (NIS, Nikon). Les cellules marquées au DAPI ont ensuite été dénombrées en utilisant le logiciel ImageJ (NIH).

Tests de migration/invasion en chambre de Boyden

Les tests de migration et d'invasion ont été effectués par la méthode des inserts, contenant une membrane percée de pores de 8µm (Fischer Scientific). Les cellules ont été ensemencées à une densité de 50.000 cellules dans 200µL de RPMI dans la partie supérieure de l'insert. Si les expériences nécessitaient de la matrice, l'insert a été tapissé avec de l'ECM. Dans la partie inférieure, 700µl de RPMI contenant 10% de SVF ont été ajoutés. Après 16 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, en atmosphère humide, l'insert a été rincé, fixé 10 minutes grâce à du PFA 4%, et les cellules ont été marquées au DAPI (1µg/ml) pendant 15 minutes. Les cellules de la partie supérieure de l'insert ont été retirées grâce à un coton-tige. Les cellules ayant migré à travers l'insert ont été photographiées au microscope inversé à fluorescence (Eclipse TE200, Nikon) et à l'aide du logiciel NIS (Nikon) dans 5 champs aléatoires et dénombrées en utilisant le logiciel ImageJ (NIH).

Tests de migration en vidéomicroscopie

Les cellules ont été ensemencées à 1000 cellules dans des plaques 48 puits. 24 heures après l'ensemencement, les cellules ont été photographiées toutes les 15 minutes en utilisant un vidéomicroscope (Eclipse TI, Nikon) et à l'aide du logiciel NIS (Nikon).

Les vitesses de migration des cellules ont ensuite été déterminées en utilisant le logiciel ImageJ (NIH) et le module d'extension MTrackJ.

Test de la cicatrice (« Wound Healing »)

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits spécialement adaptées de façon à atteindre la confluence. 24 heures après ensemencement, une cicatrice a été effectuée

dans les puits et les cellules ont été photographiées toutes les 2 heures en utilisant le système IncuCyte (Esse, BioScience). Le pourcentage de recouvrement de la cicatrice a été quantifié en utilisant le logiciel IncuCyte (Essen Bioscience).

Western Blots

Les cellules ont été rincées avec du PBS afin de retirer le milieu de culture, puis lysées en utilisant un tampon Ripa (50mM Tris (pH 7,4), 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5% déoxycholate), additionné d'inhibiteurs de protéases (cOmplete, Mini, Roche) et d'inhibiteurs de phosphatases (PhosSTOP, Roche). Les échantillons ont été soit directement utilisés soit conservés à -20°C.

Après détermination de la concentration protéique grâce au réactif de Bradford (Bio Basic Inc.), une quantité égale de protéine a été prélevée et a été dénaturée grâce à du tampon Laemmli (Tris-HCL 63mM, SDS 2%, glycérol 10%, β -mercaptoéthanol 0.1%, bleu de bromophénol), puis chauffée à 100°C pendant 5 minutes. Les protéines ont été séparées dans un gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été saturée en utilisant un tampon de blocage (TBS-T 5% BSA, ou un tampon fourni par Licor, adapté au système Odyssey). Les membranes ont été incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps d'intérêt. La liste des anticorps est répertoriée dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot

Cible	Anticorps, dilution
Phospho-p42/44 MAPK – pERK - murin	Cell Signaling (#4370S), 1/500ème
Phospho-Src (p-Src) - murin	MBL International Corp. (AT-7135) 1/500ème
Phospho-FAK (p-FAK) - murin	Cell Signaling (#3283), 1/500ème
GAPDH - murin	Santa Cruz (sc-25778), 1/1000ème
β -caténine - murin	BD Biosciences (cat 610454) ,1/1000ème
DDR1 - murin	Cell Signaling (#5583), 1/500 ^{ème}
DDR2 - murin	Cell Signaling (#12133), 1/500ème
Phospho-Tyrosine (p-Tyr)	EMD Millipore,(ref 05-321), 1/1000ème

La révélation des anticorps primaires a été effectuée à l'aide d'anticorps spécialement adaptés au système de révélation par fluorescence (Odyssey CLx, Licor). Les résultats ont ensuite été analysés en utilisant le logiciel ImageStudio (Licor).

Immunoprécipitations

Les cellules ont été lysées en utilisant un tampon de lyse (50 mM Hepes, 150mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 5mM EDTA, 10% glycérol, 1% triton x-100, 0,5% NP40), additionné d'inhibiteurs de protéases (cOmplete, Mini, Roche) et d'inhibiteurs de phosphatases (PhosSTOP, Roche).

Les quantités de protéines ont été évaluées en utilisant le réactif de Bradford (Bio Basic Inc). 1mg/500µl des lysats cellulaires ont été incubés à 4°C pendant 16 heures, sous agitation, en présence de 5µl d'anticorps. Le Tableau 8 répertorie les anticorps utilisés lors des expériences d'immunoprécipitation.

Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation

Cible	Anticorps
DDR1 - murin	DDR1 - Cell Signaling (#5583)
DDR2 - murin	DDR2 - Cell Signaling (#12133)

Les suspensions ont ensuite été incubées avec de la protéine G couplée à des billes de sépharose (Sigma) pendant 1 heure sous agitation, afin de piéger les anticorps. Les billes de sépharose ont ensuite été séparées du surnageant par centrifugations. Après 3 étapes de lavage dans du tampon de lyse, les billes ont été incubées avec un tampon Laemmli et chauffées à 100°C pendant 5 minutes. Ces échantillons ont ensuite été utilisés dans des expériences de western blot.

Extraction des ARN et qRT-PCR

Les ARNs des cellules ont été extraits soit en utilisant la méthode du TRIzol (Thermo Fisher Scientific) ou en utilisant un kit d'extraction (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen). Les quantités d'ARN ont été déterminées en utilisant un spectromètre (NanoDrop, Thermo Scientific).

Afin d'obtenir les ADNc, une transcription reverse a été effectuée sur les échantillons d'ARNs en utilisant un kit de Transcription Reverse (ThermoFisher Scientific).

Selon les analyses à effectuer les qPCR ont été effectuées en utilisant la technologie Sybr Green ou la technologie TaqMan. Les couples d'amorces utilisés sont répertoriés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Liste des amorces utilisées et technologie employée

Cible	Amorce 1 (F) ou Référence	Amorce 2 (R)	Technologie
Snail 1 - murin	5'-CACACGCTGCCTTGTGTCT	5'-GGTCAGCAAAAGCACGGTT	Sybr Green
Twist 1 - murin	5'-GGACAAGCTGAGCAAGATTCA	5'-GGACAAGCTGAGCAAGATTCA	Sybr Green
Zeb 1 - murin	5'-GCTGGCAAGACAACGTGAAAG	5'-GCCTCAGGATAAATGACGGC	Sybr Green
Zeb 2 - murin	5'-ATTGCACATCAGACTTTGAGGA	5'-ATAATGGCCGTGTCGTCGCTTC	Sybr Green
DDR1 - murin	5'-TCTCCCGAAGCTATCGGTTG	5'-TACCCGAAATCACCTCCTGTC	Sybr Green
DDR2 - murin	5'-ATCACAGCCTCAAGTCAGTGG	5'-TTCAGGTCATCGGGTTGCAC	Sybr Green
IL-34 - murin	Ref : Mm01243248_m1	(ThermoFisher Scientific)	TaqMan
CSF-1 - murin	Ref : Mm00432686_m1	(ThermoFisher Scientific)	TaqMan
HPRT - murin	Ref : Mm01545399_m1	(ThermoFisher Scientific)	TaqMan
IL-34 – humain	Ref : Hs00380956_m1	(ThermoFisher Scientific)	TaqMan
CSF-1 - humain	Ref : Hs01094429_m1	(ThermoFisher Scientific)	TaqMan
HPRT - humain	Ref : Hs99999909_m1	(ThermoFisher Scientific)	TaqMan

Les expériences de qPCR ont été effectuées en utilisant les systèmes StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) et analysées en utilisant le logiciel StepOne Software v3.2 (Applied Biosystems).

Obtention des milieux conditionnés

Les cellules ont étéensemencées à quantités égales dans du milieu complet. 48 heures plus tard, RPMI. 24 heures plus tard, les surnageants ont été récupérés et filtrés, puis conservés à -20°C, ou directement utilisés. Ces surnageants ont ensuite pu être utilisés dans les tests de zymographie, ou dans des tests d'ELISA

Zymographie

Un volume de milieu conditionné proportionnel au nombre de cellules présentes a été utilisé. Un tampon Laemmli ne contenant pas de β -mercaptoéthanol a été ajouté aux échantillons. Ceux-ci ont ensuite été chargés dans des puits de gels d'acrylamide (10%) contenant du collagène de type 1 (600 μ g/ml) ou de la gélatine (0,1%). Après migration, les gels ont été incubés dans un tampon de renaturation pendant 30 minutes sous agitation (2,5% triton X-100 dilué dans de l'eau). Les gels ont ensuite été incubés dans un tampon permettant l'activité enzymatique (50mM Tris-HCL, 0.2M NaCl, 5mM CaCl₂) pendant une nuit à 37°C et sous agitation. Les gels ont ensuite été colorés en utilisant une solution contenant du bleu de coomassie (0,5% bleu de coomassie, 5% méthanol, 10% acide acétique), puis décolorés dans de l'eau afin de faire apparaître les dégradations.

Inhibition des voies de Ras-Raf-Mek-Erk et de Src

Afin d'inhiber la voie Ras-Raf-Mek-Erk, un inhibiteur de MEK a été ajouté au milieu de culture (U0126, Sigma) à la concentration de 25 μ M.

Afin d'inhiber la voie de Src, un inhibiteur de Src a été ajouté au milieu de culture (Src Inhibitor 1, CAS 179248-59-0, Santa Cruz Biotechnology) à une concentration de 10 μ M.

Lors des expériences d'inhibition, les cellules ont été incubées 1 heure avec les inhibiteurs avant d'êtreensemencées.

Implantations des cellules

Pour les implantations des cellules en orthotopique, 100,000 cellules Renca-GFP ont été implantées sous la capsule rénale gauche de souris Balb/C femelles, dans 25 μ l de milieu RPMI basale.

Pour les injections en intraveineux (i/v) 500,000 cellules Renca-GFP ont été injectées dans la veine caudale de souris Balb/C femelles dans 100 μ l de milieu RPMI basale.

Isolement de cellules Renca issues de tumeurs primaires rénales ou de métastases pulmonaires

Les souris ont été anesthésiées avec une dose létale d'un mélange d'un anesthésique (Kétamine, Imalgene) et d'un analgésique (Xylazine, Rompun). Les tumeurs primaires et/ou les poumons ont été prélevés et découpés en petits morceaux en utilisant un scalpel. Après incubation des tissus en présence d'un mélange de collagénase I et collagénase III (Liberase TL, Roche) pendant 1 heure à 37°C sous agitation, les tissus ont été passés à travers une aiguille de 12G, puis au travers d'un tamis de 100µm afin d'améliorer la dissociation des tissus. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée à 1000g pendant 5 minutes afin de rincer la liberase, puis ressuspendu dans du milieu complet.

Les cellules ont ensuite été entretenues dans du milieu complet jusqu'à disparition des cellules primaires non tumorales. Pour chaque souris sacrifiée et pour chaque tissu, une culture indépendante a été générée, permettant ainsi d'obtenir plusieurs lignées pour chaque « type » de lignée et pour chaque générations de passages *in vivo*.

Réimplantations en série des cellules Renca-GFP isolées à partir de tumeurs ou de métastases.

Pour chaque type de lignées et chaque génération, plusieurs lignées ont pu être générées. Par exemple, pour la 5ème génération, 5 lignées « Kidney », 4 lignées « Lung » et 6 lignées « Tail » ont été générées. Lors des réimplantations de ces cellules, un mélange de quantités équivalentes de cellules de même types ont été implantées soit en orthotopique pour les lignées « Kidney » et « Lung », soit en intraveineux pour les « Tail » selon la méthode d'implantation décrite précédemment. Par exemple, afin de générer la 6ème génération de cellules de type « Kidney », une suspension de cellules « kidney » de 5ème génération contenant la même quantité de cellules des 5 lignées « Kidney » a été implantée sous la capsule rénale des souris.

Microarrays et analyses transcriptomiques

Une quantité égale d'ARN total de chaque échantillon a été amplifiée et converti en ARNc marqués à la Cyanine5 en utilisant un kit Agilent (Low Input Quick Amp Labelling Kit, Agilent) selon les recommandations du fournisseur. Les ARNc ont ensuite été hybridés

sur une puce de microarray permettant l'analyse du génome entier de souris (*Mus Musculus*) (Agilent).

Un algorithme a été utilisé afin de déterminer la significativité des expressions de chaque gène (Significance Analysis of Microarray, SAM), avec un False Discovery Rate (FDR) de 1%. L'enrichissement d'expression des gènes a été examiné en utilisant la librairie clusterProfiler.

Tests d'ELISA dirigés contre IL-34

Les tests d'ELISA ont été effectués en suivant les recommandations du fournisseur (R&D Systems). Brièvement, 50µL d'échantillons, ainsi qu'une gamme de concentration d'IL-34, ont été déposés dans des plaques tapissées d'anticorps anti-IL-34 dirigés contre la forme murine de la protéine et incubés 2 heures à température ambiante sous agitation.

Après rinçages, 100µl d'un mélange contenant un anticorps anti-IL-34 dirigé contre la souris et conjugué à une enzyme de révélation a été ajouté. Après incubation pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation, les anticorps ont été retirés et rincés. 100µL de substrat a été ajouté et incubé 30 minutes à température ambiante sans agitation. Après ajout de 100µL d'une solution permettant de stopper la réaction, les densités optiques (DO) ont été mesurées à 450nm.

Les DO ont été comparés à la gamme de concentration afin d'obtenir les concentrations d'IL-34 dans chacun des échantillons.

Tests statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5.01 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com

Résultats

Projet 1 – Modélisation de la progression tumorale dans le RCC en utilisant une approche de biologie des systèmes

Les différents processus mis en jeu lors de la progression tumorale sont encore mal connus, c'est notamment le cas pour la formation de métastases. Lors de la formation de la tumeur primaire, ou lors des étapes menant à la formation de métastases, des caractéristiques particulières sont acquises par les cellules.

En termes de traitements, l'une des particularités du RCC tient à sa résistance aux chimiothérapies traditionnelles. Le diagnostic, le pronostic et les décisions thérapeutiques cliniques sont basées essentiellement sur des informations histologiques telles que le grade nucléaire de Fuhrman ou le stade clinique TNM. Il n'existe aujourd'hui aucun biomarqueur permettant une optimisation des traitements, ou de savoir si les patients tireront bénéfice ou non d'un traitement donné. L'intégration de données variées telles que les données histologiques, moléculaires ou encore l'imagerie dans un modèle prédictible est aussi un enjeu.

Ce projet se positionne dans l'étude à grande échelle de différents processus ayant lieu lors de la progression tumorale en utilisant une approche de biologie des systèmes. La biologie des systèmes consiste en l'intégration de plusieurs niveaux d'informations pour comprendre le fonctionnement de systèmes biologiques. L'étude des relations et des interactions entre différentes parties du système biologique (cellules, réseaux de gènes, protéines, ...) peut permettre de comprendre le fonctionnement de la totalité du système. La biologie des systèmes débute généralement par l'étude des gènes et des protéines par un criblage à haut débit permettant de quantifier les changements dans le génome ou le transcriptome.

L'utilisation d'une approche de biologie des systèmes pourrait permettre d'apporter une quantité d'informations sur les mécanismes de l'évolution de la maladie. Ainsi, en utilisant un modèle syngénique de RCC murin, le modèle Renca, combiné à des analyses bioinformatiques et des modélisations mathématiques de données génomiques et transcriptomiques, nous souhaitons générer des données permettant de relier des changements moléculaires avec des mécanismes précis de la progression tumorale. L'intérêt des gènes candidats identifiés par ces méthodes passe par leur validation sur des données et des échantillons issus de patients humains.

Ce projet a été dirigé et encadré par Andreas Bikfalvi et co-encadré par Lindsay Cooley (Post-doctorante). Il a été financé par le Plan Cancer en 2012-2015 (Projet METASYS). Le projet METASYS fait intervenir trois interfaces : une composante biologique menée au laboratoire par l'équipe de Andréas Bikfalvi, une composante bioinformatique réalisée par un post-doctorant du laboratoire (Kim Clarke) en interaction avec Francesco Falciani de l'Institut de Biologie Intégrative de l'Université de Liverpool, et une composante de modélisation mathématique faisant intervenir l'équipe de Thiery Colin de l'Université de Bordeaux.

Résultats

I / Génération de lignées cellulaires de RCC murines agressives, outil clef du projet

Afin de mener à bien ce projet, la génération d'un outil était indispensable. En utilisant un modèle de RCC murin, le modèle Renca, et afin de générer différentes lignées optimisées pour différentes étapes de la progression tumorale, 3 différentes stratégies ont été employées. Elles ont permis de générer des lignées cellulaires utilisables *in vivo* et *in vitro*. Ces lignées sont l'outil clef du projet. La lignée Renca exprimant la GFP (Renca-GFP) a été utilisée comme lignée initiale. Cette lignée a été de ce fait appelée Lignée Parentale ou « p0 ». L'expression de la GFP a permis de repérer les cellules tumorales aussi bien *in vivo* que *in vitro*. Les différentes stratégies sont décrites ci-après.

A / Génération des lignées issues de la tumeur primaire : Lignée « Kidney »

Dans le but de générer des cellules ayant été optimisées pour des caractères provenant de tumeur primaire, une série de réimplantation de cellules provenant de tumeurs primaires ont été effectuées.

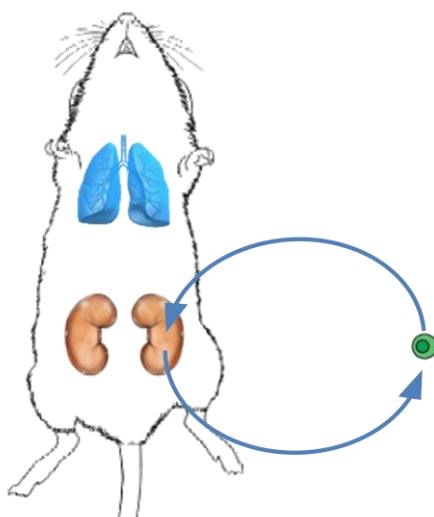


Figure 20 : Etablissement des lignées "Kidney", modèle de réimplantations rénales de cellules issues de tumeurs primaires.

Les cellules ont été implantées sous la capsule rénale de souris Balb/C. Après sacrifice, les cellules tumorales des tumeurs primaires ont été isolées, et réimplantées sous la capsule rénale de nouvelles souris Balb/C, permettant d'obtenir une nouvelle génération de cellules.

Ce type de lignée consistait en une réimplantation en séries, sous la capsule rénale, des cellules tumorales isolées à partir de tumeurs primaires orthotopiques de Renca-GFP. Par exemple, l'implantation orthotopique de lignée « Kidney » de 4ème génération ou « P4 » a donné lieu à la génération de tumeurs, qui ont permis de purifier les cellules de 5ème génération « P5 ». Ces mêmes cellules « P5 » réimplantées ont pu donner naissance à des tumeurs contenant les cellules tumorales de 6ème génération « P6 » (Figure 20). Les lignées générées ainsi ont été appelées « Kidney » du fait de leur provenance rénales.

B : Génération des lignées issues de métastases pulmonaires générées à partir de tumeur primaires : Lignée « Lung »

La deuxième stratégie visait à optimiser des caractères reproduisant l'intégralité des processus provenant à la fois de la tumeur primaire mais aussi des métastases.

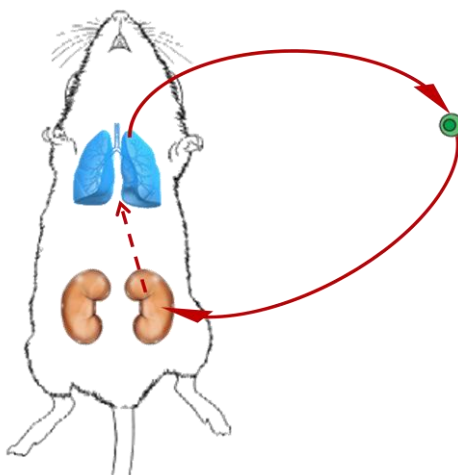


Figure 21 : Etablissement des lignées "Lung", modèle de réimplantations rénales de cellules issues de métastases pulmonaires.

Les cellules ont été implantées sous la capsule rénale de souris Balb/C. Après sacrifice, les cellules tumorales des métastases pulmonaires ont été isolées, et réimplantées sous la capsule rénale de nouvelles souris Balb/C, permettant d'obtenir une nouvelle génération de cellules.

Ce type de lignée consistait en une réimplanter en séries, sous la capsule rénale, des cellules tumorales isolées à partir de métastases pulmonaires. Ces métastases ont été générées *in vivo* par implantation orthotopique de cellules de la génération précédente, et qui ont ensuite été isolées dans les poumons. La réimplantation des cellules nouvellement isolées sous

la capsule rénale a ainsi permis de générer la lignée du passage suivant. (Figure 21). Les lignées générées ainsi ont été appelées « Lung » du fait de leur provenance pulmonaires.

C : Génération de lignées issues de métastases pulmonaires issues d'injection de cellules via la veine caudale : Lignées « Tail »

La dernière stratégie visait à reproduire certaines étapes seulement du processus de métastases.

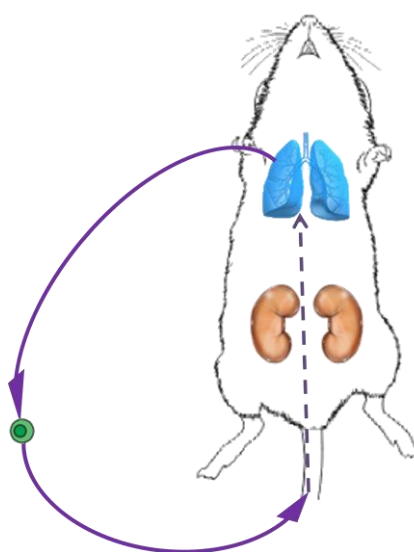


Figure 22 : Etablissement des lignées "Tail", modèle de réimplantations intraveineuses de cellules issues de métastases pulmonaires générées par implantation intraveineuse.

Les cellules ont été injectées dans la veine caudale de souris Balb/C. Après sacrifice, les cellules tumorales des métastases pulmonaires ont été isolées, et réimplantées par la veine caudale de nouvelles souris Balb/C, permettant d'obtenir une nouvelle génération de cellules.

Ce type de lignée consistait en une réinjection intraveineuse (i/v) en série de cellules issues de métastases générées elles-mêmes par injection en i/v. L'injection i/v de ces lignées a généré des métastases. La purification des cellules de ces métastases a permis de les réinjecter en i/vr afin de former les métastases de la génération suivante. (Figure 22). Les cellules tumorales isolées à partir de ce type de métastases pulmonaires ont été appelées « Tail », du fait de la stratégie d'injection des cellules par veine caudale.

Dans la première série de réimplantation et de réinjections successives, la lignée « P1 » générée était en fait issue de métastases issues d'injection intraveineuses. Ces cellules « Tail » ont ensuite été utilisées comme 1ère génération et utilisées pour générer les autres

lignées « Kidney », « Lung » et « Tail ». Une seconde série d'implantation, qui a été poussée seulement jusqu'à la première génération ou « P1bis », provient pour sa part de toutes les stratégies utilisées.

En fonction des types d'implantations et des types de cellules générées, certaines étapes de la progression tumorale ont été récapitulées par les cellules. Par exemple, les cellules de type « Kidney » sont des cellules qui peuvent avoir acquis des mécanismes accélérant la formation d'une tumeur primaire (production d'ECM, recrutement de cellules stromales, angiogenèse, propriétés invasives,...) (Figure 23). Les cellules de types « Tail » pourraient être mieux adaptées à des étapes telles que la survie dans le sang, l'extravasation ou la formation de métastases pulmonaires (Figure 23). Les cellules de type « Lung » pourraient être mieux adaptées pour toutes les étapes depuis la formation d'une tumeur primaire jusqu'à la formation de métastases (Figure 23).

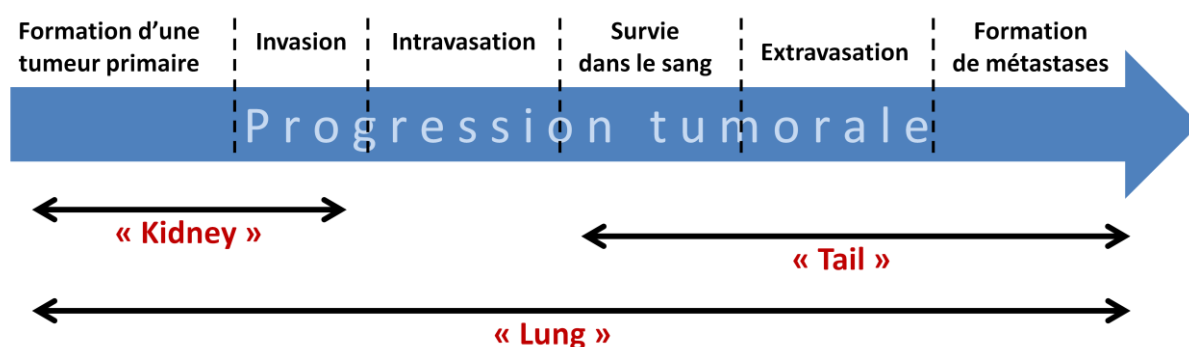


Figure 23 : Représentation schématique des étapes franchies par les différentes lignées lors des passages dans les souris.

Lorsque les cellules de chaque type de lignées ont été purifiées, elles auront menées à bien certaines étapes de la progression tumorale. Par exemples, les cellules « Kidney » auront reformé une tumeur primaire et peuvent avoir commencé certaines étapes de l'invasion tumorale. Alors que les cellules « Tail » auront survécues dans le sang et effectué l'extravasation. Les cellules « Lung », elles, auront traversé toutes les étapes depuis la formation de la tumeur primaire jusqu'à la formation de métastases.

La génération de ces lignées cellulaires a été un outil capital et indispensable au projet. Il pourrait permettre d'isoler des mécanismes nécessaires à différentes étapes précises de la progression de la maladie.

D : Bilan des lignées générées

Grâce à ces différentes stratégies, un total de 65 lignées cellulaires ont été générées. Chaque souris utilisée donnant potentiellement une lignée. L'intégralité des lignées générées est recensée dans le Tableau 10.

Tableau 10: Recensement des 65 lignées générées selon le type de réimplantation.

Passage	Nombre de lignées première et seconde séries	Détails	Nombre de lignées « Kidney »	Nombre de lignées « Lung »	Nombre de lignées « Tail »
Cellules Parentales P0	2 (1+1)	Lignées Renca-GFP parentale.	-	-	-
P1	11 (1 + 10)		Première série : 0 seconde série : 5	Première série : 0 Seconde série : 1	Première série : 1 Seconde série : 4
P2	5	Générées à partir d'une implantation de cellules « Tail »	Première série : 2	Première série : 1	Première série : 2
P3	10		Première série : 2	Première série : 5	Première série : 3
P4	10		Première série : 3	Première série : 3	Première série : 4
P5	15		Première série : 5	Première série : 4	Première série : 6
P6	14		Première série : 5	Première série : 4	Première série : 5

Au terme de la série de réimplantations, nous avons donc réussi à produire un nombre important de lignées cellulaires issues de tumeurs et de métastases générées *in vivo*. Pour chaque passage et pour chaque lignée, des cellules ont été congelées dans l'azote, et des échantillons d'ARN, d'ADN et de protéines ont été conservés. Tous ces échantillons ont été collectés en même temps, ce qui pourrait nous permettre d'étudier les changements à l'échelle phénotypique, génomique, transcriptionnel, et protéique des cellules induits par leurs passages successifs *in vivo*. Ces données sont l'élément clef permettant d'alimenter ce modèle d'agressivité des cellules de RCC murines.

II / Résultats *in vivo*

A / Survie des souris au sacrifice

Les différentes stratégies de réimplantations visaient à amplifier certains caractères des cellules tumorales qui pourraient corrélérer avec une augmentation de l'agressivité des cellules tumorales. Cette agressivité peut mener à une réduction de la survie des souris au fur et à mesure des générations. Afin de caractériser la durée de survie des souris, une analyse du nombre de jours au sacrifice a été effectuée. Les points limites ont été définis selon la réglementation en vigueur.

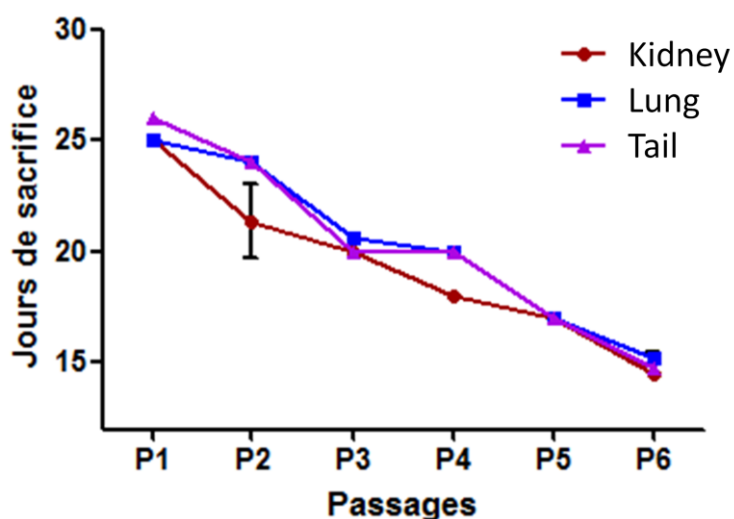


Figure 24 : Diminution de la survie des souris au cours des différents passages.

Les souris ont été sacrifiées lorsque certains points limites ont été atteints. Les résultats présentés sont les moyennes de survie pour chaque type d'expériences exprimés en jours $\pm$ SEM. (Kid : Lignées « Kidney » ; Lung : Lignées « Lungs », Tail : Lignées « Tail »).

La survie des souris implantées avec les cellules parentales (menant à la génération de cellules P1) est d'environ 25 jours. Cette survie diminue au cours des passages *in vivo* pour atteindre environ 15 jours pour la 6^{ème} génération de cellules (« P6 »). Cette chute de survie est observée dans les mêmes proportions quelque soit le type de cellules employées (Figure 24).

La survie des souris semble décliner de la même façon quelque soit la stratégie employée, ce qui peut mettre en évidence que des processus similaires ont été mis en place dans chacune des lignées.

B / Taille et masses des tumeurs à la 6ème génération

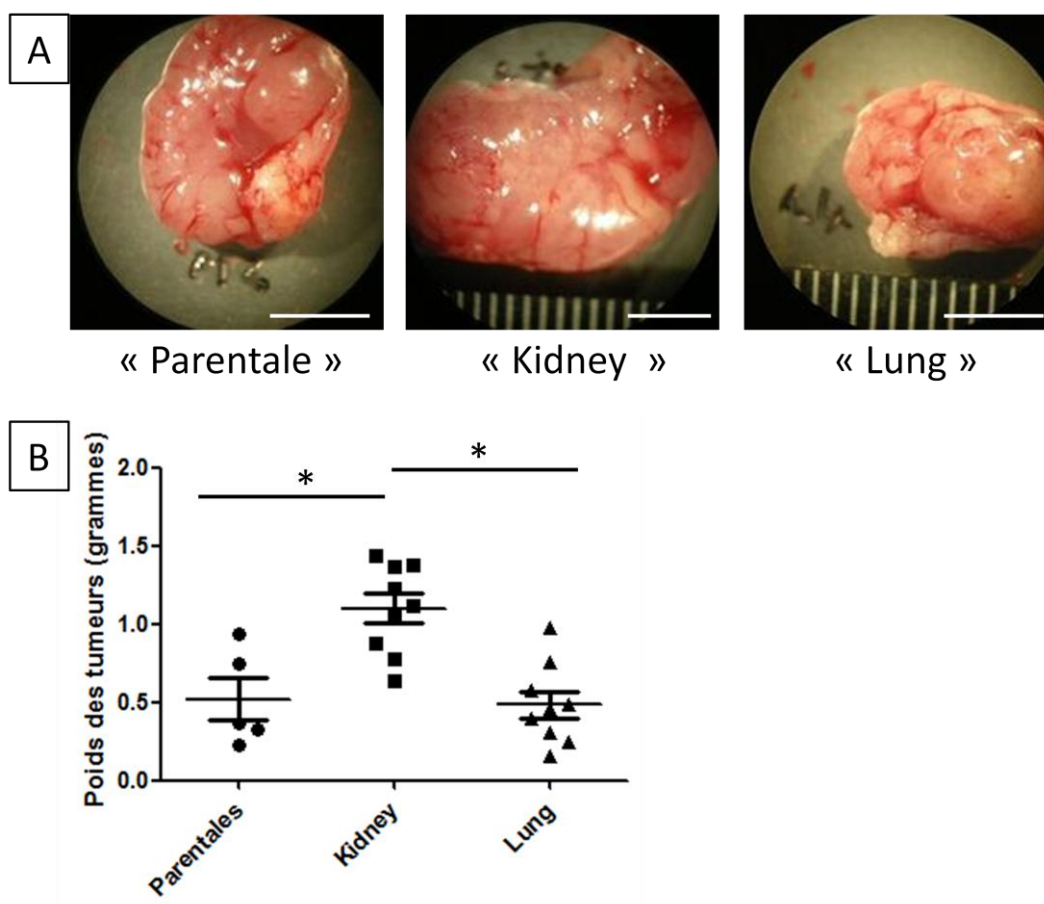


Figure 25 : Tumeurs issues d'implantation de cellules parentales ou de cellules « Kidney » et « Lung » de 5ème génération à jour 15.

100 000 cellules Renca-GFP parentales ou issues des lignes « Kidney » (Kid) et « Lung » de 5ème génération ont été implantées sous la capsule rénale de souris Balb/C. A : Après sacrifice, à jour 15, le bloc rein-tumeur a été photographié. Les clichés présentés ici sont représentatifs des tumeurs primaires à jours 15. (Barres : 5mm ; Parentales : tumeurs issues de l'implantation de cellules parentales ; Kid : tumeurs issues de l'implantation de cellules « Kidney » de 5ème génération ; « Lung » : tumeurs issues de l'implantation de cellules « Lung » de 5ème génération). B : Après sacrifice les blocs rein-tumeurs ont été pesés. Les données présentées sont les moyennes des poids des blocs rein-tumeurs par en grammes $\pm$ SEM. (Parentales : tumeurs issues de l'implantation de cellules parentales ; Kid : tumeurs issues de l'implantation de cellules « Kidney » de 5ème génération ; « Lung » : tumeurs issues de l'implantation de cellules « Lung » de 5ème génération ; * : $p < 0.05$, test utilisé : ANOVA suivi d'un post-test de Dunn's)

Des cellules Renca-GFP parentales et des cellules « Kidney » et « Lung » de 5ème génération ont été implantées de façon orthotopique dans des souris Balb/C. Cette expérience a ainsi généré des tumeurs de premières générations (issues de cellules parentales) et des tumeurs de 6ème génération (issues des cellules de 5ème génération). Les tumeurs de ces souris ont été photographiées et pesées lors du sacrifice. Des souris issues de l'implantation

parentales ont été sacrifiées en même temps que les souris implantées avec la 5ème génération afin d'en comparer les tumeurs.

Lors du sacrifice, soit 15 jours après l'implantation, les tumeurs issues de la lignée « Kidney » de 5ème génération montraient des tailles plus importantes que les tumeurs issues des cellules parentales. Ces tumeurs semblaient être environ 2 fois plus massives que les tumeurs parentales (Figure 25-A). De plus, les blocs reins-poumons montraient en moyenne un poids deux fois supérieur pour les tumeurs issues de la 5ème génération comparé à celles issues de la lignée parentale, avec 1100 grammes et 520 grammes en moyenne respectivement (Figure 25-B). En revanche, les tumeurs issues de cellules « Lung » montraient des tumeurs de taille équivalente aux tumeurs issues de cellules parentales (Figure 25-A), les poids de ces tumeurs étaient par ailleurs équivalents (Figure 25-B). De la même façon, les tumeurs issues des lignées « Kidney » montrent un volume et un poids supérieur aux tumeurs issues de la lignée « Lung » avec 480 grammes pour les cellules « Lung » issues de l'implantation de 5ème génération (Figure 25-A-B).

Ainsi, les cellules de type « Kidney », générées à partir les tumeurs primaires, montrent une capacité accrue à former des tumeurs massives. Les cellules issues de tumeurs primaires seraient donc porteuses de caractères qui accélèrent la formation et la croissance de tumeurs primaires. En revanche, les cellules « Lung » ne montre pas d'amélioration de ce caractère.

C / Métastases issues d'implantations orthotopiques à la 6ème génération

Les poumons des souris de l'expérience précédente ont été photographiés lors du sacrifice. Des souris issues de l'implantation parentales ont été sacrifiées en même temps que les souris implantées avec la 5ème génération.

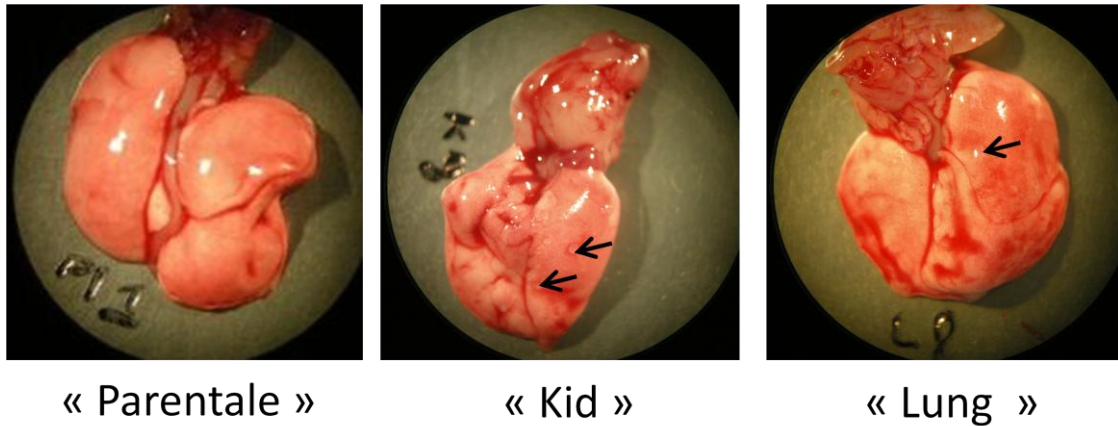


Figure 26 : Photographie de poumons issus d'implantation de cellules parentales ou de cellules « Kidney » et « Lung » de 5ème génération.

100 000 cellules Renca-GFP parentales ou issues des lignes « Kidney » (Kid) et « Lung » de 5ème génération ont été implantées sous la capsule rénale de souris Balb/C. Après sacrifice, à jour 15, les poumons ont été photographiés. Les clichés présentés ici sont représentatifs de l'état des poumons à jours 15. (Flèches : métastases ; Parentales : poumons de souris implantées avec la lignée de cellules parentales ; Kid : poumons de souris implantées avec la lignée « Kidney » de 5ème génération ; « Lung » : poumons de souris implantées avec la lignée « Lung » de 5ème génération).

Lors du sacrifice, à jour 15, aucune métastase macroscopique n'était observable sur les poumons issus de souris parentales (Figure 26). Sur les poumons des lots de souris « Kidney » et « Lung », quelques métastases macroscopiques étaient observables. De plus, si à jour 15 aucune souris du lot « Parentale » ne montrait de métastases, un nombre plus important de souris des lots « Kidney » et « Lung » montraient des métastases macroscopiques, avec 5 poumons sur 9 pour le lot « Kidney » et 5 poumons sur 9 pour le lot « Lung » (Figure 26 « Kid » et « Lung », flèches noires).

Bien que peu de métastases macroscopiques étaient visibles sur les poumons des lots « Kidney » et « Lung ». Une étude histologique du nombre de micrométastases est envisagée afin de compléter ce résultat. Compte tenu du fait que au moins la moitié des poumons de ces deux types de lots montraient des métastases, contre aucun dans le lot des cellules parentales, il semble tout de même que la formation de métastases puisse avoir été accélérée dans les lignées « Kidney » et « Lung ».

D / Métastases issues d'injections intraveineuses à la 6ème génération

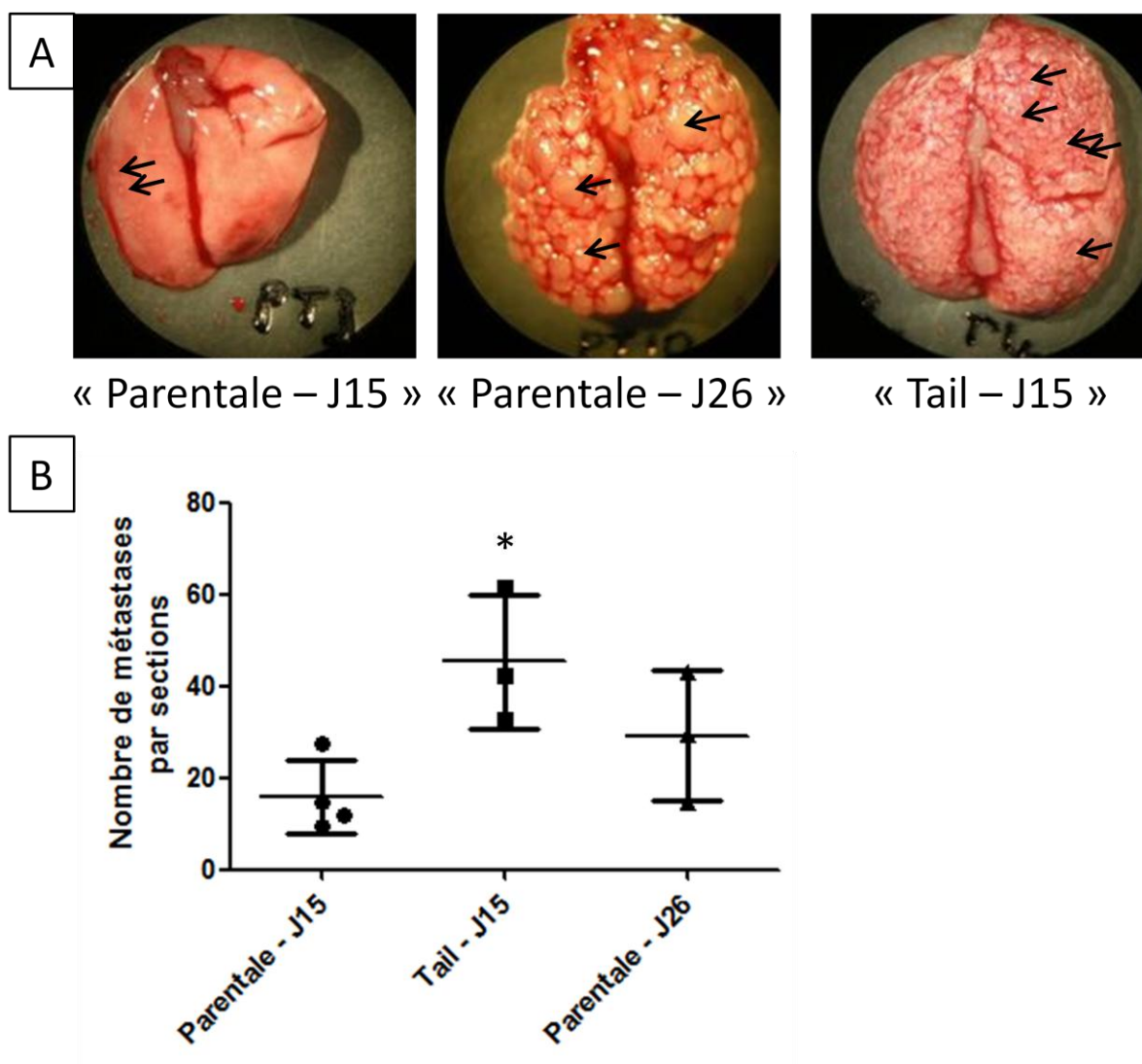


Figure 27 : Photographie des poumons et nombre de métastases issus d'injection intraveineuse de cellules parentales ou de cellules « Tail » 5ème génération.

500 000 cellules Renca-GFP parentales ou issues des lignes « Tail » de 5ème génération ont été injectées en intraveineuse dans des souris Balb/C. Après sacrifice, à jours 15 ou 26, les poumons ont été photographiés et ont été conservés pour des études histologiques. A : Les clichés présentés ici sont représentatifs de l'état des poumons au sacrifice. B : Le nombre de métastases par sections de tissus a été évalué indépendamment de la taille de celles-ci. (Flèches : métastases ; Parentale : poumons de souris implantées avec la lignée de cellules parentales ; « Tail » : poumons de souris injectées avec la lignée « Tail » de 5ème génération ; * : $p < 0.05$ par rapport au lot « Parentale – J15 », test utilisé ANOVA suivi d'un post-test de Dunn).

Le troisième type cellulaire généré provient de métastases issues d'injections intraveineuses par la veine caudale. Dans ce type de cellules, seul une partie de certains processus métastatiques pourraient avoir été amplifiés. Des cellules Renca-GFP parentale, ou des cellules « Tail » de 5ème génération ont été implantées par la veine caudale de souris

Balb/C. Au sacrifice, les poumons ont été photographiés et analysés. Comme pour les expériences précédentes, des souris ayant été injectées avec des cellules parentales ont été sacrifiées en même temps que les souris implantées avec la lignée « Tail ».

Lors de leur sacrifice, 15 jours après l'implantation des cellules, le nombre de macrométastases visibles à la surface des poumons provenant des implantations de cellules « Tail » était très nettement supérieur aux macrométastases visibles sur les poumons issues de souris implantés avec les cellules parentales. Seulement quelques macrométastases étaient visibles sur les poumons des lots de souris implantées avec la lignée parentale (Figure 27-A « Parental – J15 », flèches noires). Les poumons de souris implantées avec les cellules « Tail » sont pour leur part complètement recouverts de métastases (Figure 27-A « Tail – J15 », flèches noires). Une partie des souris implantées avec les cellules parentales ont été laissées en vie jusqu'à 26 jours. A ce stade, les poumons étaient envahis de métastases, mais de taille plus importantes que celles observées à jour 15 pour les poumons « Tail ». Des cellules avaient donc bien envahi le poumon à jours 15 dans les souris implantées avec les cellules parentales, mais n'avait pas encore produit de macrométastases (Figure 27-A « Parental – J26 », flèches noires).

La quantification des métastases sur des coupes de tissu a par ailleurs montré un nombre moyen de 15 métastases par section dans les poumons parentaux au bout de 15 jours (Figure 27-B « Parental – J15 »), là où les poumons des lots « Tail » en montraient significativement plus avec un nombre en moyenne de 45 métastases (Figure 27-B « Tail – J15 »).

Les résultats obtenus avec la lignée « Tail » semblent indiquer que ces cellules ont une capacité à former des métastases bien plus importante que les cellules parentales. Ceci pourrait passer par une meilleure capacité de croissance métastatique au sein du poumon, une meilleure survie des cellules dans le sang, ou encore une meilleure invasion du tissu pulmonaire, par exemple.

III / Caractérisation *in vitro* des lignées de 6ème génération

Les données *in vivo* tendent à mettre en évidence que, selon le type de cellules étudiées, des caractères ont été modulés par rapports aux cellules parentales initialement utilisées. Afin de comprendre certains de ces mécanismes, des caractérisations *in vitro* ont été menés. Ces analyses ont été effectuées sur les cellules de la 6ème génération. Celle-ci comprend 5 lignées de type « Kidney », 4 lignées de type « Lung » et 5 lignées de type « Tail ». Les caractères et le comportement de ces cellules « P6 » ont été comparés avec les cellules Renca-GFP parentales.

A / Morphologie

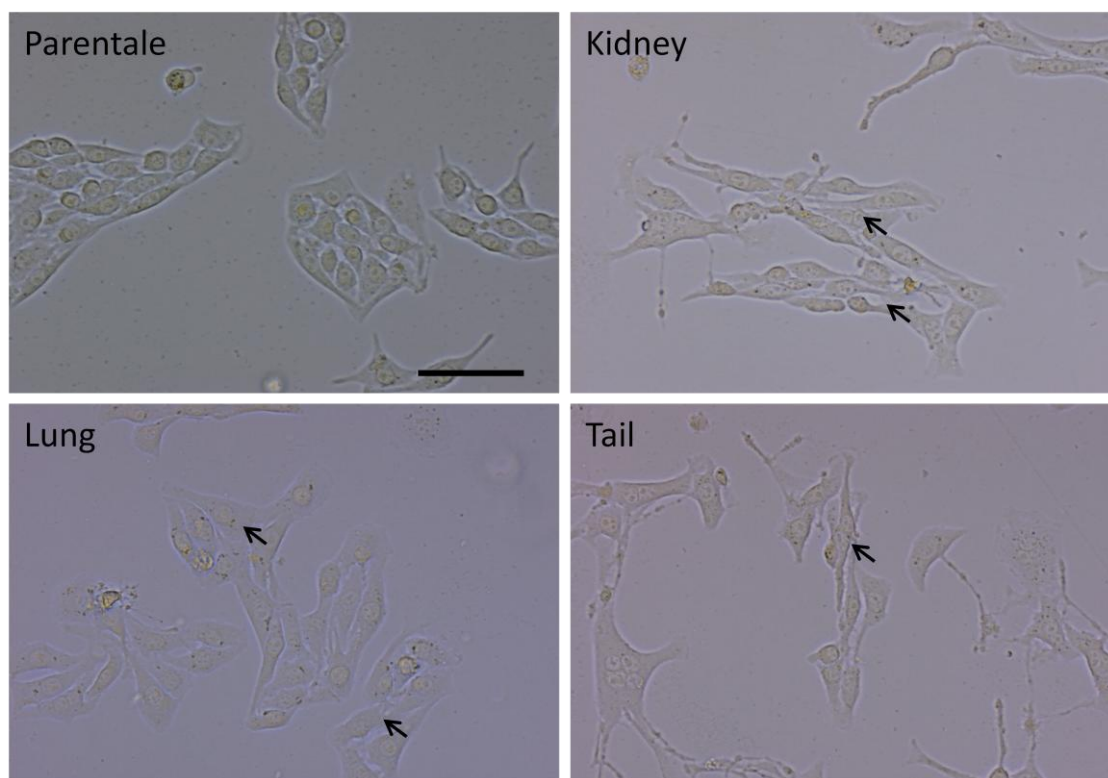


Figure 28 : Morphologie des différents types de cellules générées

Les cellules de 6ème générations et les cellules Renca-GFP ont étéensemencées puis photographiées au bout de 72 heures de culture. Les photos présentées sont représentatives de certaines variations observables entre les cellules parentales et les cellules générées (grossissement x200 ; barre : 100µm ; flèches noires : chevauchements de cellules).

Afin de jauger des différences morphologiques des différentes lignées générées, les lignées de 6ème génération et la lignée parentale ont été ensemencés et photographiés.

La lignée parentale montre des cellules à morphologie épithéliale, c'est-à-dire des cellules peu allongées et qui semblent avoir des jonctions avec les cellules voisines. On observe par ailleurs que les cellules sont en amas (Figure 28). D'une façon générale les lignées de « P6 » sont des cellules plus allongées que la lignée parentale et les cellules ont tendance à être moins jointives les unes aux autres (Figure 28). De plus, ces lignées montrent des cellules qui se chevauchent, chose que les cellules parentales ne montrent pas (Figure 28, flèches noires).

Les 3 types de lignées générées sont différents de la lignée parentale. Celles-ci semblent conserver un certain lien avec les cellules voisines, mais semblent moins jointives les unes aux autres. Ces 3 types de lignées ont une morphologie moins épithéliale que les cellules parentales et auraient une morphologie plus fibroblastoïde, ce qui peut mettre en évidence une EMT plus avancée dans ces cellules.

B / Prolifération

Les cellules de type « Kidney » ont générées des tumeurs plus massives que les cellules parentales, ou que les cellules de type « Lung ». Des expériences de prolifération ont été menées sur ces cellules.

Les cellules de type « Kidney » atteignent un taux de confluence de 95% au bout de 96 heures, là où les cellules parentales n'ont atteint que 75%. Ce taux de 75% de confluence étant atteint par les cellules « Kidney » au bout de 60 heures environ (Figure 29-A). Dans une seconde expérience indépendante, les cellules de type « Tail », atteignent un taux de confluence de 75% à 72 heures, là où les cellules parentales sont à un peu plus de 60% de confluence (Figure 29-B). Aucune de ces deux expériences n'ont montré de résultats significatifs néanmoins. Des expériences avec les cellules de type « Lung » sont en cours.

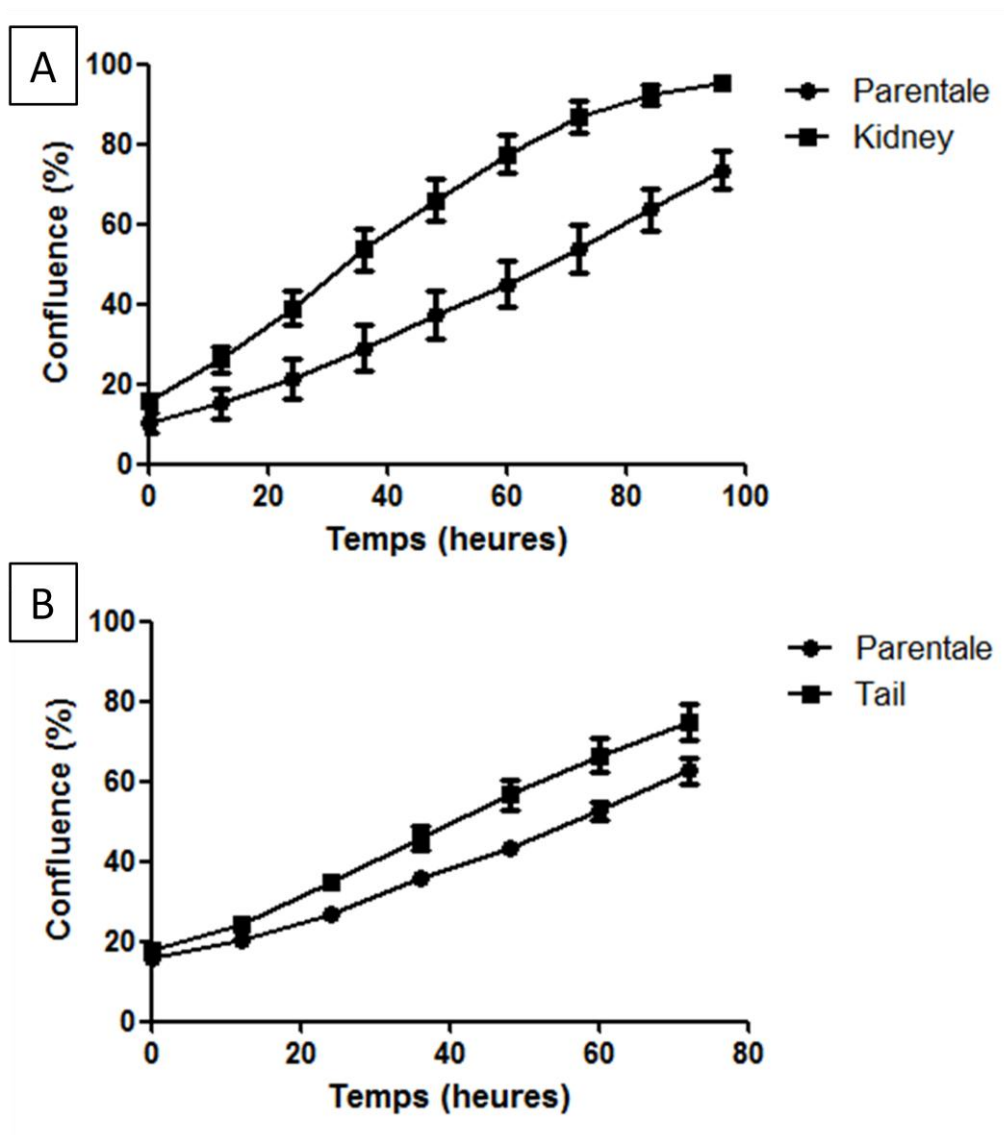


Figure 29 : Prolifération des cellules « Kidney » et « Tail » de 6ème génération comparées aux cellules Renca-GFP parentales.

3000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits. Toutes les 2 heures, chaque puits a été photographié et le niveau de confluence a été calculé. Les résultats représentent la moyenne de la confluence des lignées, exprimée en pourcentage ($\pm$ SEM) en fonction du temps. N=1.

Dans le type d'expérience utilisé ici, ce n'est pas le nombre de cellules présentes en culture, mais le niveau de confluence qui est analysé. Or, les cellules n'ont pas la même morphologie, un biais est donc possible dans les résultats. Des expériences de prolifération plus précises devront être effectuées afin d'obtenir des résultats plus fiables.

C / Migrations

La migration est un élément important de la progression tumorale, puisque participant au phénomène de métastases. Afin de comparer les capacités migratoires des cellules, différents types d'expériences de migration ont été menées.

C-1 / Migrations en chambre de Boyden

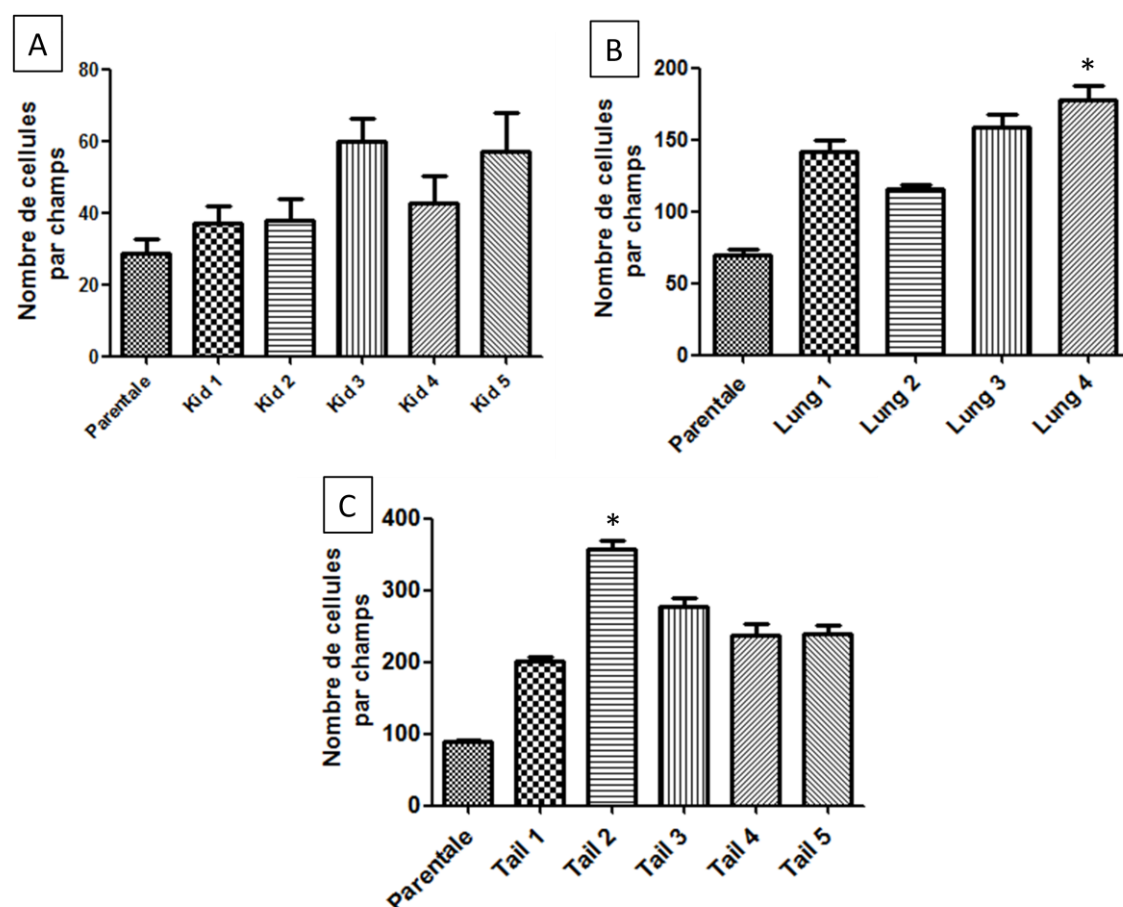


Figure 30 : Migration des cellules en chambre de Boyden des cellules de 6ème génération comparées à la lignée parentale.

50 000 cellules ont été déposées dans la partie supérieurs des inserts et dans un milieu sans en sérum. Les inserts ont été placés dans des puits contenant du milieu complet (10% de sérum). Au bout de 16h environ, les cellules ayant migré à travers l'insert ont été marquées au DAPI et dénombrées. Les résultats représentent le nombre moyen de cellules par champs visibles sur l'insert, $\pm$ SEM, N=1. (Kid : cellules « Kidney » ; * : $p < 0.05$ par rapport à la lignée parentale ; test utilisé : ANOVA suivi d'un post-test de Dunn).

Un des types d'expérience de migration utilisé a été la migration en chambre de Boyden. Ce test permet de jauger de la capacité des cellules à migrer à travers un tamis sous

l'effet d'un gradient de facteurs attractants. Il s'agit donc d'un test de migration directionnel sous l'effet d'un attractant.

Pour les cellules de type « Kidney », dans ce type d'expérience, on observe que deux fois plus de cellules ont migrés pour les lignées « Kidney 3 » et « Kindey 5 » par rapport à la lignée de cellule parentale. Ces résultats ne sont pas significatifs. Les autres cellules « Kidney » ne semble pas avoir de meilleure faculté de migration dans ce type d'expérience (Figure 30-A).

Pour les cellules de type « Lung », le nombre de cellules ayant migré est en moyenne deux fois plus élevé que les cellules parentales, et ce, pour les 4 lignées de cette génération. La seule lignée montrant des résultats significatifs est la lignée « Lung 4 » (Figure 30-B). Enfin, pour les cellules de type « Tail », le nombre de cellules ayant migré est en moyenne plus de deux fois supérieur au nombre de cellules parentales et la seule lignée montrant des résultats significatifs était la lignée « Tail 2 » (Figure 30-C).

D'une façon générale et même si peu de lignées ont montré des résultats significatifs dans les résultats préliminaires présentés ici, seules les cellules de type « Lung » et « Tail » montrent clairement de meilleures facultés à migrer dans ce type d'expérience.

C-2 / Migration 2D, vidéomicroscopie

Un autre type d'expérience de migration a été utilisé. Il permet l'analyse de la vitesse de migration des cellules en 2 dimensions (2D), en utilisant la vidéomicroscopie. Il s'agit ici d'expériences de migration non-directionnelles.

Pour ce type d'expérience, toutes les lignées « Kidney » ont montré une meilleure migration par rapport à la lignée parentale, avec en moyenne une vitesse deux fois plus élevée (Figure 31-A), mais ces résultats ne sont pas significatifs. Pour leur part, les cellules « Lung » ne montraient une meilleure vitesse de migration (Figure 31-B). Enfin, toutes les lignées « Tail » ont montré une meilleure vitesse de migration par rapport à la lignée parentale, avec une vitesse moyenne deux fois plus importante (Figure 31-C), bien que la lignée « Tail 2 » soit la seule à montrer des résultats significatifs dans ces expériences préliminaires.

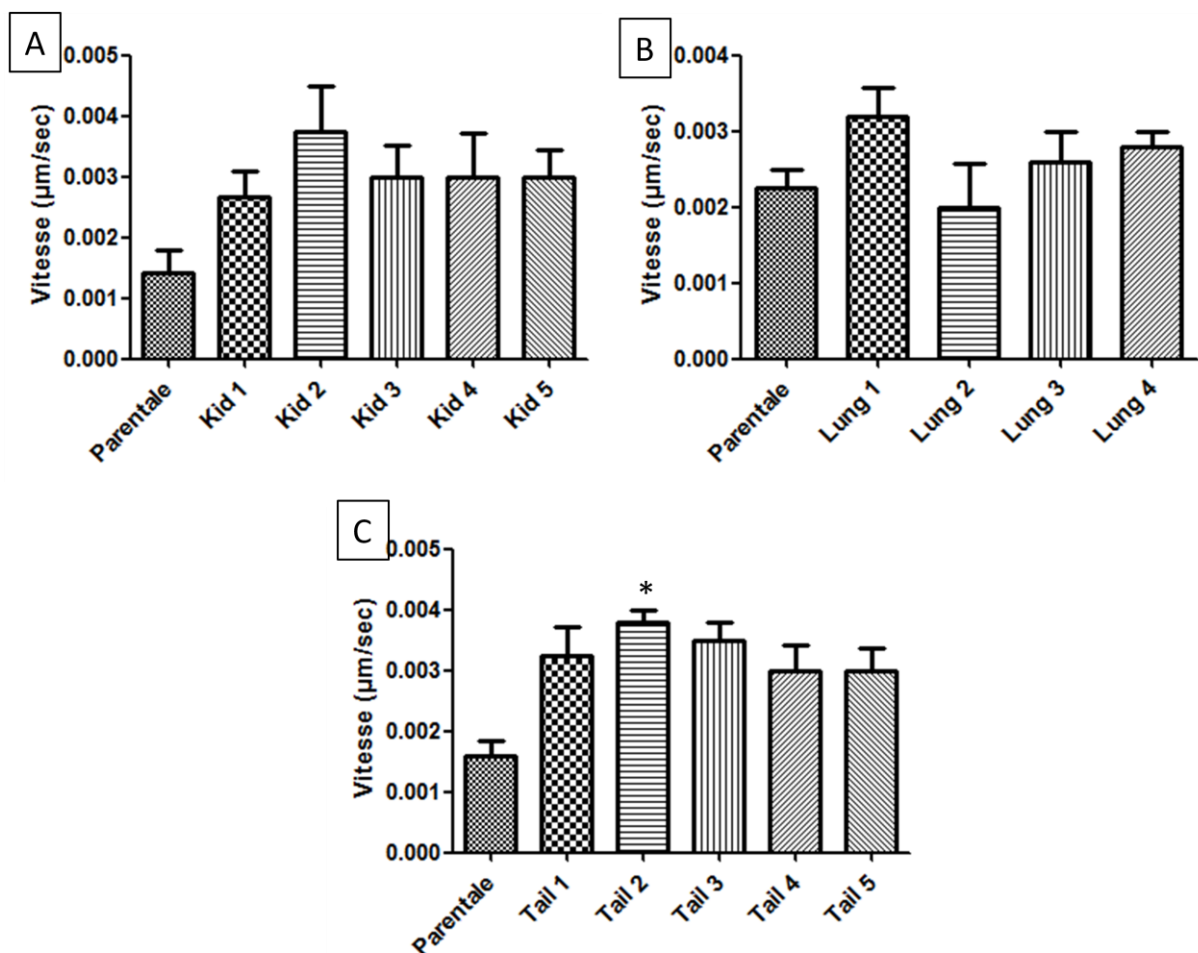


Figure 31 : Migration 2D des cellules de 6ème génération comparées à la lignée parentale.

500 cellules ont étéensemencées dans des plaques 48 puits. 24 heures plus tard, les cellules ont été photographiées à un intervalle de 15 minutes pendant 24 heures au minimum. La vitesse moyenne de plusieurs cellules par type a été mesurée. Les résultats présentent ici la moyenne de vitesse des cellules en µm/sec, $\pm$ SEM, N=1. (Kid : cellules « Kidney » ; * : $p < 0.05$ par rapport à la lignée parentale ; Test utilisé : ANOVA suivi d'un post-test de Dunn).

D'une façon générale et même si peu de lignées ont montrées des résultats significatifs dans les résultats préliminaires présentés ici, seules les cellules de type « Kid » et « Tail » semblent montrer de meilleures facultés à migrer dans ce type d'expérience.

C-3 : Expériences de migration, test de la cicatrice

Enfin, troisième et dernier type d'expérience de migration utilisé, le test dit de recouvrement de la cicatrice (ou test de « Wound Healing »). Ce test vise à tester la capacité

des cellules à migrer vers un espace libre en culture, nous sommes donc dans des expériences où une forme de migration directionnelle est étudiée.

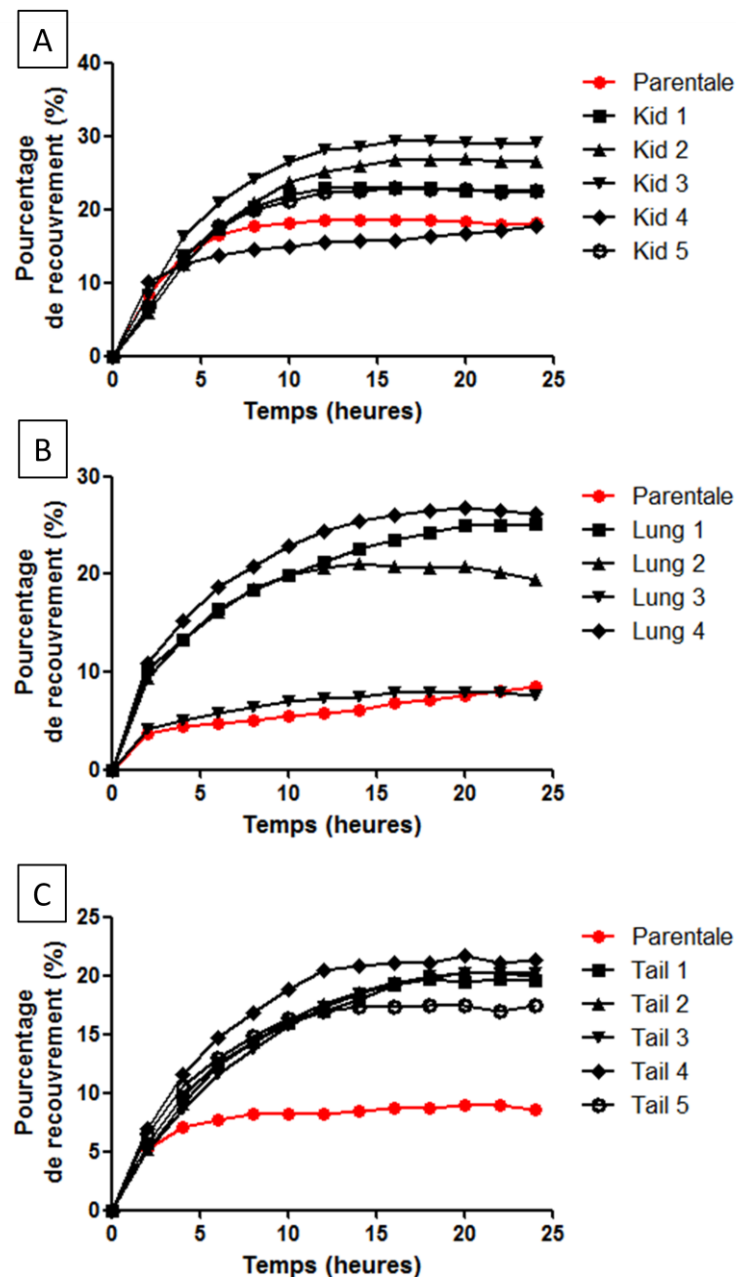


Figure 32 : Tests de la cicatrice sur les cellules de 6^{ème} génération et sur les cellules parentales.

Les cellules ont été ensemencées à confluence, puis une partie des cellules a été retiré de façon à former une cicatrice. Des clichés de la cicatrice ont été obtenus toutes les 2 heures et le pourcentage de recouvrement de la cicatrice dans le temps a été calculé. Les résultats présentés montrent ce pourcentage de recouvrement pour les cellules « Kidney » (A), « Lung » (B) et « Tail » (C) de 6^{ème} génération comparée aux cellules Parentales. N=1. (Kid : cellules « Kidney »).

Les tests de cicatrice obtenus avec les cellules « Kidney » ne semblent pas montrer de différence de migration avec les cellules « Parentales » (Figure 32-A). Les cellules de type

« Lung » montrent globalement une meilleure capacité de recouvrement de la cicatrice, et atteignent 20 à 25% de recouvrement en 24 heures, quand les cellules parentales n'en recouvrent que 8% (Figure 32-B). Les cellules de type « Tail » semblent montrer une meilleure faculté à migrer dans ce type d'expérience, avec un taux de recouvrement de 20% en moyenne, là où, dans cette expérience indépendante, les cellules parentales ne recouvraient que 7% de la cicatrice (Figure 32-C).

Les expériences de recouvrement de la cicatrice montrent globalement une meilleure migration pour les lignées de type « Tail » et « Lung ».

Quelque soit le type d'expérience, les cellules de la lignée « Tail » ont une meilleure migration que les cellules parentales, et ce quelque soit le type de migration étudié. *In vivo* ces cellules formaient une quantité plus importante de métastases par rapport aux lignées parentales implantées en intraveineux, dans un même espace de temps.

D / Etude du métabolisme cellulaire

La dérégulation du métabolisme cellulaire fait partie intégrante du processus de cancérogenèse. Afin d'analyser l'état des fonctions métaboliques des cellules, des expériences de respiration cellulaires ont été menées en utilisant la technologie Seahorse Bioscience qui permet une mesure temporelle de la consommation d'oxygène.

La consommation basale des cellules parentales est de 122 pmol par minutes (Figure 33). Pour les cellules de type « Kidney », « Lung » et « Tail » la consommation est respectivement de 246, 286 et 221 pmol par minutes. Les cellules de 6ème génération semblent donc avoir une plus grande consommation d'oxygène que les cellules parentales.

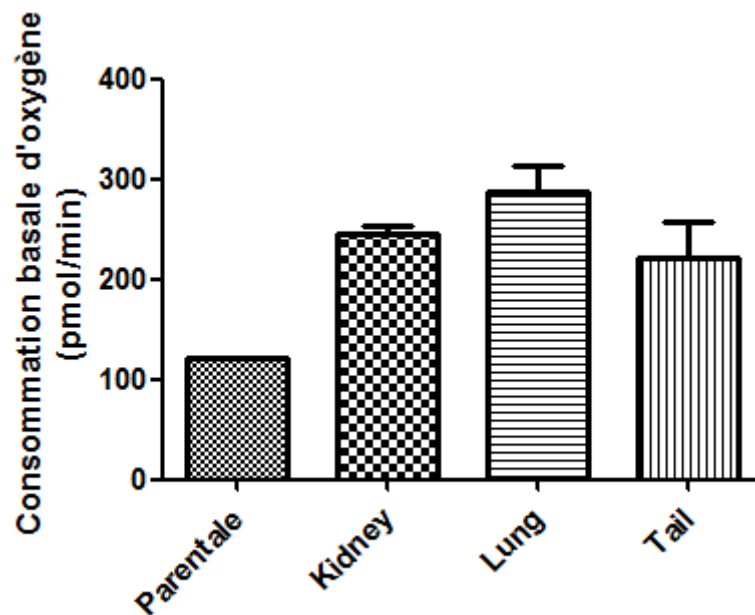


Figure 33 : Consommation basale d'oxygène par les cellules de 6ème génération

Les cellules ont étéensemencées à 40 000 cellules dans des plaques 96 puits spécialement adaptées au système Seahorse. La consommation basale d'oxygène en pmol par minutes a été analysée et a été comparé à la lignée parentale. Les résultats présentés sont les moyennes de la consommation basale des cellules. N=1.

E / Expressions de marqueurs de l'EMT

Lors de la progression tumorale, une EMT peut être induite dans les cellules tumorales. Cette EMT peut être étudiée via de nombreux caractères (migration, invasion par exemple). Lors de cette transition, certains facteurs de transcription favorisant cette EMT peuvent être exprimés. Afin d'analyser certains des marqueurs de ce processus d'EMT, des expériences de RT-qPCR ont été effectuées sur l'ensemble des lignées générées lors des expériences de passages *in vivo*.

Parmi les facteurs de transcriptions étudiés, une augmentation d'expression de Snail 1, Twist1 et de Zeb 2 dans les lignées de 6ème génération par rapport à la lignée parentale ont été observé (Figure 34).

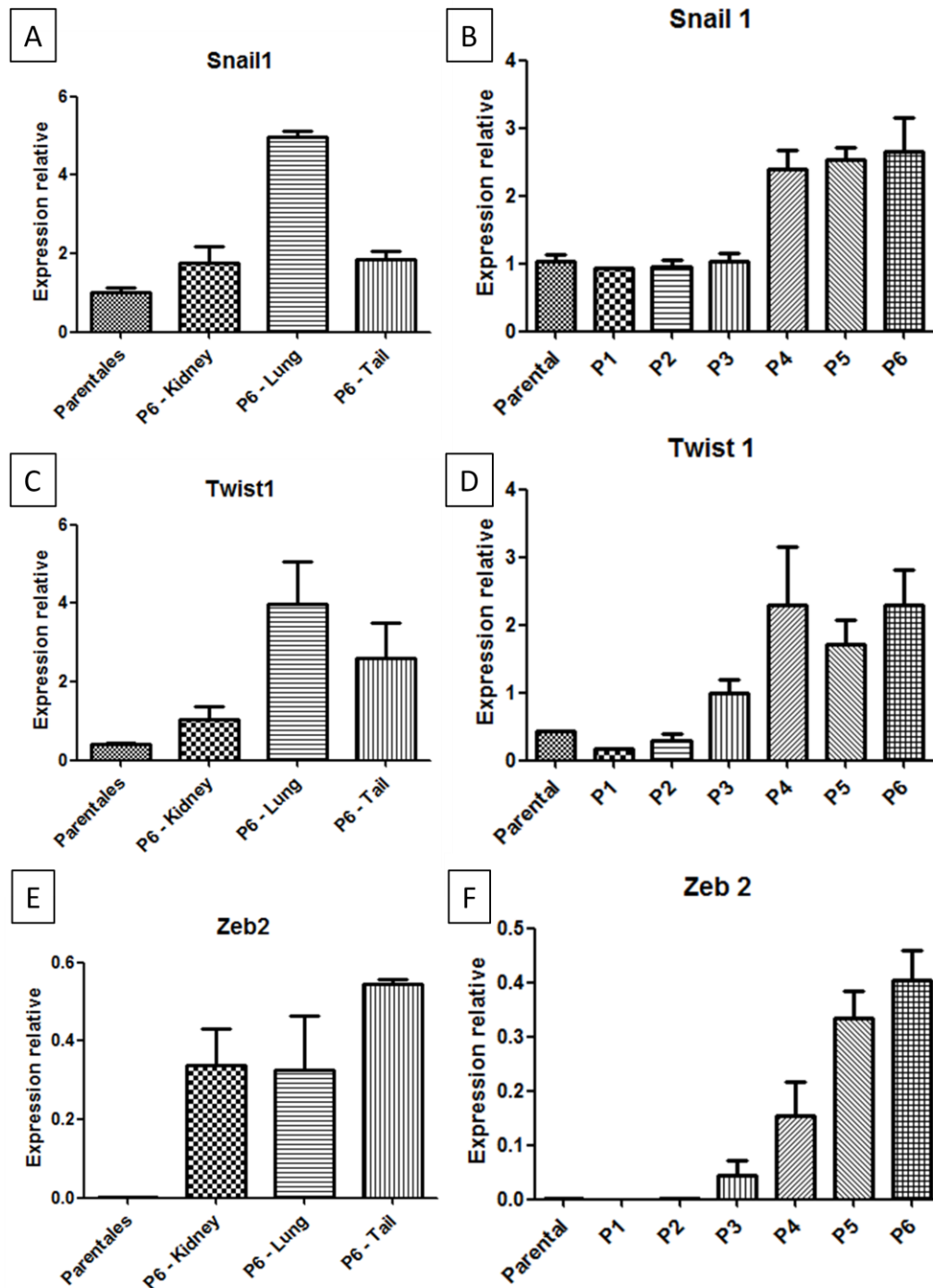


Figure 34 : Niveau d'expression relative des facteurs de transcription Snail 1, Twist 1 et Zeb 2 dans les lignées de 6ème génération, et leur évolution au cours des passages, comparé aux lignées parentales.

Les ARN des cellules générées ont été isolées, et ont été utilisés dans des expériences de RT-qPCR afin d'évaluer le niveau d'expression de Snail 1 (A), Twist 1 (B) et Zeb 2 (C) pour les cellules de 6ème génération, ainsi que leurs évolution sur l'ensemble des passages *in vivo* (B – D et F respectivement pour Snail 1, Twist1, Zeb 2). Les résultats présentés sont des valeurs d'expression relative, normalisées sur l'expression d'un gène de référence (GAPDH), permettant d'obtenir des valeurs comparatives les unes aux autres.

Malgré qu'aucune étude statistique ne soit possible en raison du nombre de lignées parentales, l'augmentation d'expression semble très forte, pouvant aller d'une augmentation de 60 fois pour Twist 1 chez la lignée « Lung » de 6ème génération par exemple (Figure 34-C). Une augmentation de plus de 400 fois pour Zeb 2 est même observable pour la lignée « Tail » (Figure 34-E). Enfin, pour ce qui est de Snail 1, on observe une augmentation d'un peu plus de 2 fois de l'expression pour les lignées « Kidney » et « Tail » et de 5 fois pour les lignées « Lung » (Figure 34-A).

Si l'on étudie les cellules en fonction des générations, l'expression de ces différents facteurs de transcription augmente au cours des générations et ce, jusqu'à la fin de la série de réimplantation (Figure 34-B-D-F), mettant en évidence des mécanismes amplifiés au cours des passages *in vivo*.

Les cellules générées montrent donc des modulations d'expression de certains facteurs connus pour participer à la progression tumorale, et il semble par ailleurs que l'EMT soit encore plus engagée dans ces cellules par rapport aux cellules parentales.

F / Analyses transcriptomique à grande échelle en fonction des types de lignées

Les résultats *in vitro* sur les cellules montrent certaines différences de comportement. Compte tenu des différentes stratégies opérées afin d'obtenir les différentes lignées cellulaires, nous nous attendions à pouvoir mettre en évidence des mécanismes distincts dans chacune d'elles.

Les résultats d'analyses transcriptomiques ont montré que certains gènes similaires étaient modulés dans les différents types de lignée. Par exemple, 24 gènes ont été identifiés comme étant surexprimés à la fois dans les lignées « Kidney », « Lung » et « Tail » (Figure 35-A), on retrouve notamment IL-34. De la même façon, seulement 2 gènes sont sous-exprimés dans les trois types de lignées (Figure 35-B). Certains gènes sont toutefois distincts à certains types de lignées, c'est le cas pour 226 gènes surexprimés exclusivement dans les lignées « Lung » (Figure 35-A) là où 85 sont spécifiquement sous-exprimés dans les lignées « Kidney » (Figure 35-B).

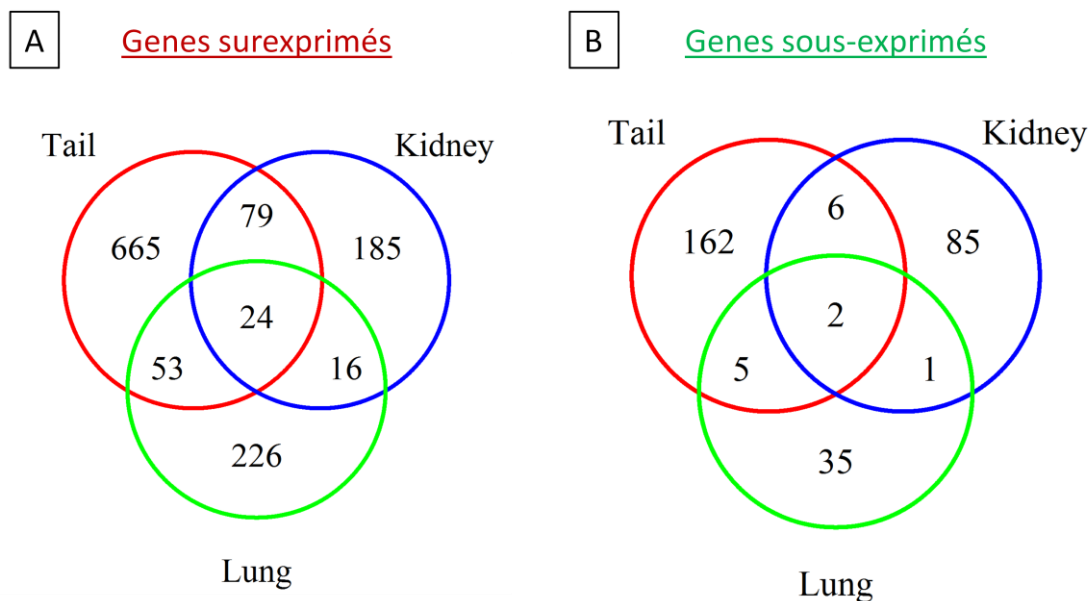


Figure 35 : Gènes surexprimés ou sous-exprimés dans les différentes lignées regroupés en fonction des types de lignées

Les ARN des cellules ont été isolés et ont été utilisées dans une analyse transcriptomique. L'intégralité du génome murin connu a ainsi été analysée. Les gènes ont ensuite été regroupés en fonction des types de lignées dans lesquels ils étaient surexprimés ou sous-exprimés.

Cette étude transcriptomique reste encore à être approfondie pour mettre en évidence certaines cibles d'études. Néanmoins, elle souligne l'intérêt et la puissance de l'outil qui a été développé au laboratoire, car elle met en évidence des différences au niveau transcriptionnel pour chacun des types de lignées.

Par ailleurs, une étude plus générale a été menée de façon plus poussée. Cette analyse se basait sur l'évolution des gènes au cours des passages indépendamment des types de lignées. La suite de l'étude s'intéresse plus particulièrement à l'analyse de ces données.

IV – Etude transcriptomique des lignées, et identification d’une cible potentielle

Le but initial de l’étude visait à générer ces cellules qui pourraient avoir améliorées certains caractères participant à la progression tumorale. Afin de trouver des pistes de gènes qui pourraient avoir un rôle dans ces processus, une étude transcriptomique a été réalisée sur l’ensemble des lignées cellulaires générées au cours des 6 générations de la première série et sur la nouvelle génération issue seconde série, appelée « P1bis ».

A / Analyse transcriptomique

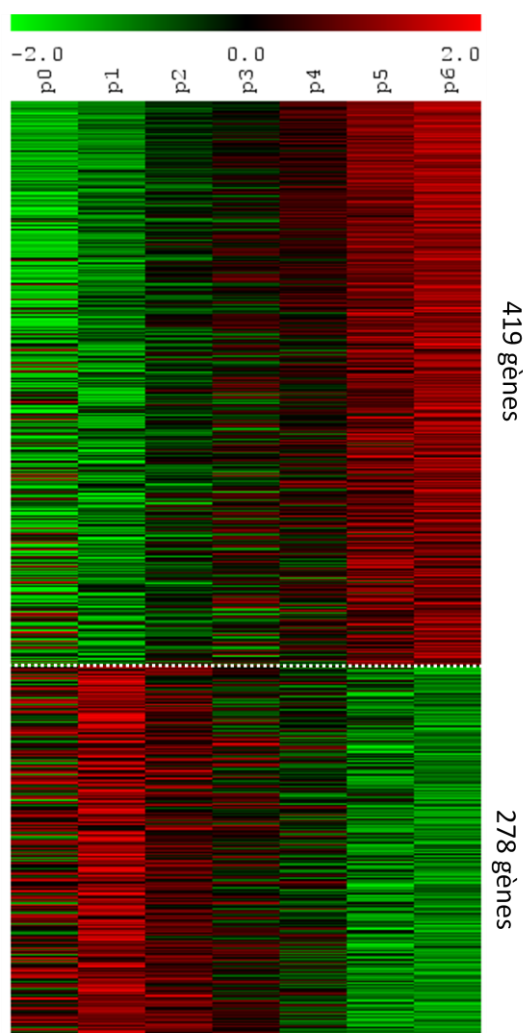


Figure 36 : Résultat des microarray montrant l’expression de gènes évoluant en concordance avec la survie des animaux.

Les ARN des cellules ont été isolés et ont été utilisées dans une analyse transcriptomique. L’intégralité du génome murin connu a ainsi été analysée. Chaque colonne représente une génération de cellules. Les cellules de première génération des deux séries ont été rassemblées pour cette première analyse.

Une étude regroupant toutes les lignées par passages seulement et donc indépendante des types de lignées a été effectuée. Nous nous sommes en premier lieu focalisés sur les gènes dont l'expression augmentait ou diminuait séquentiellement au fur et à mesure des passages, et qui corrélaient donc avec la chute de survie des animaux.

En utilisant cette approche et en analysant les groupes de gènes qui étaient mis en évidence, une étude fonctionnelle a pu montrer que les gènes modulés avaient un rôle dans certains mécanismes tels que l'adhérence cellulaire, la réponse immunitaire, ou la régulation du cytosquelette d'actine, par exemple. Ces enrichissements fonctionnels pourraient expliquer les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro*. De plus, une étude prédictive fonctionnelle suggère une diminution de certains processus liés à l'apoptose et la mort cellulaire, ainsi qu'une activation d'événements participant à la viabilité et l'activation de certaines cellules immunitaires.

Outre l'aspect fonctionnel, cette étude transcriptomique a pu mettre en évidence 278 gènes dont l'expression diminue progressivement au cours des passages (Figure 34) et 419 gènes dont l'expression augmente progressivement au cours des passages *in vivo* (Figure 34). L'interleukine-34 (IL-34) fait partie de ces gènes.

B / Expression d'IL-34 augmente progressivement au cours des passages

IL-34 est une cytokine jouant principalement un rôle dans la maturation des monocytes en macrophages de type M2 via le récepteur au CSF-1 (CSF-1R). Les cellules de RCC expriment ce récepteur. L'IL-34 peut donc aussi jouer un rôle directement sur les cellules tumorales en plus de jouer un rôle sur le contrôle du système immunitaire. Lors de l'analyse transcriptomique, parmi les gènes surexprimés, le gène de l'interleukine-34 montrait une augmentation progressive au cours des passages *in vivo*. Afin de confirmer cette augmentation d'expression séquentielle, des expériences de RT-qPCR contre IL-34 ont été effectuées sur l'intégralité des cellules.

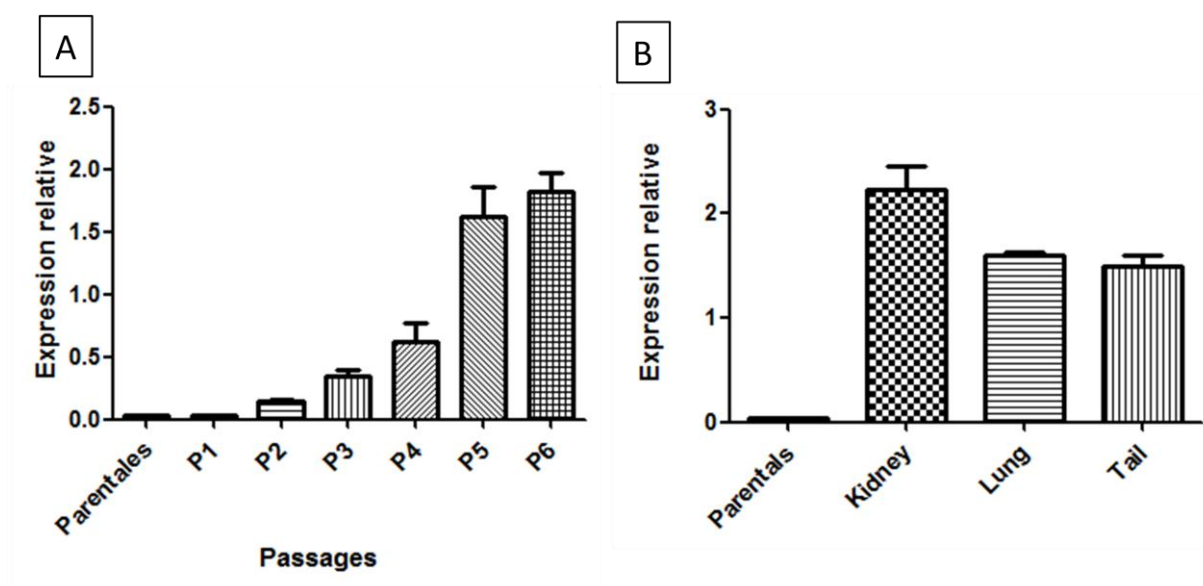


Figure 37 : Niveau d'expression relative d'IL 34 en fonction de générations et des types de cellules.

Les ARN des cellules générées ont été isolées, et ont été utilisés dans des expériences de RT-qPCR afin d'évaluer le niveau d'expression de l'IL-34 dans ces cellules en cours des différentes générations (A) et dans les différents types de cellules de la 6ème génération (B). Les cellules parentales sont aussi présentes sur les graphs. Les résultats présentés sont des valeurs d'expression relative, normalisées sur l'expression d'un gène de référence (HPRT), permettant d'obtenir des valeurs comparatives les unes aux autres.

Lorsque l'on s'intéresse seulement aux expressions par passages *in vivo*, et ce quelque soit la façon dont les lignées ont été obtenues, le niveau d'expression moyen d'IL-34 montre une augmentation d'expression de 4 fois dans les cellules de deuxième génération « P2 » par rapport aux cellules parentales. Il atteint une expression plus de 50 fois supérieure dans les cellules de 6ème génération « P6 » (Figure 37-A). Cette augmentation est séquentielle au cours de passages et confirme les données obtenues lors de l'analyse transcriptomique initiale.

Si l'on sépare les cellules par type de stratégies, pour la 6ème génération, et que l'on compare l'expression de l'IL-34 aux cellules parentales, on constate une nette augmentation d'expression d'IL-34 quelque soit la lignée générée. L'expression est augmentée en moyenne de plus de 70 fois dans les « Kidney » et est supérieure d'environ 50 fois dans les « Lung » et les « Tail », toujours par rapport aux cellules parentales (Figure 37-B).

Les résultats obtenus sur les microarrays ont donc été confirmés par RT-qPCR, et l'augmentation d'expression d'IL-34 est observée quelque soit la stratégie qui a permis d'obtenir les cellules.

C / Sécrétion d'IL-34 par les cellules *in vitro*

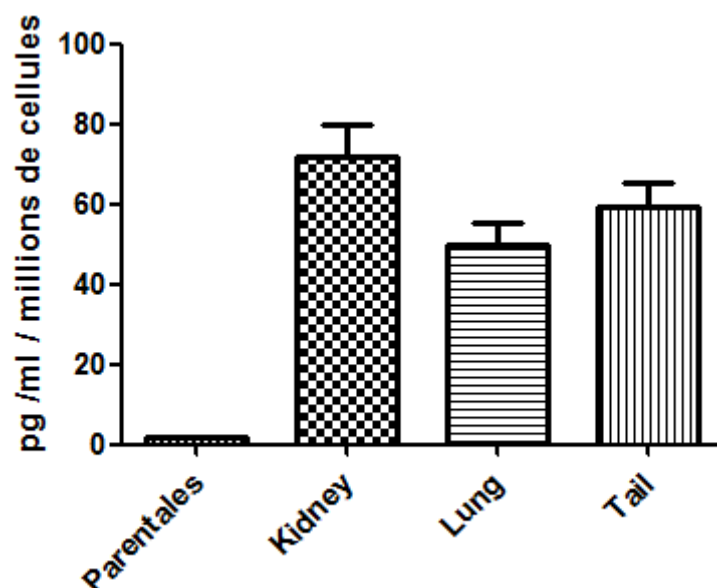


Figure 38 : Sécrétion d'IL-34 dans le milieu par les cellules de 6ème génération et par les cellules parentales

Les milieux conditionnés des cellules ont été récupérés et utilisés dans une expérience d'Elisa dirigée contre l'IL-34. Les résultats présentés sont les moyennes par types de cellules des concentrations ($\pm$ SEM) d'IL-34 mesurées dans le milieu après 24 heures de conditionnement, ramenées au nombre de cellules (en millions) présentes dans les boîtes de culture à la fin de l'expérience. Les cellules utilisées étaient les cellules de 6ème génération classées par types de cellule et les cellules parentales.

Les cellules produisent donc les ARN messagers permettant de produire l'IL-34. À ce jour la présence de la protéine dans les cellules n'a pas pu être démontrée. Afin de démontrer que l'IL-34 produit par les cellules est bien sécrétée, des tests d'ELISA dirigés contre IL-34 ont été effectués sur les surnageants de culture de ces cellules. Les niveaux de sécrétion ont été comparés aux cellules parentales.

Pour la 6ème génération de cellules, les résultats des tests d'ELISA montrent une sécrétion d'IL-34 de l'ordre de 70 pg/ml et par millions de cellules pour les cellules de types « Kidney ». Elle est de 50 pg/ml et par millions de cellules pour les cellules « Lung » et de 60

pg/ml et par millions de cellules pour les cellules « Tail » alors que le niveau de sécrétion n'est que de 1.5 pg/ml et par millions de cellules pour les cellules parentales (Figure 38).

Ainsi, les résultats montrent une augmentation de sécrétion de l'IL-34 pour les cellules de 6ème génération par rapport aux cellules parentales. L'augmentation de la sécrétion confirme et valide l'augmentation d'expression de l'IL-34 à l'échelle transcriptomique et protéique *in vitro*. Les variations de sécrétion de l'IL-34 sont de plus dans les mêmes proportions que les variations d'expression. L'IL-34 peut donc aussi être sécrété par les cellules tumorales *in vivo*, et peut donc avoir un effet sur les cellules voisines, voir sur les cellules tumorales elles-mêmes.

L'IL-34 est une cytokine qui pourrait passer dans la circulation sanguine. Cet aspect va être testé sur les sérums des souris ayant permis d'obtenir les 6èmes générations de cellules et sera comparé aux sérums des souris ayant permis d'obtenir la 1ère génération, ainsi que des souris saines. Nous espérons montrer une augmentation de la présence d'IL-34 dans le sérum des souris de 6ème génération par rapport aux souris saines et aux souris de 1ère génération.

C / Expression IL-34 chez les patients humains, survie et grade

Les niveaux d'expression d'IL-34 dans les cellules générées grâce aux passages *in vivo* montrent une augmentation successive au cours des passages. Cette augmentation est concomitante avec la chute de survie des souris. Afin d'évaluer l'intérêt d'une étude sur IL-34 en terme de survie et afin de mieux comprendre son rôle, une étude a été effectuée sur la banque de donnée de l'Atlas du Génome des Cancers (TCGA ; « The Cancer Genome Atlas »). Cette étude visait à évaluer la survie de 532 patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression d'IL-34 au sein des tumeurs primaires des ces patients.

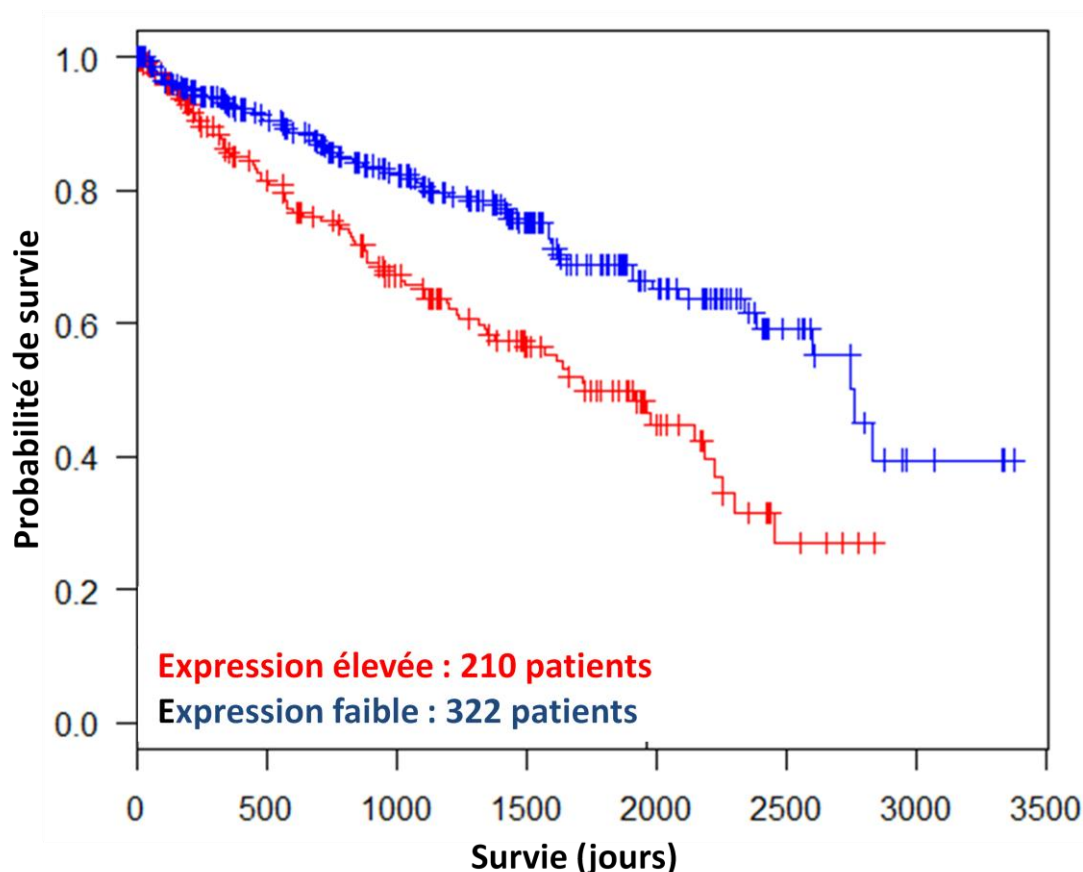


Figure 39 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d’expression d’IL-34 au sein de la tumeur primaire.

Les données d’expression d’IL-34 et de survie des patients ont été obtenues grâce à la banque de données du TCGA et ont permis d’obtenir une courbe d’estimation de Kaplan-Meier. (Rouge : forte expression d’IL-34 ; Vert : Faible expression d’IL-34 ; test utilisé : test du logrank ; $p=0,00002$, hazard ratio : 1,969 ; nombre de patients : 532 ; 210 patients à forte expression et 322 patients à plus faible expression)

La médiane de survie des patients qui ont une expression élevée d’IL-34 est de 50 mois environ (Figure 39). Pour les patients ayant une faible expression tumorale d’IL-34, cette médiane est de plus de 90 mois (Figure 39). Les chances de survie des patients dont les tumeurs ont une faible expression d’IL-34 est estimée à environ deux fois plus importante que les patients aillant des tumeurs à expression élevée d’IL-34.

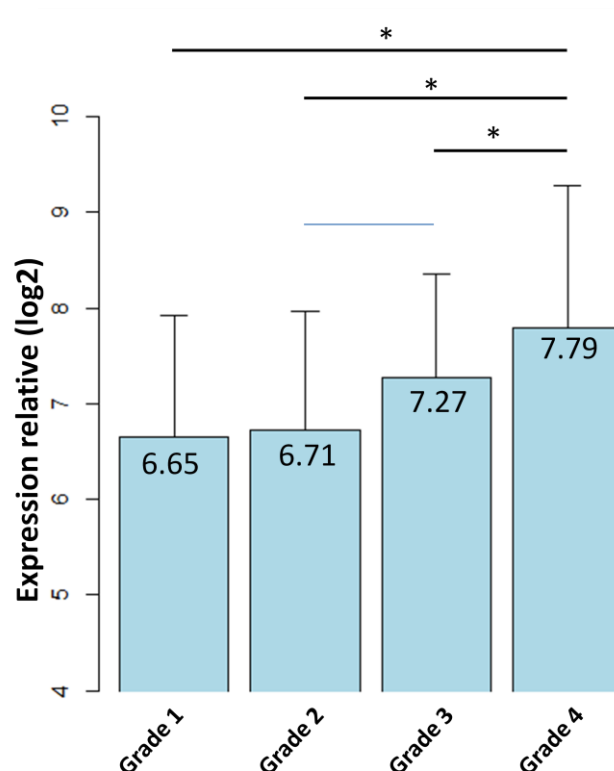


Figure 40 : Niveau d'expression d'IL-34 et grade Fuhrman.

Les données d'expression d'IL-34 et de survie des patients obtenues grâce à la banque de données du TCGA ont été comparées aux niveaux d'expression d'IL-34 au grade Fuhrman. (Test utilisé : ANOVA ; * : $p < 0.05$; nombre de patients : 532)

De plus, en comparant les niveaux d'expression au système de grade nucléaire de Fuhrman, on constate que les tumeurs de haut grade ont une expression d'IL-34 plus élevée (Figure 40).

Le niveau élevé d'expression d'IL-34 semble donc corrélérer avec une chute de survie des patients atteints de ccRCC, et corrèle avec les tumeurs de haut grade, et serait donc un facteur de mauvais pronostic.

D / Expression d'IL-34 dans la tumeur primaire et dans le rein sain

Les données du TCGA à propos d'IL-34 montrent une réduction significative de la survie des patients ayant une expression élevée d'IL-34 au sein de leur tumeur. Une banque d'échantillons de patients issus d'une cohorte indépendante a été utilisée afin d'évaluer les niveaux d'expression d'IL-34 dans les tumeurs des patients mais aussi dans les tissus sains. Nous avons comparé l'expression d'IL-34 au sein des tumeurs à l'expression du rein sain.

L'analyse d'expression du tissu sain et du tissu tumoral montre une expression d'IL-34 plus importante dans le tissu tumoral comparé au tissu sain (Figure 41-A). Dans la cohorte utilisée, certains échantillons n'étaient pas accessibles. Pour certains patients, nous n'avons parfois accès qu'aux ARN de la tumeur et quelque fois même seulement aux ARN du tissu sain. Afin de mieux évaluer les niveaux d'expression entre les tissus sains et les tissus tumoraux, une analyse comparative directe entre les tissus sains et les tumeurs des mêmes patients a été effectuée. Celle-ci montre différence significative de l'expression d'IL-34 entre la partie tumorale et la partie saine du rein (Figure 41-B).

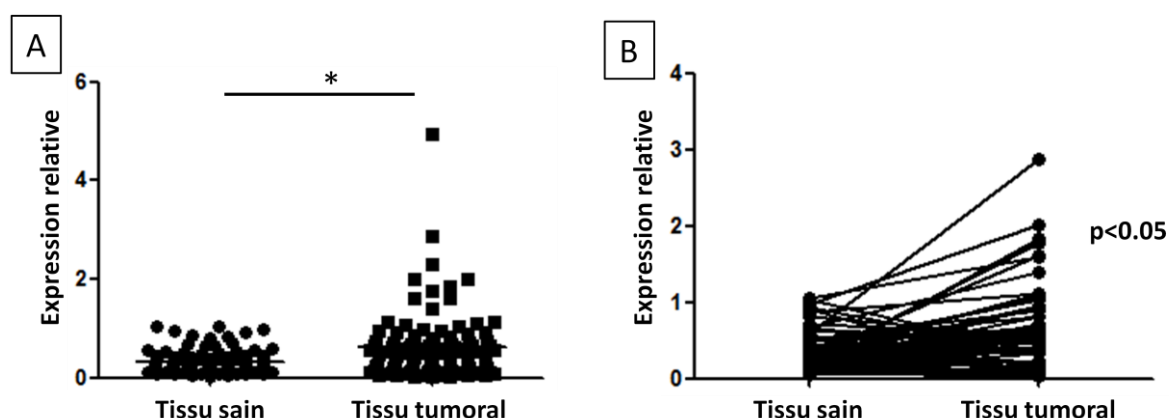


Figure 41 : Niveaux d'expressions de l'IL-34 dans les reins sains et les tumeurs de patients atteints de RCC.

Les ARN des tumeurs et du tissu sain de patients, ont été utilisés dans des expériences de RT-qPCR afin d'évaluer le niveau d'expression de l'IL-34 dans ces cellules. Les résultats présentés sont des valeurs d'expression relative, normalisées sur l'expression d'un gène de référence (GAPDH), permettant d'obtenir des valeurs comparatives les unes aux autres. A : Comparaison d'expression entre le tissu sain et le tissu tumoral. B : Comparaisons appariées du tissu sain et des tumeurs du même patient (test utilisé : t-test ; * $p < 0.05$).

Le niveau d'expression d'IL-34 est donc plus important au sein des tumeurs par rapport au tissu sain.

E / Présence et localisation de l'IL-34 protéique dans les tissus de patients

Afin de confirmer la présence de l'IL-34 protéique et de caractériser sa localisation au sein des tumeurs et des tissus sains, des marquages dirigés contre l'IL-34 ont été menés sur des coupes de tissus provenant de la même cohorte.

Les marquages d'IL-34 sur le tissu sain montrent une localisation de la protéine principalement au niveau de l'épithélium des néphrons, dans les parties tubulaires (Figure 42, flèches noires). Dans les tumeurs, le marquage d'IL-34 est localisé au niveau des cellules tumorales (Figure 42, flèches blanches).

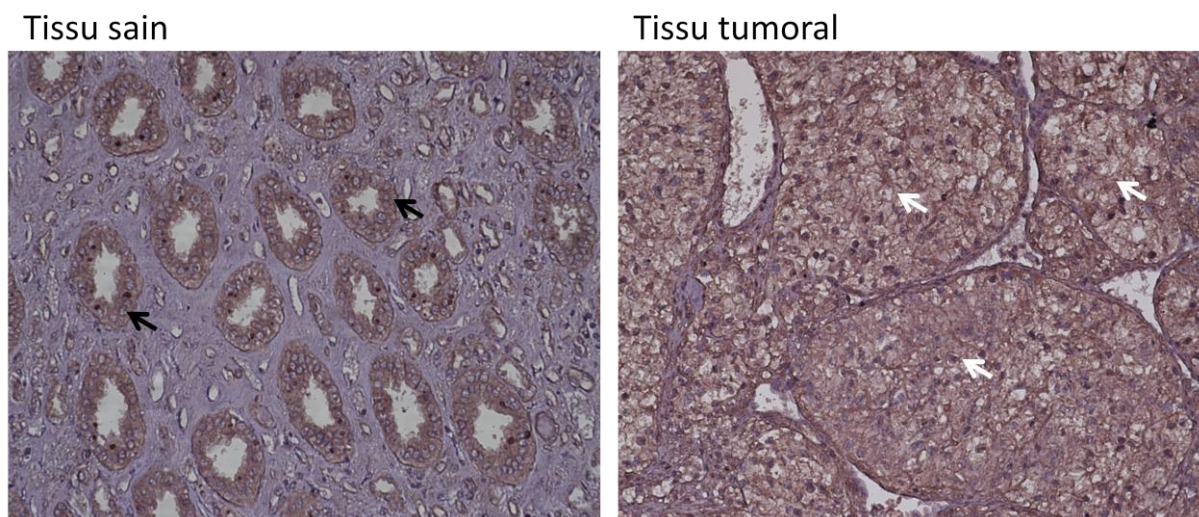


Figure 42 : Localisation de la protéine IL-34 dans le tissu rénal sain et le tissu tumoral (x20).

Les tissus sains et tumoraux des patients de la cohorte indépendante ont été marqués en utilisant un anticorps anti-interleukine-34, puis ont été révélés par la peroxydase. Les clichés présentés sont représentatifs de ce qui était observable lors des tests préliminaires de l'anticorps, et représentent le tissu sain (A) et le tissu tumoral (B) d'un seul et même patient. (Grossissement x200 ; Flèches noires : épithélium tubulaire des néphrons ; Flèches blanches : cellules tumorales).

L'IL-34 est connu pour être exprimé dans le tissu rénal, les marquages ont permis de le localiser dans le tissu épithélial formant les tubules du néphron. Dans les tumeurs, les cellules tumorales semblent produire de l'IL-34. Ces observations ne semblent pas aberrantes compte tenu de l'origine épithéliale des cellules tumorales, et corréle avec les données d'expression de l'IL-34 dans le tissu sain et la tumeur. Ces observations sont de plus intéressantes, car elles corréleront aussi avec l'expression d'IL-34 observée dans nos lignées tumorales murine.

F / Etude de l'axe CSF-1 / CSF-1R

L'IL-34 et le CSF-1 partagent des caractéristiques communes et en particulier peuvent lier et activer le même récepteur. Afin de déterminer si CSF-1 et CSF-1R sont exprimés par les cellules, des études de leurs expressions ont été réalisées.

F-1 / Expression de CSF-1 et de son récepteur dans les cellules murines

Des analyses d'expression de CSF-1 ont été réalisées sur l'intégralité des lignées générées. Le résultat montré ici représente les niveaux d'expression d'IL-34 en fonction des passages *in vivo*.

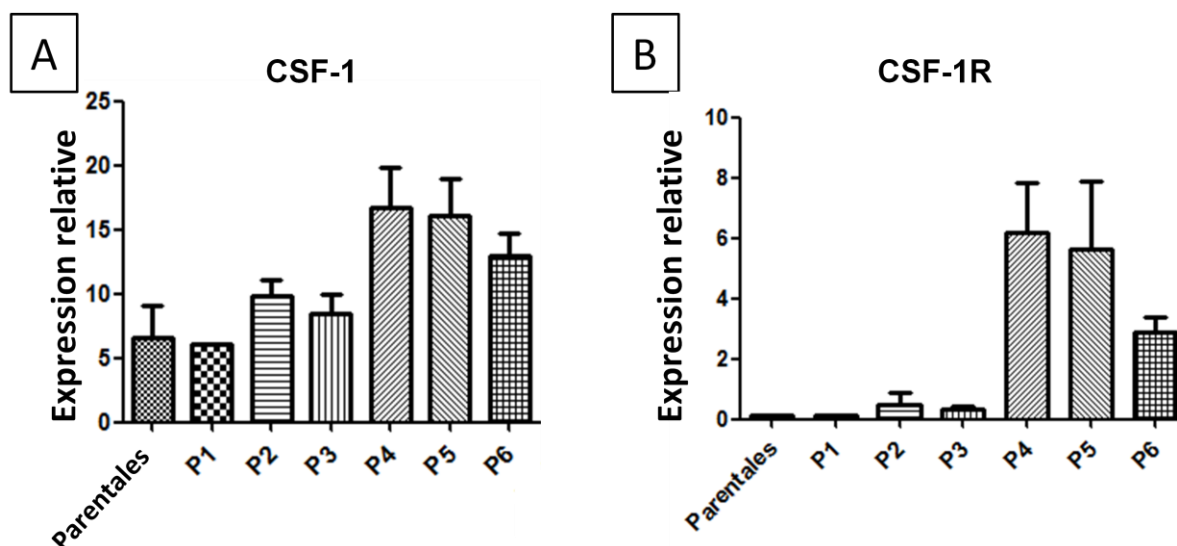


Figure 43 : Niveau d'expression relative du CSF-1 et de CSF-1R en fonction de générations de cellules lors des premières et secondes séries.

Les ARN des cellules générées ont été isolés, et ont été utilisés dans des expériences de RT-qPCR afin d'évaluer le niveau d'expression du CSF-1 et de CSF-1R dans ces cellules. Les résultats présentés sont des valeurs moyennes d'expression relative, réparties par passages, normalisées sur l'expression d'un gène de référence (GAPDH), permettant d'obtenir des valeurs comparatives les unes aux autres.

En analysant les niveaux d'expression des différentes lignées en fonction des passages, nous n'observons qu'une légère variation d'expression du CSF-1 au sein des cellules, cette expression étant seulement deux fois plus élevée entre les cellules parentales et les cellules de 6ème génération (Figure 43-A). L'expression du récepteur au CSF-1 (CSF-1R) pour sa part augmente fortement à partir du passage 4. Il augmente en moyenne 23 fois entre les lignées parentales et les lignées de 6ème génération (Figure 43-B).

Ainsi, tout comme les cellules tumorales de RCC humaines, les cellules Renca expriment le CSF-1 et son récepteur. Le niveau d'expression de CSF-1, même s'il semble fluctuer, n'évolue pas dans le temps comme le fait l'IL-34. De plus, le niveau d'induction du CSF-1 n'est que de deux fois entre les cellules parentales et la 6ème génération, alors que le niveau d'IL-34 augmente séquentiellement pour atteindre un niveau plus de 50 fois supérieure

au niveau initial. Les effets de l'augmentation de CSF-1 seraient donc minoritaires comparés aux effets induits par l'expression de l'IL-34 au cours des passages. Le niveau d'expression de CSF-1 n'évoluait que très peu dans les études transcriptomiques, le résultat présenté ici confirme ces données. L'augmentation de l'expression du récepteur peut lui s'avérer gênant. En effet, bien qu'il puisse potentialiser l'effet de l'IL-34 sur les cellules tumorales, il peut aussi potentialiser l'effet du CSF-1.

F-2 / Expression du CSF-1 chez les patients humains

L'expression plus élevée de CSF-1 chez les patients atteints de RCC est connue de la littérature. Afin de vérifier la surexpression du CSF-1 dans notre cohorte de patients, des analyses d'expression de CSF-1 ont été effectués sur les tissus sains et les tissus tumoraux.

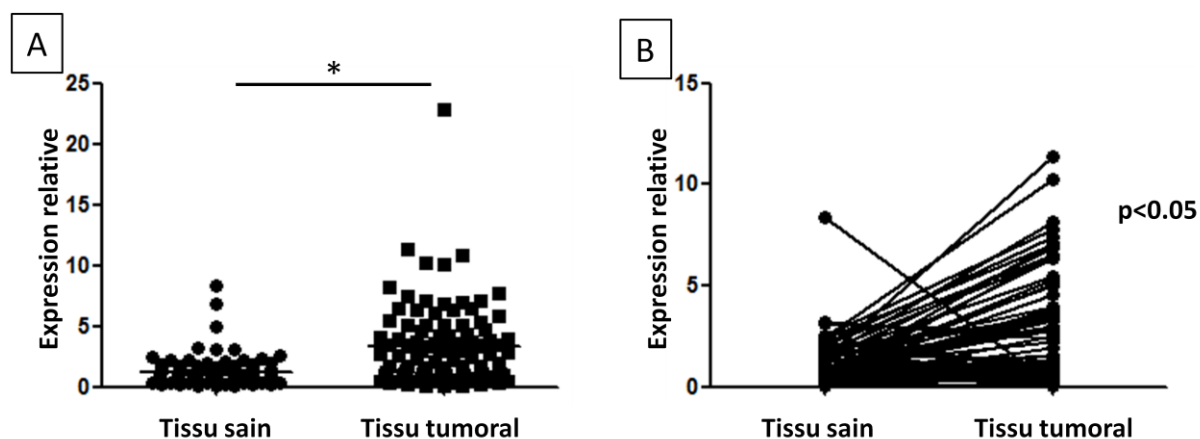


Figure 44 : Niveaux d'expressions du CSF-1 dans les reins sains et les tumeurs de patients atteints de RCC.

Les ARN des tumeurs et du tissu sain de patients, et ont été utilisés dans des expériences de RT-qPCR afin d'évaluer le niveau d'expression du CSF-1 dans ces cellules. Les résultats présentés sont des valeurs d'expression relative, normalisées sur l'expression d'un gène de référence (GAPDH), permettant d'obtenir des valeurs comparatives les unes aux autres. A : Comparaison d'expression entre le tissu sain et le tissu tumoral. B : Comparaisons appariées du tissu sain et des tumeurs du même patient (68 patients dont les échantillons tumeur et tissus sains disponibles) (test utilisé : t-test ; * $p < 0.05$).

L'analyse d'expression du tissu sain et du tissu tumoral montre une expression de CSF-1 globalement plus importante dans les tissus sains comparés aux tissus tumoraux (Figure 44-A). De plus, une analyse comparative directe entre les tissus sains et les tumeurs des mêmes patients montre une différence significative de l'expression d'IL-34 (Figure 44-B).

De la même façon que pour IL-34, nous avons voulu vérifier si le niveau d'expression du CSF-1 pouvait corrélérer avec la survie des patients. Pour cela, une étude a été réalisée en utilisant la banque de donnée du TCGA sur la survie des patients selon le niveau d'expression du CSF-1.

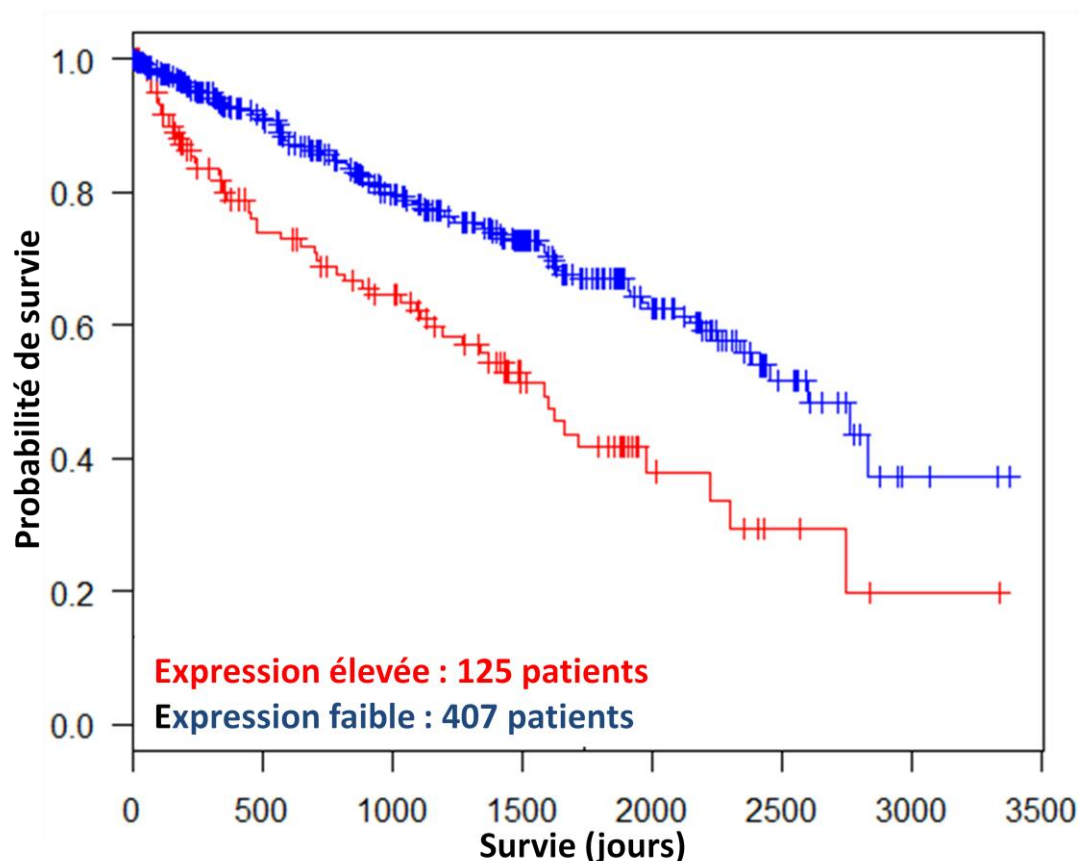


Figure 45 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression de CSF-1 au sein de la tumeur primaire.

Les données d'expression de CSF-1 et de survie des patients ont été obtenues grâce à la banque de données du TCGA et ont permis d'obtenir une courbe d'estimation de Kaplan-Merier. (Rouge : forte expression de CSF-1 ; Vert : Faible expression de CSF-1 ; test utilisé : test du logrank ; $p=0,00001$, hazard ratio : 2.094 ; 532 patients au total ; 125 patients à forte expression et 407 à plus faible expression).

Grâce aux données du TCGA, il a pu être mis en évidence qu'une expression faible de CSF-1 permettait une médiane de survie de plus de 85 mois (Figure 45), là où une expression élevée faisait chuter la médiane de survie à 50 mois environ (Figure 45). La chance de survie des patients ayant une faible expression est environ deux fois plus importante que les patients ayant une expression élevée.

Ainsi dans notre cohorte de patients, le niveau d'expression de CSF-1 est plus important que dans le tissu sein, ce qui confirme les données de la littérature. De plus, le niveau d'expression du CSF-1 qui est proposé comme facteur de mauvais pronostic est bien corrélé avec la survie des patients selon les données du TCGA.

Néanmoins, dans nos générations de cellules, le niveau d'expression n'évolue pas avec les passages. Il est de plus difficile en l'état d'évaluer la quantité de CSF-1 produite par les cellules et les effets biologiques qui en découlent. Des tests en ce sens vont être menés et en particulier grâce à des expériences d'ELISA contre le CSF-1. Il n'est pas exclu que les effets de CSF-1, bien que ne variant pas, puissent masquer ceux de l'IL-34 *in vivo* et *in vitro*. Néanmoins, l'évolution de l'expression de l'IL-34 comparée à l'évolution de l'expression de CSF-1 laisse présager que les effets d'IL-34 puissent évoluer avec les générations de cellules, les rendant plus prépondérants que ceux issue de CSF-1, qui ne devraient pas évoluer au cours des générations.

Les effets individuels du CSF-1 et surtout de l'IL-34 sur les cellules tumorales, et sur la progression tumorale vont être testés grâce au clonage de ces cytokines et de leur récepteur au sein des cellules Renca parentales. Des études *in vivo* pourront être menées grâce à ces cellules. De plus, des protéines recombinante de l'IL-34 et de CSF-1 pourront être utilisées *in vitro* en plus des clonages, afin d'évaluer les effets de l'IL-34 directement sur les cellules tumorales.

Discussions et perspectives

Quels sont les rôles de l'interleukine-34 sur la progression tumorale ?

Peu d'informations sont connues sur les rôles d'IL-34 dans les processus tumoraux. Son rôle a été montré dans certains types de cancers tels que dans l'ostéosarcome, ou il aurait un rôle dans la progression tumorale, via le recrutement de macrophages. D'une façon générale, la littérature prête à l'IL-34 un rôle dans le recrutement de macrophages, en les stimulant vers une maturation de type M2. Le recrutement de ce type de macrophages au sein des tumeurs est associé à la croissance tumorale et l'angiogenèse, et à un mauvais pronostic. Aucune donnée sur le rôle de l'IL-34 dans le RCC n'a été publiée à ce jour.

L'IL-34 pouvant agir lui aussi sur le CSF-1R, son rôle serait donc en partie recoupé par le CSF-1, ce qui rend plus délicat l'étude des effets de l'IL-34. Le rôle de l'axe CSF-1/CSF-1R a été montré comme participant à la réparation tubulaire (tubules des néphrons). Les macrophages sont aussi connus pour être impliqués dans la réparation tissulaire. Or, le récepteur CSF-1R est aussi exprimé sur les cellules de l'épithélium tubulaire. La stimulation de ce récepteur par le CSF-1, qui lui, peut être produit directement par les cellules tubulaire, participerait aussi à la réparation tissulaire en stimulant la prolifération et en réduisant l'apoptose sur les cellules tubulaire humaines et murines de façon autocrine (Menke, Iwata et al. 2009).

CSF-1R est exprimé par les cellules de RCC humaines (Menke, Kriegsmann et al. 2012) et nos données indiquent qu'il est aussi exprimé dans les cellules Renca. Une stimulation autocrine de CSF-1R par CSF-1 a été démontrée dans le RCC (Menke, Kriegsmann et al. 2012), et l'augmentation d'expression du CSF-1 est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de ccRCC (Yang, Wu et al. 2015). Nous avons de plus montré l'expression de CSF-1 et de CSF-1R dans les lignées Renca, et les lignées générées dans notre étude. Il est de ce fait envisageable que l'IL-34 produit par les cellules tumorales puisse agir d'une part sur les macrophages comme évoqué précédemment, en les menant vers une maturation pro-tumorale, mais aussi en agissant de façon autocrine sur les cellules tumorales, favorisant notamment la prolifération et la survie des cellules comme cela est le cas du CSF-1 sur les cellules tubulaires rénales.

L'IL-34 est une interleukine qui a été découverte il y a moins de 10 ans. On lui connaît à ce jour deux récepteurs, le CSF-1R, mais aussi le récepteur PTP- ζ . Il n'est pas exclu que d'autres récepteurs sensibles à l'IL-34 soient découverts. PTP- ζ semble pouvoir être exprimé dans les cellules tubulaires rénales dans certaines conditions, lors d'inflammations par exemple (Baek, Zeng et al. 2015). Il n'est donc pas exclu que les cellules tumorales de RCC puissent elles-aussi exprimer ce récepteur, rendant l'effet de l'IL-34 indépendant de l'axe CSF-1/CSF-1R.

Le rôle de l'IL-34 reste encore à élucider dans nos modèles de cellules murines et chez l'Homme. Dans les lignées de cellules murines, nous avons montré que l'IL-34 est sécrété par les cellules et qu'il était retrouvé dans le milieu de culture *in vitro*. *In vivo*, son rôle pourrait donc se faire de façon locale, c'est-à-dire au niveau de la tumeur primaire, mais il est possible que l'IL-34 puisse agir à distance sur l'organisme, notamment s'il rejoint la circulation sanguine.

Des expériences vont être menées afin de comprendre comment agit l'IL-34 sur la progression tumorale, soit directement sur les cellules tumorales, soit dans un système plus général *in vivo*. Des protéines recombinantes purifiées sont déjà à notre disposition et des cellules surexprimant l'IL-34 et ses récepteurs ainsi que surexprimant CSF-1 sont en cours de génération. De même des extinctions d'IL-34, CSF-1 et de leurs récepteurs vont être menées. Ces outils permettront de tester le ou les rôles de l'IL-34 *in vitro* et *in vivo*.

Les études *in vitro* se feront directement sur les cellules tumorales. Ces études s'intéresseront à différents mécanismes impliqués dans la progression tumorale, tel que la prolifération, la survie, ou encore la migration et l'invasion des cellules. De même, des transcriptomes des cellules stimulées ou non par l'IL-34 seront menés. Tout ceci permettra de connaître les effets de l'IL-34 sur les cellules tumorales directement et viendront alimenter le modèle, intégré dans l'étude de biologie des systèmes.

L'implantation de ces différentes lignées de cellules dans des souris sera un élément important pour l'étude. Il va nous permettre de jauger comment se comporte la maladie si l'IL-34 est surproduit ou si les cellules tumorales ne peuvent pas y répondre. L'étude de la croissance tumorale, ou encore de la présence de métastases sera un élément important pour

comprendre les rôles de l'IL-34 dans un système *in vivo*. L'IL-34 est connu pour agir sur la maturation des macrophages, des études histologiques seront ainsi menées afin de déterminer la ou les types de populations de macrophages présents dans les tumeurs sous l'effet de la stimulation ou non à l'IL-34. Les rôles supposés de ces macrophages de type M2 seront de même analysés. Le système immunitaire étant un système complexe et plus large, les autres populations ces cellules immunitaires seront importantes à étudier. Les rôles de cellules telles que les lymphocytes T ou les cellules NK faisant parti des connaissances dans le RCC, il serait intéressant de voir l'état de ces populations de cellules.

IL-34 biomarqueur pronostic ?

Le RCC est un cancer qui manque aujourd'hui de biomarqueurs utilisables en clinique, que cela soit des biomarqueurs pronostics, ou des biomarqueurs permettant le diagnostic précoce de la maladie. Certains biomarqueurs ont été proposés dans le passé, mais aucun n'a été jusqu'à la validation clinique. De même aucun biomarqueur pouvant évaluer l'évolution de la maladie ou encore la réponse aux traitements n'est connu. La thérapie ciblée ne se limite quant à elle qu'au ciblage de l'angiogenèse, ciblage qui montre ses limites ces dernières années.

Lorsque la maladie est diagnostiquée, le pronostic du patient est généré à partir de la stadification clinique TNM ou du grade nucléaire de Fuhrman. La stadification clinique donne l'état d'avancement de la maladie et non pas la façon dont elle va évoluer, même si elle reste prédictive quant au pronostic vital du patient. Bien que pouvant être utilisé pour poser un pronostic et envisager des traitements, le grade nucléaire de Fuhrman est aussi prédictif mais nécessite l'accès à la pièce opératoire ou à une biopsie, il est de ce fait particulièrement invasif.

Nous avons montré que l'IL-34 est sécrétée par les cellules tumorales murines *in vitro*. Nous espérons pouvoir démontrer aussi qu'il est retrouvé en quantité plus abondante dans les sérums des souris présentant des tumeurs. Des expériences d'ELISA contre l'IL-34 sérique seront ainsi menées afin de déterminer si l'augmentation d'expression de l'IL-34 au sein des cellules tumorales induit une augmentation du taux d'IL-34 dans le sérum des souris d'où sont issues ces cellules. La détection de l'IL-34 dans le sérum pourrait d'une part indiquer un effet potentiellement plus large qu'au simple niveau de la tumeur primaire, mais pourrait aussi avoir un intérêt quant au dosage des niveaux d'IL-34 sérique chez les patients.

En effet, un haut niveau de présence d'IL-34 dans le sang, voir dans les urines des patients, pourrait signifier une tumeur produisant beaucoup d'IL-34. L'identification des rôles d'IL-34, ainsi qu'une corrélation du niveau d'IL-34 sérique avec la survie des patients, ou avec la présence de métastases, pourrait permettre de prédire l'évolution de la maladie. En plus d'un aspect prédictif, il pourrait être intégré comme facteur pronostique, permettant de générer un pronostic quant aux chances de survie du patient.

IL-34 cible thérapeutique ?

L'axe CSF-1/CSF-1R et sa signalisation sont déjà proposés comme cibles thérapeutiques potentielle dans le ccRCC (Menke, Kriegsmann et al. 2012). A cet axe pourrait s'ajouter l'axe IL-34/CSF-1R. Des thérapies ciblant l'axe CSF-1/CSF-1R pourraient se révéler inefficace si l'apport d'IL-34 n'est pas aussi pris en compte. De plus, la possible indépendance de l'IL-34 vis-à-vis du récepteur CSF-1R, grâce à son autre récepteur PTP- ζ rend le système plus compliqué, et pourrait rendre inefficace les traitements de ciblant que le récepteur CSF-1R.

En supposant que l'IL-34 possède bien un rôle sur la virulence de la maladie, et donc sur la survie des patients, et que son rôle dans la progression tumorale soit démontré, il serait dès lors envisageable d'utiliser cette interleukine comme cible thérapeutique dans le ccRCC métastatique, cancer où l'utilisation de l'immunothérapie est dors et déjà un traitement courant.

De l'intérêt des différentes lignées générées, un puissant outil développé au laboratoire

Nous avons développé au laboratoire un outil nouveau et aucune étude similaire n'est représentée aujourd'hui dans la littérature dans l'étude du RCC. La série de lignées cellulaires que nous avons générée montre des améliorations de certaines capacités liées à la progression tumorale. Les optimisations obtenues passent, selon les types de lignées, par la génération de tumeurs plus massives, ou encore la présence de métastases plus importante, et plus rapide *in vivo*. Des modulations phénotypiques des cellules tumorales ont aussi été montrées dans nos études *in vitro*, allant de l'amélioration des capacités migratoires à la production de certains facteurs de transcriptions liées à l'EMT. Des paramètres mettant en évidence un engagement des cellules plus important vers un processus d'EMT ont ainsi été mis en évidence.

Le but principal des différentes stratégies de génération des lignées cellulaires était de les optimiser pour certains mécanismes en fonction des étapes franchies entre l'implantation des cellules et leur purification. Par exemple, les données *in vivo* semblent indiquer que la lignée « Tail » a été fortement optimisée pour la formation de métastases. Les étapes que ces cellules ont du franchir afin de former ces métastases vont de la survie dans le sang à la formation de nouvelles tumeurs dans les poumons, en passant par l'extravasation et l'invasion. Ces mécanismes pourraient être en partie retrouvés dans les cellules « Lung » qui ont eu à passer par des étapes supplémentaires pour envahir le tissu de la tumeur primaire et entrer dans la circulation sanguine. Les cellules « Tail » n'ont pas eu à opérer d'intravasation. En revanche, la lignée « Kidney » génèrent *in vivo* des tumeurs plus massives que les lignées « Lung », mettant en évidence que certaines capacités peuvent avoir été perdues ou n'ont pas été acquises par ces cellules.

La validation de ce modèle a été capitale. Il nous a permis d'identifier grâce à une première stratégie d'étude transcriptomique globale, d'une première cible d'étude. L'IL-34 est donc la première cible qui a été mise en évidence grâce à l'outil généré au laboratoire. Cette étude ne se basait pas sur la distinction entre les différentes lignées mais seulement sur l'évolution de l'expression du gène au cours des passages *in vivo*, et qui corrélait donc avec la chute de survie des animaux. Cette étude qui reste encore à approfondir n'est que le sommet de l'iceberg, et une mine d'information importante peut encore être obtenue par le raffinement de ces données.

Une analyse des données transcriptomes en fonction des types de cellules a débuté et pourrait nous permettre de mettre en évidence des mécanismes distincts en fonction des lignées cellulaires, permettant d'expliquer les différentes étapes franchies par les cellules lors de leur progression tumorale propre. Tout ceci pourra permettre de mieux comprendre les mécanismes de la progression tumorale dans le RCC, voir même de découvrir de nouveaux facteurs pronostiques, ou encore de nouveaux biomarqueurs prédictifs.

Le modèle généré au laboratoire est donc un outil de travail à la fois innovant et puissant qui a déjà permis de mettre en évidence une cible thérapeutique potentielle. Il pourrait mener à une meilleure compréhension des processus tumoraux dans le RCC. Son intégration dans une étude de biologie des systèmes le rend encore plus innovant car il permettrait de générer un modèle d'étude où de nombreux paramètres pourront être associés afin de prédire la biologie du RCC.

Projet 2 : Influence de la matrice extracellulaire dans les mécanismes de la progression tumorale du RCC

La progression tumorale et la formation de métastases sont des mécanismes complexes encore peu connus. Il existe de nombreuses données sur les différents facteurs capables de stimuler les tumeurs à différentes échelles que cela soit au niveau de sa croissance, ou encore dans l'acquisition d'un phénotype agressif.

Le microenvironnement d'une tumeur ou d'un tissu est formé par de nombreux constituants, dont l'ECM. L'ECM peut participer à différentes étapes de la progression tumorale. Dans le RCC, l'expression de fibronectine (FN-1) semble corrélée avec une plus forte mortalité (Waalkes, Atschekzei et al. 2010, Steffens, Schrader et al. 2012). L'impact du collagène n'est pas connu dans ce type de cancer.

Ce projet se positionne dans l'une des thématiques du laboratoire qui vise à étudier le microenvironnement des cancers, et ainsi mieux comprendre les rôles des interactions entre les cellules tumorales et ce microenvironnement. Le but de cette étude est donc d'évaluer les rôles que pourraient avoir différentes ECM. Les matrices testées dans cette étude sont le collagène de type I qui est le collagène le plus répandu dans les tissus adultes, la fibronectine connue comme une matrice pouvant stimuler la migration *in vitro*, et le matrigel, qui est une ECM extraite de sarcome, et d'une composition plutôt proche d'une lame basale (laminine (composant majeur), collagène de type IV notamment). L'intérêt de l'étude s'est porté en particulier sur les effets de ces différentes ECM sur différents processus tumoraux, en particulier sur les processus favorables au phénomène de métastases.

Le modèle murin utilisé, le modèle Renca, est un modèle de carcinome rénal métastatique, issues de tumeurs spontanées de souris Balb/C. En culture, les cellules Renca ont une morphologie cellulaire plutôt épithéliale. *In vivo* l'implantation orthotopique de ces cellules est connue pour générer une tumeur primaire et des métastases pulmonaires (Murphy and Hrushesky 1973). L'agressivité *in vivo* de ces cellules est bien loin de ce que l'on pourrait attendre de la part de cellules possédant un aspect plutôt épithélial *in vitro* (Smith, Gazda et al. 2011). De nombreuses modulations doivent donc intervenir afin de leur faire acquérir ces capacités métastatiques.

Ainsi, afin d'évaluer l'influence de différentes matrices extracellulaires sur le comportement des cellules Renca, les cellules ont étéensemencées sur du collagène de type I, de la fibronectine et du matrigel. Ces conditions ont été comparées à une condition de

référence qui correspond à la culture de cellules sans ECM qui sera appelée condition « plastique ». Les différentes concentrations en ECM utilisées lors de l'étude proviennent de cinétiques de modulation de morphologie des cellules Renca. Le choix de chaque concentration provient ainsi de la concentration minimale pour laquelle les changements de morphologie cellulaire étaient visibles. A noter que tout au long de l'étude, les conditions ne sont pas comparées entre elles mais seulement par rapport à la condition de référence « plastique ».

Ce projet a été dirigé et encadré par Patrick Auguste au sein du laboratoire. Des analyses bioinformatiques additionnelles ont été effectuées par Kim Clarke, participant au projet METASYS.

I / Influence du collagène de type I, de la fibronectine et du matrigel sur le phénotype des cellules Renca

A / Morphologies

Afin d'évaluer l'influence des matrices sur la morphologie des Renca, les cellules ont été cultivées sur ces différentes matrices. Au bout de 48 heures, les cellules ont été fixées et le cytosquelette d'actine a été marqué grâce à la phalloïdine couplée à un fluorophore (rhodamine).

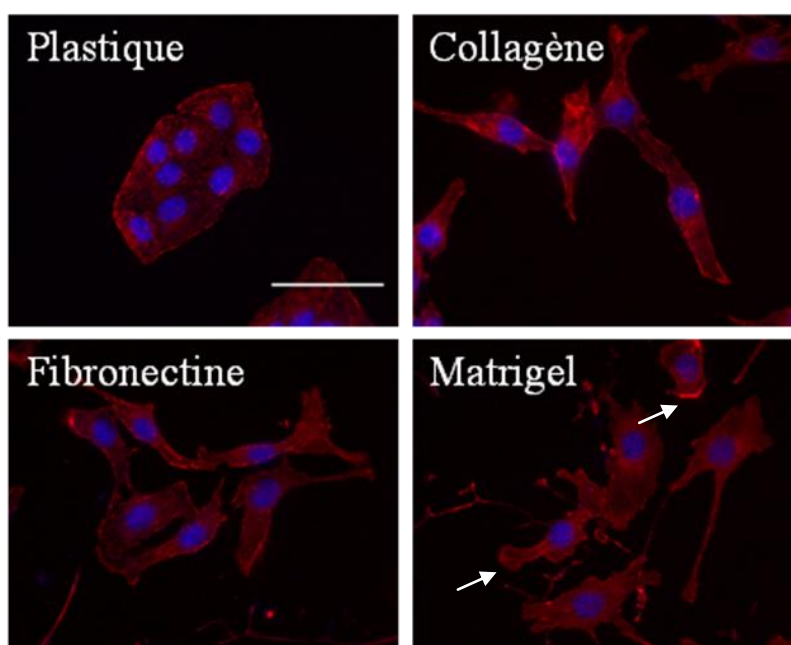


Figure 46 : Morphologie des cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.

Les cellules Renca ont été cultivées sur des lamelles de verre recouvertes ou non avec du collagène de type I, de la fibronectine ou du matrigel pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et le cytosquelette d'actine a été marqué en utilisant la phalloïdine couplée à la rhodamine (rouge). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Barre : 50µm. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Dans la condition de référence (ici lame de verre mais référée comme « plastique »), les cellules Renca forment des amas cellulaires. Elles sont peu allongées et semblent être jointives (Figure 46). Ce type de morphologie attendu est connu de la littérature pour les cellules Renca, et est caractéristique des cellules d'origine épithéliale.

Sur le collagène, les cellules sont plus allongées, et moins jointives avec les cellules voisines (Figure 46), bien qu'il semble que certaines cellules aient gardé certaines

interactions. Une perte partielle des jonctions est donc envisagée. Ce type de morphologie est nettement moins épithélial et rappelle celui de cellules mésenchymateuses.

Sur la fibronectine, les cellules semblent aussi perdre leurs adhérences cellules-cellules, et adoptent une morphologie proche de ce qui est observé sur le collagène (Figure 46), avec un corps cellulaire qui semble néanmoins plus large, faisant penser à un étalement cellulaire plus important.

Enfin, sur le matrigel, les cellules Renca présentent également une perte apparente de jonctions intercellulaires. Les cellules s'individualisent, présentent un corps cellulaire plus large que sur le plastique, et présentent de nombreuses extensions de membranes pouvant s'apparenter à des lamellipodes (Figure 46, flèches blanches).

Les cellules Renca, cellules de morphologie épithéliale sur le plastique changent donc de morphologie selon la matrice sur laquelle elles sont cultivées. Le phénotype initial est modulé vers des morphologies qui se recoupent en parties, mais qui présentent des différences en fonction du type de matrice. D'une façon générale, une caractéristique principale de ces modulations de morphologies est la perte du phénotype épithélial, avec notamment l'allongement des cellules ainsi que la perte apparente de jonctions intercellulaires.

B / Jonctions intercellulaires

L'une des caractéristiques de la perte d'un phénotype épithélial est la diminution voir la perte des jonctions intercellulaires. Ces jonctions intercellulaires semblent avoir été au moins partiellement perdues en fonction des matrices extracellulaires. Afin d'évaluer la présence des jonctions intercellulaires de type cadhérine, les cellules Renca cultivées sur les différentes ECM ont été marquées à l'aide d'anticorps dirigés contre la β -caténine.

La β -caténine est une protéine localisée aux jonctions intercellulaires, et qui participe à ces jonctions, permettant en partie la stabilisation du complexe de jonctions cellules-cellules dépendantes des cadhérines. Une diminution de la quantité de la β -caténine cellulaire est souvent associée à la perte de ces jonctions.

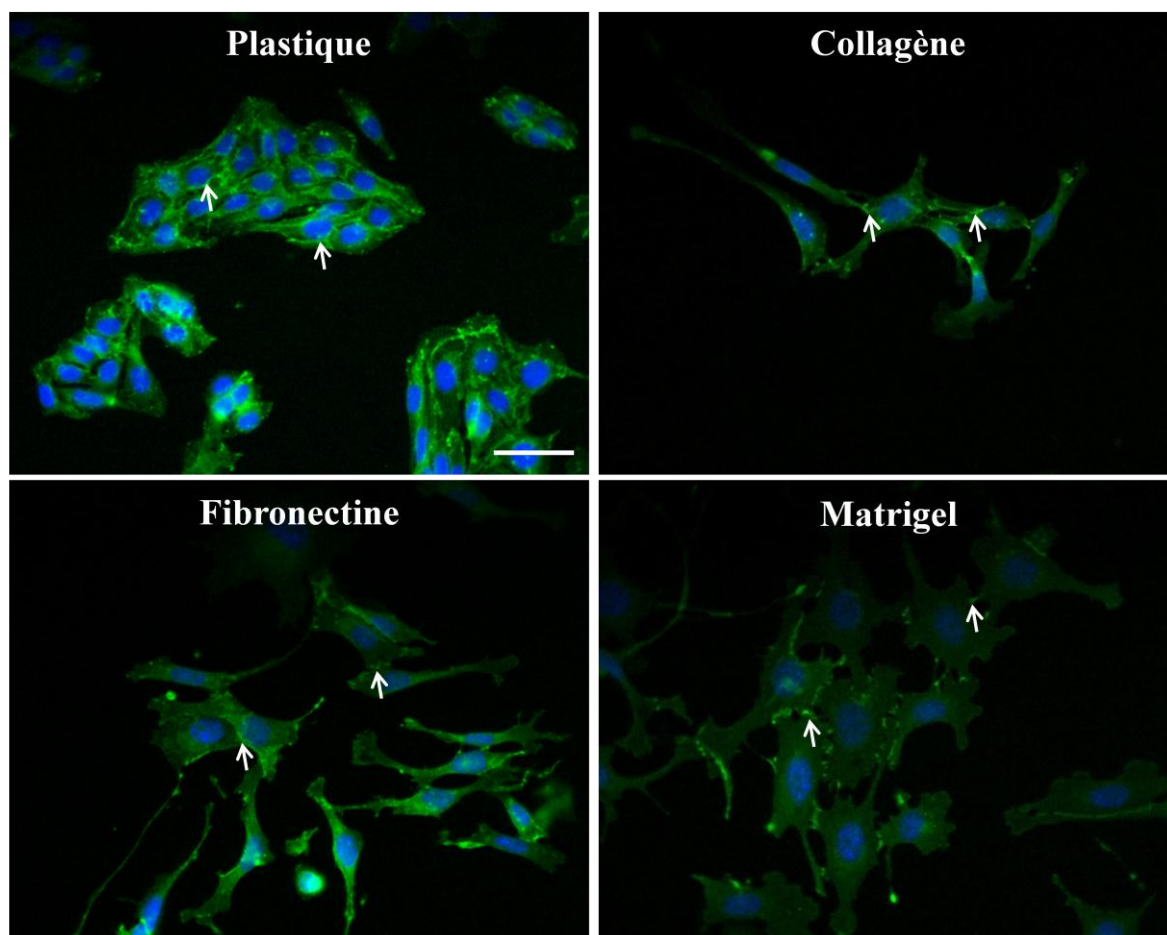


Figure 47 : Etat des jonctions intercellulaires des cellules Renca sur les différentes matrices extracellulaires.

Les cellules Renca ont été cultivées sur des lamelles de verre revêtues ou non avec du collagène de type I, de la fibronectine et du matrigel pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et un membre du complexe des jonctions intercellulaires de type cadhérine, la β -caténine, a été marqué (vert). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). (Barre : 50 μ m ; Flèches blanches : jonctions intercellulaires). Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

La β -caténine étant une protéine cellulaire capable également d'induire des réponses cellulaires, celle-ci est très régulée. La protéine est généralement dégradée, lorsqu'elle n'est plus associée aux complexes de jonctions intercellulaires. Mais, dans certains cas elle est délocalisée au noyau où sa fonction d'activateur de facteurs de transcription est activée, ce qui entraîne la régulation de gènes impliqués notamment dans la prolifération ou dans le mécanisme d'EMT.

Dans la condition plastique, la β -caténine est localisée au niveau des nombreux contacts intercellulaires (Figure 47-Plastique ; flèches blanches). Ce marquage est en accord avec le phénotype épithélial des Renca. Pour les cellules cultivées sur le collagène de type I,

une diminution des zones de concentration de la β -caténine est observée. Elle semble néanmoins se localiser au niveau des contacts intercellulaires (Figure 47-Collagène ; flèches blanches). Aucun signal β -caténine n'est présent au niveau du noyau. Le constat est le même pour les cellules cultivées sur la fibronectine et le matrigel, une diminution des zones de concentration de la β -caténine est observée. Elle reste toutefois localisée au niveau de contacts cellulaires (Figure 47-Fibronectine et Matrigel ; flèches blanches).

La localisation et/ou la présence de la β -caténine est altérée dans les cellules cultivées sur le collagène de type I, la fibronectine ou le matrigel, comparée au plastique. Ceci met en évidence la diminution des jonctions intercellulaires. Une des possibilités pour les cellules de réguler les jonctions dépendantes de la cadhérine est de déréguler la β -caténine mais, à l'inverse, la modulation de la β -caténine à l'échelle protéique peut être une conséquence de ces pertes de jonctions. Afin de comparer la quantité de β -caténine présente dans les cellules Renca cultivées sur les différentes ECM pendant 24 heures et 48 heures, des analyses par western-blot ont été effectuées sur des extraits protéiques.

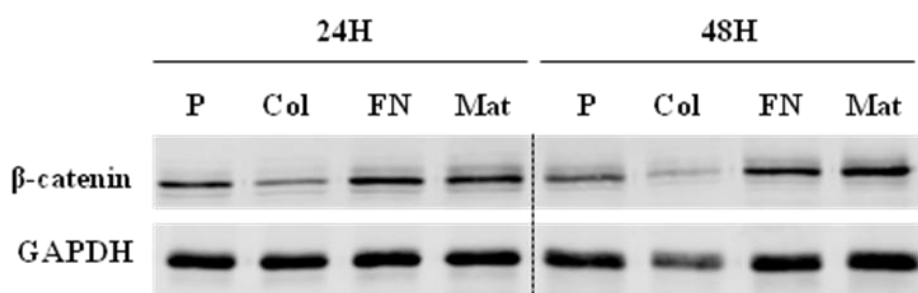


Figure 48 : Diminution de la quantité de β -caténine dans les cellules cultivées sur les différentes matrices.

Les cellules Renca ont été cultivées sur différentes matrices pendant 24 et 48 heures puis ont été lysées. La présence de la β -caténine a été analysée par Western Blot. (P : Plastique, Col : Collagène de type 1, FN : Fibronectine, Mat : Matrigel). Le résultat présenté ici est représentatif de 3 expériences indépendantes.

Ces analyses en western-blot ont montré que la quantité protéique de β -caténine dans les cellules cultivées sur le collagène est diminuée par rapport au plastique (Figure 48). En revanche, ces quantités ne sont pas diminuées dans les cellules cultivées sur la fibronectine et le matrigel (Figure 48).

La diminution de la β -caténine dans les cellules cultivées sur le collagène va dans le sens de la perte des jonctions intercellulaires observées par immunomarquage, et semble

montrer que la β -caténine est dégradée. Malgré tout, il n'est pas possible d'après les données présentées ici de dire si la perte des jonctions intercellulaires serait due à cette diminution de β -caténine au sein de la cellule, ou si cette diminution est un effet secondaire de la perte des jonctions.

Les résultats des western-blots sur les extraits protéiques des cellules cultivées sur la fibronectine et le matrigel sont par contre assez surprenants et inattendu compte tenu des résultats précédents. En effet, la diminution de la localisation β -caténine à la membrane, et son absence de localisation nucléaire, pouvait laisser supposer une diminution de la β -caténine à l'échelle protéique. Il s'avère que cela ne serait pas le cas. A ce stade, une justification possible serait que la β -caténine serait en partie délocalisée de la membrane, ne serait pas localisée au noyau, mais pourrait être stabilisée dans le cytoplasme.

La modulation de la morphologie des cellules qui semblait montrer une diminution et/ou une perte des jonctions intercellulaires a été confirmée par immunomarquage grâce à un partenaire important de la liaison intercellulaire, la β -caténine. Cette perte de liaisons dépendantes des cadhérines va dans le sens d'une perte au moins partielle du phénotype épithélial des cellules Renca cultivées sur les différentes ECM.

Pour compléter le résultat et mieux comprendre le mécanisme mis en jeu, il serait intéressant de pouvoir jauger de l'état de la E-cadhérine et de la N-cadhérine, au niveau ARNm et protéique. La diminution d'expression et/ou la diminution de la forme protéique de la E-cadhérine pourrait expliquer le phénomène, tout comme l'expression de la N-cadhérine. Néanmoins, les anticorps et les amorces n'étaient malheureusement pas disponibles au laboratoire.

C / Prolifération

Les cellules Renca sont des cellules tumorales qui ont perdu le contrôle de la prolifération. Bien que ce facteur ne soit pas un élément prépondérant dans l'acquisition d'un phénotype invasif au sein des tumeurs, il est néanmoins intéressant d'évaluer l'impact que peuvent avoir les différentes ECM sur la prolifération des cellules. De plus, dans les cellules épithéliales, la prolifération ainsi que l'apoptose des cellules, sont fortement régulées par les

jonctions intercellulaires. Ces jonctions intercellulaires étant elles-mêmes régulées par les matrices, il est intéressant d'évaluer l'impact de celles-ci sur la prolifération des cellules.

Pour répondre à cette question les cellules Renca ont été ensemencées sur ces matrices à la même densité cellulaire. Les cellules ont ensuite été comptées au compteur de cellules au bout de 72 heures.

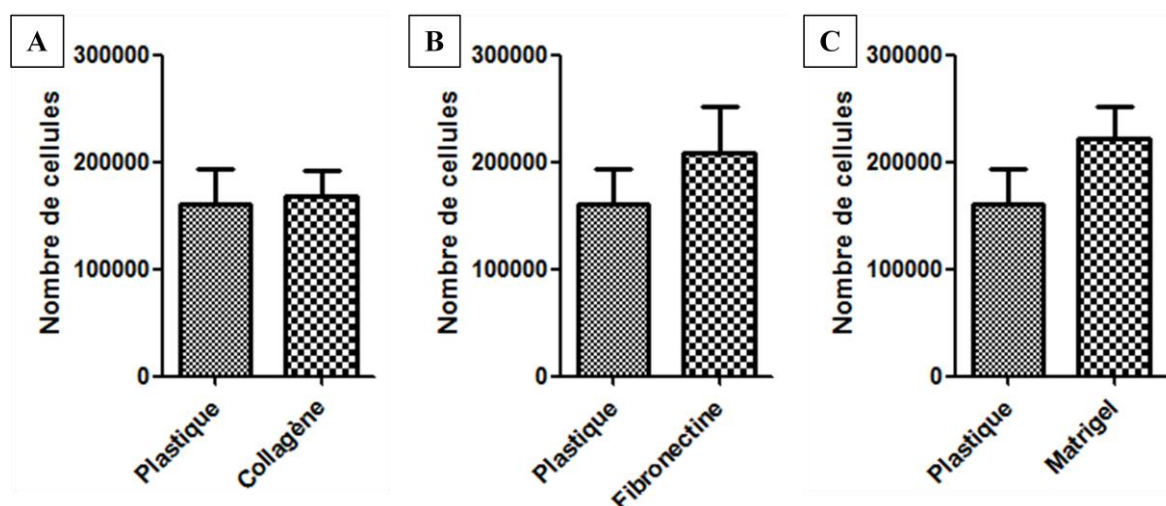


Figure 49 : Prolifération des cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.

Les cellules Renca ont été ensemencées à 20 000 cellules sur le plastique ou sur le collagène de type I (A), la fibronectine (B) ou le matrigel (C). Au bout de 72 heures, les cellules ont été comptées. Les valeurs indiquées sont le nombre moyen de cellules dénombrées au bout de 72 heures $\pm$ SEM, N = 4. (Test utilisé : t-test, comparé à la condition de référence « plastique »)

Le nombre moyen de cellules Renca cultivées sur le plastique au bout de 72 heures est d'environ 160 000. Sur le collagène, il est aussi de 160 000 environ (Figure 49-A). Sur la fibronectine ou le matrigel, le nombre de cellules est d'environ 210 000 et 220 000 au bout de 72 heures (Figure 49-B et C). Ces différences ne sont toutefois pas significatives.

Le nombre de cellules observées dans ce type d'expérience n'est pas seulement induit par le phénomène de prolifération, mais peut aussi être modulé par l'apoptose au sein des cellules. A ce stade, il ne nous est pas possible de mettre en évidence si la prolifération et/ou l'apoptose ne sont pas modulés par les matrices extracellulaires utilisées. Nous ne pouvons finalement conclure que sur la croissance globale des cellules, qui ne semble donc pas varier sous l'effet des matrices.

D / Adhérence

L'adhérence à la matrice est un élément important, notamment pour la migration des cellules. Un défaut ou un excès d'adhérence peut entraîner une incapacité des cellules à migrer. Afin de caractériser la capacité des cellules Renca à adhérer sur les différentes matrices étudiées, des tests d'adhérence ont été réalisés.

Dans le temps, les cellules Renca n'adhèrent pas mieux sur le collagène de type I que sur le plastique (Figure 50-A). Il est intéressant de noter que les cellules Renca adhèrent peu sur le plastique, une majorité de cellules n'ayant pas adhéré au bout d'une heure. Les cellules adhérentes semblent de plus s'étaler lentement. Il faut ainsi attendre plusieurs heures pour que la quasi-totalité des cellules aient adhérees. L'adhérence des cellules Renca sur le collagène de type I fait de même. Au bout d'une heure, une fraction plus importante de cellules semblent adhérer sur le collagène de type I. Cette variation n'est néanmoins pas significative. L'adhérence des Renca sur la fibronectine et sur le matrigel est bien plus rapide que sur le plastique, les cellules ayant en majorité adhérees au bout de 10 minutes sur le matrigel et en 30 minutes sur la fibronectine (Figure 50-B-C), puisqu'il semble se dessiner un plateau pour ces deux conditions à partir de 10 minutes et de 30 minutes respectivement pour le matrigel et la fibronectine.

L'adhérence des cellules sur les matrices est principalement induite par les intégrines. La forte adhérence des cellules Renca sur la fibronectine et le matrigel semble suggérer qu'une population conséquente d'intégrines pour ces substrats est présente à la surface des cellules. Les résultats des tests d'adhérences sur le collagène de type I montrent une faible adhérence pour ce substrat. Ceci laisse supposer une quantité limitée d'intégrines ou de molécules d'adhérence capable de lier le collagène de type I. Il n'est exclu que des molécules d'adhérence soit produite de façon dépendante du collagène de type I. Ceci pourrait être étudié par qRT-PCR et par western-blot. Néanmoins, les anticorps des couples d'intégrines liant le collagène de type I ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$) ne nous étaient pas accessibles et nous n'avons pas pu valider cette hypothèse.

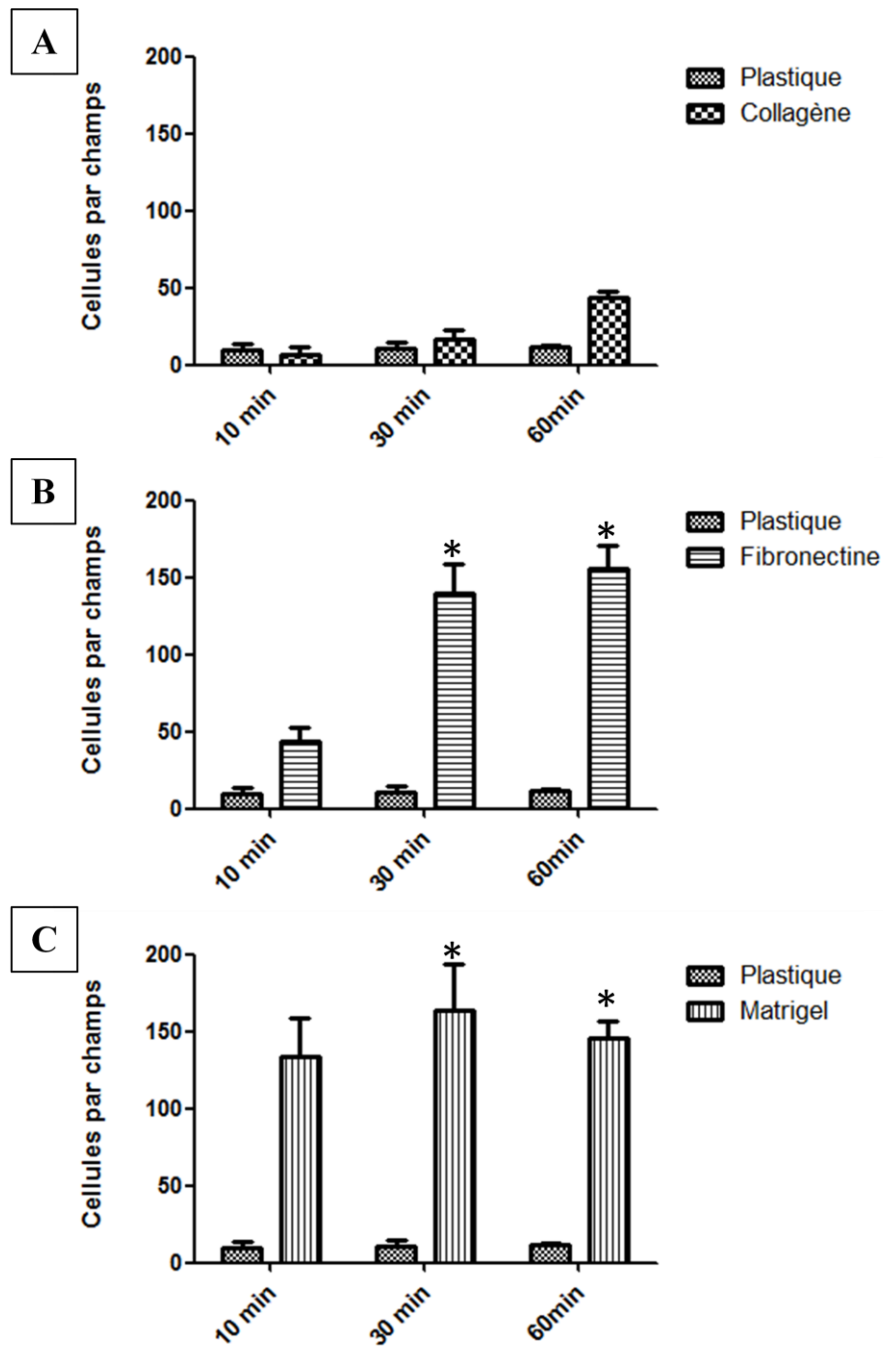


Figure 50 : Adhérence des cellules Renca sur différentes matrices extracellulaires.

Les cellules ont été mises à adhérer sur le plastique ou sur le collagène de type I (A), la fibronectine (B) ou le matrigel (C), puis les cellules qui n'ont pas adhérées ont été retirées au bout de 10 minutes, 30 minutes ou 60 minutes. Les cellules ayant adhérées ont été photographiées puis comptées. Les valeurs représentent le nombre moyen de cellules adhérentes par champs $\pm$ SEM, N = 3. (Test utilisé : ANOVA suivi d'un post-test de Dunn, * : $p < 0.05$ comparé à la condition de référence « plastique »).

E / Migration et Invasion

Les capacités migratoires et invasives des cellules tumorales sont des paramètres importants dans la progression tumorale, au moins dans les premières étapes de la formation de métastases. Lors de ces, les cellules tumorales vont devoir envahir et donc migrer dans le tissu, (et/ou dans la tumeur), afin de s'en échapper. Cette migration va nécessiter l'acquisition d'un phénotype migratoire, mais peut aussi nécessiter l'acquisition d'une capacité à dégrader la matrice extracellulaire. Afin de déterminer si les ECM utilisées sont capables de stimuler la migration et l'invasion des cellules Renca, des expériences de migration / invasion en chambre de Boyden ont été mises en œuvre.

Le principe de ces expériences est de placer des cellules sur un tamis (appelé insert) percé de pores et de les soumettre à un gradient de facteurs attractants. Ces facteurs vont attirer les cellules, dans la partie inférieure du tamis, si ces cellules ont la capacité de migrer et d'envahir les matrices sur lesquels elles reposent.

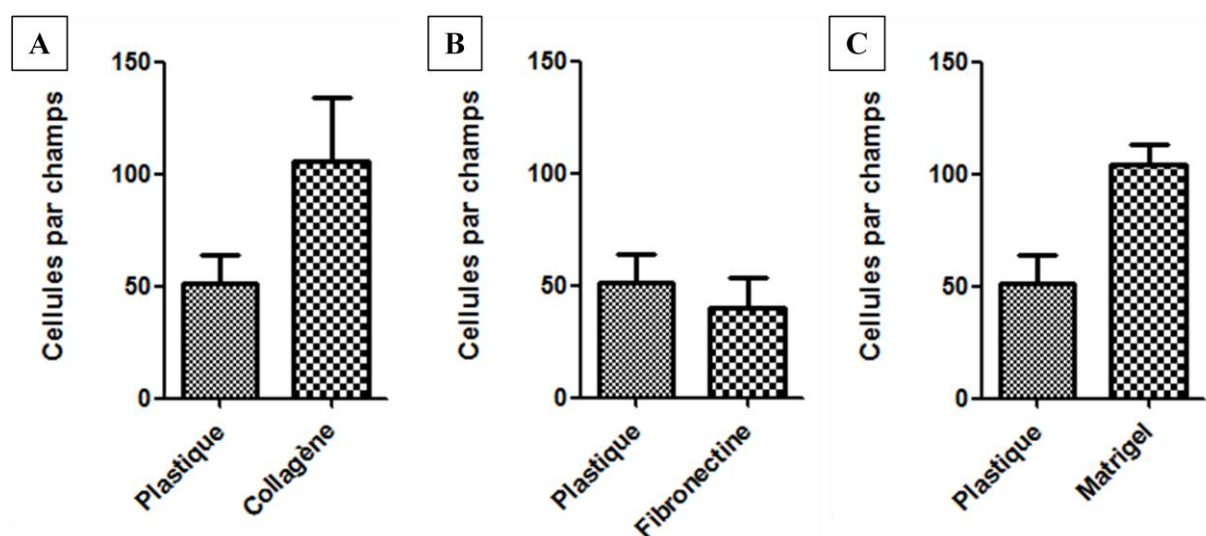


Figure 51 : Migration / Invasion des cellules Renca en fonction de la matrice extracellulaire.

50 000 cellules Renca ont été déposées sur des inserts nus (condition de référence « plastique »), ou tapissés de collagène de type I (A), fibronectine (B) et matrigel (C) et dans un milieu sans sérum. Les inserts ont été placés dans des puits contenant du milieu complet (10% de sérum). Au bout de 16h, les cellules ayant migré à travers l'insert ont été marquées au DAPI et dénombrées. Les résultats représentent le nombre moyen de cellules par champs, $\pm$ SEM, N=3. (Test utilisé : t-test, comparé à la condition de référence « plastique »).

Lorsque les cellules sont ensemencées sur du collagène de type I, 2 fois plus de cellules ont migré par rapport à une condition sans stimulation matricielle, passant ainsi de 51 cellules en moyenne par champs à 106 cellules (Figure 51-A). La migration des cellules ensemencées sur la matrigel montre aussi une augmentation avec 104 cellules (Figure 51-C). Malgré tout, ces observations ne sont que des tendances et ne sont pas significatives. Les stimulations par la fibronectine ne montre pas plus de cellules ayant migrées (Figure 51-B).

Les cellules Renca bien qu'en apparence épithéliale, ont donc une certaine capacité de migration basale, preuve de la transformation déjà opérée au sein de ces cellules, et d'un engagement des cellules vers un phénotype plus mésenchymateux. Contrairement à ce qui aurait pu être attendu du fait de ses capacités connues pour induire la migration dans de nombreux modèles cellulaires (Pankov and Yamada 2002), la fibronectine ne stimule pas la migration des cellules Renca dans ce type d'expérience. Cependant ce type d'expérience n'est peut-être pas le bon à utiliser. En effet la littérature montre que la fibronectine peut être elle-même utilisée comme facteur attractant (Brenner, Gross et al. 2000), il n'est donc pas exclu que la fibronectine entre en concurrence avec le gradient de sérum. Un autre aspect à ne pas laisser de côté pourrait être la composante adhérence, une trop forte adhérence à la matrice pourrait finalement se révéler être moins efficace pour la migration cellulaire. Des expériences de migration 2D pourraient être complémentaires des résultats précédents, et montrer ou non une augmentation de migration dans cette condition, comme dans les autres.

Bien que le collagène de type I et le matrigel ne montre pas d'augmentation de migration significative, une tendance semble tout de même se dessiner, et il n'est pas exclu que cette matrice puisse finalement améliorer les capacités migratrices des cellules. Une augmentation du nombre d'expériences de ce type pourrait permettre d'obtenir des résultats significatifs.

Dans ce type d'expérience, et malgré que les inserts aient été seulement tapissés de matrice, il n'est pas exclu que les cellules aient la nécessité de dégrader cette matrice pour pouvoir traverser le tamis. Toutefois, même si les cellules ont eu cette nécessité, cela ne ferait qu'ajouter des étapes par rapport aux conditions de références, ce qui finalement, ne remet pas forcément en cause l'augmentation de migration observée sur le collagène de type I et le matrigel.

F / Dégradation de la matrice extracellulaire – Zymographie

Lors de l'invasion, les cellules tumorales ont besoin de dégrader l'ECM. Cette fonction de dégradation peut passer par la sécrétion de MMPs. Afin de tester la capacité des cellules à libérer dans le milieu de culture des protéases capables de dégrader notamment les collagènes, des expériences de zymographie sur une matrice de gélatine ou de collagène ont été effectuées.

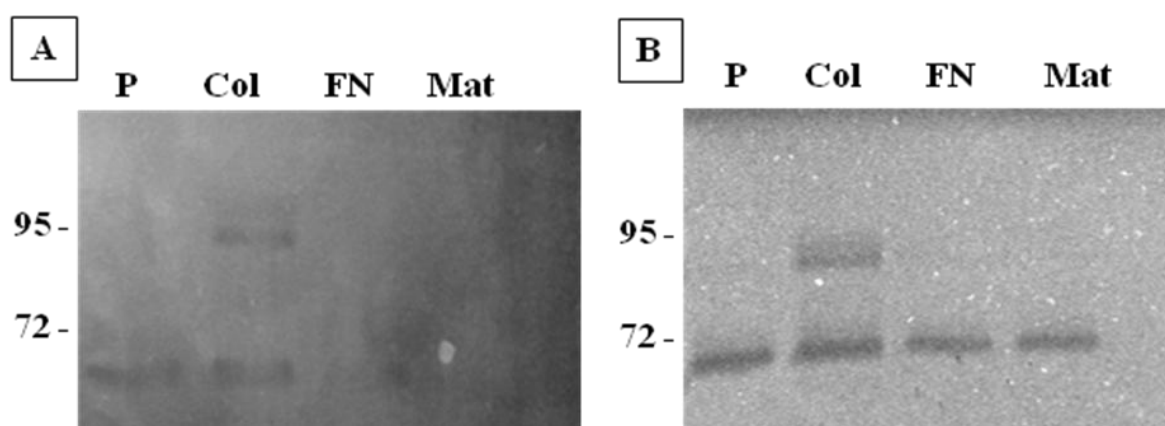


Figure 52 : Zymographie à partir du surnageant de cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.

Les cellules ont étéensemencées sur du plastique, du collagène de type I, de la fibronectine et du matrigel. Au bout de 24h, le milieu a été remplacé par du milieu ne contenant pas de sérum. Après une nuit d'incubation, le milieu conditionné a été chargé dans un gel de zymographie contenant de la gélatine (A) ou du collagène de type I (B). La figure montre un résultat représentatif de 3 expériences indépendantes (P : Plastique, Col : Collagène de type I, FN : Fibronectine, Mat : Matrigel)

La zymographie de gélatine, tout comme celle de collagène met en évidence la présence d'une protéinase active d'une taille apparente d'un peu moins de 72kDa dans le surnageant des cellules, et ce quelque soit la matrice employée, sauf dans la condition matrigel dans le cas d'une zymographie de gélatine (Figure 52). Le gel de zymographie montre aussi, une protéase active de 90kDa lorsque les cellules sont cultivées sur le collagène de type I. Elle n'est pas présente dans la condition de référence, ni même dans les conditions fibronectine ou matrigel (Figure 52).

Les poids moléculaires des protéinases obtenues sur ces types de zymographie permettent de caractériser ces protéinases : la protéinase de 72 kDa est la matrice metalloprotéinase 2 (MMP-2) et la protéinase de 92kDa est la matrice metalloprotéinase 9 (MMP-9). Le collagène est donc en mesure de provoquer au moins un relargage dans le

milieu extracellulaire de MMP-9 par les cellules. La production *de novo* et la sécrétion de MMP-9 pourrait passer par une activation de la transcription du gène de MMP-9. Cette éventualité devra être testée par RT-qPCR.

L'expression de ces MMPs dans les cellules tumorales a été montré comme étant associé à leur agressivité, notamment pour MMP-2 (Stetler-Stevenson 1990, Tryggvason, Hoyhtya et al. 1993). Ces deux MMPs ont la capacité de dégrader certaines matrices et en particulier le collagène de type IV, composant le plus abondant des lames basales. La dégradation de cette lame basale étant associée à la progression métastatique. Bien que controversée dans la littérature, la capacité de MMP-9 à dégrader le collagène de type I semble néanmoins possible (Bigg, Rowan et al. 2007). Les résultats obtenus avec le surnageant des cellules Renca vont dans ce sens.

La présence de MMP-2 dans les cellules Renca est également controversée, Miyake et al ont montré une absence de l'enzyme dans les cellules (Miyake, Hara et al. 1999) alors que Muraishi et al ont montré une expression de MMP-2 active dans ces mêmes cellules (Muraishi, Mitani et al. 2001). Cela peut s'expliquer par un manque de sensibilité du test utilisé par Miyake ou par la dérive des cellules en culture. Nos résultats soutiennent les résultats de Muraishi.

La production, la sécrétion et l'activation de MMPs dans les cellules est un des facteurs, parmi d'autres, qui permet d'évaluer le phénotype des cellules tumorales et notamment de caractériser le phénomène d'EMT.

G / Expression de facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT

Les expériences menées jusqu'ici semblent aller dans le sens d'une modification du statut épithélial des cellules cultivées sur les différentes ECM, et en particulier sur le collagène de type I. Ceci laisse présager que les cellules modulent leur phénotype pour tendre vers un phénotype moins épithélial, et plus mésenchymateux. Ce processus d'EMT peut être mis en évidence par différent moyens (modulation de la migration, des jonctions intercellulaires, production de MMPs, ...). Le programme d'EMT peut être régulé et donc décelé par la présence, ou la modulation de certains facteurs de transcription de l'EMT, en

particulier des facteurs de transcriptions Zeb 1, Zeb 2 et Snail 1. Afin de tester l'effet du collagène de type I sur l'expression de ces facteurs de transcription, des expériences de qRT-PCR ont été réalisées sur les ARN de cellules cultivées pendant 24 heures sur du plastique ou sur du collagène de type I.

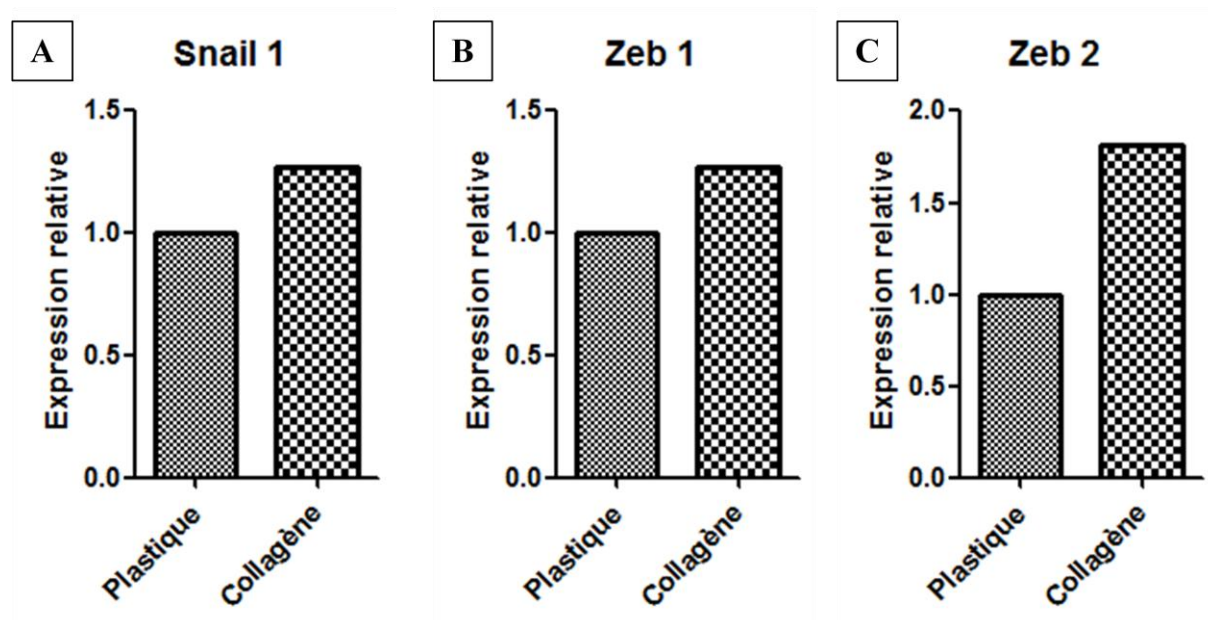


Figure 53 : Expression de facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT dans les cellules Renca cultivées sur le collagène.

Les ARN de cellules cultivées pendant 24 heures sur du plastique ou du collagène de type I ont été isolés et utilisés dans des expériences de RT-qPCT afin d'évaluer les es niveaux d'expression de Snail 1 (A), Zeb 1(B) et Zeb 2(C). Les résultats présentés sont exprimés en expression relative par rapport à la condition de référence (plastique). N=1.

Parmi les 3 gènes testés, l'expression de ZEB 1 et Snail 1 montraient une légère augmentation (environ 25%) d'expression (Figure 53-A et B). L'expression de Zeb 2 pour sa part montrait une augmentation de plus de 80% (Figure 53-C).

Bien que ces résultats ne soient que préliminaires, il semble que le collagène de type I soit en mesure d'induire l'expression de certains facteurs de transcription connus pour participer au processus d'EMT. Ces expériences restent à être approfondies et menées sur les autres types d'ECM traitées dans cette étude.

II / Exploration des voies activées par les ECM utilisées et identification de récepteurs impliqués

A / Exploration des voies activées par les différences ECM

L'ECM peut activer des voies de signalisation à l'intérieur de la cellule via leurs différents récepteurs (intégrines, voir DDRs pour le collagène). Afin d'identifier certaines des voies de signalisation activées dans les cellules Renca cultivées sur les différentes ECM, des analyses par western-blot ont été effectuées. Une étude préliminaire en utilisant des cocktails d'anticorps permettant d'évaluer l'activation de voies a été menée. Celle-ci ne montrait pas d'activation des voies de P53, P28 ou encore de AKT (non montré). Une activation des voies de Erk et de Src avait par contre été observées (non montré). Afin d'obtenir des données cinétiques sur ces voies de signalisation, des analyses ont été effectuées après 1 heure, 3 heures, 5 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures de culture des cellules sur les différentes matrices.

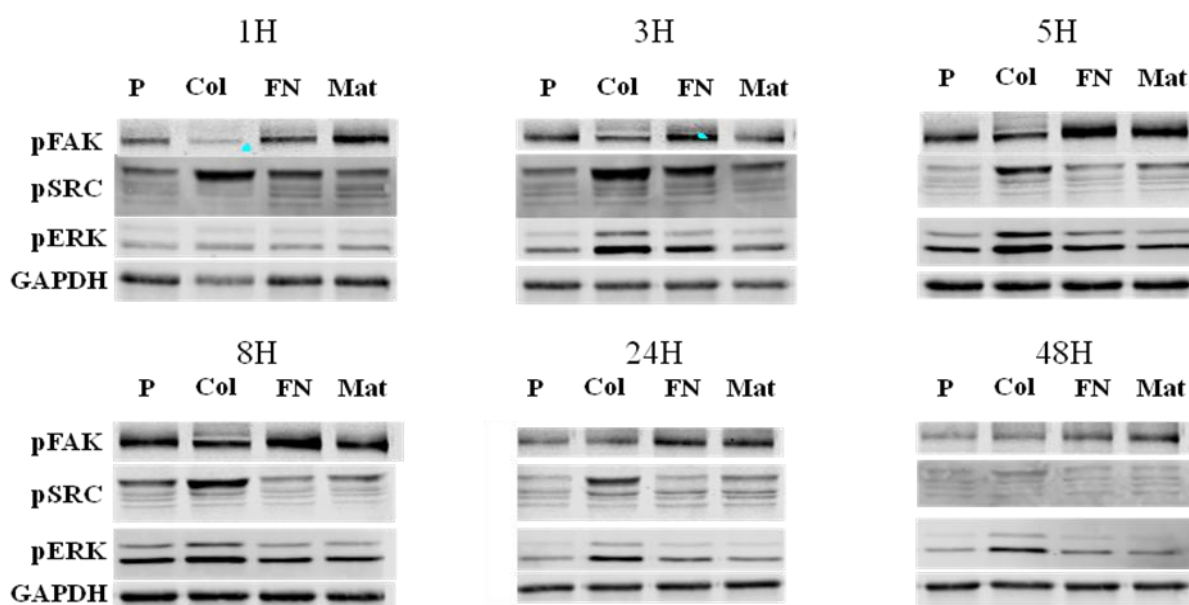


Figure 54 : Cinétique d'activation de voies de signalisation dans les cellules Renca cultivées sur différentes matrices extracellulaires.

Les cellules ont été cultivées sur différentes matrices extracellulaires. A différents temps de stimulation, les cellules ont été lysées et les activations de Fak, Erk et Src ont été analysées par Western Blot. (P : Plastique, Col : Collagène de type I, FN : Fibronectine, Mat : Matrigel). Les résultats présentés sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

Sur la plastique, l'activation des voies étudiées est détectable et ce, dès la première heure de mise en culture (Figure 54). La mise en culture des cellules Renca sur la fibronectine induit une activation rapide dès 1 heure des voies FAK et Src par rapport à la condition de

référence (plastique). Cette activation perdure pendant au moins 48 heures pour la voie FAK, et disparaît au bout de quelques heures pour la voie Src. La voie Erk, est faiblement activée à 3 heures et retombe à un niveau équivalent à la condition plastique au bout de 8 heures (Figure 54). Le même résultat est obtenu lors de la culture des cellules sur le matrigel sauf pour la voie Erk qui n'est pas activée (Figure 54).

Le collagène de type I induit une activation de la voie Src dès la première heure, par rapport à la condition de référence. Cette activation reste soutenue sur au moins 48 heures. La voie Erk quant à elle, est activée avec un léger délai de 3 heures, et reste, elle aussi, soutenue pendant au moins 48 heures. En revanche, la voie FAK n'est pas ou peu activée par le collagène de type I (Figure 54).

L'activation des voies observées dans les premières heures de l'expérience peut être due au phénomène d'adhérence des cellules via leurs différentes intégrines. L'adhérence des cellules sur l'ECM via les intégrines met en jeu des voies de signalisation transitoires qui peuvent faire intervenir Erk et Src, et surtout, FAK. Cette dernière est pour sa part un marqueur d'activation des intégrines. Si l'activation à court terme serait synonyme d'adhérence et d'étalement des cellules, l'activation soutenue et prolongée de ces voies pourrait par contre être synonyme d'un effet indépendant de l'adhérence des cellules. C'est le cas notamment pour les voies Src et Erk sur le collagène de type I qui semblent perdurer sur au moins 48 heures. La faible activation de la voie FAK pourrait écarter les intégrines comme effecteurs majeurs du collagène de type I dans les cellules Renca.

B / Identification des récepteurs activés par le collagène de type I

Deux voies ont donc été identifiées comme étant activées de façon soutenues dans le temps par le collagène de type I. Les cellules Renca n'adhèrent que très peu, ou très lentement sur le collagène de type I, ce qui laisse penser que les intégrines du collagène de type I, principaux récepteurs impliqués dans ce processus, ne sont présents qu'en faible quantité à la membrane des cellules. Un autre élément dans ce sens est le fait que la voie FAK n'est que peu activée par le collagène de type I. Ces données laissent présager que les intégrines pourraient ne pas être responsables de l'activation des voies mises en évidence ici. De plus la cinétique d'activation soutenue de ces voies, et surtout leur maintien dans le temps, va dans le

sens d'une activation d'autres récepteurs des collagènes : les DDRs. Ces récepteurs pourraient alors être en parti responsable des effets induits par le collagène de type I. Afin de mettre en évidence la présence de ces récepteurs dans les cellules Renca, des expériences de western-blot ont été menées contre DDR1 et DDR2 sur des lysats de cellules.

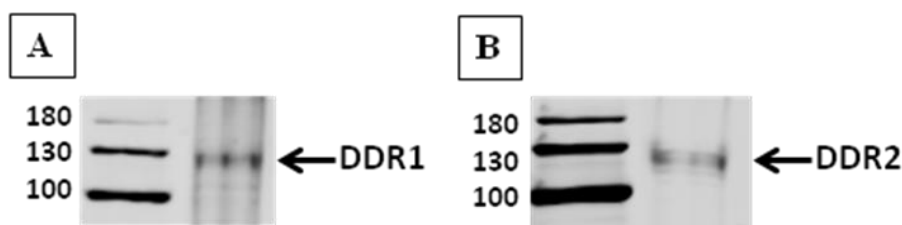


Figure 55 : Présence des récepteurs DDR1 et DDR2 au niveau protéique dans les cellules Renca. Les cellules Renca cultivées pendant 24 heures ont été lysées afin d'en récupérer les protéines. La présence de DDR1 (A) et de DDR2 (B) a été analysée par Western Blot. (DDR1 : Discoïdin Receptor Domain 1 ; DDR2 : Discoïdin Receptor Domain 2 ; Les masses moléculaires sont indiqués en kDa).

Les expériences de western-blot dirigées contre les récepteurs DDR1 et DDR2 montrent la présence à l'échelle protéique de ces 2 récepteurs au sein des cellules Renca, pour des tailles d'un peu moins de 130kDa pour chacun d'entre eux (Figure 55 A-B).

La présence de ces récepteurs n'est pas suffisante pour montrer leur possible implication dans l'activation des voies de signalisation. Des expériences ont été menées afin de montrer l'activation de ces récepteurs lorsque les cellules sont cultivées sur le collagène de type I. Aucun anticorps des formes activées (phosphorylées) n'était disponible, la stratégie employée a été d'effectuer des immunoprécipitations dirigées contre DDR1 et DDR2 et d'analyser la présence de tyrosines phosphorylées dans l'immunoprécipitât.

Les expériences d'immunoprécipitations montrent une bande de tyrosines phosphorylées à des masses moléculaires un peu inférieures à 130kDa sur les deux membranes (Figure 56 A-B). L'analyse de ces mêmes membranes avec les anticorps dirigés contre DDR1 ou DDR2 montrent que les bandes de pTyr co-localisent avec les deux récepteurs (Figure 56 A-B).

Ainsi, le collagène de type I est capable d'activer les deux récepteurs DDRs dans le modèle Renca. Nous proposons ainsi que les voies activées par le collagène le soit au moins en partie par l'un ou l'autre, sinon les deux, récepteurs DDRs dans ce modèle de RCC.

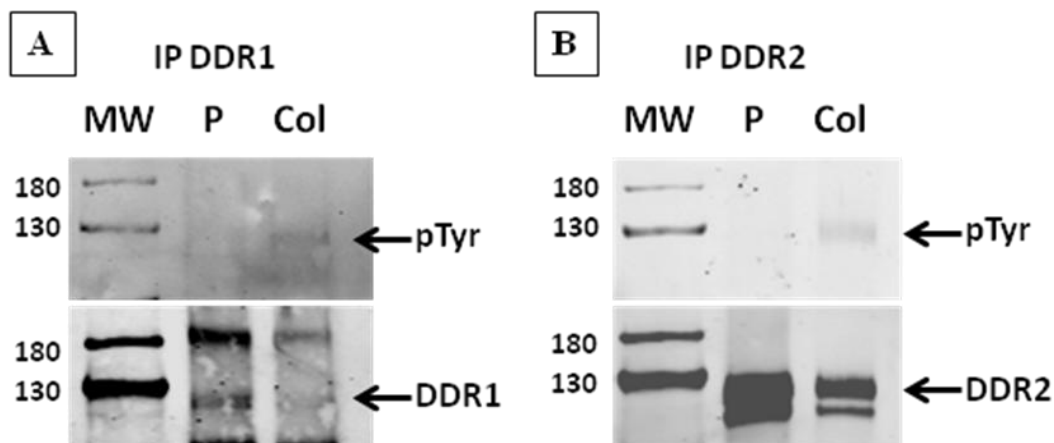


Figure 56 : Etat d'activation des récepteurs DDR1 et DDR2

Les cellules Renca ont été cultivées pendant 24 heures sur du plastique ou sur du collagène de type I, puis ont été lysées afin d'en récupérer les protéines. Les récepteurs DDR1 (A) ou DDR2 (B) ont été immunoprécipités puis des expériences de Western Blot ont été effectuées contre les tyrosines phosphorylées. Les Western Blots ont ensuite été marqués pour ces deux récepteurs afin de contrôler que l'immunoprécipitation a bien fonctionné. (DDR1 : Discoïdin Receptor Domain 1 ; DDR2 : Discoïdin Receptor Domain 2 ; pTyr : Tyrosines phosphorylées ; MW : masse moléculaire ; Les masses moléculaires sont indiqués en kDa). Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

C / Stratégie d'inhibition des voies

Les voies de signalisation activées par le collagène de type I peuvent agir à différents niveaux sur les cellules. La prochaine étape de l'étude va viser à inhiber ces voies afin d'en connaître les rôles dans les processus activés par le collagène de type I. La voie de Ras-Raf-MEK-Erk n'est qu'une des voies des MAP Kinases. Malgré tout, le terme de voie des MAP Kinases sera utilisé pour la suite afin de désigner la voie Ras-Raf-MEK-Erk.

C-1 / Stratégie d'inhibition de la voie des MAP Kinases et de Src

Afin d'inhiber l'activité de Erk, un inhibiteur de MEK (appelé aussi MAPKK) a été utilisé. MEK est l'activateur de Erk par phosphorylation dans la voie Ras-Raf-Mek-Erk (Figure 57). Cette stratégie a ainsi permis d'inhiber la voie en contrôlant l'état d'activation de Erk.

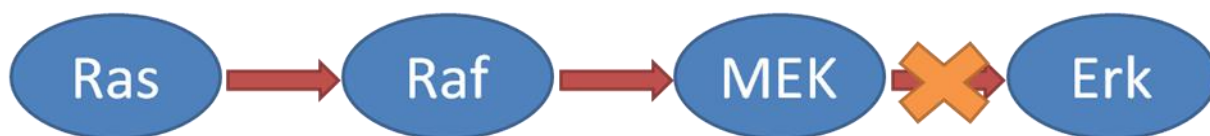


Figure 57 : Schéma de la stratégie d'inhibition de Erk dans la voie Ras-Raf-Mek-Erk.

Les voies des MAPK passe par l'activation successive de plusieurs membres. Ainsi, les MAP-kinases s'activent les unes les autres en cascade. La MAP-Kinase de la voie étudiée est Erk, elle-même activée par une MAP-kinase kinase (MEK), elle-même activée par une MAP-kinase kinase kinase appelée Raf et ainsi de suite. Dans le but d'inhiber la voie, l'activation de Erk a été shunté en utilisant un inhibiteur visant l'activité de Mek (U0126).

Afin de confirmer l'efficacité de cette stratégie, les cellules Renca ont été cultivées sur du collagène de type I en présence de différentes concentrations de U0126, l'inhibiteur de MEK. L'état de phosphorylation de Erk a été analysé par western-blot.

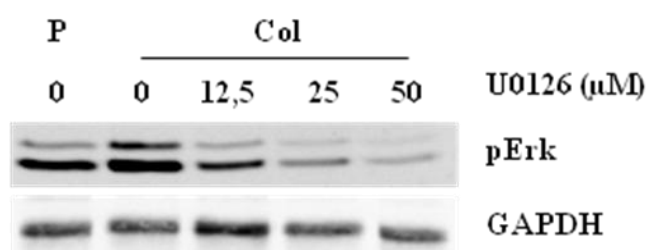


Figure 58 : Inhibition de la voie des MAP Kinases par l'inhibiteur de Mek (U0126).

Les cellules Renca ont été cultivées sur le collagène de type I pendant 24 heures en présence et en absence de l'inhibiteur de Mek (U0126). Au bout de 24 heures, les cellules ont été lysées et l'activation de Erk a été étudiée par Western Blot. (P : plastique ; Col : Collagène de type I). Le résultat présenté est représentatif de 2 expériences indépendantes.

En utilisant cette stratégie, il a été mis en évidence que 25µM d'inhibiteur était suffisant pour diminuer fortement le niveau d'activation de la voie Erk (Figure 58). Cette concentration a donc été choisie pour la suite des expériences.

C-2 / Stratégie d'inhibition de la voie Src

De même que pour l'inhibiteur de la voie des MAP kinases, différentes concentrations ont été testées afin de confirmer l'efficacité de l'inhibiteur de Src. Celle-ci a été effectuée en utilisant un inhibiteur de l'activation de membres de la famille de Src (Src Inhibitor I, CAS 179248-59-0). Cet inhibiteur empêche l'activation de Src, qui sera contrôlée par western-blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant Src active, c'est-à-dire la forme phosphorylée sur la tyrosine 416.

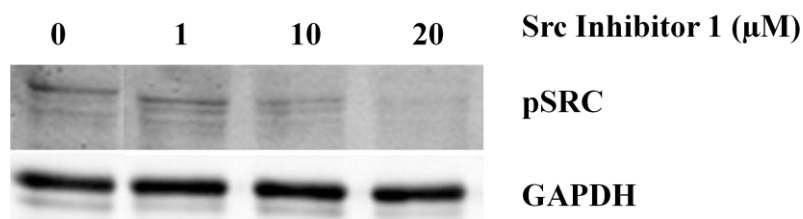


Figure 59 : Inhibition de Src en utilisant l'inhibiteur Src Inhibitor I.

Les cellules Renca ont été cultivées sur le collagène de type I pendant 24 heures en absence ou en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur de Src (Src inhibiteur 1). Au bout de 24 heures d'incubation, les cellules ont été lysées et l'activation de Src a été étudiée par Western Blot. Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

L'analyse des western-blots montre que l'activation des membres de la famille de Src était inhibée à partir de 10μM d'inhibiteur. Un effet plus prononcé était visible à 20μM, toutefois, il a été constaté une forte perte d'adhérence des cellules à cette concentration. Suite à cette analyse, une utilisation de l'inhibiteur à 10μM a été préférée pour la suite des expériences.

D / Etude de l'interaction des voies Src et MAP Kinases

D-1 / Erk est-il régulateur de Src ?

Les voies de signalisations intracellulaires sont des voies complexes avec de nombreuses interactions qui peuvent se recouper totalement ou partiellement. Il n'est donc pas exclu que la voie des MAP Kinases ne soit directement ou indirectement activatrice de la voie Src. Afin de vérifier ou d'infirmer cette éventualité, des expériences d'inhibition de la voie des MAP Kinases par l'inhibiteur de MEK ont été réalisées et l'état d'activation de la voie de Src a été analysée par western-blot.

La première chose que l'on peut constater, et qui n'avait été testé que sur le collagène de type I lors de la mise au point de l'inhibiteur de MEK, c'est que celui-ci est bien capable d'engendrer une diminution de l'activation de Erk sur la fibronectine et le matrigel (Figure 60). Par ailleurs, l'inactivation de Erk ne diminue pas l'activation de Src (Figure 60).

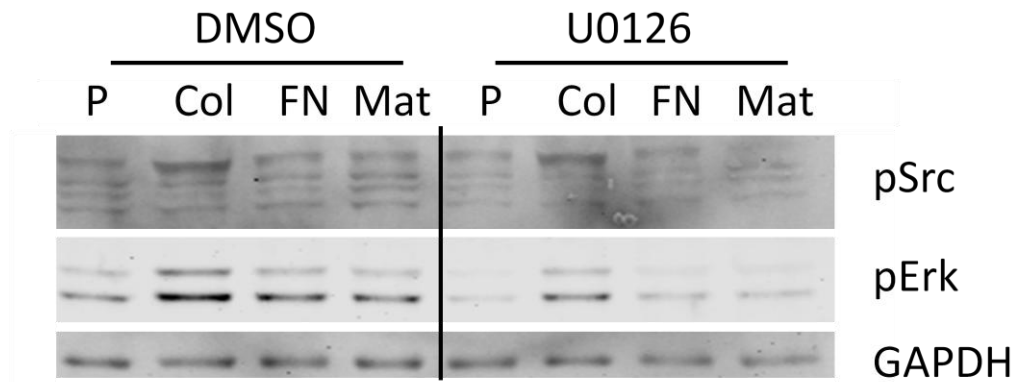


Figure 60 : Etat de la voie de Src suite à l'inhibition de la voie des MAP Kinases par l'inhibiteur U0126.

Les cellules Renca ont été cultivées sur différentes matrices extracellulaires en absence (DMSO) ou en présence de l'inhibiteur de Mek (U0126). Au bout de 24 heures, les cellules ont été lysées et l'état d'activation de Src et de Erk ont été analysés par Western Blot. (P : Plastique ; Col : Collagène de type I ; FN : Fibronectine ; Mat : Matrigel). Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

Cette expérience a permis de montrer que la voie des MAP Kinases, ou du moins celle de Erk, n'est pas inductrice de l'activation de Src quelque soit la matrice employée.

D-2 / Src est-il régulateur la voie des MAP Kinases ?

La voie de Src a été montrée comme pouvant être en amont des voies des MAP Kinases (Schlaepfer, Jones et al. 1998, Yeatman 2004). C'est notamment le cas lors de l'activation de DDR2, celui-ci pouvant stimuler cette activation. Afin de tester cette éventualité, des expériences d'inhibition de Src ont été menées sur les différentes ECM, et l'état d'activation de Erk a été analysé.

En inhibant Src au moyen de l'inhibiteur Src Inhibitor I, une diminution de l'activation de Erk a été observée dans toutes les conditions de culture (Figure 61), y compris dans la condition de référence (Figure 61).

Ceci a donc permis de mettre en évidence que la voie de Src est en amont de la voie Erk dans le modèle Renca. L'utilisation de l'inhibiteur de MEK et de l'inhibiteur de Src va ainsi permettre de découpler les voies et de comprendre ce qui provient de la voie des MAP Kinases activées par Src et ce qui est indépendant de la voie des MAP Kinases mais induit par Src.

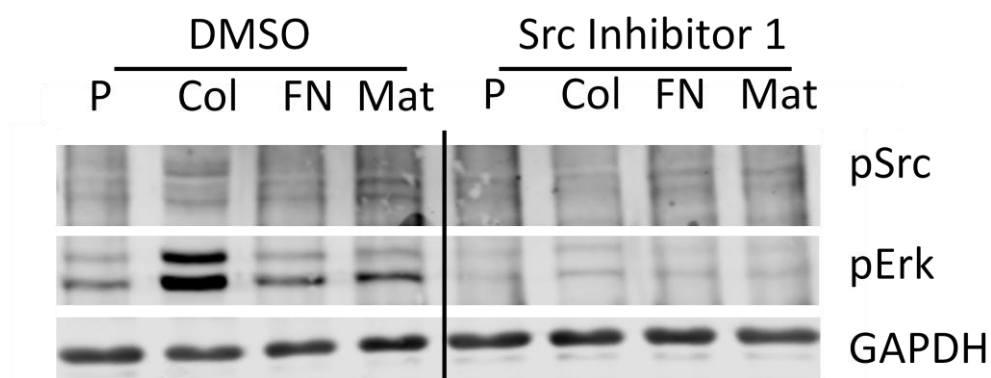


Figure 61 : Etat de la voie des MAP Kinases suite à l'inhibition de Src par l'inhibiteur Src Inhibiteur 1.

Les cellules Renca ont été cultivées sur différentes matrices extracellulaires en absence (DMSO) ou en présence de l'inhibiteur de Src (Src Inhibitor I). Au bout de 24 heures, les cellules ont été lysées et l'état d'activation de Src et de Erk ont été analysés par Western Blot. (P : Plastique ; Col : Collagène de type I ; FN : Fibronectine ; Mat : Matrigel). Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

III / Rôles des voies MAP Kinases et Src

Les deux inhibiteurs validés vont ainsi permettre de jauger les rôles de chacune de ces voies de signalisation sur les caractères mis en évidence précédemment. L'étude s'est toutefois focalisée sur les expériences qui ont montrés des modulations induites par le collagène de type I.

A / Morphologie

Sur les matrices, l'un des effets identifiés en premier lieu, était le changement de morphologie qui s'opérait sur les cellules Renca, ainsi que la perte des jonctions intercellulaires. Afin de tester les effets des voies caractérisées précédemment sur les modulations morphologiques observées sur les Renca, des expériences d'inhibitions ont donc été menées sur des cellules cultivées sur les différentes ECM. Le cytosquelette des cellules a ensuite été marqué au moyen de la phalloïdine couplé à la rhodamine.

En présence de l'inhibiteur U0126, les cellules Renca cultivées dans la condition de référence conservent leur morphologie initialement observée. Ce constat est le même en présence de l'inhibiteur de Src (Figure 62). De même, sur la fibronectine et le matrigel, la morphologie engendrée par ces matrices n'est pas altérée par l'utilisation des inhibiteurs (Figure 62).

En revanche, sur le collagène de type I, l'inhibiteur de MEK engendre une restauration partielle du phénotype. Les cellules semblent plus jointives tout en conservant un aspect plus allongé que la condition témoin (DMSO) (Figure 62). Pour ce qui est de l'inhibiteur de Src, les cellules sont moins allongées, ont beaucoup perdues l'apparence fibroblastoïde, et semblent avoir récupérées des jonctions avec les cellules voisines. La morphologie de celles-ci ressemble beaucoup à ce que l'on peut observer sur le plastique, et est bien éloignée de la condition de culture sur le collagène de type I dans la condition contrôle (DMSO) (Figure 62).

Ainsi, la voie Src, et dans une moindre mesure la voie des MAP Kinases, sont responsables de la modulation de la morphologie des cellules Renca, et en particulier de leur morphologie fibroblastoïde lorsqu'elles sont cultivées sur le collagène de type I. L'inactivation de ces voies semble par ailleurs restaurer les jonctions intercellulaires.

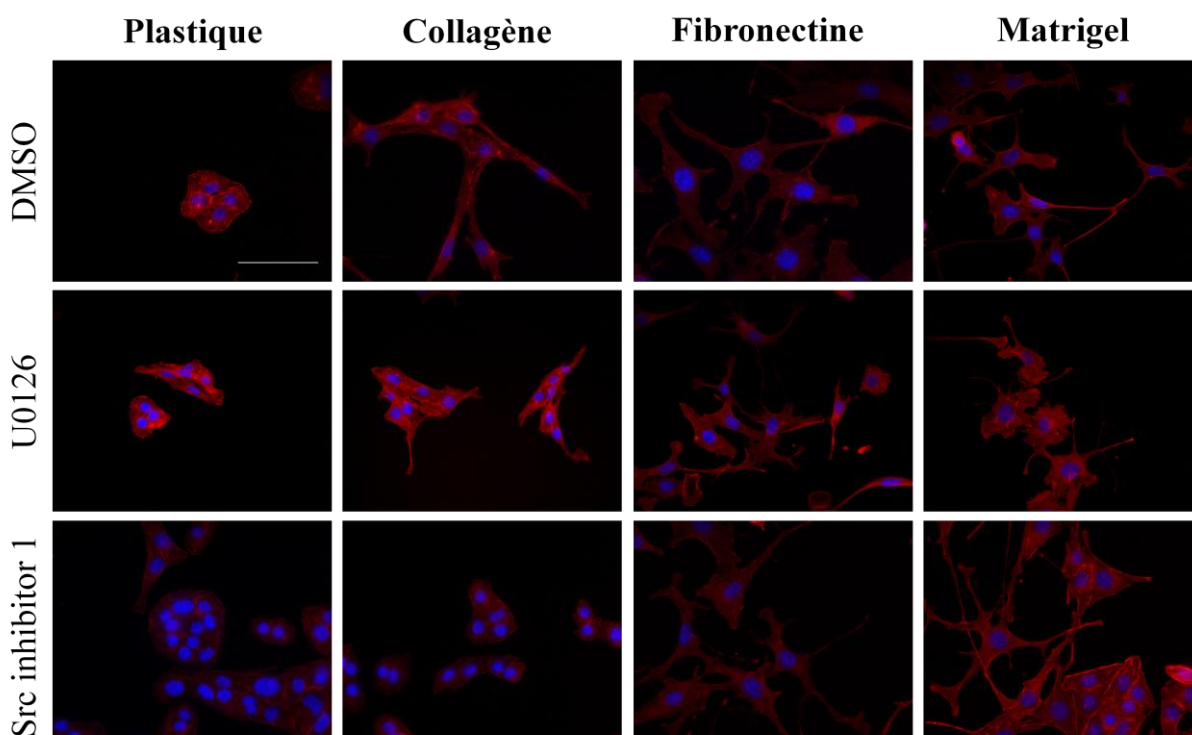


Figure 62 : Effets de la voie Src sur la morphologie des cellules Renca cultivées sur les différentes matrices.

Les cellules Renca ont été cultivées sur des lamelles de verre tapissées ou non avec du collagène de type I, de la fibronectine et du matrigel ou directement sur la lamelle de verre (condition de référence « plastique »), en absence (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de MEK (u0126) ou d'un inhibiteur de Src (Src Inhibitor I) pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et le cytosquelette d'actine a été marqué en utilisant la phalloïdine, couplée à un fluorophore (rouge). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Barre : 50µm. Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes

B / Jonctions intercellulaire

La mise en culture des cellules Renca en présence des inhibiteurs montre une restauration d'un phénotype plutôt proche de la condition de référence. Dans ces conditions de référence des jonctions intercellulaires étaient caractérisées par la localisation de la β -caténine au niveau des contacts intercellulaires. Cette localisation était perdue suite à la mise en culture des cellules sur le collagène de type I. L'état des jonctions intercellulaires a donc été vérifié dans ces conditions d'inhibitions. Les cellules ont donc été cultivées sur les différentes ECM présence ou en absence des inhibiteurs et des marquages de la β -caténine ont été effectués.

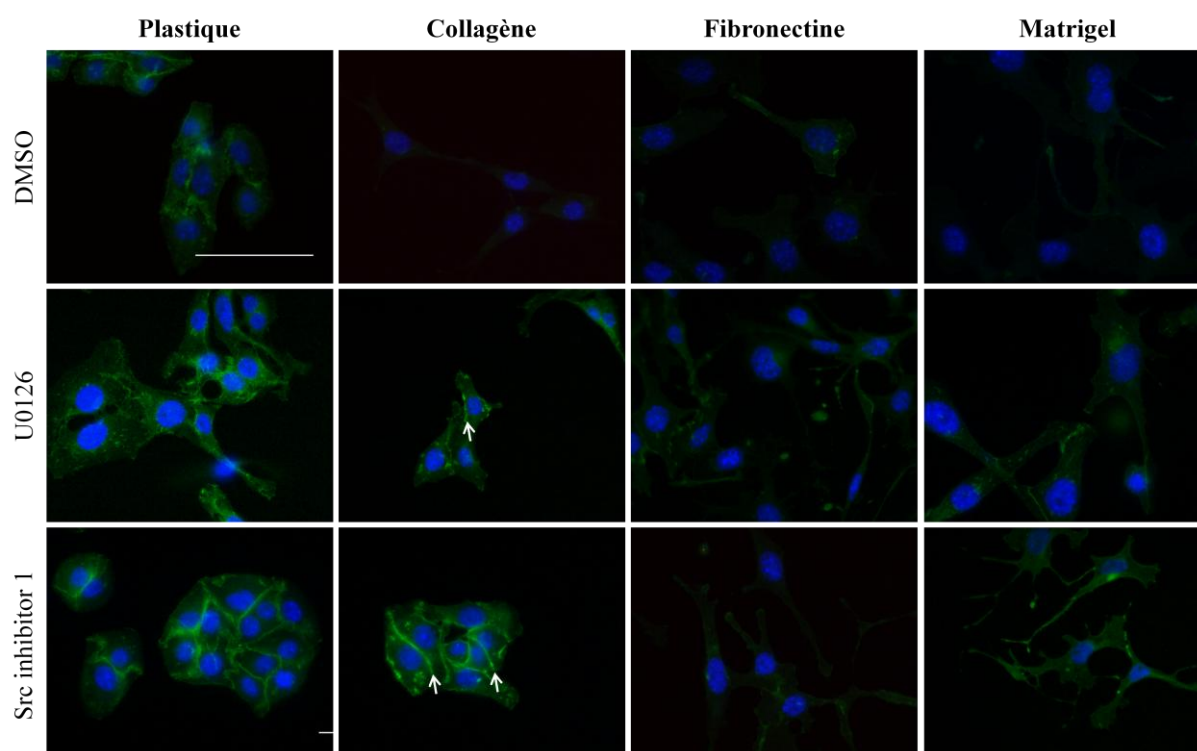


Figure 63 : Effets de la voie Src sur les jonctions intercellulaires des cellules cultivées sur les différentes matrices.

Les cellules Renca ont été cultivées sur des lamelles de verre tapissées ou non avec du collagène de type I, de la fibronectine et du matrigel ou directement sur la lamelle de verre (condition de référence plastique) en absence (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de MEK (U0126 ou d'un inhibiteur de Src (Src Inhibitor I) pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et un membre du complexe de jonction intercellulaire cadhérine, la β -caténine, a été marqué (vert). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Barre : 50 μ m. Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

L'utilisation des deux inhibiteurs dans les conditions de culture sur le plastique, sur la fibronectine et sur le matrigel n'entraînait pas de modulation du phénotype des cellules. L'observation du marquage de la β -caténine ne montre pas non plus de changements dans le statut de celle-ci (Figure 63). Sur le collagène de type I, et en présence de l'inhibiteur de MEK, on observe une proportion plus importante d'accumulation de β -caténine aux contacts intercellulaires par rapport à la condition témoins (DMSO) (Figure 63). L'utilisation de l'inhibiteur de Src engendre lui aussi une accumulation de β -caténine au niveau des ces contacts intercellulaire. Cette accumulation semble néanmoins plus importante que lors de l'inhibition de la voie des MAP Kinases (Figure 63).

La voie Src, et dans une moindre mesure la voie des MAP Kinases, sont donc responsables à la fois de la modulation de la morphologie des cellules Renca sur le collagène

de type I, mais aussi dans la diminution des jonctions intercellulaires. Ces deux paramètres sont toutefois généralement liés l'un à l'autre. Il est connu que les jonctions intercellulaires sont en partie nécessaire au maintien du phénotype des cellules. Il est donc possible que la perte des jonctions intercellulaires puisse participer à l'acquisition du nouveau phénotype. Leur restauration permettant ainsi de renverser le phénomène.

La perte des jonctions intercellulaires a été associée précédemment avec une diminution de la quantité protéique de la β -caténine. Afin de savoir si l'inhibition des voies des MAP Kinases et de Src sont responsables de cette diminution, des expériences de western-blot dirigées contre la β -caténine ont été menées dans les différentes conditions de cultures en absence ou en présence des inhibiteurs.

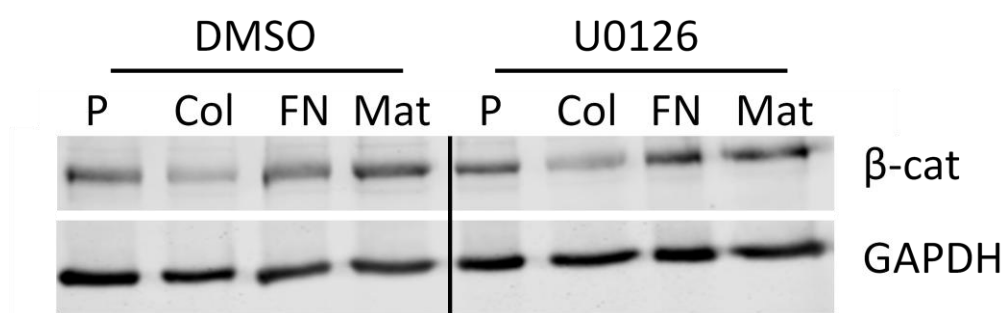


Figure 64 : Quantification de la β -caténine après inhibition de la voie des MAP Kinases

Les cellules Renca ont été cultivées sur différentes matrices, en absence (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de la voie des MAP Kinases (U0126) pendant 48 heures puis ont été lysées afin d'en récupérer les protéines. La présence de la β -caténine a été analysée par Western Blot. (P : Plastique, Col : Collagène de type I, FN : Fibronectine, Mat : Matrigel). Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

L'inhibition de la voie des MAP Kinases n'a aucun effet sur la quantité de β -caténine dans les cellules cultivées sur la plastique, la fibronectine ou sur le matrigel (Figure 64). L'inhibiteur n'entraîne aucune restauration de la quantité de β -caténine dans les cellules cultivées sur le collagène de type I (Figure 64). Le même résultat a été obtenu 72 et 96 heures de culture sur le collagène de type I en présence de l'inhibiteur U0126 (non montré).

L'inhibiteur de Src ne modifie pas la quantité de β -caténine présente dans les cellules cultivées sur le plastique, la fibronectine et le matrigel (Figure 65). De même que pour l'inhibiteur de la voie des MAP Kinases, l'inhibition de la voie de Src n'engendre aucune restauration de la β -caténine dans les cellules cultivées sur le collagène de type I (Figure 65). Le même résultat a été obtenu après 72 et 96 heures d'inhibition.

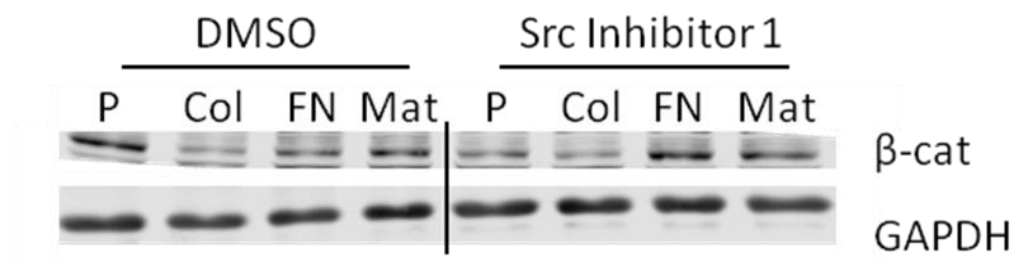


Figure 65 : Quantification de la β -caténine après inhibition de la voie de Src

Les cellules Renca ont été cultivées sur différentes matrices, en absence (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de la voie de Src (Src Inhibitor I) pendant 48 heures puis ont été lysées afin d'en récupérer les protéines. La présence de la β -caténine a été analysée par Western Blot. (P : Plastique, Col : Collagène de type I, FN : Fibronectine, Mat : Matrigel). Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

Les voies des MAP Kinases et de Src ne sont donc pas responsables de la diminution de la quantité de β -caténine au sein des cellules Renca cultivées sur une matrice de collagène de type I. L'inhibition des voies des MAP Kinases et de Src restaure le phénotype épithélial des cellules en ce qui concerne leur morphologie et partiellement les jonctions intercellulaires. De ce fait, nous nous attendions à une restauration de la quantité de β -caténine intracellulaire. Cela n'est néanmoins pas le cas. La dégradation de la β -caténine pourrait donc être en partie indépendante de ces deux voies. Malgré tout, la restauration au moins partiellement des jonctions intercellulaires montre un effet prédominant de ces deux voies dans la perte de ces jonctions. Le niveau de β -caténine restant au sein de la cellule pourrait finalement être suffisant pour restaurer partiellement les jonctions intercellulaires.

C / Migration et Invasion

La migration et l'invasion des cellules Renca semblaient être augmentée sur le collagène de type I et sur le matrigel dans des expériences de migration/invasion en chambre de Boyden. Ces résultats n'étaient malgré tout pas significatifs.

Afin d'évaluer l'influence des voies des MAP Kinases et de Src dans la migration et l'invasion des cellules Renca sur les différentes ECM, des expériences similaires ont été menées en présence de ces inhibiteurs.

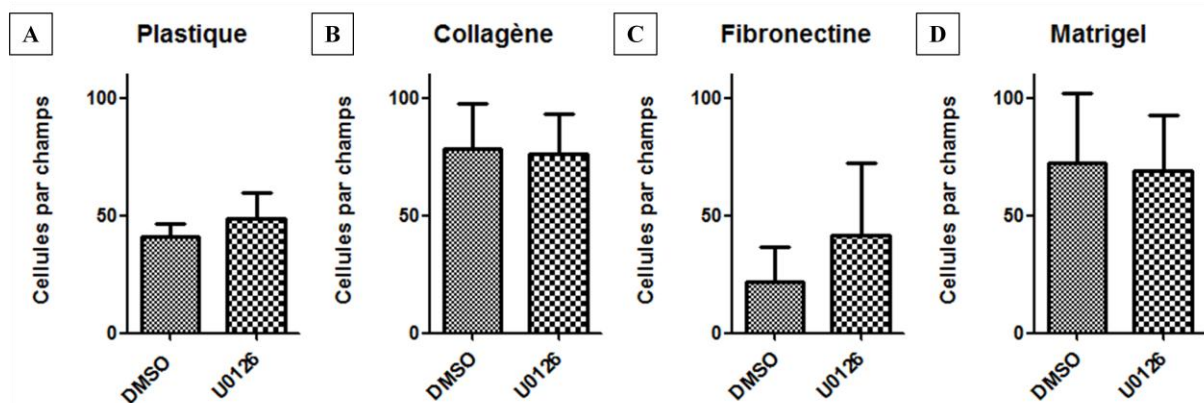


Figure 66 : Migration / Invasion des cellules Renca en fonction de la matrice extracellulaire, soumis à l'inhibition de la voie des MAPK.

50 000 cellules Renca ont été déposées sur des inserts nus (A), sur du collagène de type I (B), de la Fibronectine (C) ou du matrigel (D), en absence d'inhibiteur (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de MEK (U0126), et dans un milieu sans sérum. Les inserts ont été placés dans des puits contenant du milieu complet et en présence ou en absence l'inhibiteur de MEK. Au bout de 16h, les cellules ayant migré à travers l'insert ont été marquées au DAPI et dénombrées. Les résultats représentent le nombre moyen de cellules par champs $\pm$ SEM, N=3. (Test utilisé : t-test comparé au témoin DMSO).

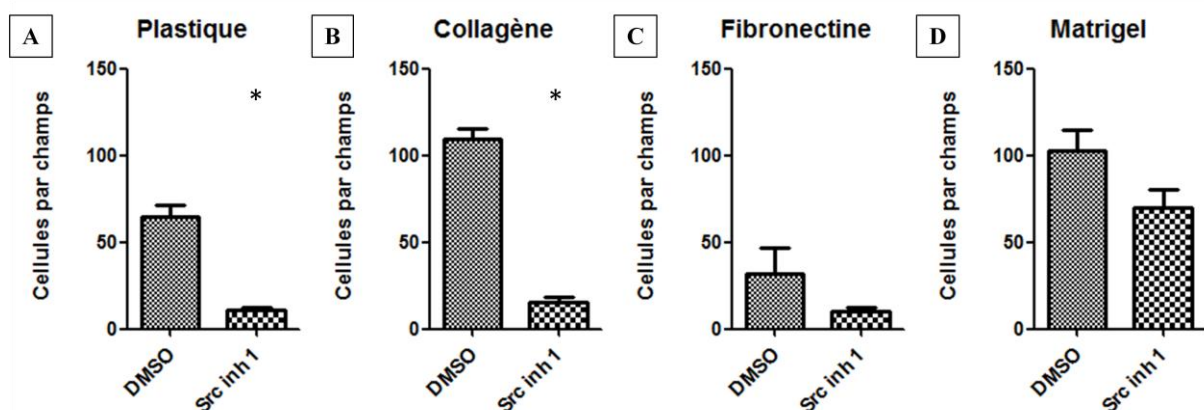


Figure 67 : Migration / Invasion des cellules Renca en fonction de la matrice extracellulaire, soumis à l'inhibition de la voie Src.

50 000 cellules Renca ont été déposées sur des inserts nus (A), sur du collagène de type I (B), de la Fibronectine (C) ou du matrigel (D), en absence d'inhibiteur (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de Src (Src inh 1), et dans un milieu sans sérum. Les inserts ont été placés dans des puits contenant du milieu complet et en présence ou en absence de l'inhibiteur de Src. Au bout de 16h, les cellules ayant migré à travers l'insert ont été marquées au DAPI et dénombrées. Les résultats représentent le nombre moyen de cellules par champs $\pm$ SEM, N=3. (Test utilisé : t-test comparé au témoin DMSO).

L'inhibition de la voie des MAP Kinases n'entraîne aucune modulation de la migration/invasion des cellules (Figure 66-A-B-C-D). En revanche, l'inhibiteur de Src engendre une diminution de la migration des cellules dans les conditions de références (plastique), comparé au contrôle sans inhibiteur (DMSO) (Figure 67-A). De même, une forte

diminution de la migration/invasion des cellules dans les conditions d'incubation sur le collagène de type I a été observée entre le contrôle (DMSO) et l'inhibiteur (Figure 67-B). L'amplitude de la diminution de migration, et ce malgré la stimulation par le collagène de type I, est importante et le nombre de cellules qui ont migrés est proche du niveau dans la condition de référence. En revanche, l'inhibiteur n'engendrait pas de variation significative de la migration/invasion des cellules incubées sur la fibronectine ou sur le matrigel, bien qu'une légère diminution non significative soit observable dans ces conditions (Figure 67-C et D).

Dans ce modèle, la voie des MAP Kinases n'est pas impliquée dans la migration des cellules Renca dans une chambre de boyden. En revanche, la voie de Src est impliquée dans la migration des cellules dans les conditions de références, mais aussi dans la migration stimulée par le collagène de type I (même si celle-ci n'était pas significative dans les expériences initiales). L'amplitude de la diminution de migration, et ce malgré la stimulation par le collagène de type I, est importante et le nombre de cellules qui ont migrées est proche de celui de la condition de référence. Ceci implique donc que l'inhibition de Src diminuerait d'une part la migration basale des Renca, mais aussi celle induite par le collagène de type I.

Un point important reste tout de même à évaluer. L'utilisation des inhibiteurs pourrait induire une mortalité cellulaire, qui pourrait biaiser les résultats de migration / invasion. Cet aspect devra être vérifié.

D / Adhérences

L'un des paramètres important dans la migration des cellules est leur capacité à adhérer sur l'ECM. Il est possible que les voies de signalisation activées puissent interférer avec l'adhérence des cellules et expliquer en partie les résultats des expériences de migration. Ainsi, des expériences d'adhérences des cellules Renca sur les différentes ECM ont été menées en présence et en absence des inhibiteurs de MEK et de Src.

En utilisant l'inhibiteur de la voie des MAP Kinases, aucune variation d'adhérence n'a été observée, que cela soit au bout de 10 minutes, 30 minutes ou 60 minutes et quel que soit la matrice utilisée (Figure 68-A-B-C-D).

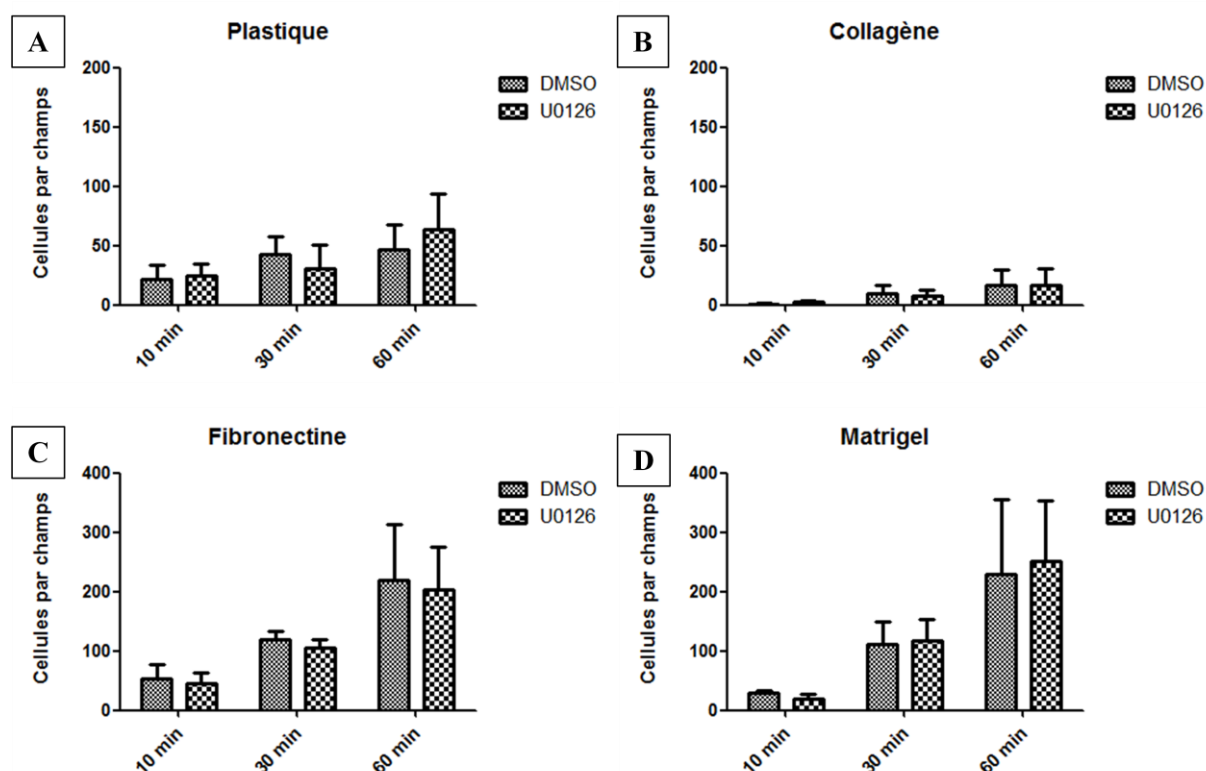


Figure 68 : Effet de l'inhibition de la voie des MAP Kinases sur l'adhérence des cellules RencA sur les différentes matrices extracellulaires.

Les cellules ont été mises à adhérer sur du plastique(A), sur du collagène de type I (B), de la Fibronectine (C) ou du matrigel (D), en absence (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de MEK (U0126), puis les cellules qui n'ont pas adhérees ont été retirées au bout de 10minutes, 30 minutes ou 60minutes. Les cellules ayant adhérees ont été photographiées puis comptées. Les valeurs représentent le nombre moyen de cellules adhérentes par champs $\pm$ SEM, N = 3. (Test utilisé : ANOVA suivi d'un post-test de Dunn comparé à son témoin DMSO).

En utilisant l'inhibiteur de la voie de Src, aucune variation d'adhérence n'a été observée, que cela soit au bout de 10 minutes, 30 minutes ou 60 minutes (Figure 69-A-B-C-D). Une chute d'adhérence était tout de même observée pour le collagène de type I en présence de l'inhibiteur mais cette différence n'était pas significative (Figure 69-B). Il n'est néanmoins pas exclu que Src puisse finalement agir sur l'adhérence des cellules sur le collagène de type I. Ces expériences devront être renouveler afin de confirmer ou d'infirmer la significativité de ces différences.

Ainsi les deux voies étudiées n'agiraient pas sur l'adhérence des cellules. Les résultats observés lors des expériences de migration / invasion en chambre de Boyden ne peuvent pas s'expliquer par une diminution des facultés d'adhérences des cellules pour le plastique. Cela pourrait néanmoins passer par une diminution de la maturation des complexes d'adhérences

en adhérences focales qui nécessite l'activation de Src. Une interrogation se porte néanmoins toujours sur la chute d'adhérence observée sur le collagène de type I qui pourrait influencer les résultats de migration en chambre de Boyden. Il serait ainsi intéressant de renouveler ces expériences afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

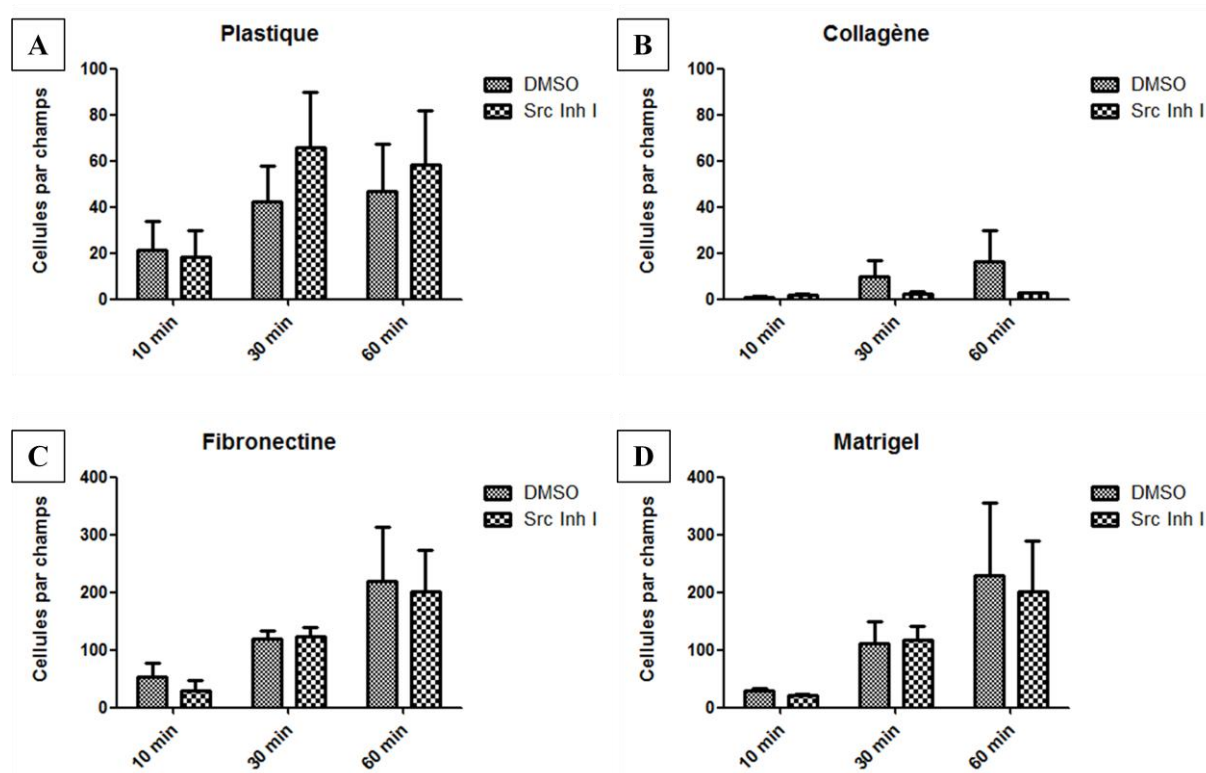


Figure 69 : Effet de l'inhibition de la voie de Src sur l'adhérence des cellules Renca sur les différentes matrices extracellulaires.

Les cellules ont été mises à adhérer sur du plastique(A), sur du collagène de type I (B), de la Fibronectine (C) ou du matrigel (D), en absence (DMSO) ou en présence d'un inhibiteur de Src (Src Inhibitor I), puis les cellules qui n'ont pas adhérentes ont été retirées au bout de 10minutes, 30 minutes ou 60minutes. Les cellules ayant adhérentes ont été photographiées puis comptées. Les valeurs représentent le nombre moyen de cellules adhérentes par champs $\pm$ SEM, N = 3. (Test utilisé : ANOVA suivi d'un post-test de Dunn comparé à son propre témoin DMSO).

Discussions et perspectives

Le collagène de Type I, facteur de mauvais pronostic participant à la progression tumorale ?

Les trois ECM étudiées semblent présenter une particularité commune, elles permettent une modulation de la morphologie des cellules, et dans une certaine mesure, une dissociation au moins partielle des cellules Renca. Lors de l'étude, et même si des modulations étaient observées aussi sur les autres types de matrices, nous nous sommes focalisés sur le cas du collagène de type I.

Celui-ci engendrait la dissociation des cellules, et la morphologie acquise se rapproche de la morphologie d'une cellule fibroblastoïde. Cet aspect correspond en général à un phénotype plus agressif des cellules *in vitro*. Bien que la migration en 2D des cellules n'ait pas été testée, les expériences en chambre de Boyden ont montré que les cellules Renca pourraient migrer plus efficacement suite à une stimulation par le collagène de type I. Une sécrétion de MMP-9 a de plus été montrée, protéinase capable de participer au phénomène d'invasion cellulaire et en particulier dans la progression tumorale. Il induit de même l'expression de Zeb 2, facteur de transcription impliqué dans l'EMT.

Ainsi, le collagène de type I peut s'avérer être un élément favorisant la progression tumorale en favorisant le phénomène de métastase. Ces modulations vont dans le sens d'une perte du phénotype épithélial des cellules au profit d'un phénotype mésenchymateux. Bien entendu, les cellules Renca sont des cellules tumorales et sont donc dans une certaine mesure déjà engagé dans le processus d'EMT. Celui-ci n'est néanmoins pas total et le collagène de type I peut participer à l'EMT en favorisant l'acquisition de nouveaux caractères mésenchymateux.

Le collagène de type I donc serait un élément matriciel pouvant participer à la modulation du phénotype cellulaire vers un phénotype encore plus malin, notamment en stimulant l'EMT dans ce modèle cellulaire. La capacité du collagène de type I à participer à l'acquisition d'un phénotype malin a déjà été montré dans d'autres modèles (Armstrong, Packham et al. 2004), et des expressions aberrantes de collagène de type I ont été montrées dans certains types de cancers, tel que le cancer du sein (Kauppila, Stenback et al. 1998). Son

rôle dans le RCC n'est par ailleurs pas connu à ce jour. Et un rôle potentiel a donc été mis en évidence dans nos expériences.

L'expression du collagène de type I au sein des tumeurs de patients pourrait ainsi être proposé comme facteur de mauvais pronostic dans le RCC. Afin de confronter cette hypothèse, des études complémentaires ont été menées en utilisant les données de la base de données de l'Atlas du Génome des Cancers (TCGA ; « The Cancer Genome Atlas »). Les niveaux d'expression pour les gènes du collagène de type I (COL1A1 et COL1A2) ont été évalués en fonction de la survie des patients.

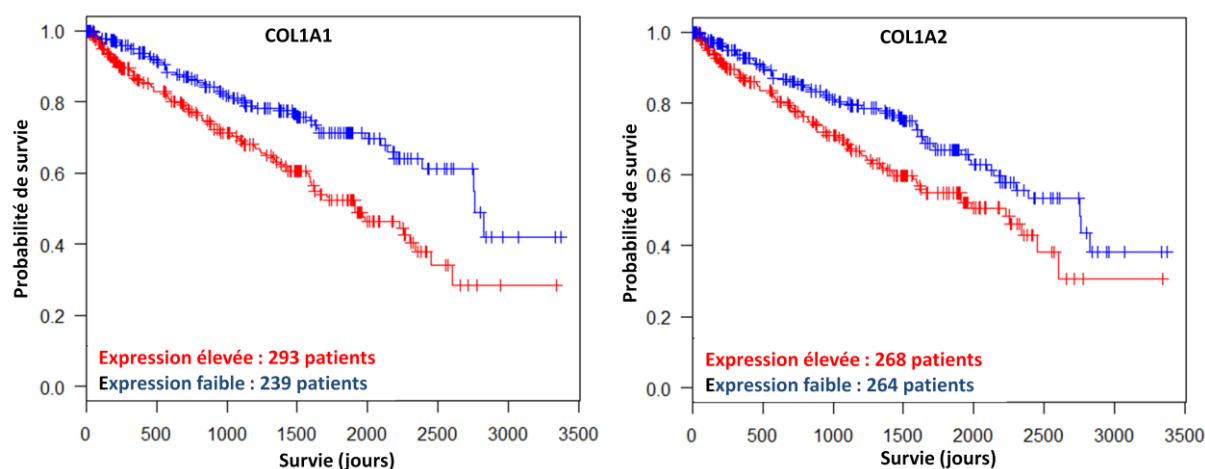


Figure 70 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression du collagène de type I au sein de la tumeur primaire.

Les données d'expression des gènes du collagène de type I et de survie des patients ont été obtenus grâce à la banque de données du TCGA et ont permis d'obtenir une courbe d'estimation de Kaplan-Meier. (Rouge : forte expression; Vert : Faible expression; test utilisé : test du logrank ; COL1A1 (Collagène de type 1, alpha 1): $p=0,0013$, hazard ratio : 1,901 ; COL1A2 Collagène de type 1, alpha 2) : $p=0.00356$, hazard ration : 1,6)

Ces graphiques de Kaplan Meier ont ainsi pu mettre en évidence que les patients ayant une faible expression du gène de la chaîne alpha-1 ont une survie presque deux fois plus élevée que les patients exprimant fortement ce gène (Figure 70). Les patients exprimant faiblement le gène de la chaîne alpha-2 ont une survie supérieure d'un plus de 50% par rapport aux patients exprimant faiblement le gène (Figure 70). L'expression élevée du collagène de type I au sein des tumeurs se révèle donc un facteur de mauvais pronostic. Ce mauvais pronostic pourrait passer par des effets engendrés par la sécrétion de ce collagène de type I dans le milieu extracellulaire, formant ainsi une ECM pouvant participer à la progression tumorale. A noter que les cellules issues du projet n°1 et qui sont amplifiées pour certains

mécanismes de la progression tumorale surexpriment ces deux gènes du collagène de type I, ce qui renforce les hypothèses proposées ici.

Enfin, en plus des effets du collagène de type I au sein de la tumeur primaire, il faut lui ajouter un effet plus vaste, en dehors de la tumeur primaire. Le collagène de type I est le collagène le plus présent dans les tissus. Il est ainsi possible d'imaginer que le collagène de type I puisse avoir un rôle au delà de la tumeur primaire. Il pourrait permettre de soutenir le phénotype invasif acquis, aussi bien au sein de la tumeur primaire, que dans d'autres tissus envahit par les cellules tumorales.

Src, cible thérapeutique dans le RCC ?

Le ciblage thérapeutique direct du collagène de type I est toutefois impossible. Une des possibilités serait donc de cibler les voies de signalisation activées par le collagène de type I. Le collagène de type I stimule au moins deux voies de signalisation au sein des cellules Renca, il s'agit des voies de Ras/Raf/Mek/Erk (Map Kinases) et de Src. De plus, dans ce modèle, la voie de Src est en amont de la voie des MAP Kinases.

La voie des MAP Kinases ne semble responsable que partiellement de la perte du statut épithélial des cellules Renca suite à la stimulation des cellules par le collagène de type I. L'inhibition de Src engendre une récupération de la morphologie épithéliale des cellules, ainsi que la restauration partielle des jonctions intercellulaires. De plus, la migration des cellules a été fortement diminuée sur le collagène de type I. Cela suggère que l'EMT engendré par le collagène de type I sur le modèle Renca est en partie due à la voie Src. Certains paramètres induits par le collagène de type I n'ont pour l'heure pas été mis en relation avec l'activation de Src, il s'agit par exemple de la sécrétion de MMP-9 ou encore l'expression de facteurs de transcription tels que Zeb-2.

Une surexpression du gène de Src est observée dans de nombreux types de cancers (Dehm and Bonham 2004). Src est un proto-oncogène puissant qui joue un rôle central dans de nombreuses voies de signalisation. Il peut ainsi jouer un rôle dans de nombreux effets biologiques et a été montré comme étant important dans des processus tumoraux. Comme dans nos expériences, la littérature l'implique dans la dissociation des cellules et la perte de jonctions intercellulaires ou encore dans la migration (Tsukamoto and Nigam 1999). Des études ont mis en évidence l'association de Src à la résistance aux thérapies (Mayer and Krop 2010, Hayette, Chabane et al. 2011). Ainsi, le rôle du collagène de type I pourrait non pas s'arrêter simplement à des rôles dans l'invasion, mais pourrait aller au-delà en participant aux résistances aux traitements, notamment via la stimulation de la voie Src,

Les différents effets de Src mis en évidence dans notre étude et dans la littérature le place comme une cible thérapeutique potentielle. L'utilisation d'inhibiteurs de Src fait partie des armes proposées comme thérapies potentielles dans certains cancers, et a été montré comme pouvant endiguer le phénomène de métastases (Yezhelyev, Koehl et al. 2004), et induisant une cytotoxicité dans un modèle de RCC humain (Fujimoto, Sato et al. 2006). Le

rôle de cette voie dans le RCC pourrait ainsi passer par la différenciation et la motilité des cellules, favorisant le processus d'EMT et donc les processus métastatiques. Il est de plus proposé comme étant associé à la diminution de la survie des patients dans le RCC (Qayyum, McArdle et al. 2012).

Les rôles de Src dans la résistance aux traitements, et dans de nombreux autres processus nécessaires à la progression tumorale, le positionne d'une part comme cible thérapeutique potentielle, mais aussi comme thérapie combinée afin d'endiguer la résistance aux thérapies. Cette hypothèse a d'ailleurs été testée sur un modèle de cellules de RCC humain, le modèle Caki-1. Les résultats montraient des effets prometteurs sur la migration et la croissance tumorale, mais aussi sur la diminution du phénomène de résistance lors de l'utilisation combinée d'un inhibiteur des membres de la famille de Src (saracatinib) et d'un inhibiteur de récepteurs tyrosine kinases (sunitinib). Le sunitinib est utilisé notamment dans le traitement de cancers du rein (Bai, Yang et al. 2012). Notre étude ajoute un poids à ces données en montrant des effets analogues à Src dans la progression tumorale, dans un modèle différent. Src se révèle donc une cible thérapeutique intéressante dans le RCC.

Les récepteurs DDR1 et/ou DDR2 ont un rôle dans la progression tumorale dans le RCC

Cette étude visait à comprendre comment différentes ECM peuvent influencer les cellules tumorales en favorisant la progression tumorale. Les expériences menées nous ont poussées à nous intéresser plus particulièrement au rôle du collagène de type I, qui induit des changements au sein des cellules connues pour favoriser la progression tumorale et plus particulièrement les processus métastatiques. Comme discuté précédemment, l'intérêt du collagène de type I est d'autant plus intéressant qu'il peut être soutenu au-delà de la tumeur, cet ECM étant exprimé fortement dans de nombreux tissus.

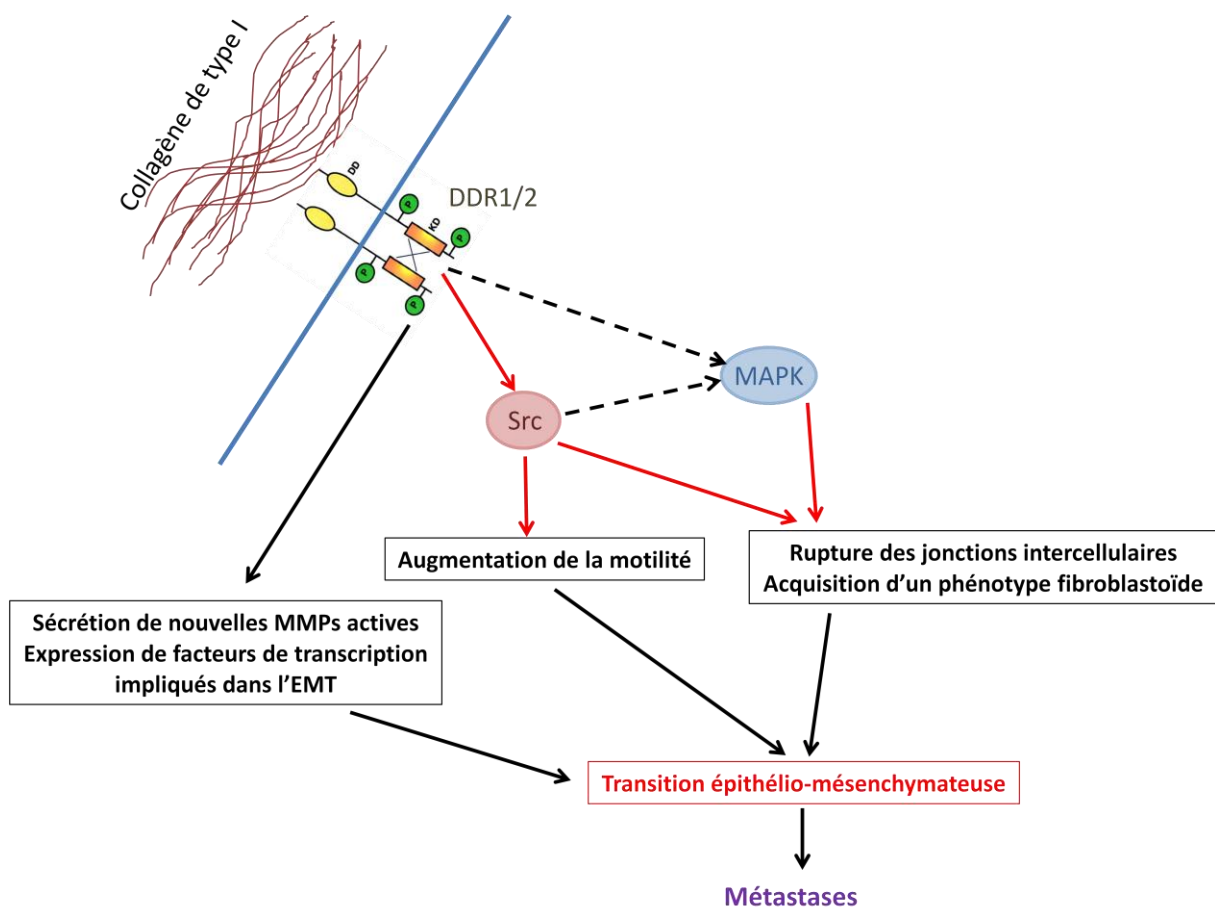


Figure 71 : Modèle proposé de participation du collagène de type I et de ses récepteurs DDRs dans le phénomène de métastase dans le modèle Renca.

La liaison du collagène de type I sur les DDRs induit l'activation des voies Src et de la voie des MAPK. La voie Src, induit la rupture des jonctions intercellulaires, l'acquisition d'une morphologie fibroblastoïde ainsi qu'une augmentation de la motilité. La voie des MAP Kinases agit aussi dans une moindre mesure sur la rupture des jonctions intercellulaires et l'acquisition d'une morphologie fibroblastoïde. La ou les voies responsables de la sécrétion des MMPs et l'induction de l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans l'EMT n'a pas été caractérisée. Tous ces phénomènes aboutissent à une modulation du phénotype épithélial des cellules vers un phénotype mésenchymateux, pouvant mener à l'augmentation du potentiel métastatique des cellules.

L'identification des récepteurs impliqués dans les effets induits par le collagène de type I sur les cellules Renca se pose. Parmi les récepteurs potentiels au collagène de type I, l'une des possibilités serait les intégrines, et en particulier les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$. Ces récepteurs transmembranaires, sont capables de stimuler certaines voies de signalisation suite à leur activation par le collagène. Parmi ces voies, la voie Src, FAK et la voie des MAP kinases.

Bien que la présence de ces couples au sein des cellules, et que leur implication n'ait pas pu être directement testée, certaines données laissent présager que les intégrines n'auraient qu'un rôle limité dans les effets engendrés par le collagène de type I. Ainsi, la faible capacité des cellules Renca à adhérer sur cette ECM, ainsi que la faible activation de la voie de FAK, marqueur d'activation de la voie des intégrines, suppose une faible quantité d'intégrines pouvant lier le collagène de type I. Nous avons donc pris le parti de désigner d'autres récepteurs au collagène comme étant en partie responsables des caractères acquis par les Renca suite à leur interaction avec le collagène de type I. La cinétique d'activation des voies Src et Erk, et surtout le maintien dans le temps, laisse ainsi supposer que les récepteurs DDR1 et DDR2 soient les effecteurs du collagène de type I dans ce modèle. L'activation par le collagène de type I de ces récepteurs a de plus été démontré dans notre étude.

Un modèle de stimulation de la progression tumorale par le collagène de type I au sein des cellules Renca est donc proposé (Figure 71). Suite à l'activation par le collagène de type I, l'un des récepteurs DDR, ou les deux, va provoquer la stimulation des voies Src et des MAP Kinases. La voie des MAPK Kinases est au moins en partie activée par la voie Src dans ce modèle. Suite à l'activation des voies de Src, les cellules Renca s'individualisent, perdent leurs jonctions intercellulaires, changent de morphologie passant d'un aspect épithélioïde vers un aspect fibroblastoïde. Leurs capacités migratoires sont de même augmentées. La voie des MAP Kinase pour sa part participe aussi, dans une moindre mesure à la rupture des jonctions intercellulaires et la modulation du phénotype. Bien que nous ayons montré que le collagène de type I provoque la sécrétion de MMP-9 et l'expression de Zeb-2 par les cellules Renca, il n'a pas été démontré que cette sécrétion dépend des voies identifiées. Des études vont être menées dans ce sens.

L'acquisition des caractères évoqués précédemment (sécrétion de MMPs, individualisation des cellules, passage d'un phénotype épithélioïde à un phénotype fibroblastoïde, augmentation des capacités migratoires) fait parti des éléments acquis lors d'une EMT. Cette EMT pourrait ainsi *in vivo* aboutir à une augmentation du potentiel métastatique des cellules tumorales (Figure 71).

Afin de confirmer ou d'infirmer notre théorie, des cellules Renca surexprimant l'un ou l'autre des ces deux récepteurs sont en cours de génération. De plus, des récepteurs tronqués, ne possédant pas la partie intracellulaires (et donc ne pouvant donc pas générer de transactivation des récepteurs) sont aussi en cours de génération. Ces différentes lignées cellulaires pourront ainsi permettre de tester les effets de ces récepteurs sur le comportement des cellules Renca *in vitro*. Des expériences de migration et d'invasion sur le collagène de type I, ainsi que des zymographies afin de tester la présence de MMPs dans le milieu de culture suite à la stimulation du par le collagène de type I, seront mises en œuvre. La morphologie des cellules, ainsi que l'expression de facteurs de transcriptions seront de même étudiés sur les cellules cultivées sur le collagène de type I. Des études *in vivo* sont prévues afin d'évaluer le rôle des ces récepteurs en particulier sur la formation de métastases. Ces études pourront ainsi confirmer ou infirmer les théories proposées.

Les récepteurs DDR1 et/ou DDR2, des cibles thérapeutiques ?

Une fois de plus, le ciblage du collagène de type I n'est pas envisageable. Outre le ciblage des voies de signalisation et notamment la voie de Src, il est envisageable de cibler le ou les récepteurs impliqués dans l'acquisition des caractères précédemment démontrés.

Avant d'envisager cette éventualité, une étude complémentaire d'expression de ces récepteurs DDR1 et DDR2 au sein des tumeurs de patients a été menée en utilisant la base de données de l'Atlas du Génome des Cancers (TCGA ; « The Cancer Genome Atlas »). Les niveaux d'expression pour les gènes de DDR1 et DDR2 ont été évalués en fonction de la survie des patients.

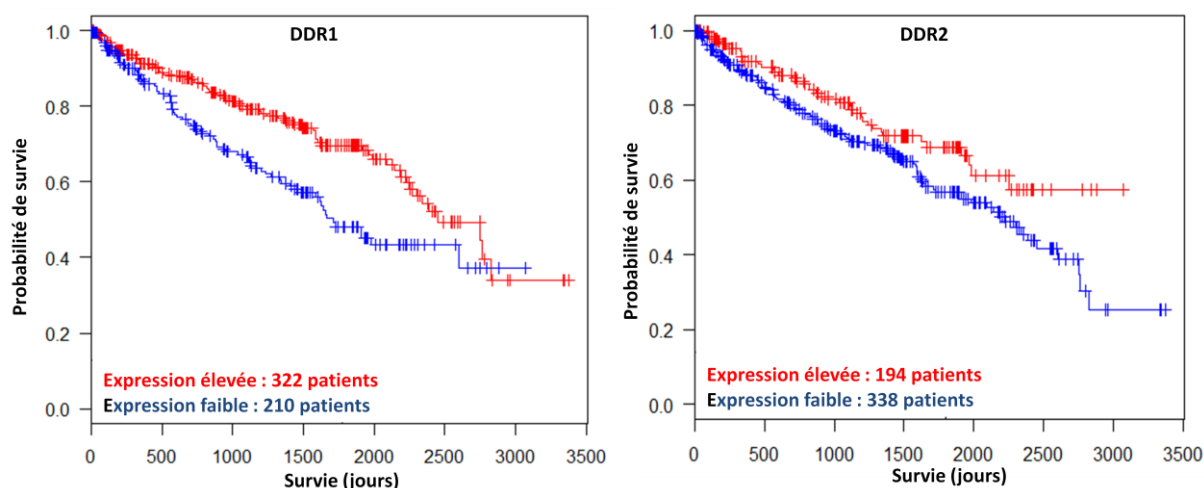


Figure 72 : Survie des patients atteints de ccRCC en fonction du niveau d'expression de DDR1 et de DDR2 au sein de la tumeur primaire

Les données d'expression des gènes de DDR1 et DDR2 et de survie des patients ont été obtenues grâce à la banque de données du TCGA et ont permis d'obtenir une courbe d'estimation de Kaplan-Meier. (Rouge : forte expression; Vert : Faible expression; test utilisé : test du logrank : DDR1 : $p=0,00078$, hazard ratio : 0,587 ; DDR2 : $p=0,02545$, hazard ratio : 0,669)

Ces graphiques de Kaplan Meier ont mis en évidence que les patients dont les tumeurs ont une faible expression de DDR1 ont une survie environ deux fois inférieure aux patients dont les tumeurs ont une expression élevée de ce récepteur (Figure 72). Ce constat est similaire pour les patients dont les tumeurs expriment faiblement DDR2 avec un peu plus de 30% de chance de survie en moins par rapport aux patients dont les tumeurs ont une expression élevée de DDR2 (Figure 72). Ainsi, l'expression de DDR1 ou DDR2 au sein des tumeurs se révélerait finalement un facteur de meilleur pronostic.

Ce constat tranche avec nos hypothèses qui proposent que les DDRs soient des récepteurs participants à la progression tumorale. Il n'est toutefois pas exclu que cela soit le cas pour les effets directs sur les cellules tumorales. L'expression dans les tumeurs de patients prend en compte l'expression de l'intégralité des cellules stromales. Ainsi il est possible que l'expression élevée et donc la plus forte activation de DDR1 ou DDR2 mène à l'activation des cellules tumorale dans un sens pro-invasif (en admettant qu'une expression plus élevée induit une présence plus importante des récepteurs à la membrane), mais que ceci soit contrebalancé par l'effet de l'activation des DDRs sur les autres populations de cellules stromales. Le collagène de type I serait donc un facteur de mauvais pronostic mais ses effets ne passeraient pas par les DDRs chez l'Homme.

Une autre possibilité serait finalement la limite du modèle murin Renca où les DDRs pourraient être bel et bien responsables de la progression tumorale, mais que cela ne soit pas le cas chez l'Homme.

L'étude en cours n'est cependant pas remise en cause. En effet, les rôles des DDRs restent inconnus dans le RCC et ces études pourraient mener à mettre en évidence la façon dont ces récepteurs au collagène participent au développement et à la progression tumorale.

Ainsi, l'éventualité d'un ciblage thérapeutique des DDRs chez les patients atteints de ccRCC n'est en l'état pas envisageable. L'inhibition de ces récepteurs pourrait avoir un effet plutôt négatif sur les patients. Par contre, lorsque les rôles de ces récepteurs *in vivo* et *in vitro* seront élucidés, et dans l'éventualité de positionner les DDRs comme facteurs de bons pronostics chez l'Homme, cette étude pourrait mener à utiliser ces récepteurs comme cible thérapeutique, non pas en les inhibant, mais en les activant afin d'amplifier les effets positifs que ces récepteurs pourraient avoir *in vivo*.

Résumé et conclusion générale

Le cancer du rein compte parmi les 10 types de cancers les plus fréquents chez l'Homme. Les deux projets présentés se basent sur l'étude du RCC au moyen d'une lignée cellulaire murine, le modèle Renca. Le projet n°1 (Projet METASYS) a permis de générer un nouvel outil au sein du laboratoire. Nous avons pu montrer que les cellules tumorales acquièrent des caractères différents en fonction des étapes franchies pour établir des tumeurs primaires ou des métastases. Nous avons aussi mis en évidence une cible d'étude prometteuse, l'Interleukine-34, dont l'expression au sein des tumeurs de patients se révèle être un facteur de mauvais pronostic. Le projet n°2 a mis en évidence les effets de certaines ECM sur les cellules tumorales. L'étude s'est focalisée sur le collagène de type I, qui induit des modulations pro-métastatiques sur les cellules Renca. L'expression du collagène de type I au sein des tumeurs de patients s'est aussi révélé comme étant un facteur de mauvais pronostic. L'étude a permis de proposer des récepteurs, DDR1 et DDR2, comme potentiellement impliqués dans les effets du collagène de type I sur les cellules Renca.

Ensemble, ces deux études permettent de mieux comprendre certains mécanismes de la progression tumorale, et pourraient permettre la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans le RCC.

Références

Aceto, N., A. Bardia, D. T. Miyamoto, M. C. Donaldson, B. S. Wittner, J. A. Spencer, M. Yu, A. Pely, A. Engstrom, H. Zhu, B. W. Brannigan, R. Kapur, S. L. Stott, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, C. P. Lin, M. Toner, D. A. Haber and S. Maheswaran (2014). "Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis." Cell **158**(5): 1110-1122.

Adams, J. C. (2001). "Cell-matrix contact structures." Cell Mol Life Sci **58**(3): 371-392.

Agarwal, G., L. Kovac, C. Radziejewski and S. J. Samuelsson (2002). "Binding of discoidin domain receptor 2 to collagen I: an atomic force microscopy investigation." Biochemistry **41**(37): 11091-11098.

Agarwal, G., C. Mihai and D. F. Iscru (2007). "Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1." J Mol Biol **367**(2): 443-455.

Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy." Nat Rev Cancer **7**(11): 834-846.

Aguirre-Ghiso, J. A., D. Liu, A. Mignatti, K. Kovalski and L. Ossowski (2001). "Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo." Mol Biol Cell **12**(4): 863-879.

Aguirre Ghiso, J. A., K. Kovalski and L. Ossowski (1999). "Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling." J Cell Biol **147**(1): 89-104.

Ahmed, N., S. Maines-Bandiera, M. A. Quinn, W. G. Unger, S. Dedhar and N. Auersperg (2006). "Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium." Am J Physiol Cell Physiol **290**(6): C1532-1542.

Al-Mehdi, A. B., K. Tozawa, A. B. Fisher, L. Shientag, A. Lee and R. J. Muschel (2000). "Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis." Nat Med **6**(1): 100-102.

Alberti, L., M. C. Thomachot, T. Bachelot, C. Menetrier-Caux, I. Puisieux and J. Y. Blay (2004). "IL-6 as an intracrine growth factor for renal carcinoma cell lines." Int J Cancer **111**(5): 653-661.

Altankov, G., T. Groth, N. Krasteva, W. Albrecht and D. Paul (1997). "Morphological evidence for a different fibronectin receptor organization and function during fibroblast adhesion on hydrophilic and hydrophobic glass substrata." J Biomater Sci Polym Ed **8**(9): 721-740.

Anderberg, C., S. I. Cunha, Z. Zhai, E. Cortez, E. Pardali, J. R. Johnson, M. Franco, M. Paez-Ribes, R. Cordiner, J. Fuxe, B. R. Johansson, M. J. Goumans, O. Casanovas, P. ten Dijke, H. M. Arthur and K. Pietras (2013). "Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination." J Exp Med **210**(3): 563-579.

Aokage, K., G. Ishii, Y. Ohtaki, Y. Yamaguchi, T. Hishida, J. Yoshida, M. Nishimura, K. Nagai and A. Ochiai (2011). "Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation." Int J Cancer **128**(7): 1585-1595.

Armstrong, T., G. Packham, L. B. Murphy, A. C. Bateman, J. A. Conti, D. R. Fine, C. D. Johnson, R. C. Benyon and J. P. Iredale (2004). "Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **10**(21): 7427-7437.

Avraamides, C. J., B. Garmy-Susini and J. A. Varner (2008). "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Cancer **8**(8): 604-617.

Baek, J. H., R. Zeng, J. Weinmann-Menke, M. T. Valerius, Y. Wada, A. K. Ajay, M. Colonna and V. R. Kelley (2015). "IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease." J Clin Invest **125**(8): 3198-3214.

Bai, L., J. C. Yang, J. H. Ok, P. C. Mack, H. J. Kung and C. P. Evans (2012). "Simultaneous targeting of Src kinase and receptor tyrosine kinase results in synergistic inhibition of renal cell carcinoma proliferation and migration." Int J Cancer **130**(11): 2693-2702.

Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." Development **132**(14): 3151-3161.

Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida and A. Garcia De Herreros (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." Nat Cell Biol **2**(2): 84-89.

Baud'huin, M., R. Renault, C. Charrier, A. Riet, A. Moreau, R. Brion, F. Gouin, L. Duplomb and D. Heymann (2010). "Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis." J Pathol **221**(1): 77-86.

Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M. M. Mareel and W. Birchmeier (1993). "Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene." J Cell Biol **120**(3): 757-766.

Bellocq, A., M. Antoine, A. Flahault, C. Philippe, B. Crestani, J. F. Bernaudin, C. Mayaud, B. Milleron, L. Baud and J. Cadranel (1998). "Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome." Am J Pathol **152**(1): 83-92.

Bhadriraju, K., K. H. Chung, T. A. Spurlin, R. J. Haynes, J. T. Elliott and A. L. Plant (2009). "The relative roles of collagen adhesive receptor DDR2 activation and matrix stiffness on the downregulation of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cells." Biomaterials **30**(35): 6687-6694.

Bigg, H. F., A. D. Rowan, M. D. Barker and T. E. Cawston (2007). "Activity of matrix metalloproteinase-9 against native collagen types I and III." FEBS J **274**(5): 1246-1255.

Bingle, L., N. J. Brown and C. E. Lewis (2002). "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." J Pathol **196**(3): 254-265.

Birchmeier, W. and J. Behrens (1994). "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness." Biochim Biophys Acta **1198**(1): 11-26.

Bonkhoff, H., U. Stein and K. Remberger (1993). "Differential expression of alpha 6 and alpha 2 very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate: simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands." Hum Pathol **24**(3): 243-248.

Brenner, W., S. Gross, F. Steinbach, S. Horn, R. Hohenfellner and J. W. Thuroff (2000). "Differential inhibition of renal cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and laminin." Cancer Lett **155**(2): 199-205.

Bretheau, D., E. Lechevallier, M. de Fromont, M. C. Sault, M. Rampal and C. Coulange (1995). "Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma." Cancer **76**(12): 2543-2549.

Bryan, T. M., A. Englezou, L. Dalla-Pozza, M. A. Dunham and R. R. Reddel (1997). "Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines." Nat Med **3**(11): 1271-1274.

Bui, M. H., D. Seligson, K. R. Han, A. J. Pantuck, F. J. Dorey, Y. Huang, S. Horvath, B. C. Leibovich, S. Chopra, S. Y. Liao, E. Stanbridge, M. I. Lerman, A. Palotie, R. A. Figlin and A. S. Belldegrun (2003). "Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy." Clin Cancer Res **9**(2): 802-811.

Bukowski, R. M. (2001). "Cytokine therapy for metastatic renal cell carcinoma." Semin Urol Oncol **19**(2): 148-154.

Cancer Genome Atlas, N. (2012). "Comprehensive molecular portraits of human breast tumours." Nature **490**(7418): 61-70.

Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo and M. A. Nieto (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol **2**(2): 76-83.

Cao, Y., L. H. Hoepfner, S. Bach, G. E. Y. Guo, E. Wang, J. Wu, M. J. Cowley, D. K. Chang, N. Waddell, S. M. Grimmond, A. V. Biankin, R. J. Daly, X. Zhang and D. Mukhopadhyay (2013). "Neuropilin-2 promotes extravasation and metastasis by interacting with endothelial alpha5 integrin." Cancer Res **73**(14): 4579-4590.

Carmona-Fontaine, C., H. K. Matthews, S. Kuriyama, M. Moreno, G. A. Dunn, M. Parsons, C. D. Stern and R. Mayor (2008). "Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration." Nature **456**(7224): 957-961.

Caruso, R. A., R. Bellocco, M. Pagano, G. Bertoli, L. Rigoli and C. Inferrera (2002). "Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy." Mod Pathol **15**(8): 831-837.

Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." Nat Rev Cancer **4**(2): 118-132.

Chaffer, C. L., J. P. Brennan, J. L. Slavin, T. Blick, E. W. Thompson and E. D. Williams (2006). "Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2." Cancer Res **66**(23): 11271-11278.

Chevile, J. C., C. M. Lohse, H. Zincke, A. L. Weaver and M. L. Blute (2003). "Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma." Am J Surg Pathol **27**(5): 612-624.

Chihara, T., S. Suzu, R. Hassan, N. Chutiwitoonchai, M. Hiyoshi, K. Motoyoshi, F. Kimura and S. Okada (2010). "IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation." Cell Death Differ **17**(12): 1917-1927.

Cho, E. H., M. Wendel, M. Luttgen, C. Yoshioka, D. Marrinucci, D. Lazar, E. Schram, J. Nieva, L. Bazhenova, A. Morgan, A. H. Ko, W. M. Korn, A. Kolatkar, K. Bethel and P. Kuhn (2012). "Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors." Phys Biol **9**(1): 016001.

Coca, S., J. Perez-Piqueras, D. Martinez, A. Colmenarejo, M. A. Saez, C. Vallejo, J. A. Martos and M. Moreno (1997). "The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma." Cancer **79**(12): 2320-2328.

Counter, C. M., A. A. Avilion, C. E. LeFeuvre, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley and S. Bacchetti (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." EMBO J **11**(5): 1921-1929.

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.

Curry, J. M., T. D. Eubank, R. D. Roberts, Y. Wang, N. Pore, A. Maity and C. B. Marsh (2008). "M-CSF signals through the MAPK/ERK pathway via Sp1 to induce VEGF production and induces angiogenesis in vivo." PLoS One **3**(10): e3405.

Danen, E. H., K. F. Jansen, A. A. Van Kraats, I. M. Cornelissen, D. J. Ruiter and G. N. Van Muijen (1995). "Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice." Int J Cancer **61**(4): 491-496.

De Calisto, J., C. Araya, L. Marchant, C. F. Riaz and R. Mayor (2005). "Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration." Development **132**(11): 2587-2597.

de Paulsen, N., A. Brychzy, M. C. Fournier, R. D. Klausner, J. R. Gnarra, A. Pause and S. Lee (2001). "Role of transforming growth factor- α in von Hippel-Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1387-1392.

Dehm, S. M. and K. Bonham (2004). "SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation." Biochem Cell Biol **82**(2): 263-274.

Demers, M. J., S. Thibodeau, D. Noel, N. Fujita, T. Tsuruo, R. Gauthier, M. Arguin and P. H. Vachon (2009). "Intestinal epithelial cancer cell anoikis resistance: EGFR-mediated sustained activation of Src overrides Fak-dependent signaling to MEK/Erk and/or PI3-K/Akt-1." J Cell Biochem **107**(4): 639-654.

Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper (1982). "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(11): 3637-3640.

Di Lullo, G. A., S. M. Sweeney, J. Korkko, L. Ala-Kokko and J. D. San Antonio (2002). "Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen." J Biol Chem **277**(6): 4223-4231.

Dimitroff, C. J., J. Y. Lee, S. Rafii, R. C. Fuhlbrigge and R. Sackstein (2001). "CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells." J Cell Biol **153**(6): 1277-1286.

Doerschuk, C. M., N. Beyers, H. O. Coxson, B. Wiggs and J. C. Hogg (1993). "Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung." J Appl Physiol (1985) **74**(6): 3040-3045.

Eda, H., J. Zhang, R. H. Keith, M. Michener, D. R. Beidler and J. B. Monahan (2010). "Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood." Cytokine **52**(3): 215-220.

Exposito, J. Y., U. Valcourt, C. Cluzel and C. Lethias (2010). "The fibrillar collagen family." Int J Mol Sci **11**(2): 407-426.

Fakhrejahani, E. and M. Toi (2012). "Tumor angiogenesis: pericytes and maturation are not to be ignored." J Oncol **2012**: 261750.

Fang, Y., J. Wei, J. Cao, H. Zhao, B. Liao, S. Qiu, D. Wang, J. Luo and W. Chen (2013). "Protein expression of ZEB2 in renal cell carcinoma and its prognostic significance in patient survival." PLoS One **8**(5): e62558.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.

Feron, O. (2009). "Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells." Radiother Oncol **92**(3): 329-333.

Ferri, N., N. O. Carragher and E. W. Raines (2004). "Role of discoidin domain receptors 1 and 2 in human smooth muscle cell-mediated collagen remodeling: potential implications in atherosclerosis and lymphangiomyomatosis." Am J Pathol **164**(5): 1575-1585.

French-Constant, C. (1995). "Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions." Exp Cell Res **221**(2): 261-271.

Fidler, I. J. (2002). "The organ microenvironment and cancer metastasis." Differentiation **70**(9-10): 498-505.

Foster, J. R. (2000). "Cell death and cell proliferation in the control of normal and neoplastic tissue growth." Toxicol Pathol **28**(3): 441-446.

Foucher, E. D., S. Blanchard, L. Preisser, E. Garo, N. Ifrah, P. Guardiola, Y. Delneste and P. Jeannin (2013). "IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFNgamma." PLoS One **8**(2): e56045.

Franco, C., K. Britto, E. Wong, G. Hou, S. N. Zhu, M. Chen, M. I. Cybulsky and M. P. Bendeck (2009). "Discoidin domain receptor 1 on bone marrow-derived cells promotes macrophage accumulation during atherogenesis." Circ Res **105**(11): 1141-1148.

Frantz, C., K. M. Stewart and V. M. Weaver (2010). "The extracellular matrix at a glance." J Cell Sci **123**(Pt 24): 4195-4200.

Friedl, P., S. Borgmann and E. B. Brocker (2001). "Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement." J Leukoc Biol **70**(4): 491-509.

Friedl, P., Y. Hegerfeldt and M. Tusch (2004). "Collective cell migration in morphogenesis and cancer." Int J Dev Biol **48**(5-6): 441-449.

Friedl, P. and K. Wolf (2009). "Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 129-135.

Fuhrman, S. A., L. C. Lasky and C. Limas (1982). "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma." Am J Surg Pathol **6**(7): 655-663.

Fujimoto, E., H. Sato, S. Shirai, Y. Nagashima, N. Virgona, K. Hagiwara, H. Yamasaki, E. Negishi, K. Ueno and T. Yano (2006). "Inhibition of Src activity enhances the tumor-suppressive effect of the connexin 32 gene in Caki-1 renal cancer cells." Oncol Rep **15**(5): 1359-1365.

Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H. E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer and W. Birchmeier (2002). "Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex." Nat Cell Biol **4**(3): 222-231.

Gamelin, E., S. D. Mertins, J. T. Regis, L. Mickley, A. Abati, R. A. Worrell, W. M. Linehan and S. E. Bates (1999). "Intrinsic drug resistance in primary and metastatic renal cell carcinoma." J Urol **162**(1): 217-224.

Ghajar, C. M., H. Peinado, H. Mori, I. R. Matei, K. J. Evason, H. Brazier, D. Almeida, A. Koller, K. A. Hajjar, D. Y. Stainier, E. I. Chen, D. Lyden and M. J. Bissell (2013). "The perivascular niche regulates breast tumour dormancy." Nat Cell Biol **15**(7): 807-817.

Gialeli, C., A. D. Theocharis and N. K. Karamanos (2011). "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting." FEBS J **278**(1): 16-27.

Granot, Z., E. Henke, E. A. Comen, T. A. King, L. Norton and R. Benezra (2011). "Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung." Cancer Cell **20**(3): 300-314.

Guo, W. and F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 816-826.

Hajra, K. M., D. Y. Chen and E. R. Fearon (2002). "The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer." Cancer Res **62**(6): 1613-1618.

Hammerman, P. S., M. L. Sos, A. H. Ramos, C. Xu, A. Dutt, W. Zhou, L. E. Brace, B. A. Woods, W. Lin, J. Zhang, X. Deng, S. M. Lim, S. Heynck, M. Peifer, J. R. Simard, M. S. Lawrence, R. C. Onofrio, H. B. Salvesen, D. Seidel, T. Zander, J. M. Heuckmann, A. Soltermann, H. Moch, M. Koker, F. Leenders, F. Gabler, S. Querings, S. Ansen, E. Brambilla, C. Brambilla, P. Lorimier, O. T. Brustugun, A. Helland, I. Petersen, J. H. Clement, H. Groen, W. Timens, H. Sietsma, E. Stoelben, J. Wolf, D. G. Beer, M. S. Tsao, M. Hanna, C. Hatton, M. J. Eck, P. A. Janne, B. E. Johnson, W. Winckler, H. Greulich, A. J. Bass, J. Cho, D. Rauh, N. S. Gray, K. K. Wong, E. B. Haura, R. K. Thomas and M. Meyerson (2011). "Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer." Cancer Discov **1**(1): 78-89.

Han, K. R., I. Bleumer, A. J. Pantuck, H. L. Kim, F. J. Dorey, N. K. Janzen, A. Zisman, C. P. Dinney, C. G. Wood, D. A. Swanson, J. W. Said, R. A. Figlin, P. F. Mulders and A. S. Belldegrun (2003). "Validation of an integrated staging system toward improved prognostication of patients with localized renal cell carcinoma in an international population." J Urol **170**(6 Pt 1): 2221-2224.

Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hanna, N. and R. C. Burton (1981). "Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastases in vivo." J Immunol **127**(5): 1754-1758.

Hay, E. D. (2005). "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." Dev Dyn **233**(3): 706-720.

Hayette, S., K. Chabane, M. Michallet, E. Michallat, P. Cony-Makhoul, S. Salesse, V. Maguer-Satta, J. P. Magaud and F. E. Nicolini (2011). "Longitudinal studies of SRC family kinases in imatinib- and dasatinib-resistant chronic myelogenous leukemia patients." Leuk Res **35**(1): 38-43.

Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S. I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger and E. Sahai (2011). "Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6." Nat Cell Biol **13**(1): 49-58.

Hirohashi, S. (1998). "Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers." Am J Pathol **153**(2): 333-339.

Holmgren, L., M. S. O'Reilly and J. Folkman (1995). "Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nat Med **1**(2): 149-153.

Hou, G., W. F. Vogel and M. P. Bendeck (2002). "Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression." Circ Res **90**(11): 1147-1149.

Hu, K., L. Lou, J. Ye and S. Zhang (2015). "Prognostic role of the neutrophil-lymphocyte ratio in renal cell carcinoma: a meta-analysis." BMJ Open **5**(4): e006404.

Huang, Y., N. Song, Y. Ding, S. Yuan, X. Li, H. Cai, H. Shi and Y. Luo (2009). "Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis." Cancer Res **69**(19): 7529-7537.

Huijbers, I. J., M. Iravani, S. Popov, D. Robertson, S. Al-Sarraj, C. Jones and C. M. Isacke (2010). "A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion." PLoS One **5**(3): e9808.

Indraccolo, S., L. Stievano, S. Minuzzo, V. Tosello, G. Esposito, E. Piovan, R. Zamarchi, L. Chieco-Bianchi and A. Amadori (2006). "Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4216-4221.

Ishigami, S., S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, X. Che, H. Iwashige, K. Aridome, S. Hokita and T. Aikou (2000). "Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma." Cancer **88**(3): 577-583.

Ito, S., H. Nakanishi, Y. Ikehara, T. Kato, Y. Kasai, K. Ito, S. Akiyama, A. Nakao and M. Tatematsu (2001). "Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line." Int J Cancer **93**(2): 212-217.

Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-252.

Kacinski, B. M. (1997). "CSF-1 and its receptor in breast carcinomas and neoplasms of the female reproductive tract." Mol Reprod Dev **46**(1): 71-74.

Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.

Kaplan, G. (1983). "In vitro differentiation of human monocytes. Monocytes cultured on glass are cytotoxic to tumor cells but monocytes cultured on collagen are not." J Exp Med **157**(6): 2061-2072.

Karrison, T. G., D. J. Ferguson and P. Meier (1999). "Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy." J Natl Cancer Inst **91**(1): 80-85.

Karsenty, G. and R. W. Park (1995). "Regulation of type I collagen genes expression." Int Rev Immunol **12**(2-4): 177-185.

Kauppi, S., F. Stenback, J. Risteli, A. Jukkola and L. Risteli (1998). "Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo." J Pathol **186**(3): 262-268.

Khatib, A. M., P. Auguste, L. Fallavollita, N. Wang, A. Samani, M. Kontogiannia, S. Meterissian and P. Brodt (2005). "Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis." Am J Pathol **167**(3): 749-759.

Khuon, S., L. Liang, R. W. Dettman, P. H. Sporn, R. B. Wysolmerski and T. L. Chew (2010). "Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study." J Cell Sci **123**(Pt 3): 431-440.

Kienast, Y., L. von Baumgarten, M. Fuhrmann, W. E. Klinkert, R. Goldbrunner, J. Herms and F. Winkler (2010). "Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation." Nat Med **16**(1): 116-122.

Kim, Y., Q. Lin, P. M. Glazer and Z. Yun (2009). "Hypoxic tumor microenvironment and cancer cell differentiation." Curr Mol Med **9**(4): 425-434.

Kinouchi, T., M. Mano, I. Matsuoka, S. Kodama, T. Aoki, M. Okamoto, H. Yamamura, M. Usami and K. Takahashi (2003). "Immature tumor angiogenesis in high-grade and high-stage renal cell carcinoma." Urology **62**(4): 765-770.

Kosmehl, H., A. Berndt and D. Katenkamp (1996). "Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects." Virchows Arch **429**(6): 311-322.

Kowanetz, M., X. Wu, J. Lee, M. Tan, T. Hagenbeek, X. Qu, L. Yu, J. Ross, N. Korsisaari, T. Cao, H. Bou-Reslan, D. Kallop, R. Weimer, M. J. Ludlam, J. S. Kaminker, Z. Modrusan, N. van Bruggen, F. V. Peale, R. Carano, Y. G. Meng and N. Ferrara (2010). "Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21248-21255.

Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-369.

Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri and E. W. Thompson (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." J Cell Biol **172**(7): 973-981.

Leibovich, B. C., Y. Sheinin, C. M. Lohse, R. H. Thompson, J. C. Cheville, J. Zavada and E. D. Kwon (2007). "Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma." J Clin Oncol **25**(30): 4757-4764.

Leitinger, B. (2003). "Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2." J Biol Chem **278**(19): 16761-16769.

Letourneau, P. C., M. L. Condic and D. M. Snow (1992). "Extracellular matrix and neurite outgrowth." Curr Opin Genet Dev **2**(4): 625-634.

Lim, J. and J. P. Thiery (2012). "Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development." Development **139**(19): 3471-3486.

Lin, E. Y. and J. W. Pollard (2004). "Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread." Br J Cancer **90**(11): 2053-2058.

Lin, H., E. Lee, K. Hestir, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Behrens, D. Hollenbaugh, T. Linnemann, M. Qin, J. Wong, K. Chu, S. K. Doberstein and L. T. Williams (2008). "Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome." Science **320**(5877): 807-811.

Liu, D., J. Aguirre Ghiso, Y. Estrada and L. Ossowski (2002). "EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma." Cancer Cell **1**(5): 445-457.

Liu, Y. J., M. Le Berre, F. Lautenschlaeger, P. Maiuri, A. Callan-Jones, M. Heuze, T. Takaki, R. Voituriez and M. Piel (2015). "Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells." Cell **160**(4): 659-672.

Lo, H. W., S. C. Hsu, W. Xia, X. Cao, J. Y. Shih, Y. Wei, J. L. Abbruzzese, G. N. Hortobagyi and M. C. Hung (2007). "Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression." Cancer Res **67**(19): 9066-9076.

Lopez-Beltran, A., M. Scarpelli, R. Montironi and Z. Kirkali (2006). "2004 WHO classification of the renal tumors of the adults." Eur Urol **49**(5): 798-805.

Lowe, S. W., E. Cepero and G. Evan (2004). "Intrinsic tumour suppression." Nature **432**(7015): 307-315.

Lu, K. K., D. Trcka and M. P. Bendeck (2011). "Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src." Cardiovasc Pathol **20**(2): 71-76.

Lu, P., V. M. Weaver and Z. Werb (2012). "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression." J Cell Biol **196**(4): 395-406.

Luzzi, K. J., I. C. MacDonald, E. E. Schmidt, N. Kerkvliet, V. L. Morris, A. F. Chambers and A. C. Groom (1998). "Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases." Am J Pathol **153**(3): 865-873.

MacDonald, B. T., K. Tamai and X. He (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." Dev Cell **17**(1): 9-26.

Madamanchi, A., A. Zijlstra and M. M. Zutter (2014). "Flipping the switch: integrin switching provides metastatic competence." Sci Signal **7**(318): pe9.

Malanchi, I., A. Santamaria-Martinez, E. Susanto, H. Peng, H. A. Lehr, J. F. Delaloye and J. Huelsken (2012). "Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization." Nature **481**(7379): 85-89.

Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang and R. A. Weinberg (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133**(4): 704-715.

Marchesi, F., L. Piemonti, G. Fedele, A. Destro, M. Roncalli, L. Albarello, C. Doglioni, A. Anselmo, A. Doni, P. Bianchi, L. Laghi, A. Malesci, L. Cervo, M. Malosio, M. Reni, A. Zerbi, V. Di Carlo, A. Mantovani and P. Allavena (2008). "The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Res **68**(21): 9060-9069.

Marhaba, R. and M. Zoller (2004). "CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation." J Mol Histol **35**(3): 211-231.

Martin, T. A., A. Goyal, G. Watkins and W. G. Jiang (2005). "Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer." Ann Surg Oncol **12**(6): 488-496.

Martinez-Morales, P. L., R. Diez del Corral, I. Olivera-Martinez, A. C. Quiroga, R. M. Das, J. A. Barbas, K. G. Storey and A. V. Morales (2011). "FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk." J Cell Biol **194**(3): 489-503.

Mayer, E. L. and I. E. Krop (2010). "Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies." Clin Cancer Res **16**(14): 3526-3532.

Mejean, A. and T. Lebreton (2008). "[Prise en charge of metastatic renal carcinoma]." Prog Urol **18 Suppl 7**: S298-308.

Melchiori, A., R. Mortarini, S. Carlone, P. C. Marchisio, A. Anichini, D. M. Noonan and A. Albini (1995). "The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion." Exp Cell Res **219**(1): 233-242.

Menke, J., Y. Iwata, W. A. Rabacal, R. Basu, Y. G. Yeung, B. D. Humphreys, T. Wada, A. Schwarting, E. R. Stanley and V. R. Kelley (2009). "CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice." J Clin Invest **119**(8): 2330-2342.

Menke, J., J. Kriegsmann, C. C. Schimanski, M. M. Schwartz, A. Schwarting and V. R. Kelley (2012). "Autocrine CSF-1 and CSF-1 receptor coexpression promotes renal cell carcinoma growth." Cancer Res **72**(1): 187-200.

Miki, S., M. Iwano, Y. Miki, M. Yamamoto, B. Tang, K. Yokokawa, T. Sonoda, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas." FEBS Lett **250**(2): 607-610.

Miyake, H., I. Hara, K. Gohji, K. Yamanaka, S. Hara, S. Arakawa, M. Nakajima and S. Kamidono (1999). "Relative expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in mouse renal cell carcinoma cells regulates their metastatic potential." Clin Cancer Res 5(10): 2824-2829.

Moody, S. E., D. Perez, T. C. Pan, C. J. Sarkisian, C. P. Portocarrero, C. J. Sterner, K. L. Notorfrancesco, R. D. Cardiff and L. A. Chodosh (2005). "The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence." Cancer Cell 8(3): 197-209.

Moon, S. J., Y. S. Hong, J. H. Ju, S. K. Kwok, S. H. Park and J. K. Min (2013). "Increased levels of interleukin 34 in serum and synovial fluid are associated with rheumatoid factor and anticyclic citrullinated peptide antibody titers in patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol 40(11): 1842-1849.

Morrison, C. D., J. G. Parvani and W. P. Schiemann (2013). "The relevance of the TGF-beta Paradox to EMT-MET programs." Cancer Lett 341(1): 30-40.

Morrissey, J. J., V. M. Mellnick, J. Luo, M. J. Siegel, R. S. Figenshau, S. Bhayani and E. D. Kharasch (2015). "Evaluation of Urine Aquaporin-1 and Perilipin-2 Concentrations as Biomarkers to Screen for Renal Cell Carcinoma: A Prospective Cohort Study." JAMA Oncol 1(2): 204-212.

Motzer, R. J., J. Bacik, B. A. Murphy, P. Russo and M. Mazumdar (2002). "Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma." J Clin Oncol 20(1): 289-296.

Motzer, R. J., B. Escudier, D. F. McDermott, S. George, H. J. Hammers, S. Srinivas, S. S. Tykodi, J. A. Sosman, G. Procopio, E. R. Plimack, D. Castellano, T. K. Choueiri, H. Gurney, F. Donskov, P. Bono, J. Wagstaff, T. C. Gaurer, T. Ueda, Y. Tomita, F. A. Schutz, C. Kollmannsberger, J. Larkin, A. Ravaud, J. S. Simon, L. A. Xu, I. M. Waxman, P. Sharma and I. CheckMate (2015). "Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med 373(19): 1803-1813.

Motzer, R. J. and P. Russo (2000). "Systemic therapy for renal cell carcinoma." J Urol 163(2): 408-417.

Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature 410(6824): 50-56.

Muraishi, Y., N. Mitani, H. Fuse and I. Saiki (2001). "Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor (ONO-4817) on lung metastasis of murine renal cell carcinoma." Anticancer Res **21**(6A): 3845-3852.

Murphy, G. P. and W. J. Hrushesky (1973). "A murine renal cell carcinoma." J Natl Cancer Inst **50**(4): 1013-1025.

Nakamichi, Y., N. Udagawa and N. Takahashi (2013). "IL-34 and CSF-1: similarities and differences." J Bone Miner Metab **31**(5): 486-495.

Nandi, S., M. Cioce, Y. G. Yeung, E. Nieves, L. Tesfa, H. Lin, A. W. Hsu, R. Halenbeck, H. Y. Cheng, S. Gokhan, M. F. Mehler and E. R. Stanley (2013). "Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34." J Biol Chem **288**(30): 21972-21986.

Naumov, G. N., I. C. MacDonald, P. M. Weinmeister, N. Kerkvliet, K. V. Nadkarni, S. M. Wilson, V. L. Morris, A. C. Groom and A. F. Chambers (2002). "Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy." Cancer Res **62**(7): 2162-2168.

Naumov, G. N., J. L. Townson, I. C. MacDonald, S. M. Wilson, V. H. Bramwell, A. C. Groom and A. F. Chambers (2003). "Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases." Breast Cancer Res Treat **82**(3): 199-206.

Negrier, S., B. Escudier, F. Gomez, J. Y. Douillard, A. Ravaud, C. Chevreau, M. Buclon, D. Perol and C. Lasset (2002). "Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Francais d'Immunotherapie." Ann Oncol **13**(9): 1460-1468.

Negrier, S., B. Escudier, C. Lasset, J. Y. Douillard, J. Savary, C. Chevreau, A. Ravaud, A. Mercatello, J. Peny, M. Mousseau, T. Philip and T. Tursz (1998). "Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie." N Engl J Med **338**(18): 1272-1278.

Nguyen, D. X., P. D. Bos and J. Massague (2009). "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization." Nat Rev Cancer **9**(4): 274-284.

Nishikawa, H. and S. Sakaguchi (2010). "Regulatory T cells in tumor immunity." Int J Cancer **127**(4): 759-767.

Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H. C. Crawford, S. Vermeulen, W. Steelant, E. Bruyneel, L. M. Matrisian and M. Mareel (2001). "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1." J Cell Sci **114**(Pt 1): 111-118.

Orsulic, S., O. Huber, H. Aberle, S. Arnold and R. Kemler (1999). "E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation." J Cell Sci **112** (Pt 8): 1237-1245.

Oskarsson, T., S. Acharyya, X. H. Zhang, S. Vanharanta, S. F. Tavazoie, P. G. Morris, R. J. Downey, K. Manova-Todorova, E. Brogi and J. Massague (2011). "Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs." Nat Med **17**(7): 867-874.

Paget, S. (1989). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889." Cancer Metastasis Rev **8**(2): 98-101.

Pankov, R. and K. M. Yamada (2002). "Fibronectin at a glance." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3861-3863.

Pankova, K., D. Rosel, M. Novotny and J. Brabek (2010). "The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells." Cell Mol Life Sci **67**(1): 63-71.

Park, H. S., K. R. Kim, H. J. Lee, H. N. Choi, D. K. Kim, B. T. Kim and W. S. Moon (2007). "Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase." Oncol Rep **18**(6): 1435-1441.

Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer and V. M. Weaver (2005). "Tensional homeostasis and the malignant phenotype." Cancer Cell **8**(3): 241-254.

Patard, J. J., H. Baumert, J. M. Correas, B. Escudier, H. Lang, J. A. Long, Y. Neuzillet, P. Paparel, L. Poissonnier, N. Rioux-Leclercq, M. Soulie and U. Oncology Committee of the French Association of (2010). "[Recommendations Onco-Urology 2010: Kidney cancer]." Prog Urol **20 Suppl 4**: S319-339.

Peinado, H., F. Portillo and A. Cano (2004). "Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis." Int J Dev Biol **48**(5-6): 365-375.

Plantefaber, L. C. and R. O. Hynes (1989). "Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells." Cell **56**(2): 281-290.

Powell, A. M., Y. Sakuma-Oyama, N. Oyama and M. M. Black (2005). "Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex." Clin Exp Dermatol **30**(6): 682-687.

Qayyum, T., P. A. McArdle, G. W. Lamb, F. Jordan, C. Orange, M. Seywright, P. G. Horgan, R. J. Jones, G. Oades, M. A. Aitchison and J. Edwards (2012). "Expression and prognostic significance of Src family members in renal clear cell carcinoma." Br J Cancer **107**(5): 856-863.

Qi, J., N. Chen, J. Wang and C. H. Siu (2005). "Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway." Mol Biol Cell **16**(9): 4386-4397.

Quail, D. F. and J. A. Joyce (2013). "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis." Nat Med **19**(11): 1423-1437.

Rajalingam, K., R. Schreck, U. R. Rapp and S. Albert (2007). "Ras oncogenes and their downstream targets." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1177-1195.

Ramaswamy, S., K. N. Ross, E. S. Lander and T. R. Golub (2003). "A molecular signature of metastasis in primary solid tumors." Nat Genet **33**(1): 49-54.

Ren, T., W. Zhang, X. Liu, H. Zhao, J. Zhang, J. Zhang, X. Li, Y. Zhang, X. Bu, M. Shi, L. Yao and J. Su (2014). "Discoidin domain receptor 2 (DDR2) promotes breast cancer cell metastasis and the mechanism implicates epithelial-mesenchymal transition programme under hypoxia." J Pathol **234**(4): 526-537.

Reymond, N., B. B. d'Agua and A. J. Ridley (2013). "Crossing the endothelial barrier during metastasis." Nat Rev Cancer **13**(12): 858-870.

Richardsen, E., R. D. Uglehus, J. Due, C. Busch and L. T. Busund (2008). "The prognostic impact of M-CSF, CSF-1 receptor, CD68 and CD3 in prostatic carcinoma." Histopathology **53**(1): 30-38.

Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-1709.

Rini, B. I. (2009). "Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma." Cancer **115**(10 Suppl): 2306-2312.

Rodrigues, R., L. Roque, C. Espadinha, A. Pinto, R. Domingues, J. Dinis, A. Catarino, T. Pereira and V. Leite (2007). "Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas." Oncol Rep **18**(4): 917-926.

Roomi, M. W., J. C. Monterrey, T. Kalinovsky, M. Rath and A. Niedzwiecki (2009). "Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines." Oncol Rep **21**(5): 1323-1333.

Rosenberg, S. A. (2007). "Interleukin 2 for patients with renal cancer." Nat Clin Pract Oncol **4**(9): 497.

Rosivatz, E., I. Becker, K. Specht, E. Fricke, B. Lubber, R. Busch, H. Hofler and K. F. Becker (2002). "Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer." Am J Pathol **161**(5): 1881-1891.

Royer, C. and X. Lu (2011). "Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer?" Cell Death Differ **18**(9): 1470-1477.

Ruiz, P. A. and G. Jarai (2011). "Collagen I induces discoidin domain receptor (DDR) 1 expression through DDR2 and a JAK2-ERK1/2-mediated mechanism in primary human lung fibroblasts." J Biol Chem **286**(15): 12912-12923.

Salup, R. R., R. B. Herberman and R. H. Wiltout (1985). "Role of natural killer activity in development of spontaneous metastases in murine renal cancer." J Urol **134**(6): 1236-1241.

Sangwan, V. and M. Park (2006). "Receptor tyrosine kinases: role in cancer progression." Curr Oncol **13**(5): 191-193.

Schlaepfer, D. D., K. C. Jones and T. Hunter (1998). "Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events." Mol Cell Biol **18**(5): 2571-2585.

Schlie-Wolter, S., A. Ngezahayo and B. N. Chichkov (2013). "The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro." Exp Cell Res **319**(10): 1553-1561.

Schultz, G., D. S. Rotatori and W. Clark (1991). "EGF and TGF- α in wound healing and repair." J Cell Biochem **45**(4): 346-352.

Seely, S. (1980). "Possible reasons for the high resistance of muscle to cancer." Med Hypotheses **6**(2): 133-137.

Segaliny, A. I., A. Mohamadi, B. Dizier, A. Lokajczyk, R. Brion, R. Lanel, J. Amiaud, C. Charrier, C. Boisson-Vidal and D. Heymann (2015). "Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment." Int J Cancer **137**(1): 73-85.

Semenza, G. L. (2008). "Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate." J Clin Invest **118**(12): 3835-3837.

Shammas, M. A., H. Koley, D. G. Beer, C. Li, R. K. Goyal and N. C. Munshi (2004). "Growth arrest, apoptosis, and telomere shortening of Barrett's-associated adenocarcinoma cells by a telomerase inhibitor." Gastroenterology **126**(5): 1337-1346.

Shammas, M. A., R. J. Shmookler Reis, M. Akiyama, H. Koley, D. Chauhan, T. Hideshima, R. K. Goyal, L. H. Hurley, K. C. Anderson and N. C. Munshi (2003). "Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma." Mol Cancer Ther **2**(9): 825-833.

Shekaran, A. and A. J. Garcia (2011). "Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair." J Biomed Mater Res A **96**(1): 261-272.

Shen, Q., V. R. Cicinnati, X. Zhang, S. Iacob, F. Weber, G. C. Sotiropoulos, A. Radtke, M. Lu, A. Paul, G. Gerken and S. Beckebaum (2010). "Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion." Mol Cancer **9**: 227.

Shen, Y., R. Shen, L. Ge, Q. Zhu and F. Li (2012). "Fibrillar type I collagen matrices enhance metastasis/invasion of ovarian epithelial cancer via beta1 integrin and PTEN signals." Int J Gynecol Cancer **22**(8): 1316-1324.

Shields, M. A., S. Dangi-Garimella, S. B. Krantz, D. J. Bentrem and H. G. Munshi (2011). "Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion." J Biol Chem **286**(12): 10495-10504.

Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (2008). "Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1." J Cell Biol **180**(6): 1277-1289.

Singh, A. B., A. Sharma, J. J. Smith, M. Krishnan, X. Chen, S. Eschrich, M. K. Washington, T. J. Yeatman, R. D. Beauchamp and P. Dhawan (2011). "Claudin-1 up-regulates the repressor ZEB-1 to inhibit E-cadherin expression in colon cancer cells." Gastroenterology **141**(6): 2140-2153.

Smith, B. H., L. S. Gazda, B. L. Conn, K. Jain, S. Asina, D. M. Levine, T. S. Parker, M. A. Laramore, P. C. Martis, H. V. Vinerean, E. M. David, S. Qiu, C. Cordon-Cardo, R. D. Hall, B. R. Gordon, C. H. Diehl, K. H. Stenzel and A. L. Rubin (2011). "Three-dimensional culture of mouse renal carcinoma cells in agarose macrobeads selects for a subpopulation of cells with cancer stem cell or cancer progenitor properties." Cancer Res **71**(3): 716-724.

Smith, B. N., L. J. Burton, V. Henderson, D. D. Randle, D. J. Morton, B. A. Smith, L. Taliaferro-Smith, P. Nagappan, C. Yates, M. Zayzafoon, L. W. Chung and V. A. Odero-Marah (2014). "Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2." PLoS One **9**(8): e104987.

Solomon, E., J. Borrow and A. D. Goddard (1991). "Chromosome aberrations and cancer." Science **254**(5035): 1153-1160.

Sporn, M. B. (1996). "The war on cancer." Lancet **347**(9012): 1377-1381.

Sporn, M. B. and A. B. Roberts (1985). "Autocrine growth factors and cancer." Nature **313**(6005): 745-747.

Steffens, S., A. J. Schrader, G. Vetter, H. Eggers, H. Blasig, J. Becker, M. A. Kuczyk and J. Serth (2012). "Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma." Oncol Lett **3**(4): 787-790.

Stegemann, J. P., H. Hong and R. M. Nerem (2005). "Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype." J Appl Physiol (1985) **98**(6): 2321-2327.

Stetler-Stevenson, W. G. (1990). "Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **9**(4): 289-303.

Stracke, M. L., S. A. Aznavoorian, M. E. Beckner, L. A. Liotta and E. Schiffmann (1991). "Cell motility, a principal requirement for metastasis." EXS **59**: 147-162.

Stuelten, C. H., S. DaCosta Byfield, P. R. Arany, T. S. Karpova, W. G. Stetler-Stevenson and A. B. Roberts (2005). "Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2143-2153.

Suh, H. N. and H. J. Han (2011). "Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through alpha2beta1 integrin- and DDR1-dependent Bmi-1." J Cell Physiol **226**(12): 3422-3432.

Surquin, M., S. Buonocore, A. Le Moine, V. Flamand, M. Goldman and D. Abramowicz (2005). "[The role of neutrophils during allograft rejection]." Nephrol Ther **1**(3): 161-166.

Tanami, H., I. Imoto, A. Hirasawa, Y. Yuki, I. Sonoda, J. Inoue, K. Yasui, A. Misawa-Furihata, Y. Kawakami and J. Inazawa (2004). "Involvement of overexpressed wild-type BRAF in the growth of malignant melanoma cell lines." Oncogene **23**(54): 8796-8804.

Tarin, D., E. W. Thompson and D. F. Newgreen (2005). "The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia." Cancer Res **65**(14): 5996-6000; discussion 6000-5991.

Theveneau, E. and R. Mayor (2012). "Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration." Dev Biol **366**(1): 34-54.

Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.

Tlsty, T. D. and L. M. Coussens (2006). "Tumor stroma and regulation of cancer development." Annu Rev Pathol **1**: 119-150.

Tryggvason, K., M. Hoyhtya and C. Pyke (1993). "Type IV collagenases in invasive tumors." Breast Cancer Res Treat **24**(3): 209-218.

Tsukamoto, T. and S. K. Nigam (1999). "Cell-cell dissociation upon epithelial cell scattering requires a step mediated by the proteasome." J Biol Chem **274**(35): 24579-24584.

Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-5121.

Tzu, J. and M. P. Marinkovich (2008). "Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins." Int J Biochem Cell Biol **40**(2): 199-214.

Valentin, J. E., A. M. Stewart-Akers, T. W. Gilbert and S. F. Badylak (2009). "Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds." Tissue Eng Part A **15**(7): 1687-1694.

Valiathan, R. R., M. Marco, B. Leitinger, C. G. Kleer and R. Fridman (2012). "Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression." Cancer Metastasis Rev **31**(1-2): 295-321.

van der Flier, L. G. and H. Clevers (2009). "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium." Annu Rev Physiol **71**: 241-260.

van Zijl, F., G. Zulehner, M. Petz, D. Schneller, C. Kornauth, M. Hau, G. Machat, M. Grubinger, H. Huber and W. Mikulits (2009). "Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma." Future Oncol **5**(8): 1169-1179.

Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers and F. van Roy (1991). "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role." Cell **66**(1): 107-119.

Vogel, W., G. D. Gish, F. Alves and T. Pawson (1997). "The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen." Mol Cell **1**(1): 13-23.

Volpe, A. and J. J. Patard (2010). "Prognostic factors in renal cell carcinoma." World J Urol **28**(3): 319-327.

Waalkes, S., F. Atschekzei, M. W. Kramer, J. Hennenlotter, G. Vetter, J. U. Becker, A. Stenzl, A. S. Merseburger, A. J. Schrader, M. A. Kuczyk and J. Serth (2010). "Fibronectin 1 mRNA expression correlates with advanced disease in renal cancer." BMC Cancer **10**: 503.

Wall, S. J., E. Werner, Z. Werb and Y. A. DeClerck (2005). "Discoidin domain receptor 2 mediates tumor cell cycle arrest induced by fibrillar collagen." J Biol Chem **280**(48): 40187-40194.

Walsh, J. H., W. E. Karnes, F. Cuttitta and A. Walker (1991). "Autocrine growth factors and solid tumor malignancy." West J Med **155**(2): 152-163.

Wan, P. T., M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford, R. Marais and P. Cancer Genome (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." Cell **116**(6): 855-867.

Wan, S., E. Zhao, I. Kryczek, L. Vatan, A. Sadovskaya, G. Ludema, D. M. Simeone, W. Zou and T. H. Welling (2014). "Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells." Gastroenterology **147**(6): 1393-1404.

Wang, C. Z., H. W. Su, Y. C. Hsu, M. R. Shen and M. J. Tang (2006). "A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration." Mol Biol Cell **17**(6): 2839-2852.

Wang, T. N., D. Albo and G. P. Tuszynski (2002). "Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production." Surgery **132**(2): 220-225.

Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.

Weathington, N. M., A. H. van Houwelingen, B. D. Noerager, P. L. Jackson, A. D. Kraneveld, F. S. Galin, G. Folkerts, F. P. Nijkamp and J. E. Blalock (2006). "A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation." Nat Med **12**(3): 317-323.

Weiss, R. H. and P. Y. Lin (2006). "Kidney cancer: identification of novel targets for therapy." Kidney Int **69**(2): 224-232.

Whiteside, T. L., N. L. Vujanovic and R. B. Herberman (1998). "Natural killer cells and tumor therapy." Curr Top Microbiol Immunol **230**: 221-244.

Wong, I. Y., S. Javaid, E. A. Wong, S. Perk, D. A. Haber, M. Toner and D. Irimia (2014). "Collective and individual migration following the epithelial-mesenchymal transition." Nat Mater **13**(11): 1063-1071.

Woodward, J. (2008). "Crossing the endothelium: E-selectin regulates tumor cell migration under flow conditions." Cell Adh Migr **2**(3): 151-152.

Wozniak, M. A., R. Desai, P. A. Solski, C. J. Der and P. J. Keely (2003). "ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix." J Cell Biol **163**(3): 583-595.

Wyckoff, J. B., J. G. Jones, J. S. Condeelis and J. E. Segall (2000). "A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor." Cancer Res **60**(9): 2504-2511.

Wynn, T. A. and T. R. Ramalingam (2012). "Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease." Nat Med **18**(7): 1028-1040.

Xu, H., D. Bihan, F. Chang, P. H. Huang, R. W. Farndale and B. Leitinger (2012). "Discoidin domain receptors promote $\alpha1\beta1$ - and $\alpha2\beta1$ -integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation." PLoS One **7**(12): e52209.

Yang, K., J. H. Kim, H. J. Kim, I. S. Park, I. Y. Kim and B. S. Yang (2005). "Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular

autophosphorylation and Shc signaling complex formation." J Biol Chem **280**(47): 39058-39066.

Yang, L., Y. Pang and H. L. Moses (2010). "TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression." Trends Immunol **31**(6): 220-227.

Yang, L., Q. Wu, L. Xu, W. Zhang, Y. Zhu, H. Liu, J. Xu and J. Gu (2015). "Increased expression of colony stimulating factor-1 is a predictor of poor prognosis in patients with clear-cell renal cell carcinoma." BMC Cancer **15**: 67.

Yeatman, T. J. (2004). "A renaissance for SRC." Nat Rev Cancer **4**(6): 470-480.

Yezhelyev, M. V., G. Koehl, M. Guba, T. Brabletz, K. W. Jauch, A. Ryan, A. Barge, T. Green, M. Fennell and C. J. Bruns (2004). "Inhibition of SRC tyrosine kinase as treatment for human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice." Clin Cancer Res **10**(23): 8028-8036.

Yu, W., L. B. Ruest and K. K. Svoboda (2009). "Regulation of epithelial-mesenchymal transition in palatal fusion." Exp Biol Med (Maywood) **234**(5): 483-491.

Zeng, Z. S., A. M. Cohen and J. G. Guillem (1999). "Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis." Carcinogenesis **20**(5): 749-755.

Zhan, M., H. Zhao and Z. C. Han (2004). "Signalling mechanisms of anoikis." Histol Histopathol **19**(3): 973-983.

Zhang, X. H., M. Yan, L. Liu, T. J. Wu, L. L. Ma and L. X. Wang (2010). "Expression of discoidin domain receptors (DDR2) in alcoholic liver fibrosis in rats." Arch Med Res **41**(8): 586-592.

Zhu, G. G., L. Risteli, M. Makinen, J. Risteli, A. Kauppila and F. Stenback (1995). "Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms." Cancer **75**(4): 1010-1017.

Zisman, A., A. J. Pantuck, F. Dorey, J. W. Said, O. Shvarts, D. Quintana, B. J. Gitlitz, J. B. deKernion, R. A. Figlin and A. S. Belldegrun (2001). "Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system." J Clin Oncol **19**(6): 1649-1657.

Zulehner, G., M. Mikula, D. Schneller, F. van Zijl, H. Huber, W. Sieghart, B. Grasl-Kraupp, T. Waldhor, M. Peck-Radosavljevic, H. Beug and W. Mikulits (2010). "Nuclear beta-catenin

induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence." Am J Pathol **176**(1): 472-481.

Zutter, M. M., G. Mazoujian and S. A. Santoro (1990). "Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast." Am J Pathol **137**(4): 863-870.

Annexe / Publication

Modélisation du développement métastatique dans le RCC

Etienne Baratchart, Sébastien Benzekry, Andreas Bikfalvi, Thierry Colin, Lindsay S. Cooley, Raphaël Pineau, Emeline Ribot, Olivier Saut, Wilfried Souleyreau

Le projet de biologie des systèmes fait intervenir trois interfaces. Parmi celles-ci, une composante biologique est menée au laboratoire par l'équipe de Andréas Bikfalvi, et une composante de modélisation mathématique fait intervenir l'équipe de Thierry Colin de l'Université de Bordeaux. Ces interactions ont abouti à une publication dans le journal PLOS Computational Biology en 2015.

L'étude vise à mieux comprendre la dynamique de la colonisation métastatique et est essentiellement issue de la composante de modélisation mathématique. Des données biologiques issues de l'implantation orthotopique des cellules Renca-GFP dans des souris Balb/C, engendrant des métastases ont été utilisées. Les données provenant du suivi de la croissance tumorale et métastatique au moyen de l'expression de la GFP, et des données d'imagerie IRM ont été confrontées à l'hypothèse selon laquelle les métastases une fois établies, croissent indépendamment les unes des autres et de la tumeur primaire. Un modèle mathématique retranscrivant cette théorie a été utilisé à cet effet, et a permis de rejeter cette hypothèse. Ce rejet a mené à la génération d'un nouveau modèle mathématique, permettant d'étudier les effets d'interactions spatiales entre des métastases établies proches les unes des autres. Ces résultats suggèrent que la dynamique globale du développement métastatique est dépendante d'interactions spatiales entre les métastases.

RESEARCH ARTICLE

Computational Modelling of Metastasis Development in Renal Cell Carcinoma

Etienne Baratchart¹, Sébastien Benzekry^{1‡*}, Andreas Bikfalvi^{2‡*}, Thierry Colin^{1‡*}, Lindsay S. Cooley², Raphaël Pineau², Emeline Ribot³, Olivier Saut¹, Wilfried Souleyreau²

1 INRIA Bordeaux-Sud-Ouest team MONC; University of Bordeaux, IMB, UMR 5251; CNRS, IMB, UMR 5251; Bordeaux INP, IMB, UMR 5251, Talence, France, **2** LAMC, INSERM U1029, University of Bordeaux, Pessac, France, **3** Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536, CNRS/ University of Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

‡ These authors are joint senior authors on this work.

* sebastien.benzekry@inria.fr (SB); andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr (AB); Thierry.Colin@math.u-bordeaux1.fr (TC)



OPEN ACCESS

Citation: Baratchart E, Benzekry S, Bikfalvi A, Colin T, Cooley LS, Pineau R, et al. (2015) Computational Modelling of Metastasis Development in Renal Cell Carcinoma. *PLoS Comput Biol* 11(11): e1004626. doi:10.1371/journal.pcbi.1004626

Editor: Natalia L. Komarova, University of California, Irvine, UNITED STATES

Received: June 11, 2015

Accepted: October 25, 2015

Published: November 23, 2015

Copyright: © 2015 Baratchart et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors would like to thank the PlanCancer from the National Cancer Institute (INCA) and the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) for financial support of this project (MetaSys grant to AB and TC). LSC, (Post-doctoral fellowship) and EB, (PhD Fellowship) were supported by the MetaSys Grant. This work is part of the PhD thesis project of EB. This study has been carried out within the frame of the LABEX TRAIL, ANR-10-LABX-0057 with financial support from the French State, managed by the French National

Abstract

The biology of the metastatic colonization process remains a poorly understood phenomenon. To improve our knowledge of its dynamics, we conducted a modelling study based on multi-modal data from an orthotopic murine experimental system of metastatic renal cell carcinoma. The standard theory of metastatic colonization usually assumes that secondary tumours, once established at a distant site, grow independently from each other and from the primary tumour. Using a mathematical model that translates this assumption into equations, we challenged this theory against our data that included: 1) dynamics of primary tumour cells in the kidney and metastatic cells in the lungs, retrieved by green fluorescent protein tracking, and 2) magnetic resonance images (MRI) informing on the number and size of macroscopic lesions. Critically, when calibrated on the growth of the primary tumour and total metastatic burden, the predicted size distributions were not in agreement with the MRI observations. Moreover, tumour expansion only based on proliferation was not able to explain the volume increase of the metastatic lesions. These findings strongly suggested rejection of the standard theory, demonstrating that the time development of the size distribution of metastases could not be explained by independent growth of metastatic foci. This led us to investigate the effect of spatial interactions between merging metastatic tumours on the dynamics of the global metastatic burden. We derived a mathematical model of spatial tumour growth, confronted it with experimental data of single metastatic tumour growth, and used it to provide insights on the dynamics of multiple tumours growing in close vicinity. Together, our results have implications for theories of the metastatic process and suggest that global dynamics of metastasis development is dependent on spatial interactions between metastatic lesions.

Research Agency (ANR) in the frame of the "Investments for the future" Programme IdEx (ANR-10-IDEX-03-02). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

We used mathematical modelling to formalize the standard theory of metastatic initiation, under which secondary tumours, after establishment in a distant organ, grow independently from each other and from the primary tumour. When calibrated on the experimental data of primary tumour and total metastatic burden in the lungs in an animal model of renal cell carcinoma, the initial model predicted a size distribution of metastatic foci that did not fit with observations obtained experimentally using magnetic resonance imaging (which provided size and number of macro-metastases). The model predicted an increase in the number of lesions, but of smaller size when compared to the data. This led us to revise the standard theory and to propose two hypotheses in order to explain the observations: 1) small metastatic foci merge into larger ones and/or 2) circulating tumour cells may join already established tumours. We then derived a spatial model of tumour growth in order to explore the quantitative implications of tumours merging on global tumour growth and estimated the numbers of required metastatic foci to obtain the observed metastatic volumes.

Introduction

Metastasis, the spread of cancer cells from a primary tumour to secondary location(s) in the body, is the ultimate cause of death for the majority of cancer patients [1,2]. Although studied for more than 180 years [3], increasing efforts in recent years contributed to a better understanding of this aspect of tumour development [2,4], with exciting new discoveries [5–8] that potentially have important clinical implications. The metastatic process can be coarsely divided into two major phases: 1) dissemination of detaching cells from the primary tumour to a secondary site and 2) colonization of this distant organ [1,9]. While the former has been relatively well elucidated, in particular due to recent advances about the epithelial-to-mesenchymal transition [10] and advances on our understanding of molecular and genetic determinants [11,12], the latter remains not fully understood, especially during the colonization phase [1,12]. This is due, in part, to experimental limitations that hinder our ability to observe colonization of organs by tumour cells and the development of tumour lesions.

In this context, mathematical models provide powerful tools to potentiate data analysis, infer hidden information, test biological hypotheses against the empirical data and simulate a range of conditions that may be confronted to the biological reality. In recent years, several models for tumour growth have been developed (see [13,14] for historical reviews), based on multiple modelling techniques from non-spatial models based on ordinary differential equations (see [15] for a benchmark of these against experimental *in vivo* data) to discrete agent-based models [16–18] and continuous partial differential equations based on tissue mechanics laws [19,20]. However, despite a large body of literature for modelling tumour growth, relatively little effort has been devoted to the development and validation of mathematical models describing the biology of the metastatic process (see [21,22] for an early and notable exception, [23,24] for more recent studies and [25] for a recent review). In 2000, Iwata and colleagues proposed a simple mathematical model for the growth of a population of metastatic colonies [26], which was recently shown able to fit experimental data describing the increase in total metastatic burden [27,28]. In this mathematical description, each metastasis grows independently from the others and from the primary tumour. We report herein a theoretical study to test this hypothesis using *in vivo* data derived from a metastatic renal carcinoma model in mice. We first show that the standard theory of metastatic initiation in which distinct foci grow

independently from each other (as assumed in [21]) predicted an unrealistically large number of metastases, while the tumours sizes were too small.

In a space-limited organ (such as the lungs), where two neighbouring metastatic foci are growing in close vicinity, they might enter in contact and interactions occur, ultimately leading to the merging of the metastatic foci. This phenomenon is not taken into account in a classical description of metastasis development, although it can lead to important differences in the number and sizes of the colonies. Moreover, mechanical interactions could occur during metastases merging, possibly impacting the global dynamics. Therefore, we next conducted a simulation study to quantify the effect of mechanical interactions between two neighbouring tumours. Based on mechanical laws for tissue growth, we derived a minimally parameterized model (2 parameters). This second spatial model, based on a pressure-mediated growth law, once fitted to magnetic resonance imaging data of individual metastatic tumour growths, offered an adapted framework to perform simulations of spatially interacting tumours. These revealed significant impact of the interactions on the global growth and allowed to test if merging by passive motion could explain the data that are not in accordance with the classical model.

To our knowledge, this is the first time that data on size distribution of metastasis at this resolution (with such a small visibility threshold, of the order of 0.05 mm³) is reported and analysed in lights of a theoretical model.

Results

Data-driven modelling of metastatic growth

As an initial step, we studied the growth rates of individual metastatic tumours. Then, we calibrated a more elaborated mathematical model of tumour growth and metastatic dissemination using quantitative data derived from green fluorescent protein (GFP)-tracking of primary and metastatic tumours (see [Materials and methods](#), $n = 31$ mice). Finally, we used the model to investigate predictions of the standard theory with regard to number and sizes of metastatic lesions and compared them to Magnetic Resonance Imaging (MRI) data (see [Materials and methods](#), $n = 6$ mice).

Growth rates of individual metastatic tumours. RENCA cells were injected orthotopically in the sub-capsular space of the kidney of Balb/c mice. The first metastatic cells were observed in the lungs at day 14 and the first macro-metastases at days 18–19 ([Fig 1](#)). No metastasis was observed in other organs.

Assuming in a theoretical model that each metastasis originates from one surviving cell would imply that some metastases grow from the volume of one cell ($\approx 10^{-6}$ mm³, according to the well-established conversion rule 1 mm³ $\simeq 10^6$ cells [29]), to a volume of few mm³ (between 0.022 and 12 mm³) in five days at most. This would give tumour doubling times comprised between 5 and 8 hours, which represent less than one third of the doubling time observed *in vitro* (24.5 hours [30]). Even if considering that the metastases arose from few cells (2–50) instead of one [31,32], this would imply doubling times between 5.5 and 13.5 hours. These doubling times would also have to remain constant during 5 days. Such a fast growth is highly improbable since no mammalian cell has a cell cycle length smaller than 10 hours [33]. Moreover, the doubling time has been reported to be non-constant and to increase during *in vivo* growth [15]. Hence, growth at initiation would have to be even faster, in order to fit the data. Therefore, the theory consisting in describing each metastasis with a tumour expansion only based on cell proliferation seems unlikely.

Primary kidney tumour and the dynamics of lung metastasis. The standard theory of metastatic development assumes that secondary tumours are seeded from the primary tumour

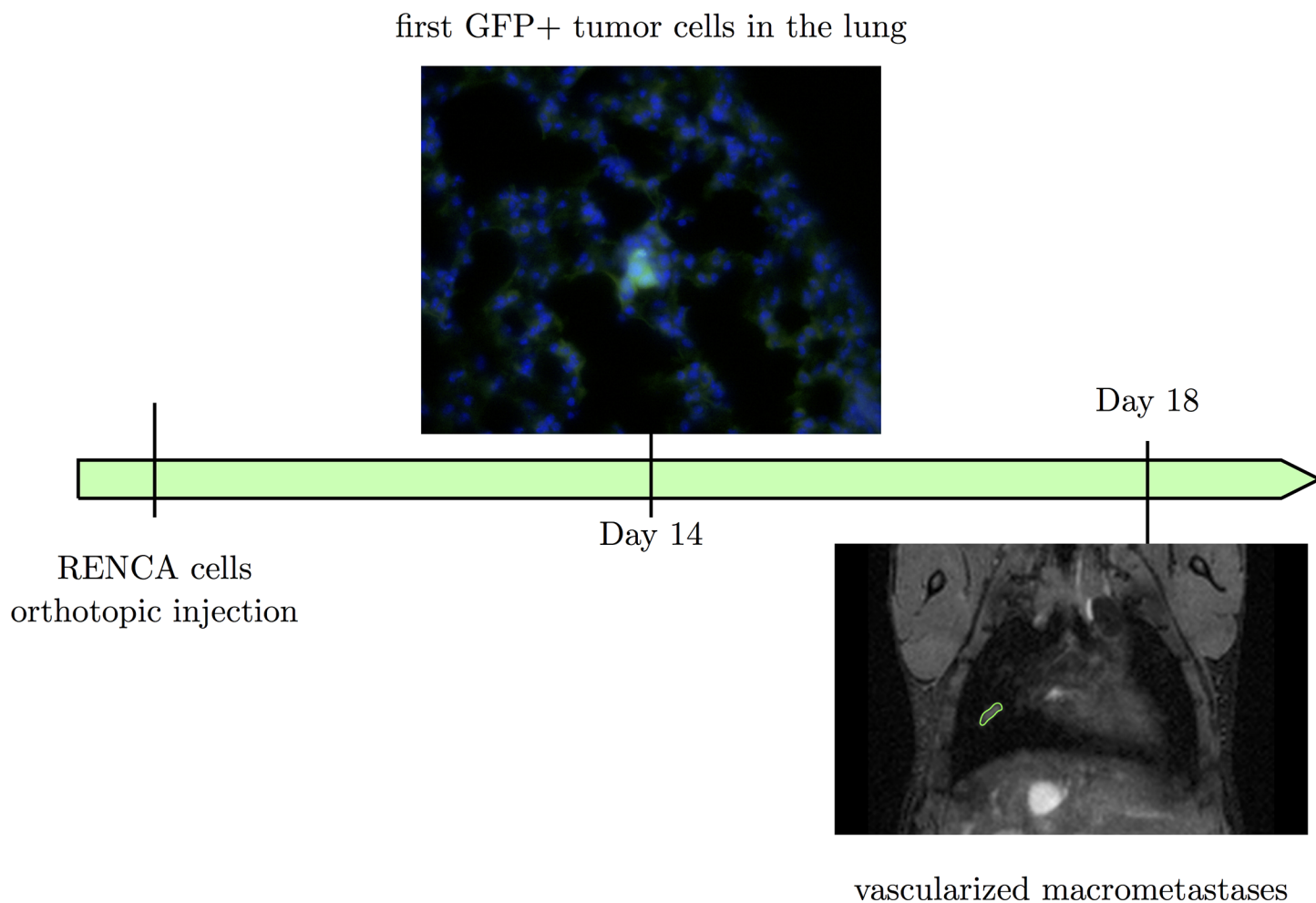


Fig 1. The animal model. At day 14 after GFP+ RENCA cells injection, the first tumour cells were observed in the lungs. At days 18–19, the first macro-metastases were observed by MRI.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.g001

and that, once established at the distant sites (the lungs in our case), they grow independently from each other and from the rest of the organism [2,3,10,34–36], as distinct foci initiated by single or few cells. We tested this theory against the following data: a) dynamics of the increase of GFP+ tumour cells in the kidney, b) longitudinal quantification of GFP+ tumour cells in the lungs and c) MRI images of lung metastasis. To this aim, we formalized the standard theory into a mathematical model. The model was then fitted to the data a) and b) and predictions were compared to the data c). For data a) and b) (Fig 2), quantification of GFP expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (see Materials and methods) required sacrifice of the animals. Therefore, each data point corresponds to a distinct animal ($n = 31$ animals in total). Since tumour cells were not detected in the lungs before day 14, measured GFP signals in the lungs in the first days were considered as noise. Including very early time points for the fit would therefore result in a strong bias because the model would be fitted on GFP values that do not reflect the presence of tumour cells. Thus, we considered the data points only starting from day 10 for the initial point for comparison and ignored the previous data points. At day 25, the GFP signal in the lungs of the two mice was within the noise level. Considering as highly unlikely the event of no metastases at such an advanced time, particularly when observing that

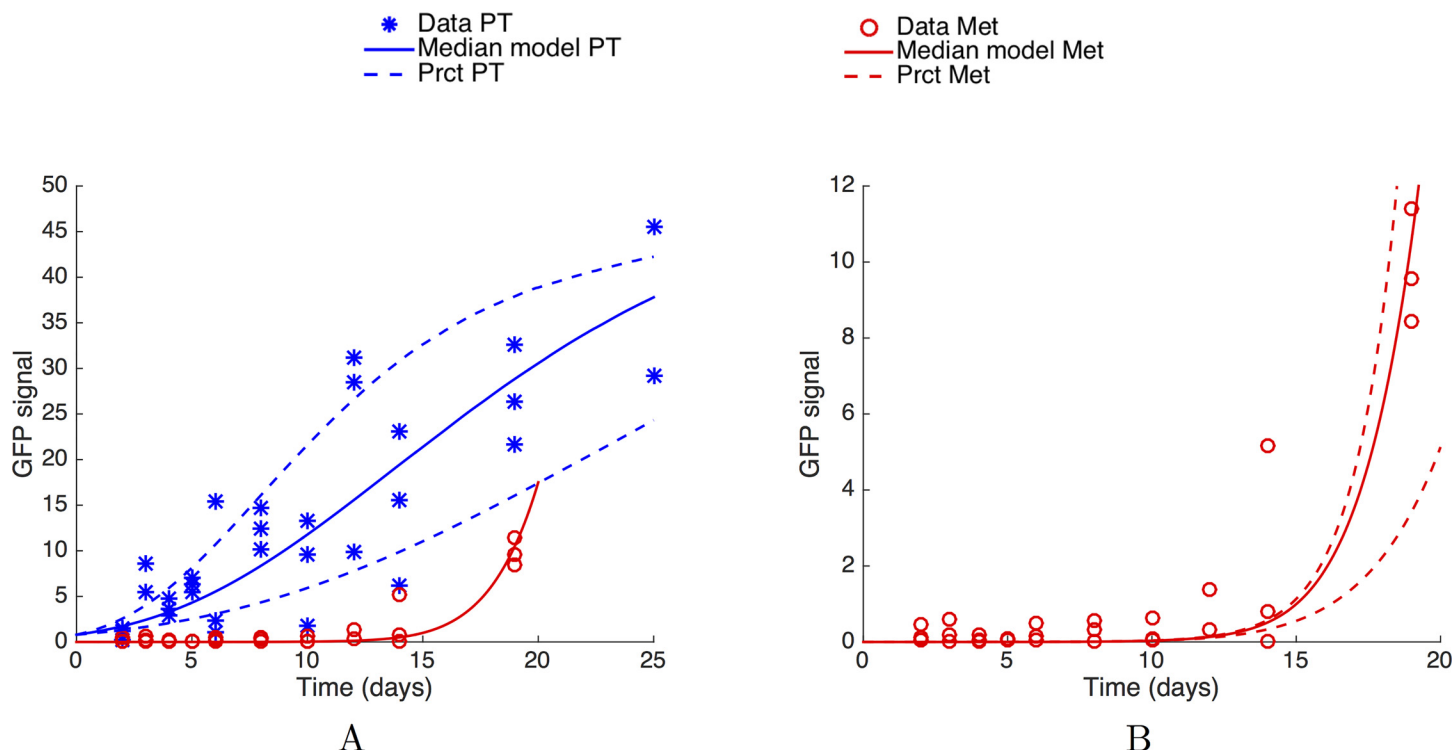


Fig 2. The standard theory: Primary tumour and metastatic burden dynamics fitting. (A) Fits of the primary tumour and metastatic burden dynamics, under a mathematical model assuming independent growth of each secondary tumour and using mixed-effects modelling for statistical representation of the population distribution of the parameters and measurement error. (B) Fit on the metastatic burden. In panels (A) and (B), each data point corresponds to one distinct mouse ($n = 31$ animals in total). Simulations were obtained using Eq 1 for the primary tumour growth and Eq 3 for the metastatic burden, endowed with a lognormal distribution of the parameters with the following values (median $\pm$ standard deviation): $\alpha = 0.417 \pm 0.171 \text{ day}^{-1}$, $\beta = 0.106 \pm 0.0478 \text{ day}^{-1}$ and $\mu = 9.72 \times 10^{-6} \pm 0.428 \times 10^{-6} \text{ cell} \cdot \text{day}^{-1}$. PT = Primary Tumour. Met = Metastatic burden. Prct = 10% and 90% percentiles

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.g002

imaged mice at day 24 either exhibited lots of metastases in the lungs or were dead due to metastatic disease, we concluded to a technical issue and removed these two data points from the analysis.

The standard theory as described above has been mathematically formalized by Iwata et al. [26]. This model was reported to provide a valid description of the dynamics of total metastatic burden in two animal models, including ours (human breast carcinoma xenograft [27,28] and syngeneic renal cell carcinoma [28]).

The model was adapted here as follows. We assumed that the GFP signal was proportional to the number of cancer cells, itself proportional to the tumour volume observed by MRI. The primary tumour volume at time t was denoted $V_p(t)$ and its growth rate $g(V_p(t))$. The primary tumour disseminates metastatic cells into the lungs according to a volume-dependent dissemination law $d(V_p(t))$. The metastatic colonies then grow into the lungs according to the same growth law as the primary tumour. The model describes the size distribution of the metastatic lesions at the distant site by means of a size-dependent density $\rho(t, v)$ of metastatic colonies of size v at time t , i.e. $\rho(t, v)dv$ is the number of metastatic colonies with a size comprised between v and $v + dv$. Secondary emission of metastases (i.e., metastases from metastases) was neglected here.

Tumour growth was modelled by means of the Gomp-Exp model [37], which is characterized by two phases: first an exponential phase (with a growth rate given by the *in vitro* proliferation rate), then a Gompertz phase (i.e., exponentially decreasing growth rate). For the primary

tumour growth, the model writes

$$\begin{cases} \frac{dV_p}{dt}(t) = g(V_p(t)) \\ V_p(0) = V_{inj} \\ g(V_p) = \min(\lambda V_p, (\alpha - \beta \ln(V_p)) V_p) \end{cases} \quad (1)$$

where λ is the *in vitro* proliferation rate of RENCA cells (retrieved from [30]), α corresponds to the specific growth rate at the size of one relative unit of GFP signal, β is the rate of exponential decrease of the specific growth rate and V_{inj} is the amount of injected cells. The Gompertz model has been proven able to describe *in vivo* tumour growth in numerous animal experimental systems [15,38,39], as well as human data [40]. Adjunction of the initial exponential phase was considered here because the Gompertz model exhibits an infinite relative growth rate for arbitrary small cell numbers, a feature that was not considered relevant, especially for the metastases that start from one cell. At this point we needed to retrieve the GFP signal associated to one cell. To achieve this, we performed a preliminary fit of the primary tumour GFP signals with the parameter V_{inj} subject to optimization, using population mixed-effects statistical modelling (see S1 Fig). We then assumed proportionality between the number of cells injected (100 000) and the estimated signal at day 0. The GFP signal associated to one cell was then derived and is denoted by V_0 . We found $V_0 = 7.96 \times 10^{-6}$ relative units of GFP signal.

Growth of secondary tumours was assumed to follow the same law (Gomp-Exp) and parameter values. More complex modelling including different growth parameters for the primary tumour and metastasis were tested but did not substantially improve the fits, while increasing the uncertainty in parameter estimation due to increased number of degrees of freedom.

At present time, there is no detailed study on the shape that the function d should have. However, it is often assumed to follow the law [26–28]:

$$d(V_p) = \mu V_p^\gamma$$

where parameter μ is related to an intrinsic (genetic) probability of the metastatic potential of the tumour cells, combined to the probability of successfully passing all the steps required for establishment of a metastasis (detachment from the primary tumour, intravasation into the blood circulation, survival in transit, arrest and extravasation at the distant site, establishment of a new colony [2,12]). Precise identification of the value of parameter γ was not possible on our data set, and in the following analysis, we arbitrarily fixed $\gamma = 1$, corresponding to the simplest assumption (emission proportional to the tumour volume).

Overall, the model writes as a transport equation on ρ , endowed with suitable boundary and initial conditions [26]:

$$\begin{cases} \partial_t \rho(t, v) + \partial_v (\rho(t, v) g(v)) = 0 & t \in]0, +\infty[, v \in]V_0, +\infty[\\ g(V_0) \rho(t, V_0) = d(V_p(t)) \\ \rho(0, v) = 0 \end{cases} \quad (2)$$

From the solution of this problem, the main quantity of interest for our purpose was the total metastatic burden, defined by

$$M(t) = \int_{V_0}^{+\infty} v \rho(t, v) dv \quad (3)$$

The model output was fitted to the GFP expression data from the lungs (Fig 2).

Due to the large inter-animal variability, we used a nonlinear mixed-effects statistical framework for fitting the model to the data and resulting estimation of the parameters [41] (see also [27,28] for applications to bioluminescence data of metastatic burden), which is particularly well suited for sparse longitudinal data in an animal population. Briefly, this framework considers estimation of a (parametric) distribution of the parameters within the population. This allows pooling all the data points together, thus leading to an increase of the robustness of the estimation and of the descriptive power for inter-animal variability. For the maximization of likelihood associated to nonlinear mixed-effects modelling, we used a version of a stochastic expectation maximization algorithm implemented in the Matlab function *nlmefitsa* [42]. To simulate the model, a well-adapted method using an integral formulation for $M(t)$ and the fast Fourier transform algorithm was employed [43]. This ensured reduction of the computational cost of simulations, which was necessary due to the very high number of runs required by *nlmefitsa*.

Data from the primary tumour and the metastatic burden were fitted together, and the model demonstrated satisfactorily descriptive power for the total metastatic burden (Fig 2), in accordance with other studies [27,28].

The calibrated model was further used to predict the distribution of macro-metastases visible in the MRI images, and to confront this prediction to the observations. Among the MRI data, images of only one mouse (over 6) were eligible for reliable assessment of the complete size distribution of macro-metastases, which was performed by manual segmentation of metastatic lesions in each of the 142 coronal slices of the MRI (resolution $156\ \mu\text{m} \times 155\ \mu\text{m} \times 155\ \mu\text{m}$), for each time point. In the other mice, the images had no sufficiently defined contours to properly establish a complete size distribution of the metastases (see S2 Fig). However, segmentation of the largest metastasis for each mouse at day 19 could be performed.

In the mouse where number and size of the lesions could properly be assessed, the smallest detectable metastasis had a volume of $0.05\ \text{mm}^3$, which was taken as the minimal visibility threshold. We defined a macro-metastasis as a metastasis having a size larger than this value. Results of the model simulation for the metastatic size distribution are reported in Fig 3A, together with the experimental data. Inter-animal variability was simulated using population distribution of the parameters (lognormal distribution and coefficients of variation reported in Table 1), retrieved from the population mixed-effects fit. The maximal volumes predicted by the model/standard theory were considerably smaller than those observed by MRI. For example, at $T = 19$ days, while the total metastatic burden was similar in the data and in the model (Fig 2), the macro-metastatic burden was three-fold larger in the data than in the model's average prediction (Fig 3B), and the largest metastasis five-fold larger. At $T = 26$ days, although macro-metastatic burdens were similar in the data and in the model, the standard theory predicted that the largest tumour would have a volume of only $1.14\ \text{mm}^3$ in average (std = $0.755\ \text{mm}^3$), while the largest observed metastasis had a volume more than 10 fold larger ($13.6\ \text{mm}^3$). This was compensated by a considerably larger number of metastatic lesions in the model (95.4 ± 47 versus 11 in the data). For each of these quantities, the p -value (probability to obtain the data value—or larger—under the null hypothesis that the data would have been generated by the model, evaluated numerically) was statistically significant ($p < 10^{-5}$).

These conclusions are limited by the fact that the entire time course of metastatic size distribution of only one mouse was available for reliable comparison with the model. However, in all the 6 mice, the size of the largest metastasis at day 19 could be measured and ranged ($0.45\text{--}12$) mm^3 , which was significantly larger than the model predictions (Fig 3C, $p < 10^{-5}$ by the z -test). To give an idea, the largest metastases predicted by the model ranged ($9.5 \times 10^{-4}\text{--}0.3$) mm^3 . This strongly suggested that the standard theory was not able to describe the volumes of individual foci. Moreover, even without statistical comparison of the model's predictions to the

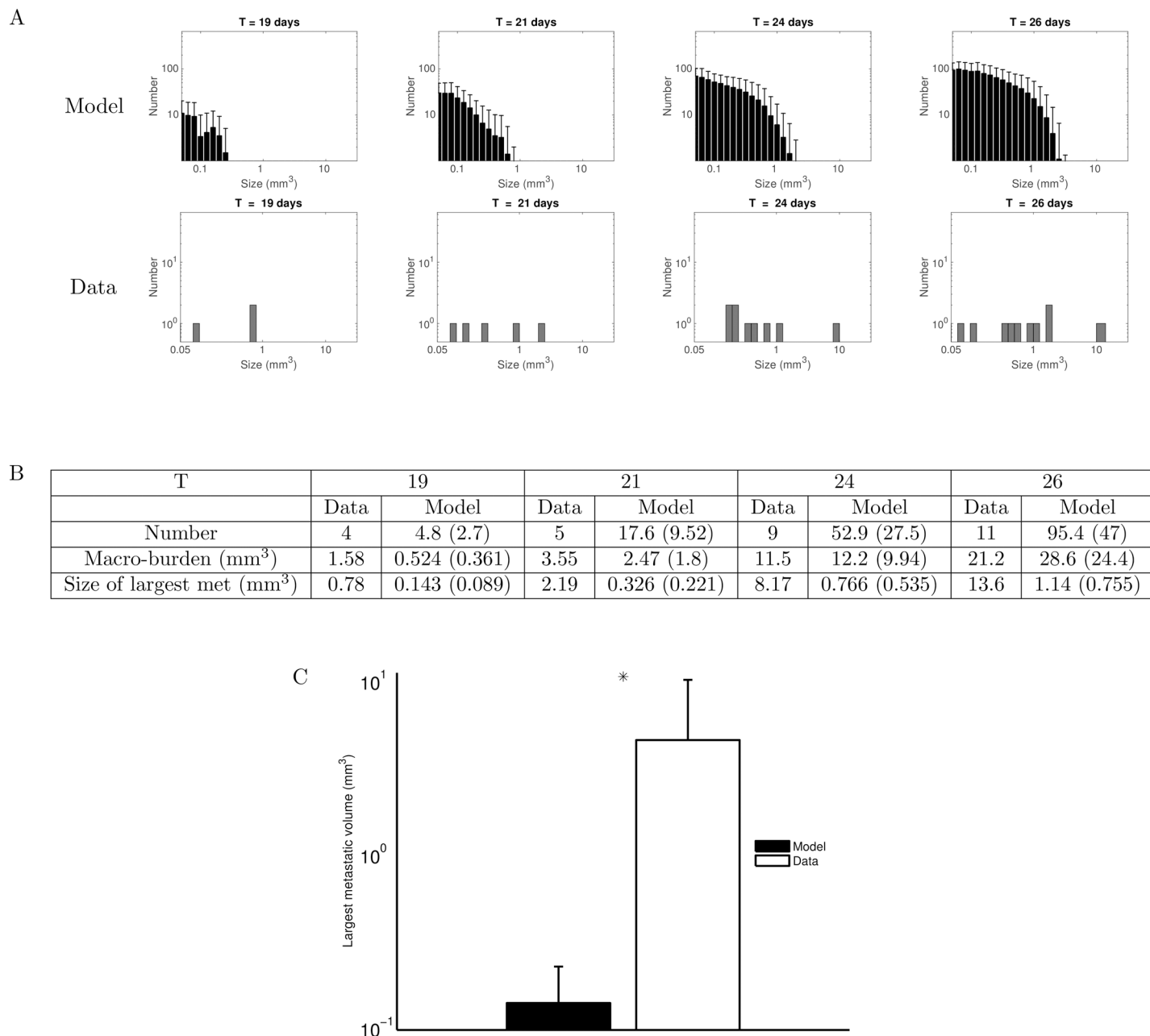


Fig 3. Time course of the macro-metastases size distribution: standard model versus observations. (A) Top row: Simulation of the mathematical formalism of the standard theory (i.e. dissemination and independent growth of the resulting tumour foci), using the parameter values inferred from the data of the total metastatic burden (total GFP signal in the lungs). Only tumours larger than the visible threshold at MRI (0.05 mm³) are plotted. Simulations were obtained using Eqs 1 and 2 for the time evolution of the density of secondary tumours, endowed with a lognormal distribution of the parameters for inter-animal variability, with the following values (retrieved from the population mixed-effects fit, median $\pm$ standard deviation): $\alpha = 0.417 \pm 0.171 \text{ day}^{-1}$, $\beta = 0.106 \pm 0.0478 \text{ day}^{-1}$ and $\mu = 9.72 \times 10^{-6} \pm 0.428 \times 10^{-6} \text{ cell} \cdot \text{day}^{-1}$. Shown are the results of 1000 simulations, mean + standard deviation. Bottom row: Observations of macro-metastases numbers and sizes in one mouse on MRI data. (B) Comparison of several metrics derived from the metastatic size distributions. For the model, numbers are represented as mean value and standard deviation in parenthesis. The data corresponds to the mouse presented in the upper histogram. (C) Comparison of the largest metastatic size at day 19 between model ($n = 1000$ simulated animals) and observations ($n = 6$ animals), log scale. The observed largest metastases are significantly larger than simulated ones ($p < 10^{-5}$ by the z-test).

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.g003

Table 1. Parameters values resulting from the population fit of the primary tumour and metastatic dynamics.

Par.	Unit	Median value (CV %)	95% CI
α	day ⁻¹	0.417 (41)	(0.329–0.557)
β	day ⁻¹	0.106 (45.1)	(0.0372–0.145)
μ	cell ⁻¹ day ⁻¹	9.72×10^{-6} (21.7)	$(1.81–52.2) \times 10^{-6}$

CI = confidence interval.

CV = Coefficient of Variation, in per cent = $\frac{std}{est} \times 100$, with *est* and *std* respectively the median value and standard deviation of the estimated lognormal population distribution of the parameters resulting from the nonlinear mixed-effects statistical estimation procedure.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.t001

empirical data, the numbers predicted by the model (in particular the number of macro-metastatic lesions at day 26) seem highly unrealistic.

To assess the robustness of our results regarding several assumptions of the model, we investigated varying several parameters. First, metastases might initiate from a size larger than from one cell [31,32]. We therefore performed the entire analysis for different values of V_0 (see [discussion](#) and [S3 Fig](#)), and found similar inconsistencies with the data in terms of largest metastases. Data-consistent and biologically plausible results in terms of number of metastases would require initial sizes larger than 100 cells, which is biologically unrealistic in view of the size of capillaries and experimental works that demonstrated that tumour cell clumps comprise less than 10 cells [31]. Similar results demonstrating inconsistency of the standard theory were also obtained when re-performing the analysis for variable values of the parameter γ ([S4 Fig](#)).

These results strongly indicate that the standard theory of metastatic progression as described by the model employed here (i.e., dissemination and independent growth), when calibrated to data of total metastatic burden, was in contradiction with the experimental observations with regard to the number of metastatic foci and their size distributions.

It is beyond the scope of the present work to elaborate (and validate against the data) a unified model able to recapitulate the behaviour of metastatic tumours during the colonization process. However, as a first step toward this objective, we put forward two assumptions to correct the inconsistency of the standard theory: (1) non-trivial interactions between metastases and (2) interactions between the metastatic foci and the circulating tumour cells (cells attraction). We indeed observed merging of two metastases in our data (between days 21 and 24, see [Fig 4](#)) and therefore decided to investigate this further. More specifically, we wanted to address the following questions: do spatial interactions have an impact on the dynamics of the total metastatic burden? To what extent could correct the theoretical predictions of the unlikely fast growth rates? Answers to these questions have implications on future theoretical models of metastatic development. The possibility of merging for two neighbouring metastases introduces a spatial aspect of metastatic colonization and, therefore, required a spatial modelling approach. We derived such a model which had to full-fill the following requirements: 1) it should be based on biological knowledge of macroscopic tumour growth (retrieved from the literature), 2) it should remain as parsimonious as possible (minimal number of parameters) and 3) it should be able to fit our spatial growth data.

Spatial interactions between metastatic tumours

Advection-type modelling of growth and movement. The two-dimensional model we used for the spatial growth describes a saturated flow in a porous medium comprising two

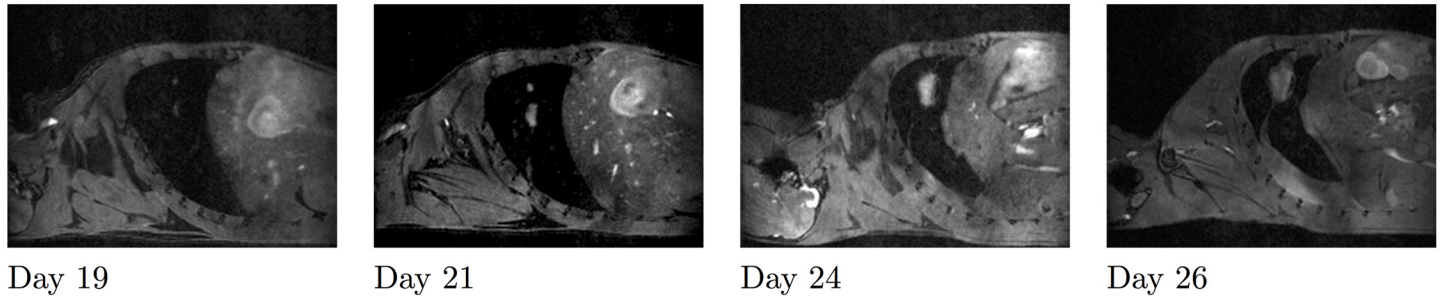


Fig 4. Metastases merging. From left to right: Sagittal slices of the lungs from day 19 until day 26 for the same mouse. Two tumours are growing close to each other and merge between days 21 and 24.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.g004

entities, the tumour tissue and the healthy tissue, with P denoting the tumour cell density and S the healthy cell density. The third variable is a pressure field Π . The model describes, on a domain Ω , the passive motion of the tissues due to the increase in volume caused by proliferation. Writing a mass-balance equation, this corresponds to the following:

$$\frac{\partial P}{\partial t}(t, x) + \nabla \cdot (v(t, x)P(t, x)) = \gamma(t, x, P, S, \Pi)P(t, x) \quad (4)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t}(t, x) + \nabla \cdot (v(t, x)S(t, x)) = 0 \quad (5)$$

where γ is the growth rate of the proliferating cells. We also assumed that the flow is saturated, with $P + S = 1$ at each point of the domain. Summing (4) and (5) leads to the following condition on the velocity of the flow:

$$\nabla \cdot v = \gamma P \quad (6)$$

This condition means that the tumour volume changes are due to proliferation. We considered the organ (the lungs) as a porous medium with a porosity $k(t, x)$ and that the velocity v is due to pressure gradients within the tumour. Therefore, we modelled the velocity flow by a Darcy law, as Preziosi and Ambrosi in [44]:

$$v = -k \nabla \Pi \quad (7)$$

The velocity v is the passive motion velocity, due to the pressure exerted by the proliferative tissue on the surrounding tissues. These tissues are in this way "pushed" and move away from the high-pressure areas to the lower-pressure ones.

The size of the computational domain Ω was fixed to the order of magnitude of mouse lungs ($\simeq 1 \text{ cm}^3$). Assuming that no mechanical interactions occur with the organ boundaries (for instance, the possible deformations of the organ due to the growth are neglected here), we supposed the domain Ω large enough to consider the pressure on the boundaries as equal to the homeostatic pressure of the body. We model this by a Dirichlet boundary condition on the pressure:

$$\Pi = \Pi_{eq} \text{ on } \partial\Omega$$

Collecting (6) and (6), and considering the porosity k constant, we obtain Π to satisfy a Poisson equation with Dirichlet boundary conditions:

$$\begin{cases} -k\Delta\Pi = \gamma P \\ \Pi|_{\partial\Omega} = \Pi_{eq} \end{cases}$$

In this model, taking γ constant leads to exponential growth of the tumour burden. However, *in vivo* growth can depend on environmental conditions, leading to increased doubling time when the conditions are not optimal. Similar models using more cellular species were used by Ribba, Colin and Schnell in [45] to predict efficacy of radiotherapy, and by Colin, Saut and colleagues in [46] to describe avascular tumour growth. In the latter work, lack of nutrients and hypoxia were considered as essential limiting factors for growth and hence included in the model, thus introducing a supplementary variable (nutrients concentration or the vasculature density). However, in our study, because we wanted to keep the model as parsimonious as possible, we focused on a more phenomenological way to describe the fact that the tumour doubling time increases with the tumour size. The natural environmental variable being the pressure, a simple way to formalize this was to model the proliferation rate as a decreasing function of the pressure. This yielded to a simple model that captured the essential features of tumour expansion and was able to describe *in vivo* tumour growth.

Modelling the pressure-mediated inhibition of tumour growth. Following the work of Montel et al. [47] and Stylianopoulos et al. [48,49], we considered that the growth rate of the tumour tissue decreases with the pressure exerted on the tissue. Therefore, we modelled the growth rate with a decreasing exponential law [47]:

$$\gamma(\Pi) = \gamma_0 \exp\left(\frac{-\Pi}{\Pi_0}\right)$$

where Π represents the pressure field, γ_0 the maximal proliferation rate, and Π_0 a characteristic pressure. Under the assumption of a constant porosity, the value of k has no impact. Indeed, as long as the product $k\Pi_0$ remains constant, the solution remains unchanged. That is why we fixed it to 1. Moreover, the boundary condition is taken homogeneous: $\Pi_{eq} = 0$, which means that the homeostatic pressure of the body is the optimal pressure of proliferation.

Under such a model, high pressure provokes decreased proliferation, but not apoptosis. Montel et al suggested that mechanical stresses have a poor effect on apoptosis, but also indicated that this could depend on the cell line and the experimental protocol [47].

Model calibration. To perform the study, we first wanted to fix the parameters of the model to realistic values. We calibrated the model according to the growth of four metastases observed by MRI. These four tumours were selected because they were detectable during sufficient time points (four for three of them and three for one of them) and were manually segmented. Fig 5 shows the MR images, the numerical simulation starting from the initial shape with the parameters fitted to the volume for one of the four metastases, and the dynamics of the simulated volume changes of the four metastases. A movie of the simulation on the MR image is shown in the supplementary S1 File and spatial distributions of pressure (Π) and proliferation rate (γ) are presented in S5 Fig. The model was able to describe the increase of the tumour volume for the four metastatic lesions with excellent goodness-of-fit. Table 2 presents the values of the two parameters for the four fitted growth curves. The fits were performed on the volume only, considering the metastases as spherical, which is a reasonable assumption because only slight differences on the mass are observed between the spherical and non-spherical cases (S6 Fig).

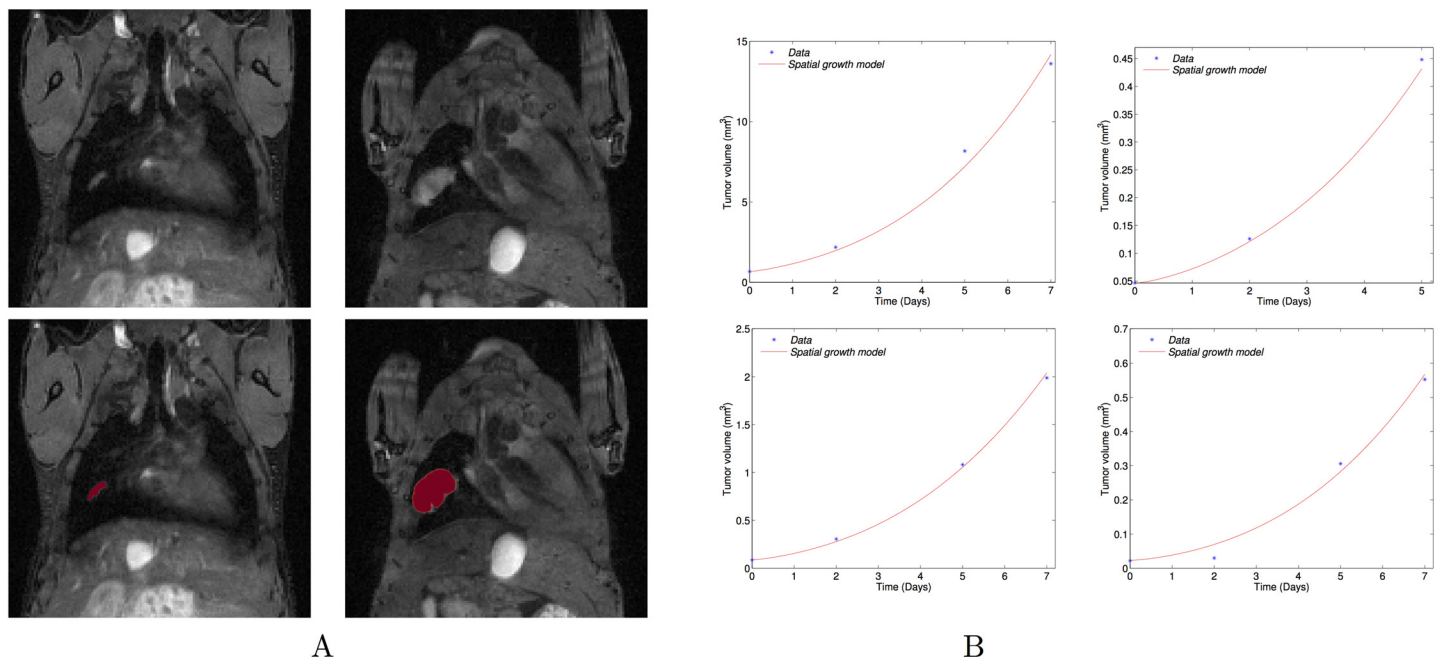


Fig 5. Spatial model fitting. (A) Top: Coronal MRI data of the lungs at days 19 and 26. Bottom: the simulated growth by the model using the fitted parameters and starting from the real shape of the observed metastasis at day 19 on the coronal MRI slice. Simulations were obtained using Eqs 4–7 with the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Pi_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; Time of simulation: $T = 7 \text{ days}$ (B) Volumes compared to simulations by the fitted model for the growth of four individual metastasis. The fits were performed on the volume only, considering the metastases as spherical.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.g005

These fitted parameters provided a range to perform the tumour-tumour contact interactions study:

$$(\gamma_0, \Pi_0) \in (0.67, 1.01) \times (5.2 \cdot 10^{-4}, 2.6 \cdot 10^{-3})$$

Quantitative impact of pressure-mediated growth interactions. We next aimed at studying the quantitative impact of the pressure that two neighbouring metastases exert on each other when they grow, and whether the merging hypothesis could explain the fast metastatic growth rates.

One tumour versus two tumours:

A first simulation of two interacting tumours was performed by choosing a bi-focal initial condition to Eqs 4 and 5, and using the parameters of Meta1 ($\gamma_0 = 0.78$, $\Pi_0 = 0.0026$, see a

Table 2. Values of the parameters resulting from the fit of each metastatic dynamics.

	$\gamma_0 \text{ (day}^{-1}\text{)}$	$\Pi_0 \text{ (Pa)}$
Meta 1	0.78	0.0026
Meta 2	1.01	0.00079
Meta 3	0.67	0.00067
Meta 4	0.8	0.00052

The value of γ_0 corresponds to the maximal proliferation rate in optimal conditions of pressure. The values of Π_0 are not reliable to real pressure values because they depend on the porosity, which is not a parameter.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.t002

movie in the supplementary [S2 File](#)). When comparing the total growth (sum of the surfaces of the two tumours) to the growth of only tumour seeded with the same initial surface as the two tumours together, we observed a slower growth in the single tumour ([Fig 6A](#)). Indeed, in a larger tumour, there are more cells that proliferate, resulting in higher mechanical constraints than in a smaller one. The pressure is therefore higher in the larger tumour, resulting in faster saturation of tumour growth over time.

To quantify the impact of the mechanical interactions, we then compared the two following situations: (1) two metastases that grow independently (the final burden consists in summing-up the two burden) and (2) two metastases that are close to each other (the exerted pressure of one metastasis impacts the growth of the other).

The two configurations were studied and compared with 64 sets of parameters chosen in the parameter space established by the calibration. The results highlight the possibility for two metastases to mutually impair their growth by mechanical interactions. Indeed, by proliferating, the neighbouring tumours exert pressure on each other, which leads to a decrease in proliferation in comparison to distant growing tumour foci. More precisely, under the assumption of increasing doubling time with respect to the pressure, the calibrated model revealed substantial differences in tumour burden, as shown in [Fig 6B](#). Among all the parameter sets, when two tumour foci interact, at the final time ($T = 7$ days, which corresponds to the time scale of the four metastatic growths) the loss of mass was $31 \pm 1.5\%$ (mean $\pm$ standard deviation) in comparison to distant growing tumour lesions. As an example, [Fig 6C](#) presents a simulation of two interacting tumours at four time points.

We observed in our data neighbouring metastases growing close to each other until merging ([Fig 4](#)). To simulate merging of two metastases, we did not introduce any merging effect in the model. It occurred naturally in the model when the tumour density field consists of two tumour foci growing in close vicinity. Mechanical interactions occurred at the time of merging, resulting in a slow-down of tumour growth. In terms of global dynamics, two different merging times generated two different dynamics. This merging time is equivalent to the initial distance between the two metastatic foci. We therefore studied the impact of the initial distance. Under our modelling assumptions, the interactions between two metastases decrease with the initial distance between them ([Fig 6D](#)). This means that the later the metastases merge, the larger the final burden is. When the initial distance between the tumours goes to 0, the burden corresponds to the burden of only one tumour. When the distance tends to infinite, the burden is equivalent to the burden of two independent tumours.

We studied the effect of the fractionation of a same burden for independent metastases and for interacting metastases with a distance of 0.2 mm between metastases. [S7 Fig](#) depicts the evolution of the burden as a function of the number of tumours in the case of independently growing tumours or tumours that mechanically interact. As shown, the difference between both situations increases with the number of metastases. For instance, for 18 metastases growing close to each other, the loss of mass from the independent case to the interactions case is 76.3% (to be compared to the 31% for two tumours).

The merging hypothesis. We investigated whether the merging of metastatic foci could have generated the formation of macro-metastases in the required timeframe, with biologically realistic growth rates. We investigated the two situations: without spatial interactions (i.e., assuming the volume resulting from the merging as equal to the sum of the metastatic foci volumes), and with spatial interactions. To do so, we performed four simulations with the four fitted parameter sets, starting from one cell, to estimate the number of merging metastatic foci required to obtain the respective observed volumes (of 0.022, 0.046, 0.085 and 0.67 mm³) seven days after initiation (day nineteen). Indeed, we chose day twelve and not day fourteen (which was the time at which the first metastatic cells were observed by direct examination of lung

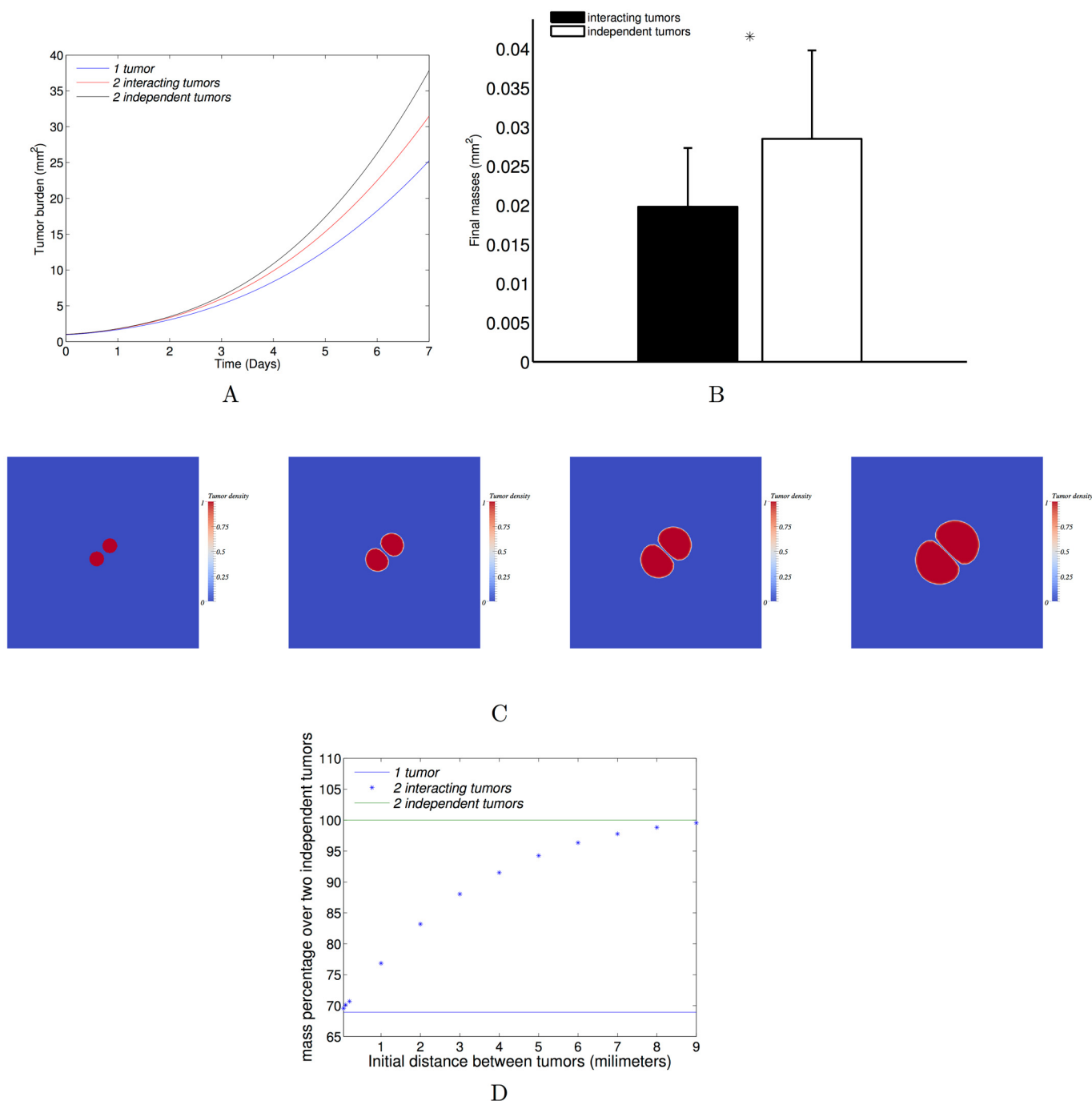


Fig 6. Tumour-tumour spatial interactions. (A) Three different configurations with a same initial burden: only one tumour, two close tumours, two far tumours. The dynamics in the three configurations are compared with the parameter set inferred from the fit on one metastatic growth ($0.78, 0.0026$) $\text{day}^{-1} \times \text{Pa}$. (B) The final burden are compared in two configurations: two close tumours and two independent tumours. The mean burdens over a set of 64 parameters (resulting from an 8×8 uniform discretization of the relevant parameter space given by the individual tumour fits, $(0.67, 1.01) \times (5.2 \cdot 10^{-4}, 2.6 \cdot 10^{-3})$) are plotted with the standard deviations (difference of $31\% \pm 1.5\%$ between the two distributions). (C) From left to right: time course of two interacting tumours growing and pushing each other. The parameters were fixed from one of the fitted MRI metastases: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Gamma_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; simulation time: $T = 7$ days; initial distance between the two metastases: $D = 0.2 \text{ mm}$; initial surface for each metastasis: $S = 0.46 \text{ mm}^2$. (D) The curve represents the time evolution of the final burden with respect to the initial distance between the two interacting tumours. The initial total burden and the parameters were taken to be the same as one of the four fitted metastases (same as C).

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.g006

Table 3. Number of required merging foci.

	Required number of metastases	
	Without spatial interactions	With spatial interactions
Meta 1	1337	2127
Meta 2	20	65
Meta 3	301	375
Meta 4	40	70

There it is the number of required merging foci to obtain the metastatic sizes measured on the MR images for each followed metastasis. Two cases are considered: with and without spatial interactions.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.t003

tissues) as the starting day because the GFP signal started to rise at day twelve (Fig 2). The required numbers are presented in Table 3, with and without spatial interactions between the tumours. For the spatial interactions case, simulations were performed as follows. Each focus was assumed to start from one cell and the foci were randomly distributed within the computational domain. To avoid metastatic foci too close from the domain boundaries and to allow the foci to merge together, the initial distance between the foci was constrained to 0.03 mm. Fig 7 depicts the simulations results (see supplementary S3 File for a movie). The number of required metastases reported in Table 3 has been estimated by dichotomy (the final burden increases with the number). Because the initial distance between the foci was small, the mechanical interactions were maximal here. The estimated number is therefore probably overestimated. Consequently, the two estimated numbers (with and without spatial interactions) give an approximate range for the exact required number.

As can be seen in Table 3, since spatial interactions reduce the growth velocity, the number of metastases was higher when interactions were taken into account. Because of potential variability (error measurements during the segmentation, differences between the MRI signal and the real lesion, especially for the small metastases, modelling assumptions), the estimated numbers of required metastatic foci may give only a rough estimate. For two of the metastases (Meta 2 and Meta 4), the estimated numbers appear to be reasonable. On the other hand, for the two other ones, the required number ranged respectively between 301 and 375 and between 1300 and 2100, which are probably too large to be biologically realistic.

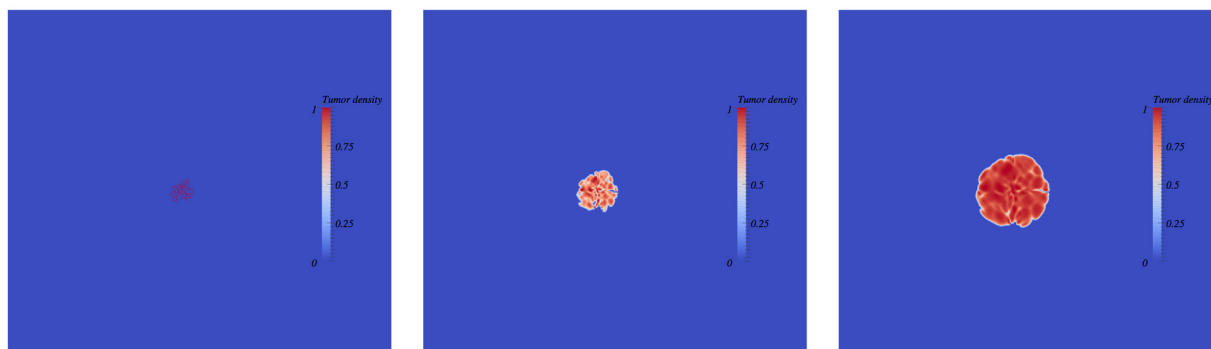


Fig 7. Simulation of multiple metastatic foci merging (with spatial interactions). From left to right: time course of merging metastatic germs. Each germ starts from one cell. The germs are randomly located at a distance of 0.03 mm from each other. Simulations were obtained using Eqs 4–7 and the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Gamma_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; time of simulation: $T = 7 \text{ days}$; number of germs = 200 in 2D. The corresponding number of cells in 3D is computed under a spherical symmetry assumption and is 2127.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004626.g007

Besides spatial interactions, another possible phenomenon involved could be the attraction and aggregation of circulating tumour cells. This hypothesis is discussed below.

Discussion

Using a combined approach between experimental data and mathematical models, we demonstrated that the standard theory of metastasis formation and growth, where metastases grow independently from the rest of the system, was biologically unlikely. To explain our findings, we proposed several hypotheses, including the possibility of metastatic foci merging by passive motion. To investigate whether this hypothesis would have quantitatively non-negligible impact on the kinetics of the total metastatic burden (thus requiring more intricate modelling for the model describing the size distribution at the scale of the organ), we introduced a parsimonious spatial model of tumour growth. After calibrating the model to the growth of single metastases, we found (in simulations) that spatial interactions resulted in a significant reduction of tumour growth. Our results indicate that spatial interactions should be considered in future efforts for the development of a general quantitative theory of metastatic colonization.

Based on the rationale that lung capillaries have a diameter of the order of one tumour cell (20 μm) and that metastatic cells have lost expressions of cell-cell adhesion proteins such as cadherins [2], we assumed in our simulations, that metastases originated from one cell. This might be arguable and metastasis could start from tumour cell clumps [31,32]. To resolve this further and assess the robustness of our results, we performed the entire data analysis (fit of the total metastatic burden and resulting prediction of the metastatic size distribution) for values of the initial number of cells of 1, 10, 100 and 500 (S3 Fig). Initial numbers of 10, 100 and 500 cells could be in agreement with the data at day 19. However, with $V_0 = 10$ cells, the predicted number of macro-metastases at day 26 was 3-fold higher than in the data. For $V_0 = 100$ cells and $V_0 = 500$ cells, the predicted macro-burden was 2-fold smaller than the observed one. Moreover the largest metastasis at day 26 was still predicted much smaller in the model than in the data (3.11 mm³ for $V_0 = 10$ cells, 3.58 mm³ for $V_0 = 100$ cells, 3.8 mm³ for $V_0 = 500$ cells, against 13.6 mm³ in the data). Furthermore, in animal experiments the vast majority of detaching tumour cell clumps has been shown to comprise less than 10 cells [31] with a range of 2–50 cancer cells [32], which makes the theories $V_0 = 100$ cells and $V_0 = 500$ cells unlikely. This suggests that, if the metastases started from a substantial amount of cells, the grouping of these cells probably occurred at the distant site, after extravasation from the blood circulation. Similarly, we did not consider any cell loss at the moment of initial sub-capsular injection. We could make theoretical assumptions of cell loss (of 10%, 20%, etc. . .), which would simply consist in multiplying V_0 by the relevant factor. For instance, considering a 90% loss (i.e. that only 10% of the cells remain viable) would be equivalent to multiplying V_0 by 10. As demonstrated in S3 Fig, it is necessary to assume an initial size of at least 100 V_0 to recover plausible values for the number of metastases at time $T = 26$ days. Combining the two (cell loss of 10% and initial metastatic size of 10 cells) thus gives a hypothesis that we are not able to infirm given the data we dispose.

The spatial model for tumour growth that we introduced is based on a pressure-induced decrease of the growth rate. Contact inhibition between cells is a mechanism for maintaining tissue homeostasis [4]. The ability of cancer cells to ignore these inhibition signals is a hallmark of cancer. In a recent study, Stylianopoulos et al showed that the uncontrolled proliferation of tumour cells results in mechanical stresses in the surrounding micro-environment of transplanted and human tumours [48]. Furthermore, they also showed that such an exerted pressure impairs *in vivo* proliferation via two mechanisms: reduced cancer cell proliferation in direct response to increased pressure, as well as a pressure-induced collapse of blood vessels within

the tumour, leading to nutrient deficiency for tumour cells [49]. Based on these considerations, it seems relevant to consider that tumour expansion depends on the pressure. In our spatial growth model, the tissues motion is mediated by pressure gradients. It means that cells within a tumour tissue proliferate and that the exerted pressure pushes the neighbouring tissues. This pressure is not solely due to mechanical constraints (solid stresses, interstitial fluid pressure, . . .) exerted by the neighbouring cells on each other, but represents a more phenomenological pressure, that reflects the basic assumption of our modelling strategy for the tumour tissue being constituted by a fluid mixture in a porous medium. The effect of the pressure on proliferation has also been studied using numerical simulations. In [47], Montel et al discussed the fact that cells proliferate faster on the surface than in the bulk of a tumour spheroid. A classical reason is that nutrients do not penetrate deeply in the spheroid. However, Montel et al. suggested a mechanical effect due to the necessity for a cell to deform its environment in order to proliferate. In a *in silico* study on two-dimensional monolayers and three-dimensional spheroids, based on experimentally determined biophysical parameters, Drasdo and Höhme suggested that pressure conditions have a higher impact on doubling time than lack of nutrients [16]. Moreover, in [47], Montel et al. performed experiments where tumour cells were submitted to different pressure constraints and observed a decrease in proliferation when pressure was applied. In their study, simulation results that were compared to experimental ones showed an exponential decreasing of proliferation with pressure, consistently with the modeling adopted here. However, the bulk and surface division rate were not affected equally by stresses. In our model, we used a similar pressure-mediated proliferation law translating direct effects of mechanical stresses on proliferation as well as indirect effects of proliferation on the micro environment (collapsing of blood vessels leading to lack of nutrients).

Our proposed hypotheses should be further experimentally reinforced, by, for example, implanting orthotopically and injecting intravenously two groups of cells into mice, each group being tagged with a different colour, and by quantifying single or mixed-coloured tumour foci. Similar experimental protocols have been already performed in [7,32]. Furthermore, *in vivo* investigations by observing two (or more) growing tumours in close vicinity that would enter mechanical interactions and then assess with a Ki-67 staining if the proliferation is impaired in the contact area, would further reinforce our contentions.

The inability of the merging theory to explain all of the observed volumes may indicate that besides merging by passive motion due to proliferation, other mechanisms such as chemokine-mediated cells attraction occur [6,50]. Circulating tumour cells may be attracted by some established niches and explain the abnormally fast volume expansions that we observed. Indeed, such chemokine-mediated attractions are presumed to play an important role for the pre-metastatic and metastatic niches establishment, in mediating myeloid and tumour cells attraction [6,50,51]. Moreover, chemo-attractants may play a role in tissue tropism of metastatic cells [52]. Chemotactic gradients can attract metastatic cells that express the chemokine receptor to specific locations. In the future, additional phenomena such as aggregation and recruitment of cells during the metastatic process from the circulation should be integrated in the standard mathematical model. Another phenomenon that could possibly explain the observed volumes would be the presence of circulating tumour cell clusters that would give rise to metastases [32]. Indeed, Aceto et al. recently showed in a breast cancer animal model that metastases do not originate from single cells only but also from tumour cells clusters that have a higher metastatic potential than single cells. However, they did not show evidence of this phenomenon for kidney cancer and in their experiments, clusters were formed by at most 50 cells. As indicated above, this order of magnitude of the initial cell numbers that colonizes the lung is not able to describe the dynamics of metastasis formation in our model and experimental data.

Taken together, our results indicate that spatial interactions are an essential component for the dynamics of metastasis development in the lung and probably also in other organs. However, it is unlikely that they alone control metastasis expansion. Indeed, when trying to assess whether this concept alone explains the fast growth of various metastases from the beginning of organ colonisation (from the first cell at days 12–14 to (0.022–0.67) mm³ at day 19), unrealistic numbers were found for two of the tumours. Thus, other mechanisms are probably also involved such as recruitment of additional cells from the blood stream and micro-environmental cues such as nutrient depletion or responses to environmental stress. Our methodology and results illustrate, furthermore, how a combined approach using multimodal biological data on one hand, and multimodal modelling analysis on the other, provides powerful insights into tumour biology and, in particular, into the metastatic process.

Materials and Methods

Ethics statement

Ethical approval for all animal studies was obtained from the Institutional Animal Care and Use Committee of the INSERM Institute in accordance with the National Advisory Committee for Laboratory Animal Research Guidelines licensed by the French Authority. Animal facility: Animalerie mutualisée de Bordeaux 1, authorisation number: B33-522, Date: February 8th, 2012. Investigator: Andreas Bikfalvi (authorisation number: R-45GRETA-F1-10).

Cell line and mouse experiments

RENCA-GFP cells. The mouse renal adenocarcinoma cell line RENCA was cultured in RPMI media (Gibco) supplemented with 10% foetal calf serum, 1mM sodium pyruvate, 2mM glutamine, 100U/ml de penicillin and 100µg/ml streptomycin., at 37°C/5% CO₂. RENCA-GFP cells were produced via infection of RENCA cells with a GFP lentivirus, a gift of Dr. C. Grosset (u889 Bordeaux).

Orthotopic implantation of RENCA-GFP cells. RENCA-GFP were cultured in exponential growth phase, and harvested by trypsinisation (Gibco). After washing in basal RPMI media, the cells were counted and concentration adjusted to 100000 cells per 25µl in basal media. 25µl of cell suspension was then injected underneath the renal capsule of the left kidney of female Balb/c mice aged 6 weeks.

Tissue harvest. Mice were sacrificed at the specified intervals and the left kidney (bearing the primary tumour) and lungs were dissected and snap frozen in liquid nitrogen. RNA was extracted using TRIzol Reagent (Life Technologies) as per the manufacturer's protocol.

Reverse transcription and Q-RT-PCR. RNA samples were quantified using a nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies). 1µg of total RNA was reverse transcribed to cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-Time PCR was carried out using the Step One Plus Real-Time PCR system. Reactions were carried out in a total volume of 20µl containing 2ng of cDNA, Power SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems), and 200nM of each of the forward and reverse primers. The reaction conditions were as follows: 10 mins at 95°C followed by 40 cycles of 15 secs at 95°C and 1 min at 60°C.

Data were analysed using Step One Software v2.3. The housekeeping gene PPIA was used as an endogenous control to normalize for differences in the amount of total RNA in each sample. Expression of GFP is thus presented as an N-fold difference relative to the total RNA per sample.

The sequences of the primer used was as follows: eGFP: Forward primer 5'-CGACCAC TACCAGCAGAACA-3' Reverse primer: 5'-GAACTCCAGCAGGACCATGT-3'

MRI material and methods

MRI material. The experiments were carried out on a horizontal 7T magnet (Bruker Biospec 70/20, Germany), equipped with a 12 cm gradient insert capable of 660 mT/m maximum strength and 110 μ s rise time. Lung imaging was performed using a quadrature emission/reception birdcage coil (inner diameter: 2.5 cm, 5 cm length).

Mice were anesthetized with 1.5% isoflurane in air during the imaging session. Mouse respiration was monitored during the entire experiment by using an air balloon placed on the abdomen (SA Instruments).

MRI sequence. A 3D water-selective balanced Steady State Free Precession sequence was used [53]. This sequence induces a T2-like contrast, allowing the detection of metastases with hyper-intense signals without injecting contrast agents [54]. The main parameters of the sequence were as follow: FOV = 30×22×22; matrix = 192×142×142; TE/TR = 3.1/6.2ms; flip angle = 20deg; reception bandwidth = 178kHz; number of excitation = 1; acquisition time = 2min3s. In order to suppress banding artifacts inherent to this sequence, the sum-of-square method was performed [55]. Thus, the total acquisition time was 8min12s.

Numerical methods

Numerical methods to simulate the partial derivative equations model of spatial. The system of partial derivative equations that models the spatial metastatic growth was solved with the following numerical methods:

- a Strang splitting method for the time scheme
- a fifth order Weno finite differences scheme for the spatial resolution
- A fixed point method to solve the nonlinear equation on the pressure

Fitting method for the recovery of the PDE parameters. The goal of the model calibration was not to precisely determine the best parameters for describing the growth of each metastatic lesion but to obtain a range of realistic parameters to perform the study. Moreover, segmentation measurement errors, which are probably important, were not estimated. For these reasons, we used a Monte Carlo method, which was easy to implement and parallelize. Boundaries of the parameter space have been first established by an analysis of the model and biological considerations for the parameters values.

Because we did not need a very high accuracy for the fits, we did not take the shape of the metastases into account. We considered them as spherical and fitted the model on the volume dynamics only.

Supporting Information

S1 Fig. Population fit of the primary tumour dynamics. The initial volume is calibrated during the fit. Right panel: the points represent the data, the curve represents the median dynamics, and the dashed curves the percentiles. Left panel: values of the parameters resulting from the population fit of the primary tumour dynamics. NSE: normalized standard error. (TIFF)

S2 Fig. Representative MR images where size distribution of metastases could not be satisfactorily assessed. Coronal slices of three mice. Left: Day 19; Middle and right: Day 21. The metastatic foci could not be clearly segmented because the metastatic burden was very diffuse. (TIFF)

S3 Fig. Time course of the macro-metastases size distribution for different initial meta-static sizes. Top to down: Simulation of the mathematical formalism of the standard theory (i.e. dissemination and independent growth of the resulting tumour foci), using the parameter values inferred from the total metastatic burden data (total GFP signal in the lungs) using four different initial numbers of initiating metastatic cells. The results are compared to observations of macro-metastases numbers and sizes in one mouse on MRI data.
(TIFF)

S4 Fig. Time course of the macro-metastases size distribution for different values of γ . The fit analysis of the GFP data was re-performed for values of γ ranging from 0.1 to 1, generating each time new distributions of the parameters α , β and μ , and simulations equivalent to Fig 3 were re-performed for the median values of parameters (inter-animal variability not shown here). Results only for $\gamma = 0.1, 2/3$ and 1 are shown here. Qualitatively similar results are observed concerning the size distribution metrics (in particular, number of metastases and size of the largest lesion).
(TIFF)

S5 Fig. Spatial simulation of a lung metastasis. The simulated growth by the model using the fitted parameters and starting from the real shape of the observed metastasis at day 19 on the coronal MRI slice. Time course of the tumour density (up), pressure (middle), and proliferation rate fields. From left to right: day 0, day 3 and day 7. Simulations were obtained using Eqs 4–7 and the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Pi_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; time of simulation: $T = 7 \text{ days}$.
(TIFF)

S6 Fig. Spherical and non-spherical shapes. (A) Simulation from the segmented shape. Simulations were obtained using Eqs 4–7 and the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Pi_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; time of simulation: $T = 7 \text{ days}$. (B) Simulation with the same parameters and same initial burden from a spherical shape. (C) Volume dynamics of the two simulations. The final relative difference is 2.5%.
(TIFF)

S7 Fig. Evolution of the final burden with respect to the number of interacting metastases. Results of the simulation (Day 7) with different numbers of metastases: 4, 12 and 22. The parameters values are chosen among the sets of fitted parameters on individual metastatic growths. Simulations were obtained using Eqs 4–7 using the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Pi_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; time of simulation: $T = 7 \text{ days}$; Initial distance between metastases: $D = 0.2 \text{ mm}$; total initial surface: $S = 0.92 \text{ mm}^2$.
(TIFF)

S1 File. Simulation movie of a lung metastasis starting from the shape of the segmented metastatic focus. The parameters have been calibrated on the volume dynamics of the metastasis. Simulations were obtained using Eqs 4–7 and the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Pi_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; time of simulation: $T = 7 \text{ days}$.
(AVI)

S2 File. Simulation movie of two neighbouring tumours that are growing and pushing each other by passive motion. Simulations were obtained using Eqs 4–7 and the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Pi_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; time of simulation: $T = 7 \text{ days}$; initial distance between the two metastases: $D = 0.2 \text{ mm}$; initial surface of each metastasis: $S = 0.46 \text{ mm}^2$.
(AVI)

S3 File. Simulation movie of merging metastatic foci. Simulations were obtained using Eqs 4–7 and the following parameter values: $\gamma_0 = 0.78 \text{ day}^{-1}$; $\Pi_0 = 0.0026 \text{ Pa}$; time of simulation: $T = 7$ days; number of germs = 200 in 2D. (AVI)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AB LSC WS. Performed the experiments: LSC WS RP ER. Analyzed the data: EB SB. Wrote the paper: EB SB AB. Supervised the study: TC SB. Designed the numerical code used in the analysis: OS EB SB.

References

1. Chaffer CL, Weinberg R a. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331: 1559–1564. doi: [10.1126/science.1203543](https://doi.org/10.1126/science.1203543) PMID: [21436443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21436443/)
2. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell*. 2006; 127: 679–695. PMID: [17110329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17110329/)
3. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010; 70: 5649–5669. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-10-1040](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040) PMID: [20610625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610625/)
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646–674. doi: [10.1016/j.cell.2011.02.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013) PMID: [21376230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/)
5. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994; 79: 315–328. PMID: [7525077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7525077/)
6. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005; 438: 820–827. PMID: [16341007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16341007/)
7. Kim M-Y, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XHF, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009; 139: 1315–1326. doi: [10.1016/j.cell.2009.11.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.025) PMID: [20064377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20064377/)
8. Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2009; 15: 232–239. doi: [10.1016/j.ccr.2009.01.021](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.021) PMID: [19249681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19249681/)
9. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 563–572. PMID: [12154349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12154349/)
10. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 453–458. PMID: [12778135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12778135/)
11. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 274–284. doi: [10.1038/nrc2622](https://doi.org/10.1038/nrc2622) PMID: [19308067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19308067/)
12. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011; 147: 275–292. doi: [10.1016/j.cell.2011.09.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024) PMID: [22000009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22000009/)
13. Byrne HM. Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 221–230. doi: [10.1038/nrc2808](https://doi.org/10.1038/nrc2808) PMID: [20179714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20179714/)
14. Araujo RP, McElwain DLS. A history of the study of solid tumour growth: the contribution of mathematical modelling. *Bull Math Biol*. 2004; 66: 1039–1091. PMID: [15294418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15294418/)
15. Benzekry S, Lamont C, Beheshti A, Tracz A, Ebos JML, Hlatky L, et al. Classical Mathematical Models for Description and Prediction of Experimental Tumor Growth. *PLoS Comput Biol*. 2014; 10: e1003800. doi: [10.1371/journal.pcbi.1003800](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003800) PMID: [25167199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25167199/)
16. Drasdo D, Höhme S. A single-cell-based model of tumor growth in vitro: monolayers and spheroids. *Phys Biol*. 2005; 2: 133–147. PMID: [16224119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16224119/)
17. Anderson AR a, Weaver AM, Cummings PT, Quaranta V. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell*. 2006; 127: 905–15. PMID: [17129778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17129778/)
18. Waclaw B, Bozic I, Pittman ME, Hruban RH, Vogelstein B, Nowak MA. A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. *Nature*. 2015; advance on.
19. Ambrosi D, Mollica F. Mechanical models in tumour growth. Preziosi L, editor. *Cancer Modelling and Simulation*. 2003. pp. 142–166.

20. Bresch D, Colin T, Grenier E, Ribba B, Saut O. Computational Modeling of Solid Tumor Growth: The Avascular Stage. *SIAM J Sci Comput.* 2010; 32: 2321.
21. Liotta LA, Saidel GM, Kleinerman J. Stochastic model of metastases formation. *Biometrics.* 1976; 32: 535–550. PMID: [963169](#)
22. Saidel GM, Liotta LA, Kleinerman J. System dynamics of metastatic process from an implanted tumor. *J Theor Biol.* 1976; 56: 417–434. PMID: [1271828](#)
23. Haeno H, Gonen M, Davis MB, Herman JM, Iacobuzio-Donahue C a., Michor F. Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell.* 2012; 148: 362–375. doi: [10.1016/j.cell.2011.11.060](#) PMID: [22265421](#)
24. Scott JG, Basanta D, Anderson ARA, Gerlee P. A mathematical model of tumour self-seeding reveals secondary metastatic deposits as drivers of primary tumour growth. *J R Soc Interface.* 2013; 10: 20130011. doi: [10.1098/rsif.2013.0011](#) PMID: [23427099](#)
25. Scott JG, Gerlee P, Basanta D, Fletcher AG. Mathematical modeling of the metastatic process. Malek A, editor. *Experimental Metastasis: Modeling and Analysis.* Dordrecht; 2013.
26. Iwata K, Kawasaki K, Shigesada N. A dynamical model for the growth and size distribution of multiple metastatic tumors. *J Theor Biol.* 2000; 203: 177–86. PMID: [10704301](#)
27. Hartung N, Mollard S, Barbolosi D, Benabdallah A, Chapuisat G, Henry G, et al. Mathematical modeling of tumor growth and metastatic spreading: validation in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 2014; 74: 6397–6407. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-14-0721](#) PMID: [25217520](#)
28. Benzekry S, Tracz A, Mastri M, Corbelli R, Barbolosi D, Ebos JML. Modeling spontaneous metastasis following surgery: an in vivo-in silico approach. *Cancer Res.* 2015
29. Spratt JS, Meyer JS, Spratt JA. Rates of growth of human solid neoplasms: Part I. *J Surg Oncol.* 1995; 60: 137–146. PMID: [7564383](#)
30. Miyake H, Hara I, Gohji K. Relative Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 in Mouse Renal Cell Carcinoma Cells Regulates Their Metastatic Potential Relative Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloprotein. *Clin Cancer Res.* 1999; 2824–2829. PMID: [10537348](#)
31. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. The Significance of Hematogenous Tumor Cell Clumps in the Metastatic Process. *Cancer Res.* 1976; 889–894. PMID: [1253177](#)
32. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell.* 2014; 158: 1110–1122. doi: [10.1016/j.cell.2014.07.013](#) PMID: [25171411](#)
33. Steel GG, Lamerton LF. The growth rate of human tumours. *Br J Cancer.* 1966; 20: 74–86. PMID: [5327764](#)
34. Talmadge JE, Fidler IJ. Evidence for the Clonal Origin of Spontaneous Metastases. *Science.* 1982; 217: 361–363. PMID: [6953592](#)
35. Fidler IJ, Talmadge JE. Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Res.* 1986; 46: 5167–5171. PMID: [3756870](#)
36. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 302–312. doi: [10.1038/nrc2627](#) PMID: [19308069](#)
37. Wheldon TE. Mathematical models in cancer research. 1988.
38. Casey AE. The Experimental Alteration of Malignancy with an Homologous Mammalian Tumor Material: I. Results with Intratesticular Inoculation. *Am J Cancer.* 1934; 21: 760–775.
39. Laird AK. Dynamics of tumor growth. *Br J Cancer.* 1964; 13: 490–502. PMID: [14219541](#)
40. Norton L. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res.* 1988; 48: 7067–7071. PMID: [3191483](#)
41. Lavielle M. Mixed Effects Models for the Population Approach. *Models, Tasks, Methods and Tools.* 2014.
42. Mathworks T. Matlab with statistics and optimization toolboxes. Natick, Massachusetts, United States; 2013.
43. Hartung N. Efficient resolution of metastatic tumor growth models by reformulation into integral equations. *Discret Contin Dyn Syst Ser B.* 2015; 20: 445–467.
44. Ambrosi D, Preziosi L. On the closure of mass balance models for tumor growth. *Math Mod Meth Appl Sci.* 2002; 12: 737–754.
45. Ribba B, Colin T, Schnell S. A multiscale mathematical model of cancer, and its use in analyzing irradiation therapies. *Theor Biol Med Model.* 2006; 3: 7. PMID: [16472396](#)

46. Bresch D, Colin T, Grenier E, Ribba B, Saut O. Computational modeling of solid tumor growth: the avascular stage. *SIAM J Sci Comput.* 2010; 32: 2321–2344.
47. Montel F, Delarue M, Elgeti J, Vignjevic D, Cappello G, Prost J. Isotropic stress reduces cell proliferation in tumor spheroids. *New J Phys.* 2012; 14: 55008.
48. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; 109: 15101–15108. PMID: [22932871](#)
49. Stylianopoulos T, Martin JD, Snuderl M, Mpekris F, Jain SR, Jain RK. Coevolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: implications for vascular collapse. *Cancer Res.* 2013; 73: 3833–3841. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-12-4521](#) PMID: [23633490](#)
50. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 1369–1375. PMID: [17128264](#)
51. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 285–293. doi: [10.1038/nrc2621](#) PMID: [19308068](#)
52. Joyce J a, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 239–252. doi: [10.1038/nrc2618](#) PMID: [19279573](#)
53. Ribot EJ, Wecker D, Trotier A, Lefrançois W, Thiaudière E, Franconi JM and MS. Water selective imaging and bSSFP banding artifact correction in humans and small animals at 3T and 7T, respectively. *PLoS One.* 2015; 10: e0139249. doi: [10.1371/journal.pone.0139249](#) PMID: [26426849](#)
54. Ribot EJ, Martinez-Santesteban FM, Simedrea C, Steeg PS, Chambers AF, Rutt BK, et al. In vivo single scan detection of both iron-labeled cells and breast cancer metastases in the mouse brain using balanced steady-state free precession imaging at 1.5 T. *J Magn Reson Imaging.* 2011; 34: 231–238. doi: [10.1002/jmri.22593](#) PMID: [21698713](#)
55. Miraux S, Massot P, Ribot EJ, Franconi JM, Thiaudiere E. 3D TrueFISP imaging of mouse brain at 4.7T and 9.4T. *J Magn Reson Imaging.* 2008; 28: 497–503. doi: [10.1002/jmri.21449](#) PMID: [18666207](#)