



HAL
open science

Implication du facteur développemental Lim1, un nouvel oncogène, dans le cancer du rein humain avancé

Imene Hamaidi

► To cite this version:

Imene Hamaidi. Implication du facteur développemental Lim1, un nouvel oncogène, dans le cancer du rein humain avancé. Biologie moléculaire. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ069 . tel-02917999

HAL Id: tel-02917999

<https://theses.hal.science/tel-02917999v1>

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**Inserm U1113 : Voies de signalisation du développement et du stress
cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques**

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline: aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Onco-urologie

Par

Imène HAMAI

*Implication du facteur développemental *Lim1*, un
nouvel oncogène, dans le cancer du rein humain
avancé*

Soutenue publiquement le 26 Septembre 2017

Devant les membres du jury

Docteur **MASSFELDER Thierry**
Docteur **RADVANYI François**
Professeur **ODARD Stéphane**
Docteur **METZGER Daniel**

DR Inserm, Strasbourg
DR CNRS, Institut Curie, Paris
PUPH, Paris
DR CNRS, IGBMC, Strasbourg

Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur interne

Dédicace...

Je ne saurais trouver les mots, car tous les mots qui existent ne sauraient exprimer mon amour, mon respect, ma gratitude et ma reconnaissance,

Alors tout simplement... Je dédie cette thèse...

À ma Mère, son amour et son cœur chaud

À mon Père, sa sagesse et son sacrifice

À ma très chère sœur Amina, sa générosité et son ambition

À mes adorables et aimantes sœurs Baya, Lylia et Fella, leur soutien et leur courage

À mes Frères Mohamed et Yacine qui m'ont peut-être blâmée d'être partie mais qui sont fiers de moi...

À mes adorables neveux et nièces qui sont convaincus que leur tante Imène aura un jour le prix Nobel : Mehdi, Omar, Adam, Anas, Ilyes, Abderrahmane, Karim, Ayoub, Abdallah, Nefissa, Farah et Yasmine

À ma grande famille ici et là-bas...

À l'idée que je me fais de l'avenir... un avenir meilleur...

Imene HAMAIDI

« Là où se trouve une volonté...

il existe un chemin ...»

Winston Churchill

« J'ai traversé la méditerranée...

Je n'hésiterai pas à traverser les océans...»

Abréviations

A

ADAMTS1	<i>ADAM metallopeptidase with Thrombospondin type 1</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	<i>Serine/threonine protein kinase B</i>
ARN/RNA	Acide ribonucléique
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
AS	Antisens

B

BCA	<i>Bicinchoninic acid Assay</i>
BET	Bromure d'éthidium
BrdU	Bromodéoxyuridine

C

CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>
Cas 9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CCC	Carcinome rénal à cellules conventionnelles (ou claires)
CCR	Carcinome à cellules rénales
CDCP1	<i>CUB domain-containing protein</i>
cer1	Cerberus 1
Chrd	Chordine
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CMV	Cytomégalovirus
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA

D

DCN	Décorine
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
DLL4	<i>Delta-like Notch ligand 4</i>
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>

E

EAU	<i>European Association of Urology</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique acid
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPO	Erythropoïétine

F

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FOXA2	<i>Forkhead box A2</i>
Foxp1	<i>Forkhead box P1</i>
G	
GAPDH	<i>Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase</i>
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLI	<i>Glioma-associated oncogene homologue</i>
GLUT-1	<i>GLUcose Transporter 1</i>
Gsc	<i>Germline stem cell</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
H	
HBG	<i>Hepes buffer glucose</i>
HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>
HNF-1β	<i>Hepatocyte nuclear factor-1β</i>
HNF-3β	<i>Hepatocyte nuclear factor-3β</i>
HRE	<i>Hypoxia responsive element</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
I	
IGF-1	<i>Insulin Growth Factor-1</i>
IgSF	<i>Immunoglobulin superfamily</i>
IHH	<i>Indien Hedgehog</i>
IL-2	<i>Interleukine 2</i>
ip	<i>intrapéritonéale</i>
IP	<i>Iodure de propidium</i>
iv	<i>intraveineuse</i>
L	
LAMA4	<i>Laminine sous unité alpha 4</i>
Ldb	<i>LIM domain binding</i>
Lhx1	<i>LIM Homeobox 1</i>
LID	<i>LIM interaction domain</i>
lncRNA	<i>Long non codant RNA</i>
M	
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MB	<i>Membrane basale</i>

MCAM	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MET	<i>Mesenchymal epithelial transition</i>
MMPs	Métalloprotéases matricielles
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycine</i>
MUC1	Mucine 1
\mathcal{N}	
Naip1	<i>NLR family apoptosis inhibitory protein 1</i>
NC	Nombre de copies
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
O	
OFP	<i>Orange fluorescence protein</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
Otx2	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PAPC	Protocadhérine paraxiale
Pax	<i>Paired box</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
Pcdh7	Protocadhérine-7
PDA-Nfs	Polydiacétyléniques nanofibres
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PTCH	<i>Patched</i>
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
PVDF	<i>PolyVinylidene Fluoride</i>
\mathcal{R}	
Rbx1	<i>Ring-Box 1</i>
RET	<i>Ret proto-oncogene</i>
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
RT-qPCR	<i>Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
\mathcal{S}	
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
SHH	Sonic Hedgehog
shRNA	<i>Short hairpin RiboNucleic Acid</i>
siRNA	<i>Small interfering RiboNucleic Acid</i>
SMO	<i>Smoothened</i>

ssODN	<i>Single stranded oligodeoxynucleotide</i>
STIP1	<i>Stress-induced phosphoprotein 1</i>
SUFU	<i>Suppressor of Fused</i>
SVF	Sérum de veau foetal
<i>T</i>	
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TKI	<i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
TMB	Tétraméthylbenzidine
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i>
<i>U</i>	
UBE3C	<i>Ubiquitin protein ligase E3C</i>
<i>V</i>	
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecules</i>
VCAN	Versicane
VEGF	<i>Vascular epidermal growth factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
<i>W</i>	
WHO	<i>World health organization</i>
WRE	<i>Wnt response element</i>
WSB1	<i>WD repeat and SOCS box-containing protein 1</i>
WT-1	<i>Wilms tumor 1</i>
<i>Z</i>	
ZO-1	Zona Occludens-1

Table des matières

<i>Abréviations</i>	1
<i>Liste des Figures</i>	9
<i>Liste des Tableaux</i>	11
<i>Chapitre I : Introduction bibliographique</i>	12
I. Le carcinome à cellules rénales	13
1. Epidémiologie	13
2. Facteurs de risque	13
3. Diagnostic	15
4. Classification	18
4.1 Les formes sporadiques des tumeurs rénales	18
4.2 Les formes héréditaires du cancer du rein	21
5. Facteurs pronostiques	23
5.1. Les facteurs anatomiques	23
5.2. Les facteurs histologiques	24
5.3. Les facteurs cliniques	24
5.4. Les facteurs moléculaires	25
5.5. Les systèmes pronostiques	26
6. Prise en charge thérapeutique	27
6.1. La chirurgie	27
6.2. Les traitements systémiques	29
7. La biologie du cancer du rein	35
7.1. Le système VHL/HIF	36
7.2. Les voies prolifératives/anti-apoptotiques	37
7.3. Les voies développementales	42
II. Généralités sur le rein	48
1. Structure du rein	48
2. Fonctions du rein	49
3. Développement embryonnaire du rein	50
3.1. Développement des ébauches rénales	50
3.2. Evolution du pronéphros au rein définitif	51
3.3. Les facteurs impliqués dans la néphrogenèse	53
III. Le Facteur de transcription Lim1	60
1. La famille des gènes homéotiques	60
2. La famille des protéines à domaine LIM	60
3. Le facteur <i>Lhx1</i>	61
4. Les interactions protéiques des domaines LIM	61
5. Les interactions moléculaires directes du <i>Lhx1</i>	62
6. Régulation et gènes cibles du <i>Lhx1</i>	63

7. Profil d'expression	65
7.1. Au cours du développement	65
7.2. A l'âge adulte	66
7.3. Dans les lignées cellulaires cancéreuses	67
7.4. Dans les tumeurs	67
8. Rôle de Lim1 pendant le développement	67
9. Rôle de Lim1 à l'âge adulte	73
10. Mutation et maladies congénitales	73
11. Implication dans la carcinogenèse	74
IV. Métastases	76
1. Description du processus métastatique	76
1.1. L'adhésion, détachement, migration et invasion	77
1.2. Le microenvironnement tumoral et la motilité cellulaire	81
2. Ciblage des métastases	83
3. Les métastases dans le CCC	84
3.1. Les médiateurs biologiques des métastases	84
3.2. Les changements génomiques	90
V. Objectifs	91
<i>Chapitre II : Matériels et Méthodes</i>	93
I. Etude <i>in vitro</i>	94
1. Les lignées cellulaires humaines	94
2. Inhibition de l'expression de Lim1 par RNA interférence	94
3. Vérification de l'extinction de l'expression de Lim1	94
4. Etude des mouvements cellulaires	96
5. Analyse de l'expression des protéines d'invasion	97
6. Etude de la capacité des cellules isolées à former des colonies	98
7. Etude statistique	98
II. Etude <i>ex vivo</i>	99
1. Les tissus humains	99
2. Etude de l'expression de Lim1 dans les métastases de CCR	100
2.1. Western blot	100
2.2. Immunohistochimie	100
3. Etude statistique	101
III. Etude <i>in vivo</i>	102
1. Mise en œuvre du modèle métastatique <i>in vivo</i>	102
1.1. La visualisation des métastases	102
1.1.1. Transfection et établissement des clones luciférase	102
1.1.2. Caractérisation et sélection des clones luciférase	102
1.2. Inhibition conditionnelle de Lim1	104
1.2.1. Short Hairpain RNA (shRNA)	104
1.2.2. Système LoxP/ Recombinase Cre-ER inducible au tamoxifène	107
1.2.3. L'antisens de Lim1	113
1.3. Le développement de métastases	114

1.3.1. Validation du modèle invasif orthotopique _____	114
1.3.2. Validation du modèle invasif par voie intra-veineuse _____	114
2. Etude du pouvoir invasif de Lim1 <i>in vivo</i> _____	115
2.1. Culture cellulaire et transfection _____	115
2.2. Implantation des cellules _____	115
2.3. Analyses histopathologiques _____	115
3. Analyse statistique _____	115
IV. Etude translationnelle	116
Les nanofibres polydiacétyléniques _____	116
1. Vérification de l'efficacité des nanofibres <i>in vitro</i> _____	116
1.1. Les lignées cellulaires _____	116
1.2. Extinction des gènes _____	116
1.3. Vérification de l'internalisation des PDA-Nfs par microscopie à fluorescence _____	117
1.4. Etude de l'extinction de la luciférase par imagerie de bioluminescence _____	117
1.5. Etude de l'extinction de l'expression de Lim1 par RT-qPCR _____	117
1.6. Etude de la cytotoxicité des PDA-Nfs par la technique du cristal violet _____	117
2. Vérification de l'efficacité des nanofibres <i>in vivo</i> _____	117
2.1. Modèle d'étude <i>in vivo</i> /Les xénogreffes sous-cutanées _____	117
2.2. Traitement <i>in vivo</i> _____	118
2.3. Etude de l'expression de Lim1 par RT-qPCR _____	118
2.4. Etude de l'expression de Lim1 par Western blot _____	118
2.5. Analyse statistique _____	119
<i>Chapitre III : Implication du facteur développemental Lim1 dans l'invasion métastatique</i>	120
I. Publication	121
II. Résumé	165
III. Discussion	166
<i>Chapitre IV : Partie translationnelle</i>	173
I. Publication	174
II. Résumé	207
III. Discussion	208
<i>Chapitre V : Conclusion et Perspectives</i>	214
<i>Chapitre VI : Références bibliographiques</i>	219
<i>Chapitre VII : ANNEXES</i>	257
I. Mise en œuvre du modèle <i>in vivo</i>	258
1. Visualisation des métastases _____	258
2. Inhibition conditionnelle de Lim1 _____	259
2.1. Le système shRNA _____	259
2.2. Système LoxP Cre-ER inducible _____	264

2.3. Le système antisens	266
3. Développement de métastases	267
3.1. Validation du modèle invasif orthotopique	267
3.2. Validation du modèle invasif par voie intraveineuse	267
II. Discussion	269
III. Résumé en Français	274
IV. Résumé en anglais	275
V. Publications	276
VI. Posters et Communications	277

Liste des Figures

Figure 1. Histologie des CCR

Figure 2. Chirurgie du CCR

Figure 3. Thérapies systémiques du CCR métastatique

Figure 4. Recommandations de l'European Association of Urology pour les patients atteints de CCC métastatique

Figure 5. Système VHL/HIF

Figure 6. Voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse rénale

Figure 7. La voie Sonic Hedgehog

Figure 8. Structure du rein

Figure 9. Développement des ébauches rénales

Figure 10. Différenciation morphologique des voies urinaires

Figure 11. Structure du domaine LIM

Figure 12. Structure du gène *Lhx1*

Figure 13. Interactions moléculaires du gène *Lhx1*

Figure 14. Processus métastatique

Figure 15. Transition épithélio-mésenchymateuse

Figure 16. Principe du système shRNA inductible à la doxycycline

Figure 17. Principe de la technique CRISPR/Cas9

Figure 18. Principe de la détection du clivage

Figure 19. Imagerie par bioluminescence des clones Luciférase

Figure 20. Courbe de croissance des clones Luciférase

- Figure 21.** Courbe de prolifération des clones Luciférase
- Figure 22.** Pourcentage d'apoptose des clones Luciférase
- Figure 23.** Bioluminescence des clones doublement transfectés
- Figure 24.** Screening des clones doublement transfectés sensibles à la doxycycline
- Figure 25.** Screening des conditions optimales pour l'induction du système Tet-On
- Figure 26.** Traitement à la doxycycline après transfection transitoire avec le vecteur shRNA ciblant Lim1 inducible
- Figure 27.** Etude de l'efficacité de 5 vecteurs shRNA ciblant Lim1 sous le contrôle d'un promoteur constitutif
- Figure 28.** Analyse par microscopie à fluorescence de l'effet du vecteur shRNA ciblant la GFP sur des cellules exprimant la GFP
- Figure 29.** Sélection des sgRNAs capables d'induire un clivage efficace de l'ADN double brin
- Figure 30.** Vérification de l'insertion des séquences LoxP à partir des clones 786-0
- Figure 31.** Vérification de l'insertion des séquences LoxP à partir des clones Caki2
- Figure 32.** Vérification de l'insertion des séquences LoxP à partir des pools cellulaires
- Figure 33.** Optimisation de la transfection pour la réparation dirigée homologue
- Figure 34.** Nombre de copies du gène *Lhx1*
- Figure 35.** Vérification de l'efficacité de la transcription de l'antisens
- Figure 36.** Analyse par Western blot de l'efficacité du vecteur antisens
- Figure 37.** Validation du modèle métastatique orthotopique chez la souris *nude*
- Figure 38.** Validation du modèle métastatique iv chez la souris *nude*

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification des tumeurs rénales selon l’OMS, 2016

Tableau 2. Classification des cancers du rein

Tableau 3. Caractéristiques des formes sporadiques du cancer du rein

Tableau 4. Formes familiales du cancer du rein

Tableau 5. Classification pTNM des CCR

Tableau 6. Supplément de la classification pTNM des CCR

Tableau 7. Grade de Fuhrman

Tableau 8. Echelle de Karnofsky

Tableau 9. Echelle du statut de performance ECOG

Tableau 10. Liste des siRNAs utilisés dans les études

Tableau 11. Liste des amorces utilisées dans les études

Tableau 12. Liste des anticorps utilisés dans les études

Tableau 13. Cohorte de patients pour l’étude *ex vivo*

Tableau 14. Liste des oligonucléotides shRNA utilisés pour la construction du vecteur inducible pSingle-tTS-shRNA

Tableau 15. Liste des vecteurs utilisés exprimant un shRNA constitutif

Tableau 16. Liste des oligonucléotides crRNA utilisés pour la construction du vecteur sgRNA/Cas9

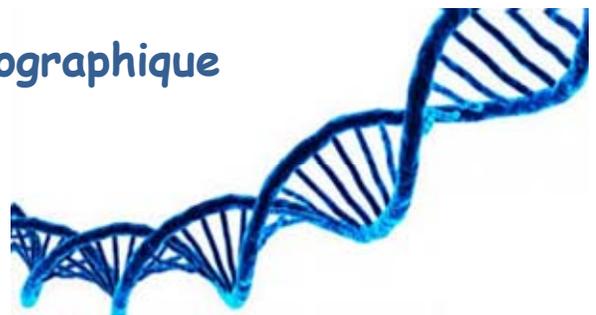
Tableau 17. Liste des amorces utilisées pour la recherche de la réparation homologue dirigée

Tableau 18. Liste des ssODNs conçus pour la réparation homologue dirigée



Chapitre I

Introduction bibliographique



I. Le carcinome à cellules rénales

1. Epidémiologie

Le carcinome à cellules rénales (CCR) représente 3% des tumeurs de l'adulte. Il est classé au 13^{ème} rang des cancers en termes de fréquence et est le troisième cancer urologique après ceux de la prostate et la vessie (*European Network of Cancer Registries: Eurocim version 4.0. 2001: Lyon, France*).

En 2012, dans le monde, le cancer du rein représente 337 860 nouveaux patients et 143 406 décès. Environ 59% des cas de cancer du rein sont concentrés dans les pays développés avec une forte incidence en Amérique du Nord et en Europe, et une faible incidence en Afrique et en Asie. La République tchèque a enregistré le taux le plus élevé de cancer du rein, suivie de la Lituanie et de la Slovaquie (Ferlay, Soerjomataram, *et al.*, 2013).

En 2012, en Europe, 84 400 nouveaux cas et 34 700 décès ont été recensés (Ferlay, Steliarova-Foucher, *et al.*, 2013). La mortalité par cancer du rein en Europe était en augmentation jusqu'à 1990. Par la suite, le taux de mortalité s'est stabilisé voire a diminué. Ceci est lié au développement des techniques diagnostiques et thérapeutiques mais probablement aussi à la maîtrise de certains facteurs de risque (Levi *et al.*, 2008).

En 2012, en France, 11 573 nouveaux cas ont été diagnostiqués et 3 957 décès par cancer du rein ont été estimés : 7 781 nouveaux cas et 2651 décès pour les hommes (67 %) et 3 792 nouveaux cas et 1306 chez les femmes (33 %), ce qui représente un sexe ratio de (1.5/1) et le classe au 6ème rang des cancers chez l'homme et au 9ème rang chez la femme (Institut National du Cancer 2012, <http://lesdonnees.e-cancer.fr/>).

2. Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risque reconnus du CCR sont détaillés comme suit:

➤ Sexe

Comme précisé plus haut, il y a une prédominance masculine de 1,5/1. Autrement dit, le CCR touche 2 fois plus les hommes que les femmes.

➤ Age

Le rein est un organe inaccessible. La découverte du cancer du rein est alors souvent tardive avec une incidence maximale entre 60 et 70 ans, plus rarement en dessous de 40 ans.

➤ Le tabagisme

La consommation de tabac favorise de nombreux cancers et notamment le cancer du rein. Une méta-analyse a confirmé que le tabagisme augmente le risque de CCR en révélant qu'une personne qui fume a environ 1,5 fois plus de risque de développer un cancer du rein qu'une personne qui n'a jamais fumé. Ce risque augmente avec la durée et le nombre de cigarettes fumées. Les personnes qui ont arrêté de fumer ont un risque moins élevé que celui des fumeurs ; il diminuerait d'environ 25 à 30 % après 10 à 15 ans d'arrêt d'où l'importance des mesures prophylactiques anti-tabac (Hunt *et al.*, 2005; Tsivian *et al.*, 2011).

➤ L'obésité

Il s'agit du deuxième facteur de risque établi. Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre Indice de Masse Corporelle (IMC) élevé et risque accru de cancer du rein. Pour une augmentation de l'IMC de 5 kg/m², l'augmentation de risque de cancer rénal est estimée, selon les études, entre 24 et 34 %. Plus l'IMC est important, plus l'augmentation du risque est élevée (Bergström *et al.*, 2001).

➤ L'hypertension artérielle

Une relation de type dose-effet a été mise en évidence entre pression artérielle élevée et cancer du rein, avec un risque augmenté même pour une élévation modérée (Ljungberg *et al.*, 2011).

➤ Dialyse

Les patients sous dialyse pendant de longues années ont un risque élevé de développer un cancer du rein et ce risque augmente avec la durée de la dialyse, ce qui justifie une surveillance particulière (Ljungberg *et al.*, 2011).

➤ Facteurs environnementaux et expositions professionnelles

- Le cadmium est un carcinogène avéré pour l'homme pour le cancer du poumon (Centre international de recherche sur le cancer, CIRC, 2012) mais pour le cancer du rein, la relation de causalité n'a pas été démontrée.
- L'arsenic est classé cancérigène avéré pour l'homme par le CIRC (groupe 1) depuis 1980. L'exposition à l'arsenic peut être environnementale. D'après le CIRC, des études épidémiologiques suggèrent l'existence d'une association entre l'exposition à l'arsenic et le développement de cancers du rein, mais ne permettent pas de conclure sur cette association (CIRC, 2012).

- L'exposition aux radiations ionisantes (groupe 1 du CIRC, volume 100D des monographies) : le risque de cancer du rein a été démontré chez les survivants d'accidents nucléaires et chez les patients (CIRC, 2012).
- L'exposition professionnelle au trichloroéthylène est suspectée d'être un facteur de risque de cancer du rein. Il a été classé en octobre 2012 cancérigène avéré pour l'homme (groupe 1) par le CIRC. Cette tendance à l'augmentation du risque a été confirmée dans une méta-analyse récente (Karami *et al.*, 2013).

Il existe certains facteurs de risque étudiés mais dont le lien de causalité n'a pas pu être reconnu comme le diabète de type 2, les infections urinaires, et l'hépatite virale (Gonzalez *et al.*, 2015). L'hypothèse d'un rôle protecteur d'un régime riche en fruits et légumes a été explorée dans plusieurs études dont les résultats sont discordants. La consommation modérée d'alcool semble avoir un effet protecteur pour des raisons inconnues (Bellocco *et al.*, 2012; Rohrmann *et al.*, 2015; D. Y. Song, et Lee, 2012). Une prophylaxie efficace comprend l'évitement de la cigarette et de l'obésité.

➤ Génétique

Des anomalies génétiques favorisent le risque de développer un cancer du rein ; elles constituent ce qu'on appelle les formes héréditaires du cancer du rein. Entre 2 et 3% des cancers du rein sont liés à des prédispositions héréditaires. Actuellement, on connaît quatre gènes majeurs de prédisposition au cancer du rein (VHL, FH, MET, FLCN) et une dizaine de formes héréditaires différentes (S. RICHARD *et al.*, 2006), (Cf. I.4.2. Les formes héréditaires du cancer du rein). Il a été montré également que le fait d'avoir un parent de premier degré avec CCR augmente également le risque d'en développer un soi-même (Clague *et al.*, 2009).

3. Diagnostic

3.1 Symptômes

Le cancer du rein reste asymptomatique jusqu'à un stade tardif de la maladie. Plus de 50% des CCR sont détectés de manière fortuite par imagerie non invasive dans le cadre d'investigation de différents symptômes non spécifiques ou d'autres maladies abdominales (Jayson et Sanders, 1998). La triade classique associant douleurs lombaires, hématurie macroscopique et masse abdominale palpable n'est retrouvée que dans 6 à 10% des cas et corrèle avec une histologie agressive et un stade avancé (Correas *et al.*, 2009; Mitterberger *et al.*, 2007). Les syndromes paranéoplasiques sont retrouvés chez environ 30% des patients atteints de CCR symptomatique. Certains patients consultent pour des symptômes provoqués par la maladie métastatique, c'est-à-dire des douleurs osseuses ou une toux persistante (H. L. Kim *et al.*, 2003).

3.2 Examen Clinique

L'examen clinique a un rôle limité dans le diagnostic du CCR et ne révèle souvent rien d'anormal sauf si la tumeur est suffisamment grosse pour être palpable. Cependant, les observations suivantes devraient faire l'indication d'un examen radiologique: masse palpable de l'abdomen, lymphadénopathie cervicale palpable, apparition d'une varicocèle (dilatation des veines spermatiques au niveau du scrotum) et œdème des membres inférieurs qui sont révélateurs d'une obstruction de la veine cave.

3.3 Examen biologique

L'examen biologique comprend généralement une formule sanguine et les paramètres permettant l'évaluation de la fonction rénale :

- La formule sanguine peut révéler une polyglobulie liée à l'augmentation de production de l'érythropoïétine par le rein, qui peut être évocatrice d'un cancer du rein.
- La créatinine plasmatique et l'urée sont des paramètres importants pour évaluer la fonction rénale.
- Une vitesse de sédimentation ou une CRP (*C-reactive protein*) élevées révèlent l'existence d'un syndrome inflammatoire associé au cancer.

D'autres paramètres peuvent être évalués comme le taux de filtration glomérulaire, la fonction hépatique, le taux de phosphatase alcaline, de lactate déshydrogénase (LDH), la calcémie corrigée (Motzer *et al.*, 2002; Sufrin *et al.*, 1989), l'étude de la coagulation et l'analyse des urines.

A l'heure actuelle et malgré toutes les recherches effectuées dans ce domaine, il n'y a pas de marqueur sanguin connu pour le diagnostic de cancer du rein.

3.4 Examen radiologique

Le diagnostic repose principalement sur les examens radiologiques. Il peut être découvert fortuitement au cours d'une échographie ou d'un scanner abdominal réalisés pour d'autres raisons médicales (Jayson et Sanders, 1998).

- L'échographie abdominale permet de mettre en évidence une masse solide avec parfois des calcifications.
- Le scanner abdominal et pelvien avec un passage avant et après injection de produit de contraste permet de visualiser la tumeur rénale et parfois d'évoquer sa nature histologique. Le cancer du rein se présente sous forme d'une masse déformant le rein et se caractérise par une

densité importante, qui augmente après l'injection de produit de contraste (Israel et Bosniak, 2008). Cet examen permet également de rechercher des métastases, en particulier hépatiques, et un envahissement veineux ou des ganglions au contact de la tumeur. La scanner abdominal fournit des informations sur la fonction et la morphologie du rein controlatéral, l'extension de la tumeur primaire, la participation veineuse, l'élargissement des ganglions locorégionaux, l'état des glandes surrénales et des autres organes solides (Sokhi *et al.*, 2015).

- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est indiquée en cas d'allergie au produit de contraste, de grossesse et d'insuffisance rénale (Putra *et al.*, 2009; Krestin *et al.*, 1992). Elle est indiquée aussi pour les patients avec CCR héréditaire afin d'éviter l'exposition fréquente aux rayons du scanner. L'IRM peut fournir des informations supplémentaires sur l'atteinte veineuse si l'étendue d'un thrombus tumoral de la veine cave inférieure est mal définie sur le scanner (Janus et Mendelson, 1991; Kabala *et al.*, 1991; Krestin *et al.*, 1992; Mueller-Lisse et Mueller-Lisse, 2010). L'IRM peut également être réalisée en complément du scanner afin de caractériser certaines tumeurs ou pour le diagnostic d'extension locale, en particulier de la veine cave inférieure.

3.5 Confirmation du diagnostic

La confirmation du diagnostic de cancer du rein est réalisée par l'examen anatomo-pathologique de la tumeur généralement après chirurgie. Cet examen consiste à mettre en évidence la présence de cellules cancéreuses dans la pièce d'exérèse et à identifier le type histologique de la tumeur selon la classification anatomo-pathologique de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS). Depuis peu, des marqueurs immuno-histochimiques sont utilisés pour préciser l'évaluation de la tumeur rénale.

Le pathologiste doit effectuer un compte-rendu et une conclusion standardisés qui comprennent tous les critères histologiques dont l'urologue ou l'oncologue auront besoin pour la prise en charge thérapeutique. Il doit préciser: le type histologique de la tumeur, sa taille, le grade de Fuhrman, la composante sarcomatoïde, la présence d'un envahissement locorégional en précisant sa localisation, la présence de nécrose, d'emboles vasculaires microscopiques, l'atteinte des ganglions hilaires, de la surrénale, les marges chirurgicales. Cette étape est primordiale car la prise en charge thérapeutique est différente selon le type histologique du cancer du rein et son extension.

3.6 La biopsie rénale

La biopsie percutanée de la tumeur rénale peut révéler l'histologie des masses rénales radiologiquement indéterminées et peut être indiquée chez les patients avec de petites masses tumorales, candidats à une surveillance active, pour obtenir une histologie avant les traitements ablatifs et pour sélectionner la stratégie de traitement (médical et chirurgical) la plus appropriée dans

le cadre de maladie avancée (Maturen *et al.*, 2007; Shannon *et al.*, 2008; Volpe *et al.*, 2008; Abel *et al.*, 2010; Veltri *et al.*, 2011). La biopsie rénale n'est pas indiquée chez les patients comorbides et fragiles qui ne peuvent être considérés que pour une gestion conservatrice, quel que soit le résultat de la biopsie. En raison de la haute précision diagnostique de l'imagerie abdominale, la biopsie de la tumeur rénale n'est pas nécessaire chez les patients présentant une masse rénale avec augmentation de contraste au scanner pour lesquels la chirurgie est prévue.

4. Classification

Le cancer du rein n'est pas une maladie unique mais regroupe un large éventail d'entités histopathologiques différentes qui évoluent et répondent différemment aux traitements. La classification des tumeurs du rein de l'adulte actuellement valable est celle de l'OMS 2016 (Humphrey *et al.*, 2016; Moch *et al.*, 2016). Selon cette classification, les tumeurs épithéliales (ou tumeurs à cellules rénales) sont individualisées des tumeurs non épithéliales. Mais 5% des tumeurs du rein restent encore inclassées (**Tableau 1**).

Moins de 10% des tumeurs du rein sont bénignes. C'est le cas des oncocytomes, des adénomes papillaires et des angiomyolipomes (tumeurs graisseuses mésoenchymateuses). Bien qu'elles soient sans risque de métastases à distance, elles peuvent parfois nécessiter un traitement chirurgical. Le reste représente des tumeurs malignes.

Les carcinomes à cellules rénales (CCR) représentent la majorité des cancers du rein de l'adulte (85%). Le carcinome rénal à cellules claires (CCC) est la forme la plus fréquente de CCR (70% à 80%). Le cancer du rein est sporadique dans 90% des cas. Il existe toutefois des formes dites familiales avec des prédispositions génétiques (**Tableau 2**).

4.1 Les formes sporadiques des tumeurs rénales

Figure 1, Tableau 3

4.1.1. Le carcinome rénal à cellules claires

Le carcinome à cellules rénales claires (CCC) est la forme la plus fréquente des tumeurs rénales. Il représente 65% des tumeurs rénales et 75% des CCR. Histologiquement, il est constitué de cellules à cytoplasme clair ou éosinophile dans un réseau vasculaire fin. Le CCC trouve son origine à partir du tube contourné proximal. Macroscopiquement, les tumeurs sont globulaires et bien délimitées, saillantes à partir du cortex rénal, avec une pseudo-capsule. La tumeur est typiquement jaune dorée en raison du contenu riche en lipides des cellules. Les nécroses, les hémorragies et la calcification sont communément présentes. Le CCC est architecturalement diversifié avec des motifs, alvéolaires et

Tumeurs à cellules rénales	Tumeurs mésenchymateuses
Bénignes	Survenant principalement chez les enfants
<ul style="list-style-type: none"> Adénome papillaire Oncocytome 	<ul style="list-style-type: none"> Sarcome à cellules claires Tumeur rhabdoïde Néphrome mésoblastique congénital Tumeur rénale ossifiante des enfants
Malignes	Survenant principalement chez les adultes
<ul style="list-style-type: none"> Carcinome à cellules claires Carcinome kystique multiloculaire à cellules claires Carcinome papillaire du rein Carcinome chromophile du rein Carcinome des tubes collecteurs de Bellini Carcinome médullaire du rein Carcinome avec translocation Xp11 Carcinome associé au neuroblastome Carcinome fusiforme tubuleux et mucineux Carcinome inclassé 	<ul style="list-style-type: none"> Léiomyosarcome Angiosarcome Rhabdomyosarcome Histiocytome fibreux malin Hémangiopéricytome Ostéosarcome Angiomyolipome Angiomyolipome épithélioïde Léiomyome Tumeur cellulaire juxta glomérulaire Tumeur cellulaire intertitielle réno-médullaire Schwannome Tumeur fibreuse solitaire
Tumeurs métanéphriques	Tumeurs hématopoïétiques et lymphoïdes
<ul style="list-style-type: none"> Adénome métanéphrique Adénofibrome métanéphrique Tumeur stromale métanéphrique 	<ul style="list-style-type: none"> Lymphome Leucémie Plastocytome
Tumeurs néphroblastiques	Tumeurs germinales
<ul style="list-style-type: none"> Restes néphrogéniques Néphroblastome Néphroblastome kystique partiellement différencié 	<ul style="list-style-type: none"> Tératome Choriocarcinome
Tumeurs mixtes épithéliales et mésenchymateuses	Les métastases
<ul style="list-style-type: none"> Néphrome kystique Tumeur mixte épithéliale et stromale Sarcome synovial 	
Tumeurs neuro-endocrines	
<ul style="list-style-type: none"> Tumeur carcinoïde Carcinome neuroendocrine Tumeur primitive neuroectodermique Neuroblastome Phéochromocytome 	

Tableau 1: Classification des tumeurs rénales selon l’OMS, 2016

D’après Holger Moch et al., (2016) The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. EUROPEAN UROLOGY; 70 : 93 – 105

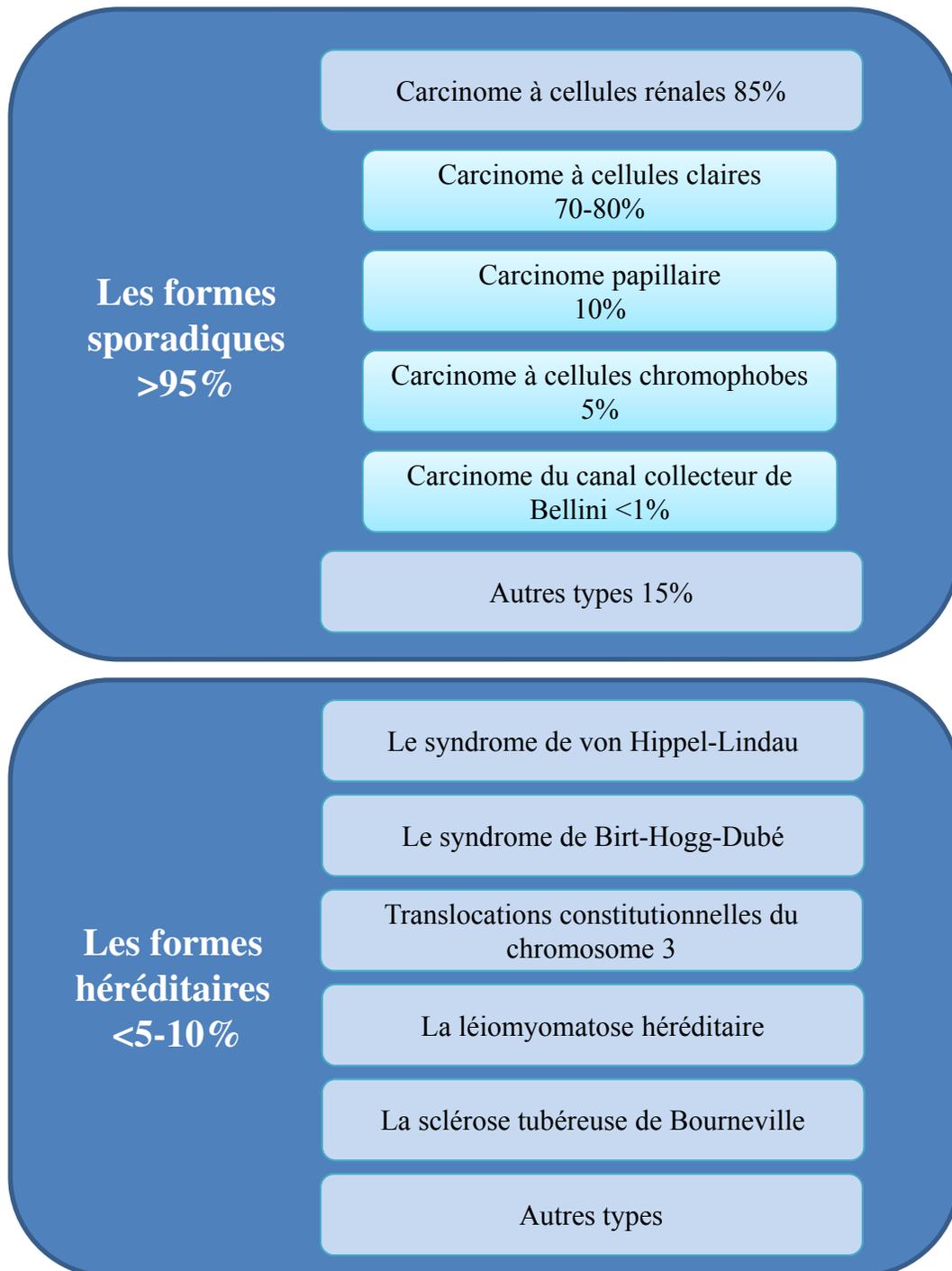


Tableau 2: Classification des cancers du rein

	Fréquence	Origine	Anomalie chromosomique
Carcinome à cellules claires	75%	Tube contourné proximal	-3p, VHL-
Carcinome papillaire	10%	Tube contourné distal	+7, +17, -Y, +16, +12, +20
Carcinome à cellules chromophobes	5%	Tube collecteur (cortical)	-1, -2, -13, -3
Oncocytome	5%	Tube collecteur (cortical)	-1, -14, -19 Anomalies de l'ADN mitochondrial
Carcinome de Bellini	1%	Tube collecteur (extra-pyramidal)	-1, -6, -14
Carcinome sarcomatoïde	1%	Tube contourné ou tube collecteur	-8, -9, -14

Tableau 3 : Caractéristiques des formes sporadiques du cancer du rein

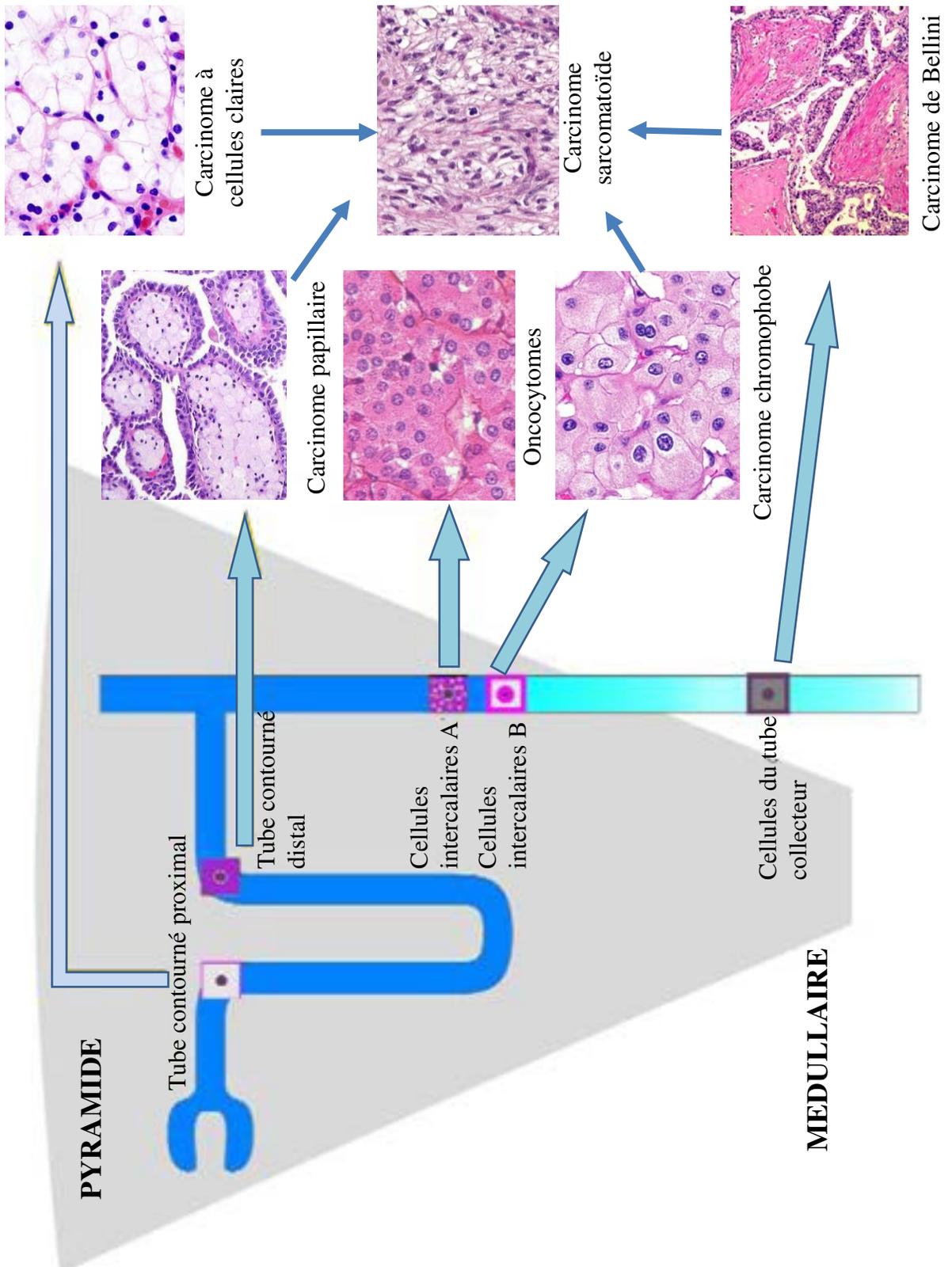


Figure 1 : Histologie des CCR

Il existe 6 principaux types histologiques, définis par des origines cellulaires différentes : les carcinomes à cellules claires et papillaires (cellules du tube contourné), les carcinomes à cellules chromophobes et les oncocytomes (cellules intercalaires du tube collecteur cortical), les carcinomes de Bellini (cellules du tube collecteur extra-pyramidal) et les carcinomes sarcomatoïdes (cellules du tube contourné ou du tube collecteur).

acinaires le plus communément. Sur le plan moléculaire, la perte du chromosome 3p et la mutation du gène von Hippel-Lindau (VHL) situé en 3p25 sont souvent retrouvées. L'inactivation somatique de VHL peut se produire par suppression allélique, mutation ou inactivation épigénétique dans 70% des cas. D'autres gènes suppresseurs de tumeur ont été identifiés tels que SETD2, BAP1 et PBRM1. Tous ces gènes sont situés près du gène VHL dans une région qui est souvent délétée dans le CCC. Ces données suggèrent une participation de multiples loci sur le chromosome 3 dans la carcinogenèse rénale (Brugarolas, 2014). Le CCC est de mauvais pronostic (Beck *et al.*, 2004; Capitanio *et al.*, 2009; Keegan *et al.*, 2012). Le taux de survie à cinq ans est de 91%, 74%, 67% et 32% pour les stades I, II, III et IV de TNM respectivement (Patients traités entre 1987-1998) (Tsui *et al.*, 2000).

Mes travaux de thèse ainsi que ceux du laboratoire d'accueil sont basés sur la forme CCC.

4.1.2. Le carcinome rénal papillaire

Le carcinome papillaire représente 10% des CCR. C'est le deuxième type le plus couramment rencontré de CCR. Il est traditionnellement subdivisé en deux types, qui se sont révélés cliniquement et biologiquement distincts (Moch *et al.*, 2016). Le type I est associé à des mutations activatrices de MET et le type II est associé à l'activation de la voie NRF2-ARE (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016). Macroscopiquement, il est bien délimité avec une pseudocapsule, de couleur jaune ou marron, et une structure molle. Le CCR papillaire de type I est le plus fréquent et de meilleur pronostic que le type II (Ledezma *et al.*, 2015). La survie à 5 ans est plus élevée comparée à celle du CCC (Sandra Steffens *et al.*, 2012).

4.1.3. Le carcinome rénal à cellules chromophobes

Il représente 5-10% des carcinomes rénaux et se forme à partir des cellules intercalaires B et du canal collecteur. Typiquement, il se présente sous forme d'une grande masse solide relativement homogène sans nécrose ou calcification, bien délimitée, sans capsule. La taille médiane de la tumeur est de 6,0 cm, plus grande que dans les autres sous-types. Microscopiquement, deux types de cellules tumorales peuvent être présents avec des proportions différentes. Des cellules pâles grandes, polygonales, avec un cytoplasme transparent abondant et des cellules plus petites avec un cytoplasme granuleux et éosinophile (Vera-Badillo *et al.*, 2012). Le CCR chromophobe ne peut pas être classé avec le système de grade de Fuhrman en raison de son atypie nucléaire innée. La perte des chromosomes Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 et 21 sont des changements génétiques typiques (Moch *et al.*, 2016). Le pronostic est relativement bon, avec un taux de survie à cinq ans élevé (Volpe *et al.*, 2012).

4.1.4. Le carcinome du canal collecteur de Bellini

Il correspond à une tumeur maligne dérivée des cellules principales du canal collecteur de Bellini et représente moins de 1% des tumeurs rénales. Macroscopiquement, il s'agit de tumeurs qui se développent dans la partie centrale du rein. Elles sont généralement de couleur gris-blanc avec un bord irrégulier. Le diagnostic histopathologique est difficile. Il présente des structures tubulaires ou tubulopapillaires. La biologie moléculaire de ces tumeurs est encore mal connue car seuls quelques cas ont été analysés. La perte d'hétérozygotie a été identifiée sur de multiples bras chromosomiques, y compris 1q, 6p, 8p, 13q et 21q. La perte du bras chromosomique 3p peut être trouvée. Des amplifications de HER2 ont été également décrites. Cette tumeur est souvent liée à un mauvais pronostic avec un haut grade de Fuhrmann (World Health Organization, 2004).

4.1.5. Les autres formes de carcinomes à cellules rénales

Les autres types de carcinomes rénaux qui sont rarement rencontrés et qui ne seront pas détaillés dans cette thèse sont : (**Tableau1**)

- le CCR multiloculaire à cellules claires.
- le carcinome rénal médullaire.
- le carcinome rénal associé à la translocation Xp11
- le carcinome associé avec le neuroblastome
- le carcinome rénal mucineux tubuleux à cellules fusiformes.
- l'adénome papillaire (bénin)
- les oncocytomes (bénin)

4.1.6. Les carcinomes rénaux non classés

Cette catégorie de diagnostic concerne les carcinomes rénaux qui ne rentrent pas dans l'une des autres catégories. Ce groupe représente 4 à 5% des cas. Cette catégorie contient des tumeurs avec des apparences et des lésions génétiques variées. Les caractéristiques qui amènent à classer un carcinome dans cette catégorie comprennent: l'apparence composite de types connus, une morphologie sarcomatoïde sans éléments épithéliaux reconnaissables, la production de mucine, un mélange d'éléments épithéliaux et stromal et la présence de types de cellules méconnaissables (World Health Organization, 2004).

4.2 Les formes héréditaires du cancer du rein

Tableau 4

Les formes héréditaires représentent 5 à 8 % des tumeurs rénales. À ce jour, il existe 10 syndromes héréditaires connus, associés à des mutations germinales. Les syndromes héréditaires sont souvent diagnostiqués plus tôt (l'âge médian est de 37 ans) suite à l'histoire familiale, l'âge d'apparition et la présence d'autres lésions typiques pour les syndromes respectifs (Pignot *et al.*, 2007; Przybycin *et al.*, 2013; Shuch *et al.*, 2014).

4.2.1. La maladie de von Hippel-Lindau

Il s'agit de la forme la plus fréquente du cancer du rein héréditaire. C'est une maladie autosomique dominante, décrite pour la première fois en 1904 par Eugène Von Hippel puis en 1926 par Arvid Lindau. Le gène responsable a été identifié 60 ans plus tard. Cette affection est liée à des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (VHL), qui joue un rôle important dans le contrôle des facteurs impliqués dans la vascularisation des tumeurs. Cette maladie prédispose au développement de tumeurs bénignes et malignes richement vascularisées notamment les cancers du rein, du cerveau, de la rétine, du pancréas ou de la glande surrénale. Le cancer du rein est retrouvé chez 40 à 50 % des personnes présentant la mutation. Il est découvert en moyenne à 39 ans, mais parfois beaucoup plus tôt. Il s'agit toujours de cancers à cellules claires, le plus souvent bilatéraux et multifocaux. Il constitue la principale cause de décès des patients (Gossage *et al.*, 2015; Nielsen *et al.*, 2016).

4.2.2. Le cancer papillaire héréditaire

C'est une affection autosomique dominante rare, caractérisée par le développement de carcinomes tubulo-papillaires de type I. L'âge de survenue est précoce, avant 40 ans. Elle est caractérisée par des mutations activatrices du proto-oncogène MET sur le chromosome 7q32 qui code pour un récepteur à activité tyrosine kinase dont le seul ligand connu est le HGF (*Hepatocyte growth factor*) (Behnes *et al.*, 2013; Zbar *et al.*, 1994).

4.2.3. La léiomyomatose héréditaire avec cancer rénal

Il s'agit d'une forme agressive de cancer rénal héréditaire. C'est une affection autosomique dominante qui prédispose au développement de cancer cutané, de léiomyomes utérins (tumeurs bénignes des tissus mous qui se développent à partir du muscle lisse) et des tumeurs rénales chez 32% des patients et qui constituent la principale cause de décès à un jeune âge. L'anomalie responsable de ce syndrome est une mutation inactivatrice du gène FH situé sur le chromosome 1q42.2-42.3 et qui code pour une enzyme du cycle de Krebs, la fumarate déshydrogénase. Cette enzyme est impliquée dans les

Affections	Gènes	Types de tumeurs rénales	Autres manifestations cliniques
Maladie de von Hippel-Lindau	VHL	Carcinome à cellules claires, bilatéral et multifocal	Oui
Cancer papillaire héréditaire	MET	Carcinome papillaire de type 1, bilatéral et multifocal	Non
Léiomyomatose héréditaire avec cancer papillaire	FH	Carcinome papillaire de type 2, carcinome des tubes collecteurs, unilatéral et unique	Oui
Syndrome de Birt-Hogg-Dubé	BHD	Cancers hybrides, chromophobes, oncocytomes, carcinomes à cellules claires	Oui
Translocations constitutionnelles du chromosome 3	Inconnu	Carcinome à cellules claires bilatéral et multifocal	Non
Cancer à cellules claires familial	Inconnu	Carcinome à cellules claires souvent unique	Non
Paragangliomes héréditaires	SDHB	Carcinome à cellules claires	Oui
Sclérose tubéreuse de Bourneville	TSC1, TSC2	Carcinome à cellules claires, angiomyolipomes	Oui
Hyperparathyroïdie avec tumeurs des mâchoires	HRPT2	Carcinome papillaire, néphroblastome tardif	Oui
Cancer papillaire familial de la thyroïde avec tumeurs rénales	Inconnu	Carcinome et adénomes papillaires	Oui
Diabète MODY 5	HNF1-bêta	Carcinome chromophobe	Oui

Tableau 4 : Formes familiales du cancer du rein

phénomènes d'oxydation et sa perte conduit à une activation des facteurs induit par l'hypoxie, HIFs. Le type histologique du cancer du rein retrouvé dans ce syndrome est le tubulo-papillaire type II (Grubb *et al.*, 2007).

4.2.4. Le syndrome de Birt-Hogg-Dubé

Le syndrome de Birt-Hogg-Dubé, désigné par le nom des trois médecins canadiens qui l'ont décrit en 1977, est un syndrome héréditaire autosomique dominant rare causé par des mutations constitutionnelles au niveau du gène suppresseur de tumeur FLCN codant pour la folliculine. Ce syndrome est caractérisé par des tumeurs souvent bénignes mais fréquentes de la peau (visage, cou), des tumeurs rénales et des kystes pulmonaires qui peuvent conduire à un pneumothorax (décollement de la plèvre). La manifestation la plus sévère est la prédisposition au CCR dans 30% des cas avec un risque multiplié par 7. Les CCR se développent généralement à l'âge moyen de 50 ans. L'histologie des tumeurs rénales est multiple et parfois composite. 50% des tumeurs rénales sont chromophobe/oncocytome hybrides et 33% sont chromophobes. Le CCC et les oncocytomes bénins représentent respectivement 9% et 5% des cas. 56% des patients développent des tumeurs bilatérales (Jensen *et al.*, 2017).

4.2.5. Les translocations constitutionnelles du chromosome 3

Sept translocations équilibrées impliquant le chromosome 3 ont été décrites dans les formes héréditaires du cancer du rein. La première translocation équilibrée décrite est la t (3; 8) (p14; q24). Les tumeurs rénales sont principalement multifocales et bilatérales. La perte d'hétérozygotie et des mutations au niveau du gène VHL ont été identifiées dans les tumeurs rénales de ces patients. D'autres gènes suppresseurs de tumeur perturbés par les points d'arrêt de la translocation pourraient être impliqués dans la tumorigenèse rénale tels que FHIT, TRC8, DIRC2, DIRC3, LSAMP et NORE1A (Bonné *et al.*, 2004).

4.2.6. La sclérose tubéreuse de Bourneville

La sclérose tubéreuse est une maladie génétique multifactorielle caractérisée par des hamartomes (malformation tissulaire d'aspect tumoral) répandus dans plusieurs organes, le cerveau, le cœur, la peau, les yeux, les reins, les poumons et le foie. Les gènes affectés sont les gènes suppresseurs de tumeur TSC1 et TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex*), qui codent pour l'hamartine et la tubérine respectivement. Le complexe hamartine-tubérine inhibe la voie mTOR, qui contrôle la croissance et la prolifération des cellules. Ce syndrome est caractérisé par la formation d'angiomyolipomes et de kystes rénaux multiples. Le CCC est également observé dans environ 1 à 2% des cas (Lendvay et Marshall, 2003; Curatolo *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2017).

4.2.7. Les autres formes héréditaires

- le cancer à cellules claires familial.
- les paragangliomes héréditaires associés à des mutations du gène SDHB qui code pour la sous-unité B de la succinate déshydrogénase.
- l'hyperparathyroïdie avec tumeurs des mâchoires.
- le cancer papillaire de la thyroïde associé à des tumeurs rénales.
- Le diabète MODY 5 caractérisé par la mutation du gène *HNF1B* (*hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B*).

D'autres syndromes de prédisposition aux tumeurs rénales sont peut-être encore à identifier.

5. Facteurs pronostiques

L'évaluation du pronostic du cancer du rein est encore à l'heure actuelle un vrai challenge. Cette difficulté est liée principalement à la nature très hétérogène des tumeurs rénales aussi bien sur le plan clinique que sur le plan biologique. L'intérêt d'établir des systèmes pronostiques est d'évaluer les chances de guérison, les risques de rechute et dans les formes les plus graves, les chances de survie. Ces systèmes prennent en compte différents facteurs précisés ci-après.

5.1 Les facteurs anatomiques

➤ Classification TNM

La classification du cancer par l'étendue anatomique de la maladie est le déterminant majeur du pronostic et du traitement approprié. Il s'agit des caractéristiques incluses dans le système de classification TNM à savoir : la taille de la tumeur, l'invasion veineuse, l'invasion de la capsule rénale, l'atteinte de la surrénale et des ganglions lymphatiques et la présence de métastases à distance (Brierley *et al.*, 2017). Chaque aspect individuel de TNM est appelé catégorie. La catégorie T décrit le site de la tumeur primaire. La catégorie N décrit la participation des ganglions lymphatiques régionaux. La catégorie M décrit la présence ou non d'une propagation métastatique distante. L'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) a publié la classification TNM des tumeurs malignes il y a plus de 50 ans, et depuis, cette classification est considérée comme la norme internationalement acceptée pour déterminer le stade tumoral. La dernière version a été publiée en 2017 (**Tableau 5**). La combinaison des trois repères TNM permet d'établir un stade de I à IV plus synthétique (**Tableau 6**). Les stades I et II correspondent à une maladie limitée au rein, le stade III à une maladie étendue au-delà du rein mais sans extension à distance, et le stade IV, à l'existence de métastases à distance. Cependant, cette classification ne donne qu'une première idée du pronostic. Ainsi, dans les stades IV,

T	Tumeur primaire
pTx	Non déterminée/ non évaluable
pT0	Absente
pT1	Limitée au rein, ≤ 7 cm
pT1a	≤ 4 cm
pT1b	> 4 cm mais ≤ 7 cm
pT2	Limitée au rein, > 7 cm dans la plus grande dimension
pT2a	> 7 cm mais ≤ 10 cm
pT2b	Limitée au rein, > 10 cm
pT3	La tumeur s'étend dans les veines majeures ou les tissus périnéphriques, mais pas dans la glande surrénale homolatérale et pas au-delà du fascia de Gérota
pT3a	La tumeur s'étend grossièrement dans la veine rénale ou ses branches segmentaires (musculaires), ou la tumeur envahit la graisse périrénale et / ou rénale (graisse peripélvique), mais pas au-delà du fascia de Gérota
pT3b	La tumeur s'étend grossièrement dans la veine cave au-dessous du diaphragme
pT3c	La tumeur s'étend grossièrement dans la veine cave au-dessus du diaphragme ou envahit le mur de la veine cave
pT4	La tumeur envahit au-delà du fascia de Gérota (y compris l'extension contiguë dans la glande surrénale homolatérale)
N	Ganglions lymphatiques régionaux
Nx	Non déterminée/ non évaluable
N0	Pas de métastases ganglionnaires régionales
N1	Métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux
M	Métastases à distance
Mx	Non déterminée/ non évaluable
M0	Absentes
M1	Métastase (s) à distance

Tableau 5: Classification pTNM des CCR

D'après Brierley, J.D., et al., TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 8th edn. Wiley-Blackwell, 2017. 199.

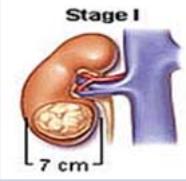
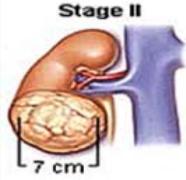
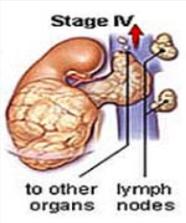
Stade	Classification TNM	Description	Figure	Taux de survie à 5 ans
Stade I	T1, N0, M0	Tumeur ≤ 7 et limitée au rein		75-80%
Stade II	T2, N0, M0	Tumeur > 7cm mais reste limitée au rein		75-80%
Stade III	T3, N0, M0 T1-3, N1, M0	La tumeur s'est propagée sans avoir cependant franchi les limites de la loge rénale, ni avoir atteint plus d'un ganglion lymphatique voisin		50%
Stade IV	T4, Nx-1, M0 Tx-1, Nx-1, M1	La tumeur s'est étendue au-delà de la loge rénale ou a métastasé aux ganglions et/ou aux organes voisins.		10%

Tableau 6: Supplément de la classification pTNM des CCR

D'après Wittekind B.J et al., TNM Supplement: A Commentary on Uniform Use, 4th Edition. UICC International Union against cancer. 4th edition. Wiley-Blackwell. 106. (2012)

le pronostic est très différent en fonction de l'état général du patient, de la localisation des métastases, du moment où apparaissent les métastases.

5.2 Les facteurs histologiques

Les facteurs histologiques comprennent le grade de la tumeur, le sous-type histologique du CCR, la composante sarcomatoïde, l'invasion microvasculaire, la nécrose tumorale et l'invasion du système collecteur (Sun *et al.*, 2011).

Une analyse univariée a montré que les patients atteints de CCR chromophile avaient un meilleur pronostic que ceux atteints d'un CCR papillaire ou d'un CCC (Cheville *et al.*, 2003; Patard *et al.*, 2005). Cependant, les informations pronostiques fournies par le type de CCR sont perdues lorsqu'elles sont stratifiées par rapport au stade tumoral.

➤ Le grade nucléaire de Fuhrman

Le grade nucléaire de Fuhrman est le système de classement le plus largement répandu (Fuhrman, 1982). Il est utilisé pour caractériser les carcinomes rénaux mais pas les nouvelles entités histologiques des tumeurs rénales, ni le carcinome chromophile (en raison de son atypie nucléaire innée comme précisé plus haut). Il est basé sur l'aspect des noyaux des cellules cancéreuses à savoir leur taille, leur forme du noyau et leur prééminence du nucléole. Il est coté en fonction de la gravité croissante de I à IV. Ce système de notation décrit les différences entre les cellules cancéreuses et les cellules normales du rein. Plus elles sont différentes et plus la tumeur est agressive : le grade I est utilisé pour qualifier des cellules tumorales assez ressemblantes aux cellules normales ; à l'inverse, le grade IV caractérise les cellules très différentes qui se divisent rapidement. Si la tumeur est hétérogène, c'est le grade le plus élevé qui sera retenu (**Tableau 7**).

Il existe un manque de reproductibilité du grade de Fuhrman à cause de divergences intra et inter observateurs. Le regroupement des tumeurs des classes 1 et 2 en tant que tumeurs de bas grade et 3 et 4 en tant que tumeurs de haut grade permettrait une meilleure reproductibilité tout en préservant la valeur pronostique de la survie globale. Malgré les divergences intra et inter observateurs, le grade nucléaire de Fuhrman reste un facteur pronostique indépendant (Lang *et al.*, 2005).

5.3 Les facteurs cliniques

Les facteurs cliniques comprennent le statut de performance, les symptômes locaux, les symptômes systémiques, la cachexie, l'intervalle entre le diagnostic et le traitement, l'anémie, le nombre de plaquettes, le ratio des neutrophiles/lymphocytes, le taux de CRP, d'albumine et la calcémie (Bensalah *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; Patard *et al.*, 2004).

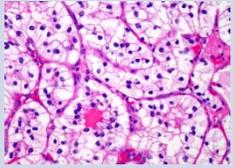
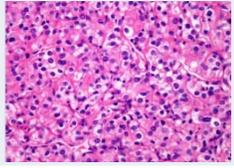
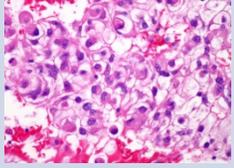
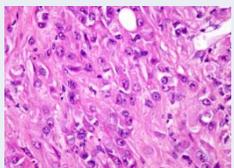
Stade	Taille de noyau	Contour du noyau	Nucléole	Cellules monstrueuses	Figure
Grade I	Rond petite taille 10µm	Régulier	Absent ou imperceptible	0	
Grade II	Plus volumineux 15µm	Discrètes irrégularités	Visible à Gr x400	0	
Grade III	Volumineux 20µm	Nettement irrégulier	Visible à Gr x100	0	
Grade IV	Volumineux 20µm	Nettement irrégulier	Visible à Gr x100	Cellules monstrueuses multilobées	

Tableau 7: Grade de Fuhrman

Le statut de performance est un indicateur de l'état d'autonomie d'une personne, les principales échelles utilisées sont ECOG et Karnofsky.

➤ *Echelle de Karnofsky*

Tableau 8

L'échelle de Karnofsky s'échelonne de 100 à 0, où 100 représente la pleine santé et 0 la mort. Cette échelle d'évaluation porte le nom du Dr David A. Karnofsky qui a décrit cette échelle en 1949 avec le Dr Joseph H (Karnofsky et Burchenal, 1949). L'objectif initial de son élaboration était de fournir aux thérapeutes une évaluation des capacités de leur patient à survivre à une chimiothérapie anticancéreuse.

➤ *Echelle ECOG*

Tableau 9

L'échelle de l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), publiée par Oken *et al.* en 1982, (Oken *et al.*, 1982), s'échelonne de 0 à 5, où 0 représente un bon état de santé et 5 le décès. Son avantage sur l'échelle de Karnofsky réside dans sa simplicité. Une étude a montré une corrélation entre le statut de performance et le développement de métastases osseuses dans le carcinome rénal (Shvarts *et al.*, 2004).

5.4 Les facteurs moléculaires

De nombreux marqueurs moléculaires sont en cours d'investigation pour préciser le pronostic du CCR, tels que l'anhydrase carbonique IX (CaIX), le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), les facteurs HIFs, le marqueur de prolifération Ki67, p53, p21, PTEN, l'E-cadhérine, l'ostéopontine, le CD44 (facteur d'adhésion cellulaire), le CXCR4 et bien d'autres facteurs du cycle cellulaire et de prolifération (Li *et al.*, 2008; Sabatino *et al.*, 2009; Sim *et al.*, 2012; Choueiri *et al.*, 2014; Choueiri *et al.*, 2015 ; Hammers *et al.*, 2015).

Aucun de ces marqueurs n'a amélioré la précision prédictive des systèmes pronostiques actuels. Aucun n'a été validé et recommandé pour une utilisation en routine dans la pratique clinique. D'autre part, plusieurs études rétrospectives et de grands programmes de dépistage moléculaire ont identifié des gènes mutés dans les tumeurs CCR. La perte d'expression des gènes BAP1 et PBRM1, situés sur le chromosome 3p (région supprimée dans plus de 90% des CCR), est associée à un mauvais pronostic avec une récurrence tumorale. Il existe aussi des données validées à partir de plusieurs séries chirurgicales qui peuvent prédire une récurrence tumorale à l'aide d'une signature de 16 gènes. Cette signature peut être utile dans le contexte clinique (Rini *et al.*, 2015).

Score %	Critères	Définition
100	Normal, pas de plaintes, pas d'évidence de maladie	Capable de mener une activité normale et de travailler ; pas besoin de soins particuliers
90	Capable d'une activité normale, signes ou symptômes mineurs en relation avec la maladie	
80	Activité normale avec effort, signes ou symptômes de la maladie	
70	Capacité de subvenir à ses besoins, incapable d'avoir une activité normale et professionnelle active	Incapable de travailler ; capable de vivre à domicile et de subvenir à la plupart de ses besoins
60	Requiert une assistance occasionnelle mais est capable de subvenir à la plupart de ses besoins	
50	Requiert une assistance et des soins médicaux fréquents	
40	Invalide ; requiert des soins et une assistance importants	Incapable de subvenir à ses besoins, requiert un équivalent de soins institutionnels ou hospitaliers
30	Sévèrement invalide ; hospitalisation indiquée bien que le décès ne soit pas imminent	
20	Extrêmement malade, hospitalisation nécessaire, traitement actif de soutien nécessaire	
10	Mourant, mort imminente	
0	Décès	

Tableau 8: Echelle de Karnofsky

D'après Karnofsky D. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. Columbia University Press, New-York 1949 :191-205.

Score	Description
0	Pas de différence avec l'état précédent la maladie
1	Patient restreint dans ses activités physiques, mais ambulateur et capable d'effectuer des activités légères ou sédentaires
2	Patient ambulateur et capable de s'occuper de lui, mais incapable d'effectuer des activités. Debout > 50% de la journée
3	Patient capable de soins limités, alité ou au fauteuil > 50% de la journée
4	Patient complètement handicapé, ne pouvant s'occuper de lui. Totalement alité ou confiné au fauteuil
5	Mort

Tableau 9: Echelle du statut de performance ECOG

Actuellement, une collaboration internationale étudie les altérations génomiques grâce à des études d'association génomique large (GWAS, *genome wide association study*), des miARN, des SNP et des méthylations de gènes, dans le but d'améliorer l'information diagnostique et pronostique. Des études ont confirmé l'information pronostique basée sur le gain des régions chromosomiques 7q, 8q et 20q et les pertes chromosomiques des régions 9p, 9q et 14q, qui sont associées à une survie médiocre. Les tests basés sur la méthylation de CpG permettent également de prédire de manière indépendante la survie dans le CCR (Köhn *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015).

5.5 Les systèmes pronostiques

Le stade TNM ou le grade de Fuhrman seuls sont souvent pris à défaut à cause de l'évolution imprévisible du cancer du rein. Des systèmes pronostiques qui combinent plusieurs facteurs pronostiques indépendants ont alors été développés dans le but de définir les groupes à risque et d'orienter le traitement ou éventuellement de proposer un essai clinique. Ils peuvent être plus précis que le stade TNM ou Fuhrman pris individuellement pour prédire la survie (Zisman *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2002; Leibovich *et al.*, 2003; Patard *et al.*, 2004; Sorbellini *et al.*, 2005; Karakiewicz *et al.*, 2007; Zigeuner *et al.*, 2010). Avant d'être adoptés, ces systèmes doivent démontrer une capacité prédictive supérieure aux schémas pronostiques post-opératoires classiques (Isbarn et Karakiewicz, 2009). Récemment, de nouveaux systèmes pronostiques préopératoires avec une excellente précision prédictive ont été conçus (Raj *et al.*, 2008; Karakiewicz *et al.*, 2009).

Dans le cancer du rein localisé, les deux systèmes les plus performants sont l'UISS et le SSIGN. Dans les cancers du rein métastatiques, les deux systèmes pronostiques et prédictifs de la réponse à l'immunothérapie qui ont été largement utilisés sont le modèle du Groupe Français d'Immunothérapie et le modèle de Motzer.

➤ *Dans les cancers du rein localisés*

De nombreux systèmes ont été développés. Le premier est celui de Kattan, qui combine les symptômes au diagnostic, le sous-type histologique, la taille de la tumeur et le stade TNM (Kattan *et al.*, 2001). Un autre système majeur l'UISS, (*University of California, Los Angeles Integrated Staging System*) combine le stade TNM, le grade de Fuhrman et le statut ECOG et intègre une variante pour la maladie localisée et une variante pour la maladie métastatique (Zisman *et al.*, 2002). Le troisième système pronostique important est le SSIGN pour *Stage, Tumor Size, Fuhrman Grade et Tumor Necrosis*. Ce système a été mis au point uniquement pour les variétés histologiques à cellules claires. Il inclut des variables anatomiques et histologiques. Il n'inclut pas de variables cliniques, à la différence du modèle de Kattan et de l'UISS (Ficarra *et al.*, 2006). Karakiewicz a mis au point un nouveau système prédictif basé sur la classification TNM 2002, la taille tumorale définie comme une variable

continue, le grade de Fuhrman et la classification des symptômes dans le cancer du rein (Patard *et al.*, 2004; Karakiewicz *et al.*, 2007).

➤ *Dans les cancers du rein avancés*

Les différents modèles pronostiques élaborés jusqu'alors sont principalement des modèles prédictifs de la réponse à l'immunothérapie. Pour le cancer du rein métastatique, un des principaux modèles pronostiques qui a prouvé son utilité est le modèle du Groupe Français d'Immunothérapie. Il repose schématiquement sur le taux de polynucléaires neutrophiles circulants, sur l'intervalle de temps entre le diagnostic initial et la survenue de métastases, sur la présence de métastases hépatiques et sur le nombre de sites métastatiques.

Le deuxième modèle, plus largement utilisé, est celui de Motzer qui a subi quelques modifications depuis sa conception mais repose schématiquement sur les taux de LDH, d'hémoglobine, de calcium corrigé, sur l'index de Karnofsky et sur la réalisation préalable d'une néphrectomie (Motzer *et al.*, 1999).

6. Prise en charge thérapeutique

Au moment du diagnostic, environ 25 % des CCR sont métastatiques d'emblée (10 à 40 % selon les études) et 25 % des tumeurs localisées développeront ultérieurement des métastases, justifiant une surveillance régulière après la chirurgie. Les métastases se développent le plus souvent dans les 5 années qui suivent la chirurgie, le délai moyen d'apparition étant de 36 mois (Méjean et Lebreton, 2008). La prise en charge de la maladie et la stratégie thérapeutique choisie dépendent de plusieurs paramètres.

6.1 La chirurgie

Figure 2

La chirurgie d'une tumeur du rein consiste à enlever tout ou une partie du rein. On parle de néphrectomie totale ou de néphrectomie partielle (ou tumorectomie). Il s'agit du traitement de référence des tumeurs rénales quel que soit le stade. La néphrectomie partielle, quand elle est techniquement possible, doit toujours être privilégiée afin de préserver au maximum le rein du fait des conséquences à long terme de la néphrectomie totale, à savoir une insuffisance rénale et une fragilité du patient (Krabbe *et al.*, 2014).

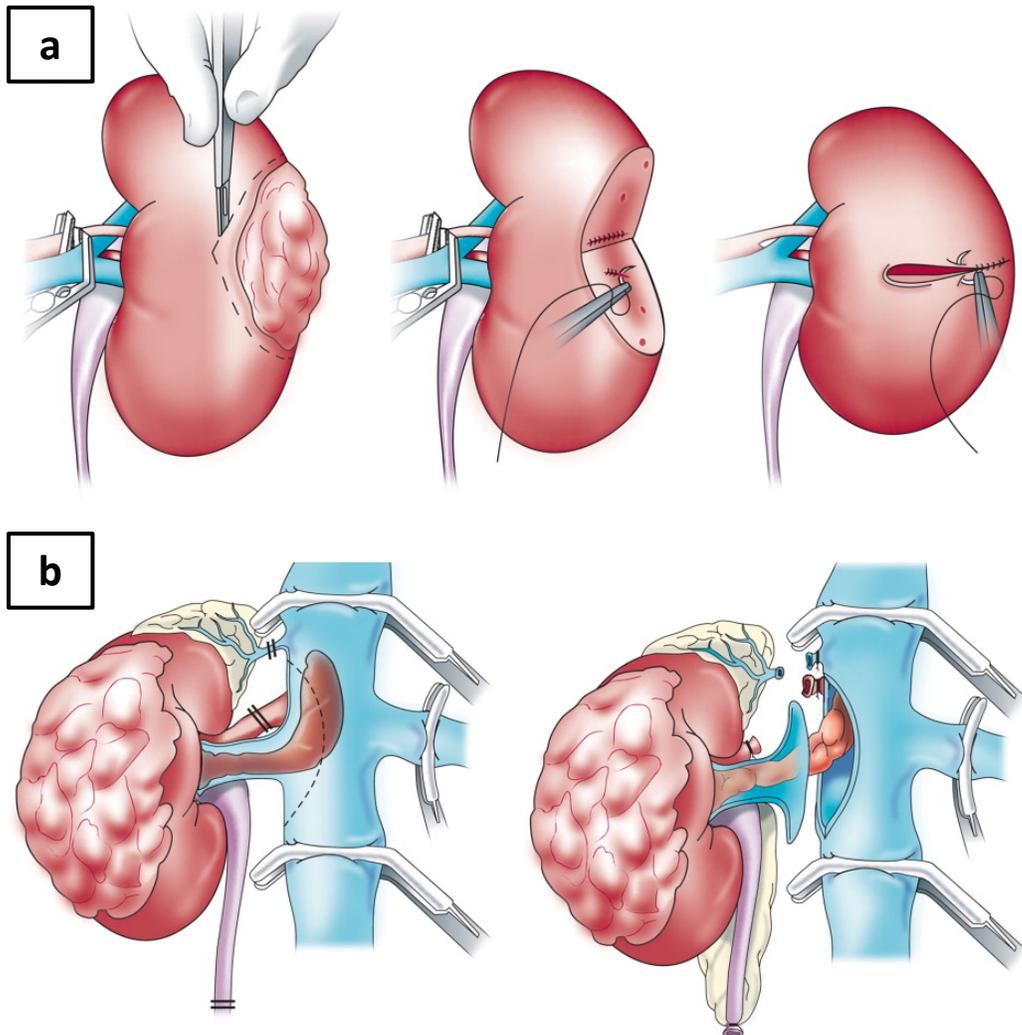


Figure 2: Chirurgie du CCR

La chirurgie est le traitement de référence dans le CCR. Il existe deux types de chirurgie. (a) La néphrectomie partielle pour les tumeurs localisées avec une occlusion temporaire du système vasculaire puis une résection de la tumeur avec un bord du parenchyme normal et une reconstruction du rein. (b) La néphrectomie radicale pour les tumeurs localement avancées: après mobilisation du rein et ligature de l'artère rénale, la veine rénale est excisée et l'incision est prolongée le long de la paroi antérieure de la veine cave inférieure. Le thrombus tumoral est ensuite éliminé et la cavotomie est suturée par des sutures vasculaires.

D'après Rini BII et al.,(2009). Renal cell carcinoma. Lancet; 372: 1119-32

➤ *Néphrectomie totale*

Lorsque la tumeur est de grande taille, le traitement de référence consiste à retirer la totalité du rein avec la graisse qui l'entoure ainsi que la glande surrénale. Cette intervention est parfois associée à un curage ganglionnaire ; on parle alors de néphrectomie totale élargie. Depuis sa description pour la première fois par Robson *et al* en 1969, la néphrectomie totale a été le traitement de référence des tumeurs rénales avec une intention curative pendant des décennies (Robson *et al.*, 1969). Cependant, elle s'est révélée être associée au développement d'une maladie rénale chronique et de morbidités apparentées, tels que la nécessité d'une hémodialyse, une maladie et une mortalité cardiovasculaires (Go *et al.* 2004; Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009).

➤ *Néphrectomie partielle*

Lorsque la tumeur est de petite taille, la néphrectomie partielle est privilégiée. L'intervention consiste à retirer la tumeur rénale entourée d'une marge de tissu sain. On parle alors de chirurgie conservatrice qui a pour but de préserver la fonction rénale (Campbell *et al.*, 2009). En termes de survie, les résultats sont similaires à ceux observés après néphrectomie totale. Elle est réservée aux patients présentant des indications impératives telles que un rein unique anatomique ou fonctionnel, des tumeurs bilatérales, des patients atteints d'une maladie rénale chronique ou présentant des prédispositions générales à une maladie rénale chronique comme le diabète, la sténose de l'artère rénale et la néphrosclérose, afin de prévenir le haut risque de dialyse (Novick, 1993).

Dans certaines situations, la chirurgie est déconseillée et une surveillance est mise en place en particulier chez les personnes âgées et les comorbides avec de petites masses tumorales où la mortalité liée au CCR est faible (Hollingsworth *et al.*, 2007; Lane *et al.*, 2010). La surveillance active est définie par la surveillance de la taille de la tumeur par imagerie abdominale en série avec intervention retardée réservée aux tumeurs montrant une progression clinique pendant le suivi (Volpe *et al.*, 2004).

➤ *Les techniques d'ablation non chirurgicales*

Depuis le milieu des années 1990, l'orientation vers des alternatives peu invasives a entraîné le remplacement de la chirurgie ouverte (néphrectomie radicale ou partielle) par des techniques laparoscopiques et maintenant avec des technologies ablatives non chirurgicales dans le but de réduire la morbidité post-opératoire. Plusieurs technologies ablatives ont été étudiées telles que la cryoablation, l'ablation par radiofréquence, qui consistent à détruire la tumeur par l'application respectivement de froid (cryothérapie) ou de chaleur (radiofréquence) (Kwan *et al.*, 2007).

6.2 Les traitements systémiques

Figure 3

6.2.1 Chimiothérapie

Le CCR est résistant à la chimiothérapie. Aucun avantage de survie n'a été démontré. Parmi les agents cytotoxiques les plus couramment utilisés, la vinblastine et le 5-fluorouracile (5-FU) ont montré des taux de réponse ne dépassant pas les 9%. Une étude a montré que le 5-FU est modérément efficace lorsque qu'il est combiné avec l'immunothérapie (Stadler *et al.*, 2003). Cependant, une autre étude a montré que l'interféron-alpha (IFN- α) seul a une efficacité équivalente à IFN- α + interleukine-2 (IL-2) + 5-FU (Gore *et al.*, 2010). En conclusion, la chimiothérapie n'est pas efficace et ne devrait pas être proposée dans le CCR métastatique.

6.2.2 Immunothérapie

L'immunothérapie à base d'IFN- α et d'IL-2 a été longtemps le traitement de référence du CCR métastatique, remplacée par les thérapies ciblées anti-angiogéniques. Et plus récemment, le développement des nouvelles immunothérapies à base d'inhibiteurs d'*immune checkpoint* a modifié les paradigmes de traitement du CCR.

6.2.2.1. INF- α et interleukine 2

L'IFN- α présente un taux de réponse de 6 à 15% (Motzer *et al.*, 2002; Coppin *et al.*, 2005), il ne peut être efficace que dans certains sous-groupes de patients, avec des facteurs de risque favorables, définis par le *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC).

L'interleukine-2 (IL-2) a été utilisé pour traiter le CCR depuis 1985, avec des taux de réponse allant de 7% à 27% (Rosenberg *et al.*, 1993; Fyfe *et al.*, 1995; McDermott *et al.*, 2005). Des réponses complètes et durables ont été obtenues avec l'IL-2 à haute dose (Yang *et al.*, 2003).

L'IFN- α et d'IL-2 sont associés à une grande toxicité, les manifestations les plus courantes sont le syndrome de fuites vasculaires capillaires conduisant à des œdèmes (pulmonaires) et à une hypotension chez 75 % des patients, le syndrome inflammatoire se traduisant par un syndrome grippal (fièvre, frisson, arthralgie), l'arythmie cardiaque, les troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées) et les troubles psychiatriques associant confusion et dépression (Coppin *et al.*, 2005). L'IL2 est sensiblement plus toxique que l'INF- α (Brahmer *et al.*, 2012).

a. Les inhibiteurs tyrosine kinase et de VEGF

b. Les inhibiteurs de PD-1 mTOR

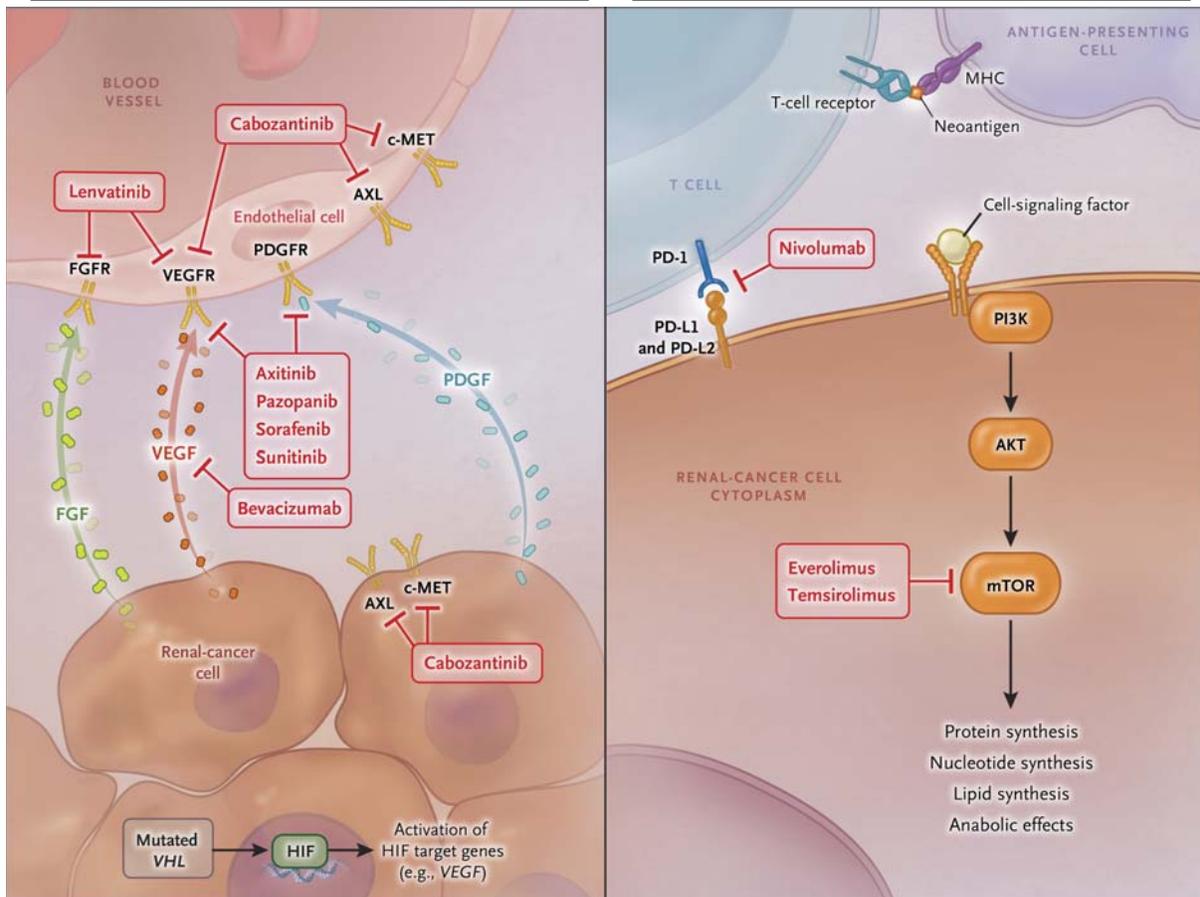


Figure 3: Thérapies systémiques du CCR métastatique

Les thérapies systémiques actuelles pour le CCR métastatique comprennent les thérapies ciblées et les immunothérapies. (a) Les inhibiteurs de tyrosine kinase Sorafénib, pazopanib, axitinib, cabozantinib et lenvatinib agissent notamment sur le VEGFR et ou PDGFR/FGFR /AXL/c-MET en ciblant la cellule cancéreuse rénale et/ou la cellule endothéliale. L'anticorps Bévacizumab neutralise le VEGF circulant ce qui empêche sa fixation sur son récepteur VEGFR. (b) Le blocage du récepteur PD-1 par nivolumab (en haut) permet la réactivation des cellules cytotoxiques T et la destruction des cellules tumorales. Évérolimus et temsirolimus (en bas) inhibent mTOR, ce qui entraîne plusieurs effets antinéoplasiques en aval.

FGFR, *fibroblast growth factor receptor*; VEGFR, *vascular epidermal growth factor receptor*; PDGFR, *platelet-derived growth factor*; HIF, *Hypoxia-inducible Factor*; VHL, *von Hippel-Lindau*; AKT, *serine/threonine protein kinase B*; PD-1, *programmed cell death protein 1*; PI3K, *phosphatidyl inositol 3 kinase*; mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*

D'après Toni K et al., *Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma*.

6.2.2.2. Vaccins

Il s'agit de vaccins à base de virus atténués qui expriment l'antigène tumoral 5T4 dans le but de stimuler le système immunitaire des patients. Un essai clinique de phase III n'a montré aucun bénéfice de survie de ces vaccins en combinaison avec une thérapie standard (Amato *et al.*, 2010).

6.2.2.3. Les inhibiteurs d'immune checkpoints

Il existe plusieurs points de contrôle pour bloquer l'activation du système immunitaire contre les cellules normales de l'organisme. Ces verrous, ou points de contrôle immunitaire, se mettent en place dès les premiers mois de la vie, et sont impliqués dans la tolérance immunitaire au soi. Les cellules tumorales, dans le cadre de leur stratégie de résistance et d'échappement tumoral face aux réactions immunes, sont capables d'utiliser ces points de contrôle pour inactiver la réponse immunitaire antitumorale et cela en exprimant à leur surface des protéines inhibitrices telles que PD-L1 qui bloque l'activation des cellules immunitaires. Le blocage des points de contrôle immunitaire avec les anticorps monoclonaux, est la nouvelle stratégie thérapeutique pour rétablir la réponse immunitaire antitumorale. Elle a pour objectif de bloquer le signal inhibiteur du récepteur PD-1 (*Programmed cell death 1*) à la surface des lymphocytes T ou son ligand PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) à la surface des cellules tumorales ou encore l'antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques 4 (CTLA-4) (Ribas, 2012). Parmi ceux qui ont été testés dans le CCR :

6.2.2.3.1. *Ipilimumab (Bristol-Meyers-Squibb)*

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre la protéine CTLA-4. Dans une étude de phase II (NCT00057889), l'ipilimumab a permis une régression tumorale chez certains patients atteints de CCR métastatique. Des réponses ont été observées chez des patients qui n'avaient précédemment pas répondu à l'IL-2. Cependant, une association très significative entre les événements auto-immuns et la régression tumorale a été retrouvée (Yang *et al.*, 2007).

6.2.2.3.2. *Nivolumab (Bristol-Myers-Squibb)*

Le nivolumab est un anticorps monoclonal ciblant le récepteur PD-1. Un essai randomisé de phase II avec le nivolumab chez des patients atteints de CCR métastatique a révélé un taux de réponse objective élevé avec des réponses rapides et durables chez des patients ayant reçu plusieurs traitements (Motzer *et al.*, 2015).

Un essai de phase III étudie actuellement la combinaison du nivolumab et de l'ipilimumab *versus* le sunitinib en traitement de première ligne (CheckMate 214, NCT 02231749) (Hammers *et al.*, 2015).

Un essai de phase III de nivolumab *versus* évérolimus après plusieurs lignes de thérapies ciblées (CheckMate 025, NCT01668784) a montré une survie globale plus élevée, une meilleure qualité de vie et moins d'événements indésirables de grade 3 ou 4 avec le nivolumab comparativement à l'évérolimus (Hammers *et al.*, 2015; Motzer *et al.*, 2015; Escudier *et al.*, 2017). Les résultats avec le nivolumab ont montré une survie globale supérieure à celle observée avec l'évérolimus dans le cancer rénal réfractaire aux thérapies ciblées avec une survie globale médiane de 25 mois pour le nivolumab et 19,6 mois pour l'évérolimus. Cependant, il n'y avait pas de bénéfice dans la PFS avec le nivolumab malgré l'augmentation de la survie globale. Les patients qui ont échoué à plusieurs lignes de thérapies ciblées ont été inclus dans cet essai rendant les résultats largement applicables. Le nivolumab est alors fortement recommandé après une ou deux lignes de thérapies ciblées dans le CCR métastatique.

6.2.2.3.3. Atézolizumab (Roche)

L'atézolizumab bloque le ligand, PD-L1. Dans une étude de phase I (NCT01375842), l'atézolizumab a montré un profil de sécurité gérable et une activité antitumorale prometteuse chez les patients atteints de CCR métastatique. La survie globale était de 28,9 mois et la PFS médiane était de 5,6 mois. Le taux de réponse objective était de 15%. Ces résultats ont conduit à d'autres études de combinaison avec l'atézolizumab dans le CCR (McDermott *et al.*, 2016).

La reconnaissance de la pertinence potentielle de l'immunothérapie comme approche de la gestion des CCR métastatiques augmente des résultats thérapeutiques prometteurs.

6.2.3 Thérapies ciblées

Dans le CCR sporadique, l'accumulation des facteurs induits par l'hypoxie (HIF) entraîne une surexpression des facteurs angiogéniques tels que le VEGF et le PDGF qui favorisent la néo-vascularisation et donc la progression tumorale (Patard *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2003). Ces découvertes majeures ont ouvert la voie au développement des thérapies anti-angiogéniques ciblées actuelles qui ont révolutionné le traitement du cancer du rein métastatique. Depuis 2007, plusieurs molécules ont été développées et approuvées pour traiter le CCR métastatique aux États-Unis et en Europe. La plupart des essais publiés ont été adoptés pour les sous-types CCC. Par conséquent, aucune recommandation ne peut être donnée pour les autres sous-types de CCR.

6.2.3.1. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

6.2.3.1.1. Sorafénib

Le sorafénib est un inhibiteur de tyrosine kinase multi-cible, administré par voie orale avec des effets sur la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Il inhibe Raf, VEGFR1/2/3 (*Vascular Epidermal Growth Factor Receptor*), PDGFR β (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*), Flt-3 (*Fms like*

tyrosine kinase 3), c-Kit, et RET (Wilhelm *et al.*, 2004; Carlomagno *et al.*, 2006). Un essai clinique de sorafénib contre placebo après l'échec de l'immunothérapie ou chez des patients inaptes à l'immunothérapie a montré une amélioration de la PFS et de la survie globale (Escudier *et al.*, 2007).

6.2.3.1.2. Sunitinib

Le sunitinib est un inhibiteur sélectif très puissant de protéines tyrosine kinase telles que le VEGFR1/2/3 et PDGFR α/β . Son activité antitumorale résulte de l'inhibition de l'angiogenèse et des effets antiprolifératifs directs sur les cellules tumorales (O'Farrell *et al.*, 2003). Le sunitinib en monothérapie de deuxième ligne (après les cytokines) a montré une réponse partielle chez 34-40% des patients et une stabilisation de la maladie > 3 mois chez 27-29% des patients (Motzer *et al.*, 2006). En monothérapie de première ligne, le sunitinib a montré une survie sans progression significativement plus élevée par rapport à l'IFN- α . La survie globale était plus grande chez les patients traités par sunitinib (26,4 mois) par rapport à INF- α (21,8 mois) malgré un croisement (Motzer *et al.*, 2009). Plusieurs schémas thérapeutiques ont été adoptés afin de réduire sa toxicité mais la toxicité reste comparable (Motzer *et al.*, 2012; Bracarda *et al.*, 2015).

6.2.3.1.3. Pazopanib

Le pazopanib est un inhibiteur de l'angiogenèse utilisé par voie orale et ciblant les récepteurs VEGFR, PDGFR et la protéine c-Kit (Hutson *et al.*, 2008). En traitement de première ligne ou après échec des cytokines, le pazopanib a montré une amélioration significative de la PFS et une réponse tumorale a été observée (Sternberg *et al.*, 2010). Un essai comparant pazopanib avec sunitinib (COMPARZ) a établi que le pazopanib peut être utilisé comme autre option thérapeutique de première ligne (Motzer *et al.*, 2013). Dans une étude de préférence pour les patients (PISCES), les patients ont préféré le pazopanib au sunitinib (70% contre 22%) en raison de la toxicité symptomatique (Escudier *et al.*, 2012).

6.2.3.1.4. Axitinib

L'axitinib est un inhibiteur puissant et sélectif de deuxième génération du VEGFR1/2/3. Il est actif à des concentrations de l'ordre du sous-nanomolaire. La puissance relative de l'axitinib est 50-450 fois supérieure à celle des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (TKI) de première génération. De plus, les autres cibles des TKI de première génération telles que le PDGFR, b-Raf, c-KIT ne sont pas sensiblement inhibées par l'axitinib. Ces activités hors cible sont probablement liées aux effets néfastes des TKI de première génération, ce qui suggère que l'axitinib pourrait avoir une fenêtre thérapeutique améliorée (Sonpavde *et al.*, 2008).

L'axitinib a d'abord été évalué comme traitement de deuxième intention après échec thérapeutique des cytokines ou d'une thérapie ciblée (sunitinib) (Rini *et al.*, 2011). Les résultats ont montré une PFS médiane plus élevée pour l'axitinib comparé au sorafénib mais sans différence significative pour la survie globale (Michaelson *et al.*, 2012; Motzer *et al.*, 2013). Dans un essai randomisé de phase III comparant l'axitinib vs le sorafénib dans le traitement en première intention, aucune différence significative dans la PFS médiane n'a été démontrée (Hutson *et al.*, 2013). À la suite de cette étude, l'axitinib n'a pas été approuvé pour la thérapie de première intention.

6.2.3.1.5. Cabozantinib

Le cabozantinib est un inhibiteur oral des récepteurs à activité tyrosine kinase, ciblant MET, VEGFR2 et AXL. Une étude de phase I chez des patients résistants aux TKI et aux inhibiteurs de mTOR a montré une réponse objective de 28% et une survie sans progression de 12,9 mois (Yakes *et al.*, 2011; Choueiri *et al.*, 2014). Sur la base de ces résultats, un essai randomisé de phase III a porté sur le cabozantinib *versus* évérolimus chez des patients atteints de CCC après échec à une ou plusieurs thérapies ciblées (METEOR) (Choueiri *et al.*, 2015). Le cabozantinib a prolongé la PFS par rapport à l'évérolimus de 42%. La PFS médiane pour le cabozantinib était de 7,4 mois contre 3,8 mois pour l'évérolimus avec une survie globale médiane de 21,4 mois avec cabozantinib et 16,5 mois avec l'évérolimus (Choueiri *et al.*, 2016).

6.2.3.1.6. Lenvatinib

Le lenvatinib est un TKI multi-cible oral de VEGFR1/2/3, FGFR1/2/3/4, PDGFR α , RET et de c-KIT. Il a récemment été étudié dans un essai randomisé de phase II seul ou en association avec l'évérolimus *versus* évérolimus seul (Matsui *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2013). Un bénéfice dans la PFS et de la survie globale a été observé pour la combinaison (Motzer *et al.*, 2015). Mais des effets indésirables graves de 3^{ème} grade se sont produits chez les patients traités avec l'association (45%) et les patients traités avec le lenvatinib seul.

6.2.3.1.7. Dovitinib

Le dovitinib (TKI258) est un inhibiteur de tyrosine kinase administré par voie orale. Il cible les récepteurs FGFR, VEGFR et PDGFR. Il a été testé en thérapie de troisième ligne après des résultats prometteurs de phase I et II. L'essai GOLD de phase III n'a malheureusement pas démontré une efficacité supérieure du dovitinib par rapport au sorafénib chez les patients atteints de CCR qui ont subi une progression de la maladie après avoir reçu des traitements TKI et inhibiteurs de mTOR (Motzer *et al.*, 2013).

6.2.3.2. Anticorps monoclonal contre le VEGF circulant : le Bévacizumab

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF circulant, neutralisant ainsi l'activation du VEGFR en amont. Il est administré par voie intraveineuse. Il est associé à l'INF- α en thérapie de première ligne dans le CCR avancé. L'étude AVOREN comparant le bévacizumab + IFN- α *versus* IFN- α en monothérapie dans le CCR, a montré une réponse globale plus élevée et une PFS médiane doublée pour l'association (Escudier *et al.*, 2010,2016). Les effets indésirables les plus fréquents associés au bévacizumab sont : l'hypertension, l'anorexie, la fatigue et une protéinurie.

6.2.3.3. Les inhibiteurs de la voie mTOR

6.2.3.3.1. Temsirolimus

Le temsirolimus est un inhibiteur spécifique de mTOR administré par voie intraveineuse (Larkin et Eisen, 2006). Il est utilisé en traitement de première ligne chez les patients atteints de CCR de mauvais pronostic selon un essai qui a montré une survie globale plus élevée comparé à l'IFN- α (Hudes *et al.*, 2008). Cependant, il n'est pas recommandé chez les patients réfractaires aux TKI sur la base des résultats de l'essai INTORSECT comparant le temsirolimus au sorafénib après échec au sunitinib et qui a montré un bénéfice significatif sur la survie globale pour le sorafénib (Hutson *et al.*, 2014).

6.2.3.3.2. Évériolimus

L'évérolimus est un inhibiteur de mTOR administré par voie orale. Il est préconisé pour le traitement de la maladie réfractaire aux TKI. L'étude RECORD-1 a comparé l'évérolimus au placebo avec les meilleurs soins de support chez des patients ayant précédemment échoué ou étant intolérant aux thérapies ciblées (Motzer *et al.*, 2008). Les résultats ont montré une PFS médiane de 4.9 mois pour l'évérolimus contre 2 mois pour le placebo (Motzer *et al.*, 2010).

6.2.4 Ce qu'il faut retenir concernant les traitements systémiques

Figure 4

Les essais cliniques ont établi avec preuve l'utilisation du sunitinib, du pazopanib et de l'association bévacizumab+IFN- α en première intention pour le traitement du CCC métastatique de bon ou intermédiaire pronostic. Pour le CCC de mauvais pronostic, il n'existe pas vraiment de preuves solides pour l'utilisation du temsirolimus.

En seconde ligne après échec d'une thérapie ciblée, l'évérolimus est recommandé comme une des options thérapeutiques (Motzer *et al.*, 2008).

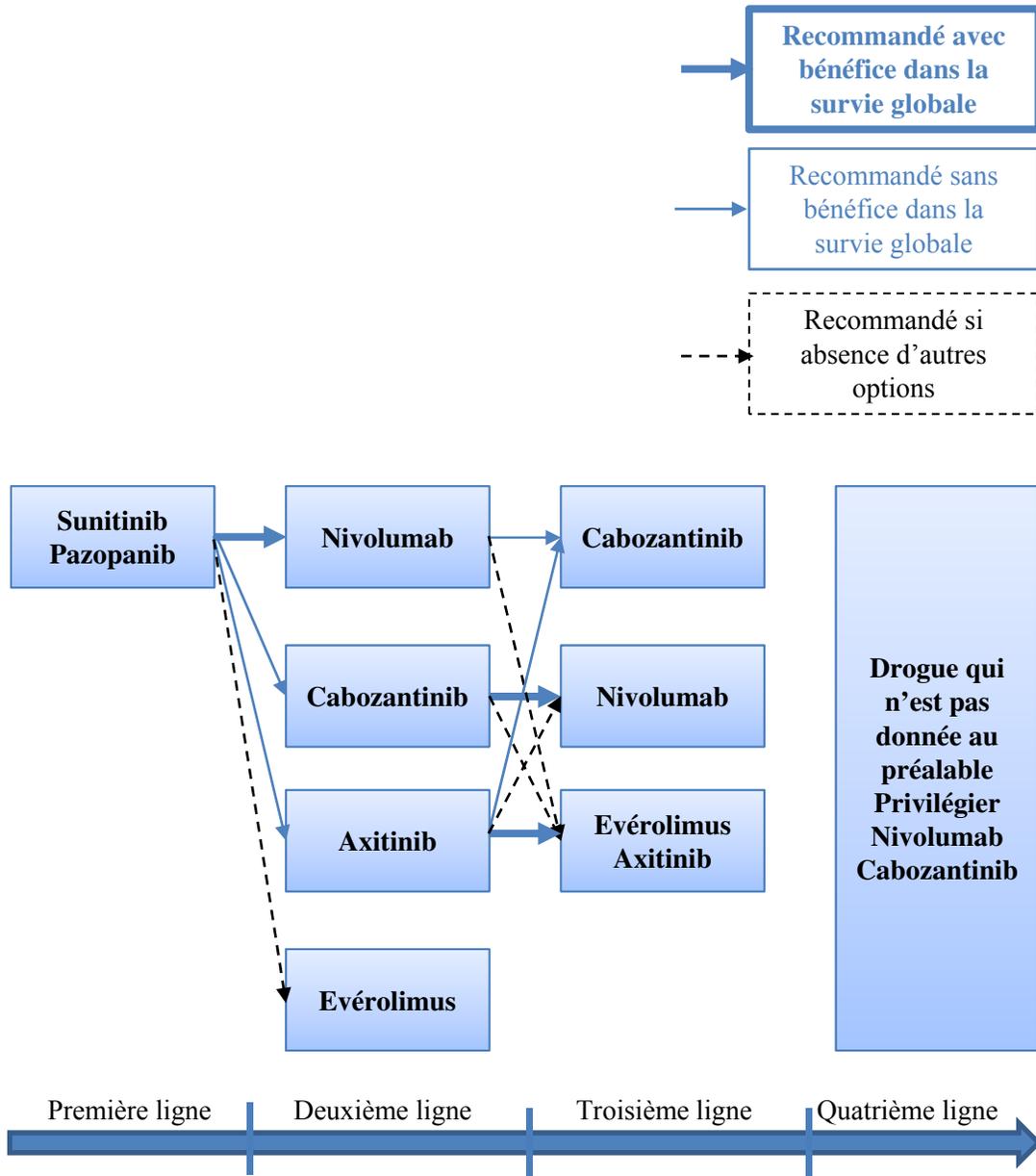


Figure 4: Recommandations de l'European Association of Urology pour les patients atteints de CCC métastatique

Le sunitinib ou le pazopanib sont utilisés en thérapie de première intention pour le CCC métastatique. Le cabozantinib et le nivolumab sont indiqués après échec à une ou plusieurs thérapies ciblées. L'axitinib ou l'évérolimus sont proposés aux patients qui ont échoué à la thérapie ciblée, et lorsque nivolumab ou cabozantinib ne sont pas sûrs, tolérables ou disponibles.

Le nivolumab et le cabozantinib devraient être considérés comme une nouvelle norme de traitement chez les patients de toutes les catégories de risque qui ont échoué à une ou plusieurs thérapies ciblées suite aux résultats supérieurs à l'évérolimus (Motzer *et al.*, 2015). Le nivolumab a montré un avantage significatif dans la survie globale par rapport à l'évérolimus, ainsi qu'un profil de tolérance attrayant. Le cabozantinib est le premier TKI à disposer à la fois d'une PFS et d'une survie globale supérieure à l'évérolimus.

En seconde ligne, il existe également l'axitinib qui a montré une survie sans progression supérieure au sorafénib dans le CCC réfractaire au sunitinib (Escudier *et al.*, 2012b). Ni le nivolumab ni le cabozantinib n'ont été testés directement comparativement à l'axitinib en traitement de deuxième ligne.

Les essais ont établi également l'utilisation du sorafénib, de l'axitinib et du pazopanib comme options thérapeutiques chez les patients qui progressent après une thérapie par cytokine.

Deux essais cliniques majeurs CheckMate 025 et METEOR, respectivement avec le nivolumab et le cabozantinib, ont modifié les paradigmes de traitement des CCR réfractaires aux TKI. Il existe une forte raison d'utiliser et de préférer ces deux médicaments en deuxième et troisième ligne après un échec d'une ou plusieurs thérapies ciblées.

Trois approbations supplémentaires de la FDA ont été accordées pour le CCR métastatique : un inhibiteur de VEGFR / MET / AXL (cabozantinib), un inhibiteur de PD-1 (nivolumab) et un inhibiteur multi-kinase (lenvatinib, approuvé avec évérolimus). Il reste à voir comment ces agents modifieront les estimations de survie globale pour le CCR, même si cela va certainement déplacer la barre dans une direction positive.

En dépit de ces progrès, la réalité est que la grande majorité des patients atteints de CCR métastatique demeure incurable.

7. La biologie du cancer du rein

La physiopathologie du cancer du rein reste encore mal élucidée. Le CCR représente un modèle de tumeurs épithéliales original et unique dans lequel il existe plusieurs anomalies génétiques récurrentes, d'où la complexité de la compréhension de la carcinogenèse rénale. L'étude des formes familiales de CCC a permis l'identification de gènes impliqués dans le développement de ces tumeurs. L'implication de ces gènes dans les formes sporadiques a secondairement été établie.

La connaissance de la tumorigenèse rénale permet de mieux comprendre la maladie pour préciser le pronostic et orienter les cliniciens dans le choix du traitement et l'amélioration du suivi des patients. La recherche actuelle a mis l'accent sur l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents au CCR. L'objectif étant de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces et moins toxiques que celles déjà disponibles ainsi que de nouveaux marqueurs pronostiques et diagnostiques. L'identification des voies/marqueurs régulant la prolifération, la différenciation et l'invasion cellulaires est un axe majeur pour définir de nouvelles options thérapeutiques dans le CCR.

7.1 Le système VHL/HIF

Figure 5

Sur le plan moléculaire, la majorité des CCC sporadiques et familiaux présentent des altérations au niveau du bras court du chromosome 3. Les anomalies les plus fréquentes concernent le locus 3p25-26 où se situe le gène VHL.

Le gène suppresseur de tumeur VHL a été cartographié en 1993 (Latif *et al.*, 1993). Les personnes atteintes de la forme héréditaire de ces tumeurs héritent d'un seul allèle mutant, et le développement de la tumeur se produit lorsque la deuxième copie de type sauvage est spontanément perdue ou inactivée. Cette perte se produit à travers une variété de mécanismes, tels que des mutations ponctuelles, des délétions ou l'hyperméthylation du promoteur (Prowse *et al.*, 1997). L'inactivation somatique du VHL est retrouvée dans 70% des cas sporadiques. Cette perte est un facteur critique dans la carcinogenèse de la quasi-totalité des CCC (Kaelin, 2004; Gerlinger *et al.*, 2014).

Le gène VHL est impliqué en particulier dans la réponse cellulaire adaptative à l'hypoxie. Il régule les facteurs HIF (*Hypoxia inducible factor*) par l'ubiquitinylation ciblée et la dégradation des sous-unités α (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α). La protéine pVHL se lie à l'élongine C, qui forme un complexe ubiquitine ligase E3 avec l'élongine B, Cullin-2 et Rbx1. Ce complexe catalyse la polyubiquitinylation de protéines spécifiques et les cible pour la dégradation protéosomale. Dans des conditions normoxiques, les sous-unités HIF α sont hydroxylées par des hydroxylases prolyl. C'est une réaction qui nécessite de l'oxygène. La protéine pVHL se lie alors à HIF α hydroxylé, en le ciblant pour la dégradation par son complexe de destruction attaché. En absence d'oxygène ou en cas d'inactivation de pVHL, les sous-unités HIF α sont stabilisées, accumulées et transloquées vers le noyau où elles forment des hétérodimères avec les sous-unités HIF β (ARNT pour *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) qui se lient à des éléments de réponse à l'hypoxie HRE (*hypoxia-responsive element*) et activent la transcription d'une panoplie de gènes cibles (Gossage *et al.*, 2015). Ces gènes cibles sont impliqués notamment dans l'angiogenèse (VEGF, PDGF, Adrénomédulline), le métabolisme cellulaire (GLUT1, GLUT3, hexokinase 2, phosphoglycérate kinase LDHA, phosphofructokinase 1, pyruvate

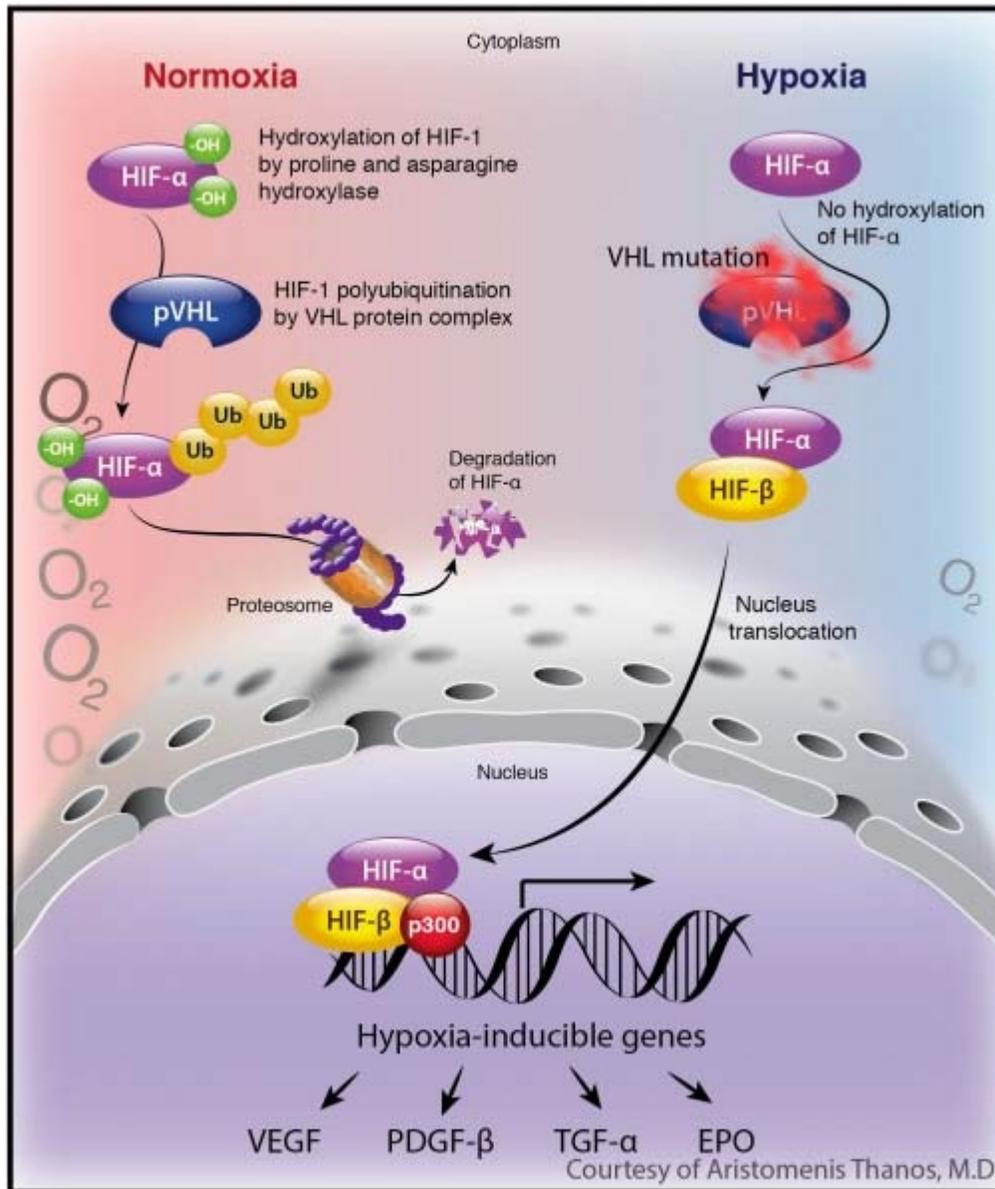


Figure 5: Système VHL/HIF

(a) Normoxie : en conditions normoxiques, les facteurs HIF-1 α sont hydroxylés et reconnus par le VHL qui fait partie d'un complexe E3 Ubiquitine ligase. Ils sont alors polyubiquitinylés puis dégradés par le protéasome.

(b) Hypoxie : en conditions hypoxiques, les facteurs HIF-1 α ne sont pas dégradés, ils s'accumulent dans le cytoplasme pour finalement être transloqués dans le noyau où ils se dimérisent avec leur sous-unité HIF-1 β et stimulent la transcription des gènes cibles impliqués notamment dans la prolifération, la survie et l'apoptose.

En cas de mutation de VHL, ce qui est le cas dans la plupart des CCC, les facteurs HIF-1 α ne sont plus dégradés quel que soit le niveau en oxygène.

TGF, *Transforming Growth Factor* ; EPO, érythropoïétine.

déshydrogénase, *Adipose differentiation-related protein*), la prolifération et la survie cellulaire (TGF α , EGFR), la chimiotaxie (SDF1, CXCR4), l'homéostasie cellulaire (CAIX) et la progression du cycle cellulaire (cycline D1) (Gossage *et al.*, 2015).

Les cellules mutantes en VHL subissent une pseudo hypoxie et une activation continue des cibles de l'hypoxie même en présence d'oxygène, ce qui est un facteur primordial pour la progression tumorale.

La compréhension de ces mécanismes moléculaires a servi de base à l'introduction de nouvelles thérapies ciblées dans le traitement standard du CCR avancé.

L'histoire de la maladie de von Hippel-Lindau et du gène VHL fournit un paradigme qui illustre la pertinence d'étudier les syndromes cancéreux héréditaires rares pour obtenir de nouvelles connaissances sur la biologie sous-jacente des cancers humains et pour aider au développement de nouvelles thérapies.

7.2 Les voies prolifératives/anti-apoptotiques

Figure 6

7.2.1. L'axe PI3K/Akt/mTOR

La voie de phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) / Akt est génétiquement altérée et activée dans plusieurs types de cancer et représente un conducteur majeur de la carcinogenèse. Il s'agit d'une voie proliférative et anti-apoptotique activée par une variété de stimuli extracellulaires, tels que les facteurs de croissance (EGF, PDGF IGF-1), qui se lient à leurs récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (RTK). La voie PI3K/Akt est composée de multiples cascades de kinases bifurquantes et convergentes, fournissant de nombreuses cibles potentielles pour les thérapies anticancéreuses comme mTOR. La sous-unité catalytique PI3K est l'oncogène le plus ciblé dans les thérapies anticancéreuses.

L'activation globale de la voie PI3K/Akt dans le CCC est élevée parmi tous les autres types de cancer (Akbari *et al.*, 2014). Les données de la TCGA (*the cancer genome atlas*) pour le CCC montrent un taux global d'altérations génétiques de 27,7%. La plupart des composants de la voie ont été identifiés avec des modifications génétiques de type amplification, mutations activatrices (mTOR) et des délétions (PTEN) (Weinstein *et al.*, 2013; Grabiner *et al.*, 2014).

Les études génomiques et protéomiques intégrées ont montré une activation de PI3K/Akt/mTOR par divers mécanismes dans le CCC. En plus des altérations génétiques, des dérégulations au niveau épigénétique, post-traductionnel sont également très répandues dans le CCC (Akbari *et al.*, 2014).

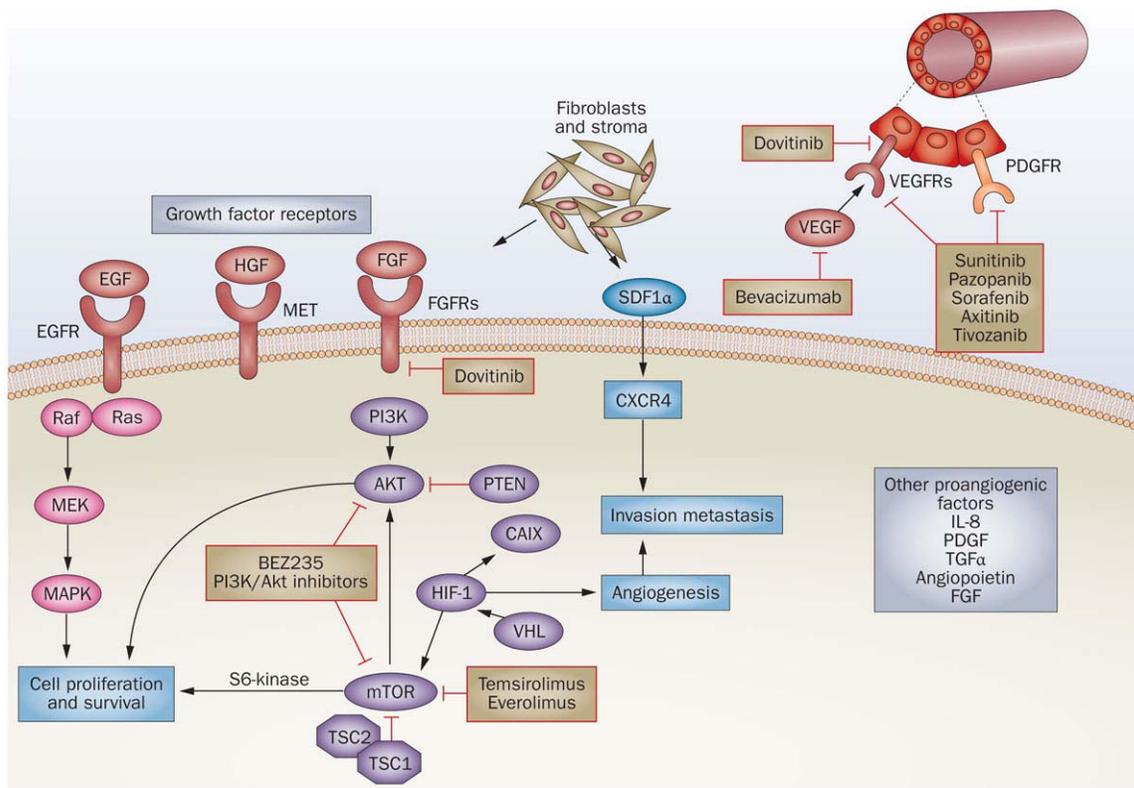


Figure 6: Voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse rénale

Implication de l'axe PI3/Akt/mTOR d'une part et de la voie des MAPK d'autre part dans les processus de prolifération et de survie. Les facteurs HIF interviennent dans l'activation de nombreux facteurs pro-angiogéniques qui favorisent la progression tumorale. La compréhension de ces mécanismes a permis le développement des thérapies ciblées actuelles.

EGF, *epidermal growth factor*; HGF, *hepatocyte growth factor*; FGF, *fibroblast growth factor*; SDF-1, *stromal cell-derived factor 1*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; PI3K, *phosphatidylinositol 3 kinase*; TSC, *tuberous sclerosis complex*.

D'après Bellmunt, J. et al. (2013) *Molecular targets on the horizon for kidney and urothelial cancer*. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* doi:10.1038/nrclinonc.2013.155

Les axes VHL/HIF et PI3K/Akt se chevauchent dans un grand réseau de signalisations et contribuent à la carcinogenèse rénale. L'accumulation des facteurs HIF due à la perte de VHL favorise l'expression de divers facteurs de croissance qui, à leur tour, activent la voie PI3K/Akt à travers les RTK. L'activation ultérieure de mTORC1 et mTORC2 favorise l'expression de HIF formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif et entraînant une activation constitutive des voies prolifératives et anti-apoptotiques. Par conséquent, les voies VHL/HIF et PI3K/Akt sont étroitement liées, et forment un grand réseau de signalisation contribuant à la carcinogenèse rénale et à la progression tumorale du CCR.

Les thérapies anti-angiogéniques actuelles ciblent plusieurs RTK en plus du VEGFR (Godley et Kim, 2002). Il est probable que ces médicaments ciblent également la voie PI3K/Akt dans les cellules cancéreuses et contribuent ainsi à l'inhibition de la croissance tumorale. De même, des inhibiteurs de mTOR (évérolimus, temsirolimus) ont été développés et constituent la deuxième génération des thérapies ciblées dans le CCR métastatique

7.2.2. Le Facteur nucléaire kappa B (NF-κB)

Le facteur nucléaire kappa B (NF-κB) est un facteur de transcription impliqué dans la croissance cellulaire, la motilité cellulaire et la vascularisation. Son rôle oncogénique est bien documenté dans tous les cancers. NF-κB joue un rôle orchestral en régulant tous les aspects importants de la biologie des cancers, notamment la résistance aux agents cytotoxiques en supprimant l'apoptose induite par les drogues.

L'activation de la voie NF-κB dans le CCR humain a été démontrée (Sourbier *et al.*, 2007). Il est activé de façon constitutive dans les tumeurs rénales et son inhibition *in vitro* et *in vivo* a bloqué la croissance tumorale en induisant l'apoptose cellulaire. Cette étude démontre les mécanismes responsables de la résistance intrinsèque du CCR à l'apoptose induite par les thérapies anticancéreuses conventionnelles.

Il a été montré que la surexpression de NF-κB induit la formation de structures kystiques au niveau du rein et leur transformation tumorale séquentielle.

De plus, le VHL qui se trouve inactivé dans 70% des cas de CCC joue un rôle régulateur négatif de NF-κB. En cas d'inactivation du VHL, l'expression et l'activité de NF-κB sont augmentées, contribuant ainsi à la progression tumorale (Qi et Ohh, 2003).

NF-κB constitue ainsi une cible prometteuse dans le cancer du rein réfractaire. Son inhibition comme stratégie thérapeutique potentielle fait l'objet d'une recherche intense, compromise par l'indisponibilité

d'inhibiteurs spécifiques et le rôle essentiel de NF- κ B dans le développement normal du système immunitaire qui doit être pris en compte soigneusement (Morais *et al.*, 2011).

7.2.3. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)

La glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) est une sérine-thréonine kinase ubiquitaire avec de nombreuses fonctions intracellulaires. Plusieurs études ont montré le rôle important de GSK3 dans la survie et la prolifération cellulaires médiées par NF- κ B dans de nombreux cancers (Ougolkov *et al.*, 2005; Ougolkov *et al.*, 2006).

Le CCR est résistant à la chimiothérapie en raison d'un seuil anti-apoptotique élevé. Des preuves récentes suggèrent que GSK-3 contribue à la chimiorésistance dans le cancer du rein. En effet, une surexpression nucléaire absolue de GSK-3 β dans la plupart des carcinomes rénaux humains a été retrouvée. Son inhibition entraîne une diminution de la prolifération et de la survie cellulaire dans le CCR. De plus, un effet anti-cancéreux synergique de l'inhibiteur de GSK-3 et du Docétaxel a été observé (Bilim *et al.*, 2009).

L'inhibition de GSK-3 supprime l'expression de Bcl-2 et XIAP médiée par NF- κ B conduisant à une diminution de la survie des cellules cancéreuses rénales. Effectivement, il a été démontré qu'une localisation efficace de NF- κ B sur le promoteur de certains gènes nécessite GSK-3 β (Steinbrecher *et al.*, 2005). GSK-3 contribue également au maintien de la chromatine active au niveau des promoteurs des gènes cibles de NF- κ B tels que Bcl-2 et XIAP (Ougolkov *et al.*, 2007).

GSK-3 représente donc une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement du CCR et son inhibition peut sensibiliser les cellules cancéreuses rénales aux agents chimiothérapeutiques classiques par induction de l'apoptose.

7.2.4. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)

La protéine apparentée à la PTH (PTHrP), découverte en 1987 par T.J. Martin, joue un rôle physiologique régulateur de la différenciation cellulaire, de la prolifération et de la mort cellulaires dans les cellules normales (Suva *et al.*, 1987). Cependant, elle est sécrétée par plusieurs cellules cancéreuses dans le cancer du sein et du poumon. Elle est responsable de l'hypercalcémie humorale maligne (HHM), un syndrome paranéoplasique associé à plusieurs cancers. D'un point de vue fonctionnel, elle mime les mêmes fonctions que la PTH, à savoir la résorption osseuse et l'augmentation de la réabsorption calcique rénale. En plus de son rôle dans la pathogénie du syndrome d'HHM, la PTHrP présente des fonctions physiologiques propres, en particulier pendant la vie fœtale (transfert transplacentaire de calcium) et au cours de la lactation. Le laboratoire d'accueil a montré pour la première fois le rôle primordial de la PTHrP dans la carcinogenèse rénale. Elle est surexprimée

dans le cancer du rein et joue un rôle oncogénique dans la croissance tumorale. Sa neutralisation induit une régression tumorale *in vivo* en favorisant l'apoptose cellulaire. Dans la même étude, il a été montré que le gène suppresseur de tumeur VHL régule négativement l'expression de la PTHrP au niveau post-transcriptionnel (Massfelder *et al.*, 2004 ; Sourbier et Massfelder, 2006). D'autres travaux ont montré le rôle de cette hormone dans le développement des métastases osseuses rénales (Soki *et al.*, 2012). Ces études ont identifié la PTHrP comme un facteur de croissance critique dans le CCR et suggèrent le potentiel thérapeutique de son ciblage dans le CCR.

7.2.5. GAS6/AXL

AXL, comme Tyro3 et Mer, appartient à la famille TAM des RTK où GAS6 est le ligand commun. Il a d'abord été identifié comme un gène transformant dans la leucémie myéloïde chronique. Gas6 (*Growth arrest-specific 6*) est une protéine dépendante de la vitamine K qui se lie à AXL avec une forte affinité. GAS6/AXL stimule de multiples cascades de signalisation impliquée dans l'adhésion cellulaire, l'invasion, la migration, la production de cytokines pro-inflammatoires, la prolifération et la survie (Korshunov, 2012). De plus, il a été montré que AXL régule l'homéostasie du muscle lisse vasculaire, la migration des cellules endothéliales et la formation du réseau vasculaire (Collett *et al.*, 2007). Les principales cibles activées par AXL dans différents types de cellules comprennent la PI3-K, AKT, S6K, Src, ERK, p38 MAPK et NF- κ B, connues pour leur rôle oncogénique dans de nombreux cancers (Hafizi et Dahlbäck, 2006). La surexpression du récepteur AXL a été retrouvée dans de multiples tumeurs malignes telles que les cancers du poumon, de l'ovaire, de l'estomac et du foie. Un niveau d'expression élevé est retrouvé dans la métastase comparativement à la tumeur primaire. AXL est également associé à un mauvais pronostic (Verma *et al.*, 2011). Il a été montré que la voie AXL participe à la progression tumorale en résistant à l'apoptose des cellules tumorales et en favorisant leur migration et leur invasion (Han *et al.*, 2013). L'expression d'AXL est augmentée dans le CCR par rapport au tissu rénal normal (Chung *et al.*, 2003) et cette augmentation est corrélée à la progression tumorale et à une survie courte (Gustafsson *et al.*, 2009). Plus récemment, un rôle pour AXL dans la régulation des récepteurs MET et EGFR a été décrit. En outre, la signalisation AXL est essentielle à l'activation de la voie PI3K/AKT par voie du VEGF et à la migration des cellules endothéliales (Ruan et Kazlauskas, 2012). Toutes ces données font penser que AXL peut être impliqué dans la résistance induite par les TKI et qu'il y a un intérêt thérapeutique de son ciblage. Effectivement dans un modèle de résistance au sunitinib chez des souris *nude* portant des tumeurs de CCC, il a été montré que le sunitinib induit une augmentation de l'expression d'AXL ainsi que ses cibles. Le traitement avec le cabozantinib, un TKI qui cible MET et AXL, entraîne une régression tumorale après résistance au sunitinib (Zhou *et al.*, 2016).

Le cabozantinib a été approuvé par la FDA en avril 2016 pour le traitement du cancer rénal avancé, prétraité avec au moins un TKI. Il s'agit du premier agent thérapeutique dans le CCR métastatique qui

a montré une amélioration dans les trois paramètres de l'efficacité clinique à savoir le taux de réponse, la survie sans progression et de la survie globale dans un essai randomisé de phase III (Abdelaziz et Vaishampayan, 2017).

Là encore, ceci argumente l'importance de la compréhension de la carcinogenèse rénale pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

7.2.6. La voie MET

Le gène *MET* code pour un récepteur tyrosine kinase, largement exprimé dans la phase initiale du développement et son expression persiste tout au long de l'âge adulte (Birchmeier *et al.*, 2003). Un rôle dans le développement rénal a été identifié. L'absence de MET pendant le développement entraîne une réduction de la ramification du bourgeon urétéral et une diminution du nombre de néphrons (Woolf *et al.*, 1995).

L'expression de MET est augmentée après une insuffisance rénale, en tant que mécanisme général de réparation et de régénération des tissus après les lésions tissulaires (Matsumoto et Nakamura, 2001). Il existe une diaphonie entre l'axe de signalisation MET et plusieurs autres voies de signalisation telles que Src, STAT3, PIK3/Akt et Ras/MEK. L'activation constitutive de la voie MET est retrouvée dans plusieurs cancers humains comme les cancers mammaires, colorectaux, pulmonaires, pancréatiques, hépatiques et ovariens (Peters et Adjei, 2012). Cette activation peut résulter de divers mécanismes moléculaires, y compris les mutations germinales ou somatiques, le réarrangement chromosomique, l'amplification au niveau du gène MET, la régulation à la hausse de la transcription de MET ou à travers une boucle autocrine ou paracrine dépendante du ligand facteur de croissance des hépatocytes (HGF). Ces modifications peuvent être observées seules ou combinées. L'expression élevée de MET est souvent observée dans les carcinomes à phénotype agressif et associés à un mauvais pronostic comme le cancer de la vessie du poumon du foie.

Dans le cancer du rein, des mutations activatrices de *MET* sont typiques dans le CCR papillaire héréditaire et sont retrouvées dans 13% des CCR papillaires sporadiques. Outre le CCR papillaire, une augmentation d'expression de MET a également été observée dans le CCC.

L'augmentation de MET total ainsi que de phospho-MET sont associés à un mauvais pronostic dans les CCR (Gherardi *et al.*, 2012). Une autre étude a montré une corrélation entre le niveau d'expression de MET et son ligand HGF avec une survie courte (Betsunoh *et al.*, 2007). Une étude récente a montré une corrélation entre le nombre de copies de gène MET et l'agressivité de la maladie (Macher-Goeppinger *et al.*, 2016). L'inhibition de la signalisation MET apparaît donc comme une approche

prometteuse dans le CCR métastatique (Birchmeier *et al.*, 2003; Gherardi *et al.*, 2012; Peters et Adjei, 2012).

Les résultats finaux récemment publiés de l'essai METEOR montrent l'efficacité du cabozantinib, un TKI multi-cible incluant MET comme précisé avant, pour le traitement du CCC métastatique chez des patients ayant reçu une ou plusieurs thérapies anti-angiogéniques (Abdelaziz et Vaishampayan, 2017).

7.3 Les voies développementales

Comme détaillé ci-dessus, les voies prolifératives, anti-apoptotiques et angiogéniques, PI3K/Akt/mTOR et NF- κ B sont constitutivement actives et oncogéniques dans le CCC et jouent un rôle majeur dans la carcinogenèse rénale. Ces voies, ainsi que leurs cibles bifurquent et convergent avec les voies développementales. Les diverses investigations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse font penser qu'il existe une similitude mécanistique entre tumorigenèse et embryogenèse. Sur la base de ces observations, l'hypothèse a été émise que les cellules tumorales réactivent et/ou réexpriment des voies et des marqueurs du développement pour le maintien de la croissance et l'échappement à la mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques.

7.3.1. La voie du Sonic Hedgehog SHH

Figure 7

Le gène Hedgehog (HH) a été découvert en 1980 par Nusslein-Volhard et Wieschaus grâce à une analyse génétique de la drosophile (Nüsslein-Volhard et Wieschaus, 1980). Au début des années 1990, trois homologues du gène HH ont été décrits chez des vertébrés: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH), et Desert Hedgehog (DHH) (Echelard *et al.*, 1993; Krauss *et al.*, 1993; Roelink *et al.*, 1994). Il s'agit de trois ligands distincts de la voie HH. DHH et l'IHH jouent un rôle important dans le développement normal des tissus et l'organogenèse (Roelink *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 2002). SHH est le ligand le plus puissant et le plus largement exprimé dans les tissus adultes (Pathi *et al.*, 2001). La voie SHH joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et elle est essentielle pour le maintien de la polarité des tissus adultes. Il a été démontré que SHH est le ligand oncogénique dominant de la voie HH, son expression ectopique était suffisante à induire un carcinome basocellulaire chez la souris (Oro *et al.*, 1997). La voie SHH est étroitement régulée dans la plupart des tissus adultes et son hyperactivation est corrélée à de nombreuses transformations malignes (Lum et Beachy, 2004).

Après sécrétion, les glycoprotéines SHH lient et inactivent le récepteur Patched (PTCH) à 12 domaines transmembranaires. PTCH contrôle et inhibe l'activité du récepteur couplé à la protéine G Smoothened (SMO) à 7 domaines transmembranaires. Ainsi, en présence du ligand SHH, l'inhibition

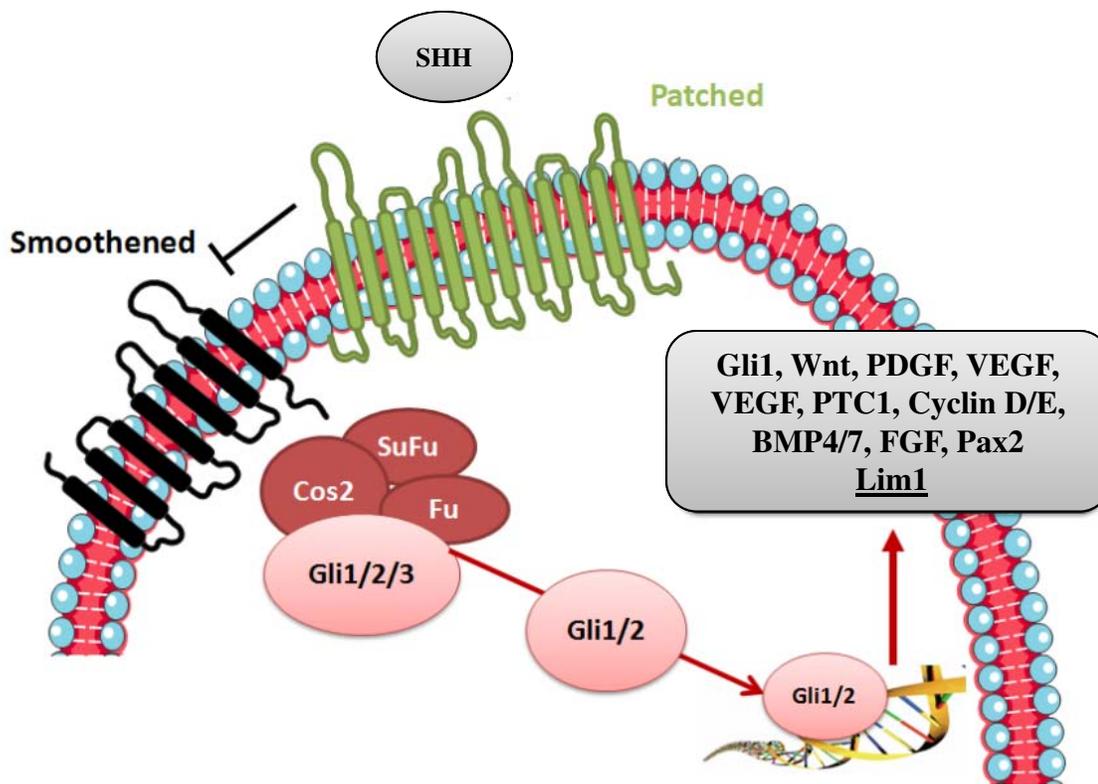


Figure 7: La voie Sonic Hedgehog

En absence du ligand de la voie HH, le récepteur Patched réprime l'activité du récepteur Smoothened. En présence du ligand SHH, la voie est activée par levée de l'inhibition de Patched sur Smoothened, les facteurs de transcriptions Glis vont être activés et vont transloquer dans le noyau pour leurs gènes cibles.

BMP, *Bone Morphogen Protein*; Cos, *costal 2*; SuFu, *Fused homolog* ; SHH, *Sonic Hedgehog*; Gli, *Glioma-associated oncogene homolog*, PTC1, *Patched*. (Dormoy, 2010).

de PTCH sur SMO est levée, ce qui entraîne la translocation nucléaire des facteurs de transcription GLI (*Glioma-associated oncogene homologue*), les effecteurs terminaux de la signalisation SHH.

En absence du ligand, le SUFU (*Suppressor of Fused*) régule négativement la voie en se liant directement aux facteurs de transcription GLI et en les ancrant dans le cytoplasme empêchant leur translocation dans le noyau (Kogerman *et al.*, 1999; Cheng et Bishop, 2002; Paces-Fessy *et al.*, 2004). La séquestration cytoplasmique des facteurs GLI par SUFU facilite le traitement et la dégradation des protéines GLI, ce qui bloque la signalisation de la voie SHH. Chez les vertébrés, il existe trois facteurs de transcription GLI : GLI1, GLI2 et GLI3. GLI1 est le seul activateur transcriptionnel complet de la voie. GLI2 et GLI3 agissent comme régulateurs positifs ou négatifs.

Les facteurs de transcription GLI peuvent activer de nombreux gènes cibles impliqués dans le rétrocontrôle de la voie SHH (GLI1, PTCH1), la prolifération (Cyclin-D1, Myc), l'apoptose (Bcl-2), l'angiogenèse (ANG1/2), la transition épithélio-mésenchymateuse (Snail) et l'auto-renouvellement de cellules souches (NANOG, SOX2) (Hui et Angers, 2011; Scales et de Sauvage, 2009; Stecca et Ruiz I Altaba, 2010). De ce fait, la voie SHH interagit avec diverses voies prolifératives telles que PI3K/Akt, NF- κ B, les voies MAPK qui sont directement liées à la carcinogenèse et à la progression tumorale.

De nombreuses études ont montré l'implication de la voie SHH dans plusieurs cancers mais c'est le laboratoire d'accueil qui a montré pour la première fois son implication dans le CCR. Effectivement, ces travaux ont établi que la voie est constitutivement exprimée et activée dans le CCC humain. Cette activation est liée à une expression élevée de SMO et des facteurs de transcriptions Gli dans les tumeurs de CCC par rapport aux tissus normaux correspondants.

De plus, il a été montré que la voie de signalisation SHH favorise la croissance des cellules tumorales en stimulant essentiellement la prolifération cellulaire et secondairement la survie cellulaire. De façon intéressante, l'inhibition de la signalisation SHH par la cyclopamine a induit une régression tumorale chez les souris *nude* xéno greffées en sous-cutané de CCC humain et cet effet inhibiteur sur la croissance tumorale a perduré longtemps après l'arrêt du traitement. Une diminution de la vascularisation tumorale a été également observée, suggérant que la voie SHH stimule l'angiogenèse dans le CCR humain, probablement en régulant l'expression des facteurs angiogéniques VEGF et TGF- β , sous le contrôle transcriptionnel de la voie SHH (Dormoy *et al.*, 2009). En outre, dans ces travaux, diverses cibles de Gli ont été mises en évidence pour la première fois telles que : SHH, Gli1 et les facteurs développementaux Pax-2 et Lim1. Ces travaux indiquent que la voie SHH est une voie de signalisation importante impliquée dans la tumorigenèse rénale et que son inhibition pourrait représenter une approche thérapeutique nouvelle dans le CCR humain.

L'identification du facteur de transcription développemental et néphrogénique Lim1 comme une cible de la voie SHH-Gli a été la base de mon travail de thèse.

7.3.2. Les gènes Pax-2/8

La famille de gènes Pax compte 9 membres chez l'homme et chez la souris. Ce sont des facteurs régulateurs de la transcription caractérisés par la présence d'un domaine « *paired* » de liaison spécifique à l'ADN exerçant une activité régulatrice dans plusieurs tissus au cours du développement embryonnaire. Dans le système urogénital, Pax-2/8 sont des acteurs essentiels dans plusieurs étapes du développement du rein et des voies urinaires (Patel *et al.*, 2014). Ils sont impliqués dans des processus importants tels que la survie cellulaire, les décisions de lignage cellulaire et les interactions tissulaires par la régulation d'un réseau très complexes de gènes cibles. La réactivation de l'expression de Pax-2 dans les cellules épithéliales du rein adulte est observée lors de la réparation tissulaire du rein. Elle est également associée à un certain nombre de maladies, y compris le cancer et la maladie rénale polykystique (Sharma *et al.*, 2015). En effet, Pax-2/8 sont réexprimés à des niveaux élevés dans plusieurs cancers du système urogénital et l'immunomarquage est largement utilisé pour le diagnostic de tumeurs rénales primaires et métastatiques (Ordóñez, 2012; Ozcan *et al.*, 2012). La réactivation de l'expression de Pax-2/8 a été retrouvée également dans les tumeurs pédiatriques de Wilms, dans presque tous les sous-types de carcinome rénal (RCC) (80% des tumeurs) ainsi que dans les adénomes néphrogènes (Ozcan *et al.*, 2012). Les mécanismes qui activent l'expression de ce gène développemental pendant la transformation maligne sont largement inconnus. Certains travaux ont proposé que l'expression de Pax-2 dans le CCC peut être induite par les facteurs HIF et la perte du VHL (Luu *et al.*, 2009).

Plusieurs études suggèrent que ces gènes Pax agissent comme des facteurs anti-apoptotiques et confèrent aux cellules tumorales une résistance à l'apoptose, en cohérence avec leur rôle lors du développement embryonnaire. En effet, l'inhibition de l'expression de Pax-2/8 dans le CCR, inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose (Gnarra et Dressler, 1995; Hueber *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent la possibilité intéressante d'exploiter Pax-2/8 comme des cibles thérapeutiques dans le cancer du rein.

Ce rôle dans la survie cellulaire explique le rôle oncogène des gènes Pax dans les tumeurs rénales. Les analyses des éléments cis-régulateurs suggèrent que Pax-8 active directement l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl2 et que Pax-2 active le gène inhibiteur d'apoptose Naip1 (Dziarmaga *et al.*, 2006). Une autre étude a rapporté que Pax-2 pouvait réguler négativement PTEN et par conséquent médier l'activation de la voie de survie PI3K /Akt et la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses rénales (Fonsato *et al.*, 2006).

Un nombre croissant d'études suggèrent que les gènes Pax peuvent favoriser la progression tumorale en régulant l'expression des gènes impliqués dans l'EMT et le cycle cellulaire. Il a été démontré que Pax-2 active directement l'expression du gène ADAM10 dans les cellules cancéreuses rénales (Doberstein *et al.*, 2011). L'ADAM10 est également surexprimé dans les CCR et joue un rôle dans le clivage de protéines importantes impliquées dans l'EMT et l'invasion telles que la molécule d'adhésion L1-CAM et le récepteur tyrosine kinase c-MET.

7.3.3. La voie Notch

La signalisation Notch est une voie de communication cellulaire directe essentielle pour la prolifération, l'apoptose et les décisions de devenir des cellules souches pendant le développement embryonnaire (Fischer *et al.*, 2004). Chez les mammifères, il existe 5 ligands (Delta-like : Dll-1, Dll-3, Dll-4 et Jagged: Jagged-1, Jagged-2) et 4 récepteurs Notch1/2/3/4, tous constitués de protéines transmembranaires. L'activation du récepteur Notch entraîne la libération du domaine NICD (*Notch intracellular domain*) dans le noyau, activant par la suite les gènes cibles apparentés (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Des nombreuses études suggèrent que cette voie favorise la prolifération, la survie, l'auto-renouveau, la différenciation, l'angiogenèse et la migration des cellules cancéreuses dans plusieurs tumeurs malignes (Büchler *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012).

Paradoxalement, une autre étude a rapporté que cette voie peut jouer un rôle suppresseur de tumeurs dans certains cancers comme les tumeurs cérébrales (Giachino *et al.*, 2015). Par conséquent, les rôles spécifiques de la voie Notch dans le développement tumoral peuvent dépendre du type de tumeurs. Il est rapporté que Notch1, Notch3 et Jagged1 sont fortement exprimés dans le CCR et le blocage de la signalisation Notch peut supprimer sa croissance (Rae *et al.*, 2000; Sjölund *et al.*, 2008). De plus, l'expression élevée de Jagged1 est corrélée à un mauvais pronostic dans le CCR (Wu *et al.*, 2011). CXCR4, qui joue un rôle primordial dans la dissémination métastatique, trouve son expression augmentée dans plusieurs échantillons de CCR humain (Schrader *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2006). Une étude a démontré que Notch1 favorise la dissémination métastatique de CCR *via* une surexpression de CXCR4 (Xiao *et al.*, 2017).

Ainsi, il est suggéré que l'activation aberrante de la signalisation Notch peut augmenter les capacités invasives, migratoires, prolifératives et anti-apoptotiques des cellules cancéreuses rénales, ce qui favorise le développement et la progression tumorale dans le CCR. La voie Notch constitue alors une cible thérapeutique potentielle dans le CCR humain.

7.3.4. La voie Wnt

L'implication de la voie Wnt dans le CCR est le sujet de plusieurs investigations. La famille Wnt comprend 19 glycoprotéines sécrétées, qui régulent la prolifération cellulaire, la différenciation, la

survie, la migration et l'auto-renouveaulement des cellules souches (Anastas et Moon, 2012). La signalisation Wnt et ses gènes cibles sont connus pour participer activement à différents processus biologiques de la vie embryonnaire et sa dérégulation est responsable de plusieurs maladies dégénératives (Clevers et Nusse, 2012). Son rôle dans la néphrogenèse rénale est bien établi. Elle joue un rôle crucial dans l'organogenèse rénale et la formation du bourgeon urétéral. Les études classiques de *knock-out* chez des embryons provoquent des phénotypes rénaux graves et une létalité (Pietilä *et al.*, 2016).

Il a été démontré que la signalisation Wnt contribue activement au développement du CCR à travers diverses fonctions cellulaires telles que la survie, la prolifération, la migration et l'invasion et que son inhibition dans le CCR inhibe la croissance tumorale (Saini *et al.*, 2011; Majid *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016).

L'activation de la voie de signalisation Wnt modifie l'expression de plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur dans le CCR soit directement, soit par interaction avec d'autres voies. Parmi les gènes régulés par Wnt et retrouvés dérégulés dans les tissus de CCC, on retrouve l'oncogène c-Myc et le régulateur du cycle cellulaire, la cycline D1.

Le rôle important de la signalisation Wnt dans le CCR est également mis en évidence par le fait que l'expression de différents composants de la voie est modifiée dans le CCR humain. En effet, une expression élevée de Wnt1 est associée à un stade avancé (Kruck *et al.*, 2013). Une surexpression de Wnt10A a été également observée dans les tissus tumoraux rénaux, étant un facteur de risque indépendant pour la carcinogenèse rénale (Hsu *et al.*, 2012). Le niveau d'expression des récepteurs Fzd5 et Fzd8 a été retrouvé augmenté dans le CCR, ainsi que de leur cible en aval comme la cycline D1 (Janssens, *et al.*, 2004). L'expression altérée de β -caténine a également été détectée. La β -caténine cytoplasmique a été identifiée comme le candidat le plus prometteur associé à un stade avancé et un statut clinique défavorable chez les patients atteints de CCR.

Tous ces éléments mettent en évidence la contribution de la voie Wnt dans la carcinogenèse rénale et sa progression tumorale et que ses acteurs représentent des candidats majeurs pour de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ce cancer réfractaire (Xu *et al.*, 2016).

➤ Conclusion

La caractérisation moléculaire du CCR a permis d'identifier les gènes conducteurs et les voies moléculaires spécifiques de la tumeur, ce qui a permis de mieux comprendre la maladie. Cette compréhension a révolutionné le traitement pour les patients atteints de la maladie métastatique. Malgré ces progrès, de nombreux patients ne répondent pas d'emblée ou développeront une résistance

conduisant à un échec thérapeutique. La cause principale de cette résistance au traitement est l'hétérogénéité tumorale qui représente un obstacle apparemment insurmontable.

L'hétérogénéité des tumeurs englobe des variables génétiques, épigénétiques et micro-environnementales. La tumeur rénale diffère spatialement au sein d'une tumeur ainsi que chez les patients. Les efforts génomiques sur l'hétérogénéité intratumorale génétique confirment l'évolution ramifiée avec des sous-clones résistants devenant dominants dans le temps.

L'hétérogénéité tumorale est extrêmement complexe et pose des défis pour le diagnostic et le traitement du cancer du rein. Il faut penser à passer peut être de l'approche thérapeutique unique à un traitement personnalisé basé sur le profil moléculaire de chaque individu (Hsieh *et al.*, 2016).

II. Généralités sur le rein

1. Structure du rein

Figure 8

Les reins font partie de l'appareil urinaire qui comprend la vessie, les uretères (deux longs canaux qui relient les reins et la vessie) et l'urètre (un autre canal qui relie la vessie à l'extérieur). Chaque rein, dont la forme ressemble à celle d'un haricot, mesure environ 12 centimètres de hauteur, 6 centimètres de largeur et 3 centimètres d'épaisseur.

Les reins se situent dans l'espace rétropéritonéal où ils se projettent par leur face postérieure dans la région lombaire. Ils sont placés entre la 11^{ème} vertèbre thoracique et la 3^{ème} lombaire pour le rein gauche et la 12^{ème} vertèbre thoracique et l'espace entre la 3^{ème} et la 4^{ème} lombaire pour le rein droit à cause de la pression du foie sus-jacent.

Le rein se compose de plusieurs parties :

- la capsule : l'enveloppe externe qui protège le rein.
- le parenchyme rénal : cette partie renferme environ un million de petites structures appelées néphrons. La partie périphérique du parenchyme est le cortex alors que la partie centrale est la médulla.
- les calices et le bassinnet qui représentent les cavités où est collectée l'urine. Une fois formée par les néphrons, l'urine est d'abord recueillie dans les calices puis elle s'écoule dans le bassinnet puis dans l'uretère.

Le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle du rein. Chaque rein humain contient environ un million de néphrons et chaque néphron est constitué de deux structures, un corpuscule rénal et un système tubulaire. Le corpuscule rénal est la portion initiale du néphron, de forme sphérique où s'effectue le filtrage du plasma. Le corpuscule rénal est la réunion d'une composante vasculaire (le glomérule) et d'une composante épithéliale (la capsule de Bowman). Le système tubulaire consiste en une succession de tubules droits et contournés. Il est constitué de trois parties : le tube contourné proximal, l'anse de Henlé (situé dans la médulla, en forme de U) et le tube contourné distal. Le tube contourné distal se jette dans le tube collecteur. Ce dernier dérive embryologiquement du bourgeon urétéral (et non du blastème métanéphrogène comme le néphron) et n'est pas considéré comme faisant partie du néphron. L'ensemble néphron et tube collecteur forment une unité appelé tube urinifère.

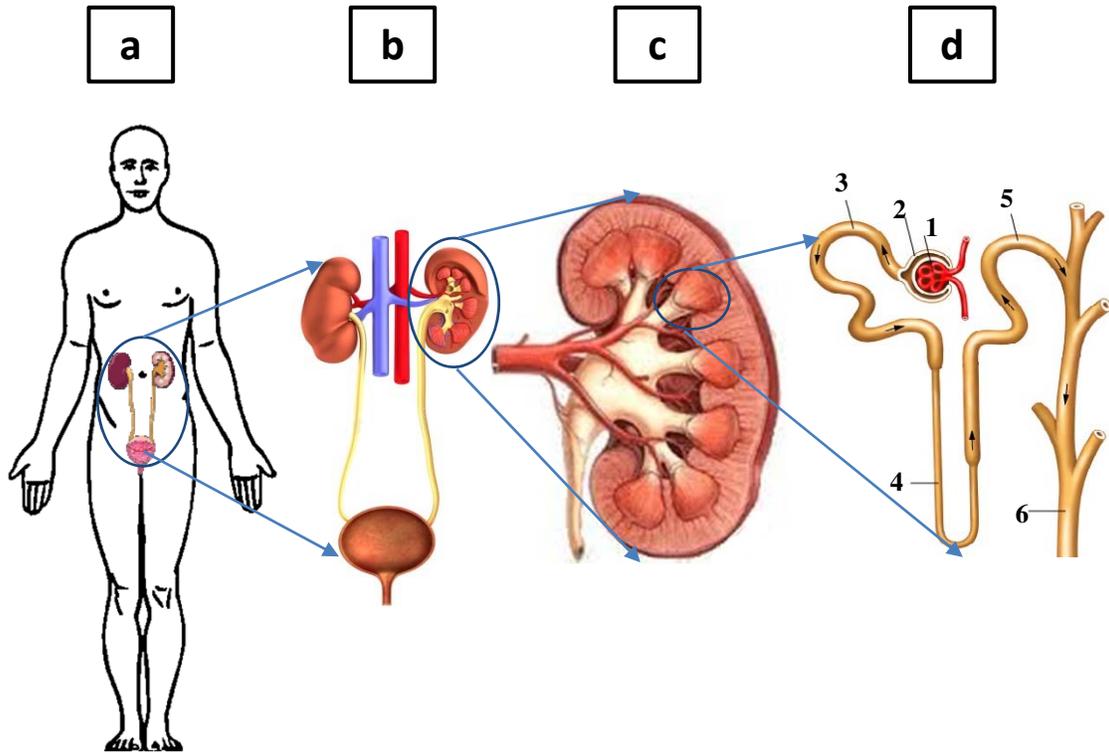


Figure 8: Structure du rein

(a) Les reins se situent dans l'espace rétro-péritonéal. (b) Ils font partie de l'appareil urinaire qui comprend la vessie, les uretères et l'urètre. (c) Chaque rein, dont la forme ressemble à celle d'un haricot se compose de la capsule, du parenchyme rénal qui comprend le cortex et la médulla. des calices et du bassinets. (d) Le parenchyme rénal héberge les néphrons, l'unité structurale et fonctionnelle du rein. Le néphron comprend 1-le glomérule 2-la capsule de Bowman. 3- le tube contourné proximal, 4- l'anse de Henlé 5-le tube contourné distal et 6-le tube collecteur.

2. Fonctions du rein

Le rein participe : au maintien de l'homéostasie de l'organisme, à la régulation de l'équilibre acido-basique et hydro-électrolytique, à la volémie et à la pression artérielle. Tous les jours, le rein filtre 180 litres de sang mais ne rejette que 2 litres d'urines.

Les reins éliminent une variété de déchets produits par le métabolisme normal de l'organisme comme les déchets du métabolisme protidique communément dosés en pratique clinique, l'urée, la créatinine et l'acide urique.

Le rein prend aussi en charge la réabsorption des nutriments essentiels tels que le glucose et les acides aminés qui sont réabsorbés au niveau du tubule proximal. Le glucose est complètement réabsorbé à l'état physiologique.

Le rein participe à l'équilibre acido-basique en maintenant le pH sanguin autour d'une valeur relativement stable. Cette fonction est assurée par réabsorption ou régénération des bicarbonates à partir des urines ou par excrétion des ions hydrogènes et des acides fixes dans les urines.

Le rein intervient aussi dans la régulation de l'osmolarité. Toute augmentation significative de l'osmolarité plasmatique provoque la sécrétion de l'hormone antidiurétique (ADH) par l'hypophyse postérieure. L'ADH stimule la réabsorption de l'eau par le rein en se liant aux cellules principales du canal collecteur. Ceci entraîne une augmentation de la concentration d'urine et une correction de l'osmolarité plasmatique.

Le rein joue un rôle essentiel dans le maintien de pression artérielle normale *via* le système rénine-angiotensinogène-aldostérone où la rénine est sécrétée par le rein. La rénine est sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire en réponse d'une baisse de pression artérielle. Elle clive l'angiotensinogène, produit par le foie, en angiotensine I qui sera convertie par l'ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine) en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur qui joue un rôle important dans l'hypertension.

Les reins sécrètent une variété d'hormones telles que l'érythropoïétine, le calcitriol, les prostaglandines et la rénine. L'érythropoïétine est libérée en réponse à l'hypoxie dans la circulation rénale et stimule l'érythropoïèse dans la moelle osseuse. Le calcitriol, forme active de la vitamine D, est synthétisé dans le tubule proximal. Il favorise l'absorption intestinale du calcium et des phosphates, la résorption osseuse et la réabsorption rénale du calcium. Les prostaglandines augmentent le taux de filtration glomérulaire.

3. Développement embryonnaire du rein

Le développement du rein est l'un des processus les plus complexes mais aussi l'un des mieux étudiés de l'organogenèse chez les vertébrés. Il représente le meilleur modèle pour la compréhension du modelage mésodermique et de l'organogenèse. La néphrogenèse est un processus qui nécessite une spécification régionale sur les différents axes du corps, la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices, une morphogenèse tubulaire étendue, une transition entre le mésenchyme et l'épithélium et l'allongement et la ramification tubulaire.

3.1. Développement des ébauches rénales

Figure 9

Le rein dérive du feuillet mésodermique intermédiaire et passe par trois étapes. Les structures rénales antérieures comprennent le pronéphros et le mésonéphros dont la complexité, la taille et la durée varient considérablement chez les espèces de vertébrés. Le rein est fonctionnel à partir de la 10^{ème} semaine. Il se développe progressivement jusqu'à la 35^{ème} semaine, bien que non indispensable à la vie fœtale. Le placenta est un rein artificiel et plusieurs fœtus anéphriques arrivent à terme.

3.1.1 *Le pronéphros (structure éphémère)*

Le pronéphros se différencie au cours de la 4^{ème} semaine de la vie embryonnaire à partir de l'extrémité crâniale du cordon néphrogène et régresse dès la 5^{ème} semaine. Il se segmente dès la 4^{ème} semaine selon un gradient céphalo-caudal en amas indépendants appelés néphrotomes. Chaque néphrotome se creuse en une vésicule néphrotomiale qui s'allonge vers la paroi latéro-externe de l'embryon sous forme d'un tubule pronéphrotique. C'est la réunion des extrémités de ces tubules qui formera l'ébauche du canal collecteur pronéphrotique. Chez l'homme, le pronéphros correspond à la structure la plus primitive et la plus éphémère qui régresse totalement au cours de la 5^{ème} semaine et n'est jamais fonctionnelle. La partie distale du canal collecteur (canal pronéphrotique) se poursuit au niveau des somites dans le canal mésonéphrotique (canal de Wolff).

3.1.2 *Le mésonéphros (rein transitoire)*

Le mésonéphros se différencie au cours de la 4^{ème} semaine et régresse dès la 8^{ème} semaine. Il succède au pronéphros. Le canal mésonéphrotique se développe sur le versant dorsal du cordon néphrogène, à la hauteur du 9^{ème} somite, sous la forme d'un cordon cellulaire mésenchymateux initialement solide. Il se dissocie du cordon néphrogène et se trouve alors sous l'ectoderme de surface qui joue probablement un rôle inducteur dans sa formation.

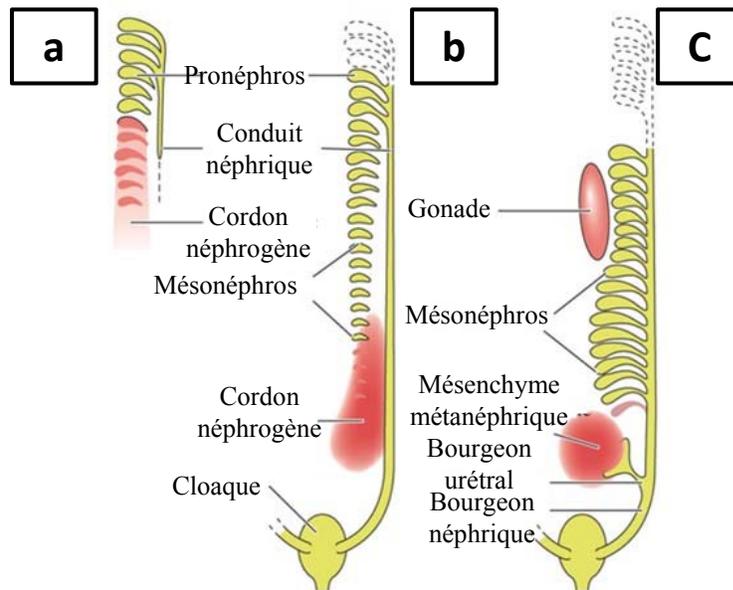


Figure 9: Développement des ébauches rénales

Le rein dérive du feuillet mésodermique intermédiaire et passe par trois étapes. Les structures rénales antérieures du rein comprennent (a) le pronéphros (structure éphémère) et (b) le mésonéphros (structure transitoire) (c) le métanéphros qui donnera le rein définitif se développe à partir du bourgeon urétral et du mésenchyme métanéphrique.

Development of the Vertebrate Kidney. Source: Developmental Biology 8th edition, Fig.14.21

Détaché du cordon néphrogène, il progresse en direction caudale pour fusionner finalement avec la paroi du cloaque en même temps qu'il commence à se canaliser. C'est à partir de ce moment qu'il sera appelé canal de Wolff. Au cours de cette progression cranio-caudale, le canal mésonéphrotique de structure mésenchymateuse va subir une transition épithéliale avec formation d'une lumière centrale ; seule la partie caudale reste mésenchymateuse.

3.1.3 Le métanéphros (rein définitif)

Le métanéphros se développe à partir du mésoderme intermédiaire de la région sacrée, à partir de trois structures suivantes:

- le bourgeon urétéral : c'est un diverticule épithélial dérivant de la partie caudale du canal de Wolff au niveau de la première vertèbre sacrée (S1) et dont l'extrémité élargie pénètre dans le blastème métanéphrogène. Il est à l'origine des voies excrétrices extra et intra-rénales.
- le blastème métanéphrogène : il correspond à la partie sacrée du cordon néphrogène. C'est une masse de tissu mésenchymateux diffuse et mal délimitée qui donnera naissance aux vésicules métanéphrotiques. Ces dernières sont à l'origine de la formation des néphrons.
- le réseau capillaire glomérulaire : il n'est toujours pas clair si le réseau capillaire glomérulaire se développe par vasculogénèse - différencié directement depuis le blastème métanéphrogène - ou par angiogénèse - formé à partir de vaisseaux préexistants dans le métanéphros.

3.2. Evolution du pronéphros au rein définitif

Figure 10

3.2.1. Bourgeon urétéral et blastème métanéphrogène: induction réciproque

L'interaction entre le bourgeon urétéral (structure épithéliale) et le blastème métanéphrogène (tissu mésenchymateux) est déterminante pour le développement rénal. En effet, ces deux structures exercent des effets inducteurs réciproques de type épithélio-mésenchymateux. Au cours de la métanéphrogenèse, le blastème métanéphrogène induit la bifurcation du bourgeon urétéral, qui induit à son tour l'agrégation des cellules du blastème en vésicules qui s'épithélialisent pour former les tubules rénaux et finalement les néphrons.

Les études récentes en biologie moléculaire - en particulier les études sur les souris transgéniques - ont permis d'identifier le rôle de plusieurs facteurs impliqués dans ces processus. Nous allons aborder l'étude de ces différents facteurs de manière non exhaustive au chapitre suivant.

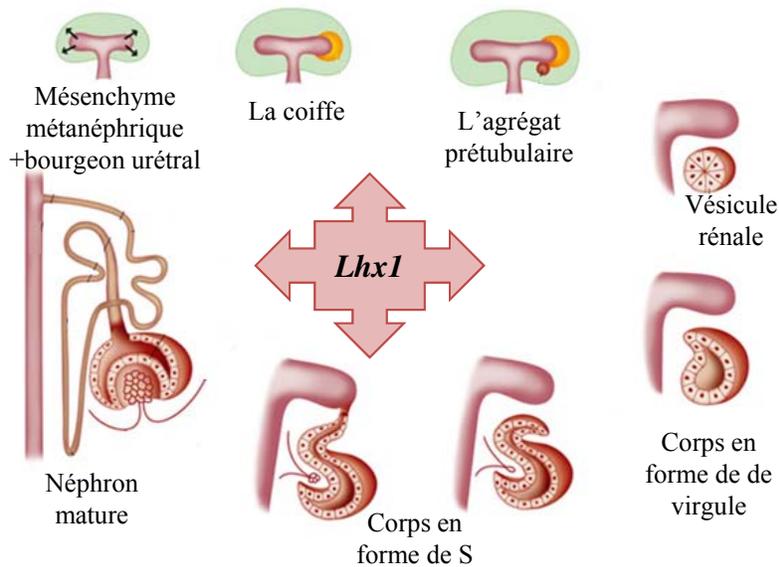


Figure 10: Différenciation morphologique des voies urinaires

Le bourgeon urétral épithélial, envahit le mésenchyme métanéphrique et subit une morphogénèse de la ramification urétérale. Les cellules mésenchymateuses situées à la face médullaire des extrémités de bourgeons urétraux se regroupent pour former des agrégats pré-tubulaires qui subissent une transition mésenchymato-épithéliale pour former des vésicules rénales, des corps en formes de S et de virgule et, finalement, former des néphrons matures. Le facteur de transcription *Lhx1* est impliqué dans toutes les étapes de la morphogénèse tubulaire.

Published in "Factors Influencing Mammalian Kidney Development: Implications for Health in Adult Life", Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology series Volume 196, Springer Berlin Heidelberg, May 11, 2008.

3.2.2. Différenciation morphologique des voies urinaires

➤ Le bourgeon urétéral et la formation de l'appareil excréteur

Le bourgeon urétéral est un diverticule épithélial dérivant de la partie caudale du canal de Wolff au niveau de la première vertèbre sacrée (S1) et dont l'extrémité libre élargie progresse en direction céphalique et dorsale pour pénétrer dans le blastème métanéphrogène. Il est à l'origine des voies excrétrices extra et intra-rénales, à savoir l'uretère, le bassinnet, les grands et petits calices et les tubes collecteurs.

La dilatation initiale forme le bassinnet qui va se subdiviser au cours de la 6^{ème} semaine à 4 reprises et donner naissance à 16 branches qui vont se résorber et former 2 à 4 grands calices. Au cours de la 7^{ème} semaine, les 4 générations de subdivisions suivantes vont également se résorber et former à leur tour les petits calices rattachés aux grands calices subsistants. Il s'en suit une série de divisions dichotomiques jusqu'à la 15^{ème} génération (environ 32^{ème} semaine) avec une réduction progressive du calibre des canaux qui vont donner naissance à un et jusqu'à 3 millions de tubes collecteurs rénaux en périphérie du blastème métanéphrogène.

A chaque branche de première génération va correspondre une arborisation complexe qui est à l'origine d'un lobe rénal. Ainsi, les grands calices reçoivent les petits calices dans lesquels convergent les canaux papillaires, regroupant les tubes collecteurs de ce système tubulaire complexe.

➤ Le blastème métanéphrogène et la formation du néphron

Le processus aboutissant à la formation du néphron est complexe et peut se dissocier en plusieurs étapes :

- Le blastème métanéphrogène recouvre chaque tube collecteur nouvellement formé et se condense pour former des agrégats cellulaires péritubulaires serrés.
- Sous l'influence de signaux diffusibles en provenance du bourgeon urétéral, les cellules mésenchymateuses subissent une transformation épithéliale et forment des vésicules.
- Ces vésicules vont s'allonger en tubules en forme de «S» avec très schématiquement trois segments :
 - développement du segment supérieur en tube distal (tube contourné et droit distal, partie ascendante du tube intermédiaire).
 - développement du segment moyen en tube proximal (tube contourné et droit proximal, partie descendante du tube intermédiaire).
 - développement du segment inférieur qui va former la capsule rénale.

Les vésicules épithéliales expriment des facteurs angiogéniques et attirent les cellules endothéliales dans la capsule rénale en voie de développement. Au contact d'une artériole afférente, l'épithélium tubulaire s'amincit et s'invagine pour former à ce niveau une coiffe à double feuillet, la capsule de Bowman (formation du corpuscule rénal).

- En même temps que se développe le corpuscule rénal, le côté opposé de la vésicule fusionne avec le tube collecteur distal qui lui est adjacent. Le métanéphros devient alors fonctionnel, filtrant le plasma des capillaires glomérulaires dans les corpuscules rénaux.

Le filtrat glomérulaire (urine primaire) s'écoulera dans les tubes proximaux, intermédiaires et distaux et dans les segments d'unions où il sera concentré et traité pour former l'urine secondaire. Celle-ci sera excrétée en passant par les tubes collecteurs, le bassinot et l'uretère qui s'abouche dans la vessie. L'urine est déversée dans la cavité amniotique pendant la grossesse.

3.2.3. Evolution fonctionnelle

A la naissance, les reins ont un aspect polylobé dû à l'évolution du bourgeon urétéral dans le blastème métanéphrogène. Cet aspect va s'estomper vers la fin de la période fœtale mais persiste néanmoins encore à la naissance. En raison de la croissance en taille des néphrons sans augmentation de leur nombre, les lobules vont s'estomper complètement au cours de la petite enfance. Le rein adulte, sauf rares exceptions, ne présente plus aucun lobule. La croissance du rein après la naissance est liée essentiellement à l'élongation des tubes contournés proximaux et à l'accroissement du tissu conjonctif.

3.2.4. Migration rénale

Le métanéphros est formé dans la région sacrée au niveau de la première vertèbre sacrée (S1). La migration rénale se fait entre la 6^{ème} et la 9^{ème} semaine. Le rein se place finalement au niveau de la 12^{ème} côte sous les glandes surrénales. Le mécanisme responsable de l'ascension du rein n'est pas une migration active. Cette migration est essentiellement liée à la croissance différentielle des régions lombaires et sacrées, provoquant le déroulement de l'extrémité inférieure du corps chez l'embryon. Il faut également noter qu'au cours de leur déplacement, les reins subissent une rotation de 90° vers la colonne vertébrale, ce qui oriente les hiles en direction médiane alors qu'ils étaient initialement en direction ventrale.

3.3. Les facteurs impliqués dans la néphrogenèse

L'étude du développement rénal chez les mammifères a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués et d'élucider les mécanismes généraux d'interactions épithéliales mésenchymateuses de la polarisation des cellules épithéliales et de la morphogenèse des ramifications épithéliales. Les premiers

événements moléculaires qui se produisent dans le développement rénal sont de plus en plus clairs grâce à l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés et aux expérimentations sur des embryons de grenouilles et de poulets (Ly *et al.*, 2011).

3.3.1. Les facteurs de croissance et induction de la néphrogenèse

Basé sur le travail pionnier de Grobstein, il est clair que le processus d'induction de la néphrogenèse est complexe et implique de nombreux signaux intercellulaires qui régulent la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la motilité cellulaire. Actuellement, il existe une liste croissante de molécules signalétiques potentielles qui comprend de nombreux facteurs de croissance et leur récepteur exprimés par le rein embryonnaire.

➤ La voie GDNF / RET et la croissance du bourgeon urétéral

Chez la souris, l'inactivation ciblée de RET, un membre de la famille des RTK, aboutit à une agénésie rénale et à une hypodysplasie (Schuchardt *et al.*, 1994). Le récepteur RET est exprimé dans le conduit de Wolff de E8 à E11.5 et dans le bourgeon urétéral lorsqu'il émerge et se ramifie dans le mésenchyme métanéphrique. Plus tard (E13.5-17.5), l'expression se limite aux pointes croissantes de l'épithélium des bourgeons urétéraux. Le GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), le ligand de RET, est exprimé dans le mésenchyme métanéphrique dès E11.5 (Hellmich *et al.*, 1996). Plus tard, son expression est retrouvée dans le mésenchyme le plus périphérique du rein où se produit l'induction des néphrons, suivant le profil d'expression de son récepteur RET dans les bourgeons urétéraux. Dans les modèles murins *knock-out* de GDNF, les tubules mésonéphrotiques et les conduits de Wolff se forment normalement mais le bourgeon urétéral est absent (Moore *et al.*, 1996). Ces données démontrent que GDNF et RET sont des éléments de la même voie de signalisation qui régulent le bourgeonnement de l'uretère.

➤ Wnt-11 et la croissance du bourgeon urétral

Plusieurs membres de la famille de gènes Wnt sont exprimés dans des domaines du bourgeon urétéral, ce qui suggère une fonction inductrice. Les gènes Wnt-11, Wnt-7b et Wnt-4 sont exprimés dans des domaines uniques du rein de souris en développement (Stark *et al.*, 1994; Kispert *et al.*, 1996). Des résultats récents montrent que l'ARNm de Wnt-11 est localisé dans le conduit de Wolff en développement, mais se limite à une région discrète à la position adjacente au blastème métanéphrique (Kispert *et al.*, 1996). À mesure que le bourgeon urétéral émerge, l'expression de Wnt-11 peut être retrouvée dans la pointe mais pas dans la tige. Les auteurs montrent que le contact avec le mésenchyme métanéphrique est nécessaire pour maintenir l'expression de Wnt-11 aux pointes de l'urètre. La rupture du réseau de protéoglycane dans la culture des organes supprime l'expression de RET et de Ros mais ces changements sont évidents après la perte de l'expression de Wnt-11. Les

signaux du mésenchyme métanéphrique peuvent limiter le profil d'expression Wnt-11 à la pointe du bourgeon urétéral, qui à son tour peut établir le profil d'expression de RET (Kispert *et al.*, 1996).

➤ Les gènes Wnt-4 et BMP-7: régulateurs de la maturation du néphron

Un autre membre de la famille des gènes Wnt, Wnt-4, est requis pour la formation de l'épithélium dans le métanéphros. Les transcrits de Wnt-4 sont retrouvés dans l'agrégation des cellules mésenchymateuses adjacentes à l'urètre croissant et à leurs descendants, les corps en forme de virgule et en forme de S (Stark *et al.*, 1994). Les souris mutantes Wnt-4 meurent à la naissance et présentent une agénésie rénale. L'induction primaire est observée à E11.5 mais des défauts particuliers dans les reins des mutants Wnt-4 sont clairement observés à E15. Le mésenchyme reste largement indifférencié bien que certains marqueurs d'induction précoce tels que Pax-2 et N-Myc soient détectés. Il existe peu de formation de cellules épithéliales et aucune expression du gène Pax-8 dans les reins mutants. De toute évidence, Wnt-4 est nécessaire pour la progression des agrégats mésenchymateux vers un phénotype épithélial.

BMP-7 est un des facteurs de croissance exprimés dans le rein embryonnaire au moment de l'induction. Les protéines BMP sont des membres de la superfamille TGF- β , molécules de signalisation sécrétées qui jouent un rôle dans de nombreux événements morphogénétiques. Les transcrits de BMP-7 se trouvent dans le conduit et les tubules mésonéphrotiques et plus tard dans les agrégats métanéphriques, les corps en forme de virgule et de S (Lyons *et al.*, 1995). On peut également trouver une expression dans les conduits collecteurs formés par l'urètre ramifié. Les souris mutantes BMP-7 meurent peu de temps après la naissance et possèdent des reins dysplasiques qui semblent arrêtés dans leur développement (Dudley *et al.*, 1995). De nombreux marqueurs du mésenchyme induit sont exprimés dans les reins précoces de souris mutantes BMP-7 tels que WT-1, Pax-2, Pax-8, Wnt-4 et RET. Cependant, les niveaux d'expression sont généralement réduits. Les deux facteurs Wnt-4 et BMP-7 semblent agir après l'induction initiale du mésenchyme et sont nécessaires pour une différenciation séquentielle du mésenchyme.

➤ D'autres facteurs de croissance

Les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) et leurs récepteurs ont été observés dans les tissus du rein en développement et chez l'adulte (Orr-Urtreger *et al.*, 1993; Dono et Zeller, 1994). FGF a été identifié comme une composante capable de provoquer la condensation et l'expression de WT-1 et c-Met dans des cultures de mésenchyme métanéphrique (Perantoni *et al.*, 1995). Les gènes Hedgehog peuvent également affecter le développement du rein. Sonic Hedgehog (SHH) semble être exprimé au début du développement du système urogénital (Bitgood et McMahon, 1995) alors que Indian hedgehog (IHH) est exprimé dans le rein plus mature avec des niveaux d'expression élevés dans les

tubules proximaux (Valentini *et al.*, 1997). La perturbation des gènes de SHH chez la souris entraîne des défauts sévères du modelage axial et l'absence de reins (Chiang *et al.*, 1996).

3.3.2. Les facteurs de transcription dans le développement du rein

Considérés comme des « régulateurs maîtres », la fonction clef des facteurs de transcription est de coordonner l'expression des molécules effectrices qui adoptent des programmes spécifiques de différenciation. À ce jour, les données les plus concluantes proviennent d'études sur les souris mutantes générées par ciblage des différents gènes.

➤ BF-2: fonction de la cellule stromale

BF-2 est un membre de la famille des facteurs de transcription *Forkhead/Winged Helix* (Lai *et al.*, 1993). Les souris dépourvues de BF-2 meurent 24 h après leur naissance et présentent des reins rudimentaires plus petits et plus fusionnés (Hatini *et al.*, 1996). L'expression du BF-2 peut être détectée dans les cellules qui entourent immédiatement les cellules condensées du mésenchyme métanéphrique qui expriment Pax-2. Ainsi, l'expression de BF-2 distingue une population de cellules mésenchymateuses qui ne sont pas induites pour devenir l'épithélium mais destinées à devenir des cellules stromales. Une autre caractéristique marquante des reins mutants est l'absence de corps en forme de virgule et en forme de S. Les agrégats induits de mésenchyme et les cellules expriment Wnt-4 et Pax-2 mais la morphogenèse est arrêtée à ce stade. Étant donné que les événements initiaux semblent avoir lieu normalement, les cellules stromales fournissent probablement des facteurs à la fois pour la croissance des bourgeons urétéraux et la maturation des agrégats pré-tubulaires. Les cellules BF-2 positives se retrouvent adjacentes à l'urètre en croissance lorsqu'elles pénètrent dans le rein, à la périphérie du rein en développement et intercalées dans la région médullaire. Cependant, certains progrès peuvent être obtenus simplement en examinant l'expression de certains des gènes.

➤ Les gènes WT-1 et Pax: un circuit règlementaire

WT-1 a été identifié comme gène suppresseur dans les tumeurs de Wilms (Call *et al.*, 1990). Il code pour un facteur de transcription requis pour le développement du rein embryonnaire (Kreidberg *et al.*, 1993). La perte du gène WT-1 est associée à des tumeurs embryonnaires rénales dites tumeurs de Wilms et à des malformations urogénitales (Dehbi *et al.*, 1996). Chez les souris mutantes WT-1, le bourgeon urétéral ne se forme pas, entraînant une dégénérescence du mésenchyme métanéphrique et l'absence de reins (Kreidberg *et al.*, 1993). Un niveau élevé de protéine WT-1 est observé dans les corps en forme de S précisément où l'expression de Pax-2 est perdue en premier (Ryan *et al.*, 1995). De plus, des niveaux élevés de Pax-2 ont été signalés dans les tumeurs de Wilms, suggérant que WT-1 régule l'expression du gène Pax-2 (Dressler et Douglass, 1992). D'autres études suggèrent que les protéines Pax peuvent activer l'expression de WT-1 (Dehbi *et al.*, 1996), ce qui indique une relation

réciroque. Ainsi, Pax-2 et Pax-8 peuvent réajuster l'expression de WT-1 dans le mésenchyme qui à son tour commence à éteindre l'expression du gène Pax-2 lorsque la néphrogenèse est terminée.

➤ Gènes Pax et néphrogenèse

Les gènes Pax codent pour des facteurs de transcription qui partagent un domaine de liaison à l'ADN, appelé « *Paired box* ». Dans cette famille, Pax-2 et Pax-8 sont exprimés dans des domaines se chevauchant dans le rein en développement (Dressler *et al.*, 1990). Pax-8, qui partage un fort degré d'homologie avec Pax-2 à l'extérieur du domaine *paired*, s'exprime à un stade légèrement plus ultérieur dans des vésicules rénales et persiste dans le corps en forme de S (Poleev *et al.*, 1992). Les mutants nuls homozygotes de Pax-2 ne développent pas de reins et ne parviennent pas à former des tubules mésonéphrotiques et des voies génito-urinaires (Torres *et al.*, 1995). Contrairement aux phénotypes d'autres souris *knock-out* présentant des défauts rénaux, les défauts liés à Pax-2 affectent la différenciation épithéliale du mésoderme intermédiaire. Pax-2 a un rôle critique dans la différenciation des cellules mésenchymateuses (Rothenpieler et Dressler, 1993). À l'inverse, dans l'épithélium rénal plus différencié, un défaut de répression de l'expression de Pax-2 chez les souris transgéniques provoque un syndrome de type néphrotique avec apparition de kystes de tubules proximaux et distaux (Dressler *et al.*, 1993). Des niveaux élevés de protéine Pax-2 sont également retrouvés dans les épithélia kystiques à partir de reins dysplasiques humains et corrént avec une prolifération cellulaire continue (Winyard *et al.*, 1996) L'ensemble de ces données montre clairement que le développement du rein repose sur la coordination de l'expression de Pax-2 dans de multiples domaines. Par exemple, l'expression de Pax-2 est réprimée dans les cellules tubulaires proximales qui n'expriment pas des niveaux élevés de WT-1. Ce seul fait indique qu'il doit y avoir plusieurs mécanismes pour assurer le bon modèle d'expression spatio-temporel

➤ Les gènes *Homeobox*

Les gènes *homeobox* sont une grande famille de gènes codant pour des facteurs de transcription à homéodomains.

Les gènes Hox constituent un sous-ensemble de cette famille et jouent un rôle dans la spécification des informations de position le long de l'axe antéro-postérieur en fonction de leur domaine d'expression et de la séquence temporelle dans laquelle ils sont exprimés (Krumlauf, 1994). Beaucoup de gènes Hox ont été analysés chez la souris par des mutations ciblées. Jusqu'à présent, aucun des *knock-out* individuels ne présente d'anomalies rénales. Par exemple, les gènes *hox-a11* et *hox-d11* sont exprimés dans le mésenchyme métanéphrique (Hsieh-Li *et al.*, 1995) mais la suppression de l'un ou l'autre n'affecte pas le développement du rein (Small et Potter, 1993; Davis et Capecchi, 1994). Les mutants homozygotes ont souvent un ou deux reins hypoplasiques.

Un autre membre de cette famille est le facteur Lim1 qui joue un rôle fondamental dans les premières étapes de la formation de rein chez les mammifères. Il est nécessaire pour la formation du conduit néphrique et des tubules pro et mésonéphrotiques (Shawlot et Behringer, 1995). Le profil d'expression de Lim1 pendant l'embryogenèse comprend le mésenchyme néphrogène, le conduit de Wolff et les tubules induits (Barnes *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1994).

Le facteur de transcription Lim1, sur lequel sont basés mes travaux de thèse, sera abordé en détail dans le chapitre suivant.

3.3.3. *La prolifération et l'apoptose au cours du développement du rein*

Le contrôle et l'exécution des voies de différenciation cellulaire au cours de la néphrogenèse nécessitent des facteurs généraux et des facteurs spécifiques au rein. Des facteurs généraux sont susceptibles d'être impliqués dans une variété d'événements tels que la division cellulaire, la génération de la réponse à la croissance précoce, la régulation de la motilité cellulaire et l'établissement de contacts cellulaires. Peu de choses sont connues sur la façon dont ces événements sont coordonnés au cours du développement rénal. Cependant, certaines données commencent à émerger dans la littérature scientifique.

➤ P53

P53 est gène suppresseur de tumeur. Il régule la croissance cellulaire de deux façons. Il peut agir comme point de contrôle dans le cycle cellulaire ou contrôler l'apoptose en réponse au stress. Au cours du développement rénal, p53 est normalement exprimé dans les corps en forme de virgule et de S (Schmid *et al.*, 1991), bien que la suppression de p53 chez la souris n'affecte pas de manière significative le développement (Donehower *et al.*, 1995). En revanche, la surexpression de p53 dans l'urètre d'animaux transgéniques conduit à des reins plus petits avec moins de néphrons (Godley *et al.*, 1996). Des expériences ont montré que Pax-2 régule l'expression de p53 et que WT-1 se lie à la protéine p53. Pax-2 et WT-1 pourraient limiter l'activité de p53 jusqu'à ce que le nombre approprié de divisions cellulaires soit atteint et que les cellules plus différenciées sortent du cycle mitotique (Maheswaran *et al.*, 1995; Stuart *et al.*, 1995).

➤ Apoptose

La mort cellulaire généralisée se produit dans le mésenchyme métanéphrique en l'absence de signaux inductifs (Koseki *et al.*, 1992). En effet, un certain nombre de facteurs de croissance, incluant EGF et FGF, peuvent empêcher la mort cellulaire dans le mésenchyme en culture. Dans le rein ainsi que dans d'autres organes en développement, de nombreuses cellules subissent également une mort cellulaire programmée comme conséquence normale du développement (Weller *et al.*, 1991; Perantoni *et al.*,

1995). Les cellules apoptotiques se caractérisent par des îlots entre les néphrons matures dans le mésenchyme et sont fréquemment situées à côté de corps condensés ou à la queue de corps en forme de S. Une phase ultérieure de la mort cellulaire se produit dans les branches de l'urètre après la naissance (Coles *et al.*, 1993). Parmi les facteurs contrôlant l'apoptose, Bcl-2 un anti-apoptotique a été identifié. Les souris dépourvues de bcl-2 développent des reins kystiques qui sont hypoplasiques avec moins de néphrons. Ces résultats démontrent que la régulation de l'apoptose est nécessaire pour le développement normal du rein et que bcl-2 peut bloquer l'apoptose dans de nombreux types de cellules rénales.

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, divers tableaux d'expression ont été proposés. Malgré la complexité architecturale du rein, la néphrogenèse est devenu le processus le mieux caractérisé en biologie du développement.

III. Le Facteur de transcription Lim1

1. La famille des gènes homéotiques

Les gènes *homeobox* ou homéotiques sont des gènes développementaux qui dirigent la formation de nombreuses structures lors du développement embryonnaire précoce. Ce sont des gènes dits « architectes » ou gènes « maîtres » qui, par leur expression, donnent l'ordre à d'autres gènes dits « ouvriers » d'agir selon l'axe antéro-postérieur. Ces gènes permettent donc de contrôler la régionalisation du corps. Selon le dernier screening, la famille de gènes *Homeobox* compte environ 235 gènes fonctionnels et 65 pseudogènes (inactifs) qui sont regroupés en 11 classes (ANTP, PRD, LIM, POU, HNF, SINE, TALE, CUT, PROS, ZF et CERS) (Holland *et al.*, 2007). Les gènes *Homeobox* sont présents sur chaque chromosome humain sous forme de clusters. Ces gènes agissent comme des facteurs de transcription. Ils possèdent un domaine de liaison à l'ADN pour stimuler ou réprimer l'expression des gènes ouvriers. Ce domaine est appelé homéodomaine et la séquence nucléotidique qui en est à l'origine est appelée *homeobox* (ou homéoboite). Les mutations de ces gènes sont responsables de divers troubles du développement et de malformations congénitales.

2. La famille des protéines à domaine LIM

Figure 11

Les protéines à domaine LIM représentent une grande famille de protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Dans le génome humain, il existe 135 séquences codantes pour le domaine LIM situées dans 58 gènes (Kadmas et Beckerle, 2004). Les domaines LIM sont des domaines d'interaction protéine/protéine avec un motif unique riche en cystéines, composés d'environ 55 acides aminés avec 8 résidus fortement conservés (Cystéine et Histidine). La séquence consensus de LIM est définie comme suit : CX2CX16-23HX2CX2CX2CX16-21CX2(C/H/D) où X désigne n'importe quel acide aminé (Schmeichel et Beckerle, 1994). Les 8 résidus les plus conservés sont les résidus de liaison au zinc. Les résidus 1-4 coordonnent le premier ion de zinc et les résidus 5-8 coordonnent le second ion zinc. Ceci établit la topologie en doigt de zinc impliquée dans les interactions protéiques (Michelsen *et al.*, 1994). Ce domaine doit son nom aux initiales des 3 premiers gènes où il a été décrit pour la première fois, à savoir Lin11/Isl1/Mec3. Mec-3 (Way et Chalfie, 1988) et Lin-11 (Freyd *et al.*, 1990) ont été identifiés chez *C. elegans* et Isl-1 chez le rat (Karlsson *et al.*, 1990). Les protéines LIM peuvent être composées exclusivement de domaines LIM ou de domaines supplémentaires afin d'assurer une liaison ou une fonction supplémentaire tels que les homéodomaines (LIM-*Homeobox* : LIM-HD), les domaines catalytiques (LIM-Kinase), les domaines de liaison au cytosquelette ou d'autres modules de liaison protéique tels que SH3 (*SRC Homology 3 Domain*), LD (pour leucine et aspartate) ou PDZ (PSD95/Dlg1/ZO-1) (Kadmas et Beckerle, 2004). Les protéines

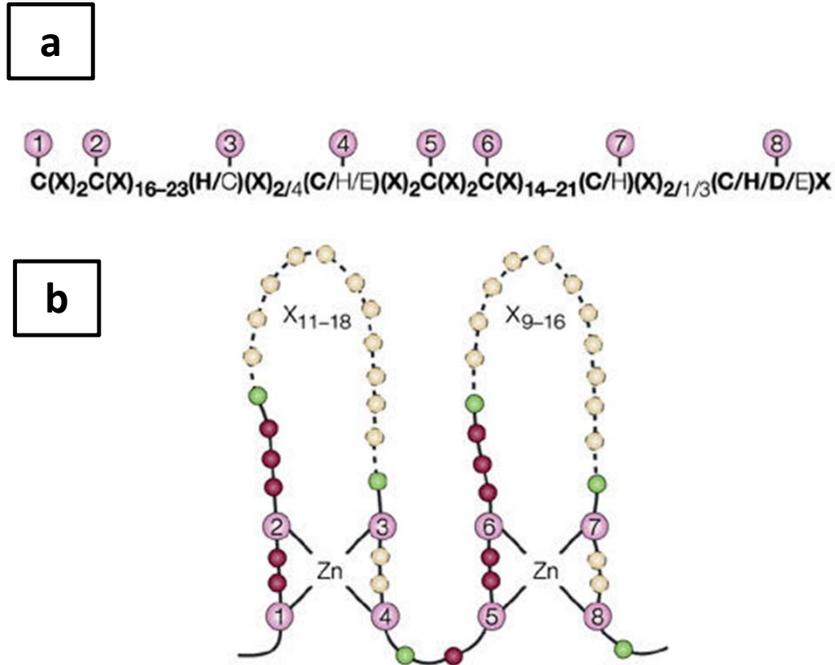


Figure 11: Structure du domaine LIM

(a) Séquence consensus du domaine LIM avec 8 résidus fortement conservés (7 Cystéine et 1 Histidine). La séquence consensus de LIM est définie comme suit: CX₂CX₁₆₋₂₃HX₂CX₂CX₂CX₁₆₋₂₁CX₂(C/H/D) où X désigne n'importe quel acide aminé. (b) Le domaine LIM est composé approximativement de 60 acides aminés. Les résidus 1-4 coordonnent le premier ion de zinc et les résidus 5-8 coordonnent le second ion zinc. Ceci établit la topologie en doigt de zinc qui permet l'interaction protéine/protéine.

D'après Julie L et al., From the cytoskeleton to the nucleus Beckerle Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 920-931 (November 2004).

contenant un domaine LIM participent à des complexes cytosquelettiques tels que des adhésions focales et des jonctions adhérentes pour réguler la croissance et la division cellulaires, ainsi que la motilité. Les protéines à domaines LIM du groupe nucléaire telles que les LIM-*Homeobox* transloquent dans le noyau où elles régulent l'expression de gènes et les décisions du devenir cellulaire pendant le développement embryonnaire. En raison de leur capacité à recruter des protéines spécifiques, les domaines LIM peuvent localiser ses cibles dans des endroits subcellulaires discrets, moduler leurs activités ou les assembler en complexes multi-composants. Ils sont par conséquent essentiels pour intégrer divers circuits cellulaires (Koch *et al.*, 2012).

3. Le facteur *Lhx1*

Figure 12

Le gène LIM *Homeobox 1*, *Lhx1*, appelé également LIM1 ou LIM-1, appartient à la famille des gènes *homeobox* et plus précisément à la sous-classe LIM-*Homeobox* qui code pour des protéines portant deux domaines LIM à l'extrémité N-terminale et un homéodomaine central. Il a été identifié et isolé pour la première fois chez *Xenopus laevis* en 1994 sous le nom Xlim-1 (Masanori *et al.*, 1992). Chez l'homme, il est situé sur le chromosome 17 en position 17q12: 36937475-36944615. Sa séquence a été caractérisée et clonée pour la première fois par Wei-Feng Dong *et al.* en 1997. Cependant, dans cette étude, il avait été cartographié en position 11p12-13 (Dong *et al.*, 1997). Il présente 98% d'homologie avec son orthologue murin qui est quant à lui, localisé sur le chromosome 11 (Zhadanov *et al.*, 1995). La taille du gène est de 4.172 Kpb. Il comporte 5 exons séparés par 4 introns. Son numéro d'accèsion sur PubMed est *Gene ID: 3975*. Les 2 domaines LIM sont entièrement contenus dans le premier et le deuxième exon, tandis que l'homéodomaine est compris dans les exons 3 et 4.

Le gène *Lhx1* possède 5 transcrits par épissage alternatif dont uniquement 2 sont traduits en peptide. Le premier de 120 acides aminés n'a pas de fonction connue et le deuxième comptant 406 acides aminés représente la protéine d'intérêt fonctionnelle (**Numéro d'accèsion P48742**). Les deux motifs LIM sont situés entre les acides aminés 4-55 et 63-118 et l'homéodomaine est situé entre les acides aminés 180-239.

4. Les interactions protéiques des domaines LIM

L'activité des protéines LIM-HD dépend d'un cofacteur essentiel appelé Ldb1 (*LIM domain binding*) (Agulnick *et al.*, 1996). En effet, les souris mutantes Ldb1 présentent des défauts sévères au cours du développement, similaires aux phénotypes observés chez les souris *knock-out* de LIM-HD (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

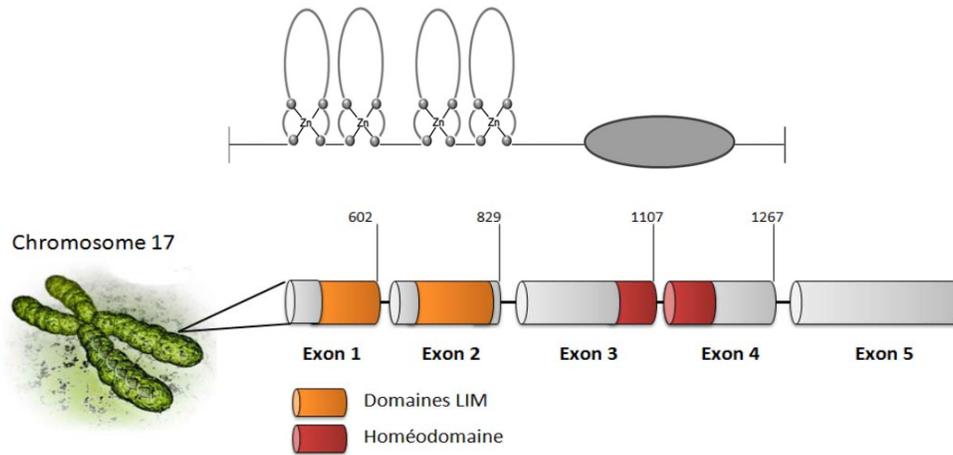


Figure 12: Structure du gène *Lhx1*

Le gène *Lhx1* humain se situe sur le chromosome 17. Il contient 5 exons séparés par quatre introns, les deux domaines LIM sont contenus dans l'exon 1 et 2 tandis que l'homéodomaine est compris entre l'exon 3 et 4 (*Dormoy, 2010*).

Ldb1 se lie spécifiquement aux protéines à domaines LIM du groupe nucléaire : LMO1, LMO2, Lmx1, *Lhx1*, Isl1, Mec3 (Jurata *et al.*, 1996). La partie de Ldb1 interagissant avec LIM est appelée "LID" (*LIM interaction domain*) (Breen *et al.*, 1998).

Toutes les protéines LIM-HD contiennent deux domaines LIM disposés en tandem à ou près de l'extrémité N-terminale suivis par un homéodomaine à l'extrémité C-terminale. Presque toutes les interactions protéine-protéine de ces facteurs font intervenir les domaines LIM aboutissant à la formation d'hétérodimères LIM/LID (Hobert et Westphal, 2000). Le domaine LIM responsable de la reconnaissance de LID n'est pas clairement défini. Dans certains cas, c'est le premier domaine LIM, tandis que dans d'autres cas, c'est le deuxième domaine LIM de la protéine LIM-HD qui est impliqué. En outre, des données contradictoires existent pour *X. laevis* X-Lim1 où LIM1 et LIM2 apparaissent comme se liant à Ldb1 (Breen *et al.*, 1998).

Il existe de plus en plus de preuves que les protéines à domaines LIM et les membres de la famille Ldb peuvent exercer des régulations positives et négatives sur la transcription. Les domaines LIM des facteurs de transcription LIM-HD peuvent inhiber la liaison de l'homéodomaine à l'ADN (Sánchez-García *et al.*, 1993) mais peuvent également favoriser l'activité transcriptionnelle des LIM-HD en synergie avec d'autres classes de facteurs de transcription (German *et al.*, 1992, Bach *et al.*, 1997).

5. Les interactions moléculaires directes du *Lhx1*

Figure 13

Sept interactions directes avec Lim1 ont été décrites. Il s'agit pour la plupart de facteurs de transcriptions développementaux impliqués dans la détermination des lignages cellulaires.

5.1. *LIM domain binding protein 1: Ldb1*

Ldb1 interagit directement avec Lim1 via son domaine LIM (Nishioka *et al.*, 2005; Costello *et al.*, 2015). Chez *Xenopus*, il a été démontré que Ldb1 est nécessaire pour la fonction de X-Lim1. La co-injection de X-Lim1 et de Ldb1 dans les embryons de *Xenopus* a induit une formation d'axe secondaire alors qu'aucune protéine, prise individuellement, n'a montré cette activité (Agulnick *et al.*, 1996).

5.2. *Orthodenticle homeobox 2: Otx2*

Otx2, comme *Lhx1*, appartient à la famille des gènes *homeobox*. C'est un facteur de transcription développemental qui joue un rôle important dans le développement de la tête chez les mammifères. Or, Lim1 joue également un rôle dans la formation de la tête (Fossat *et al.*, 2015). Une étude a démontré une interaction directe entre les facteurs Otx2 et Lim1 *via* la région C-terminale de Otx2 et

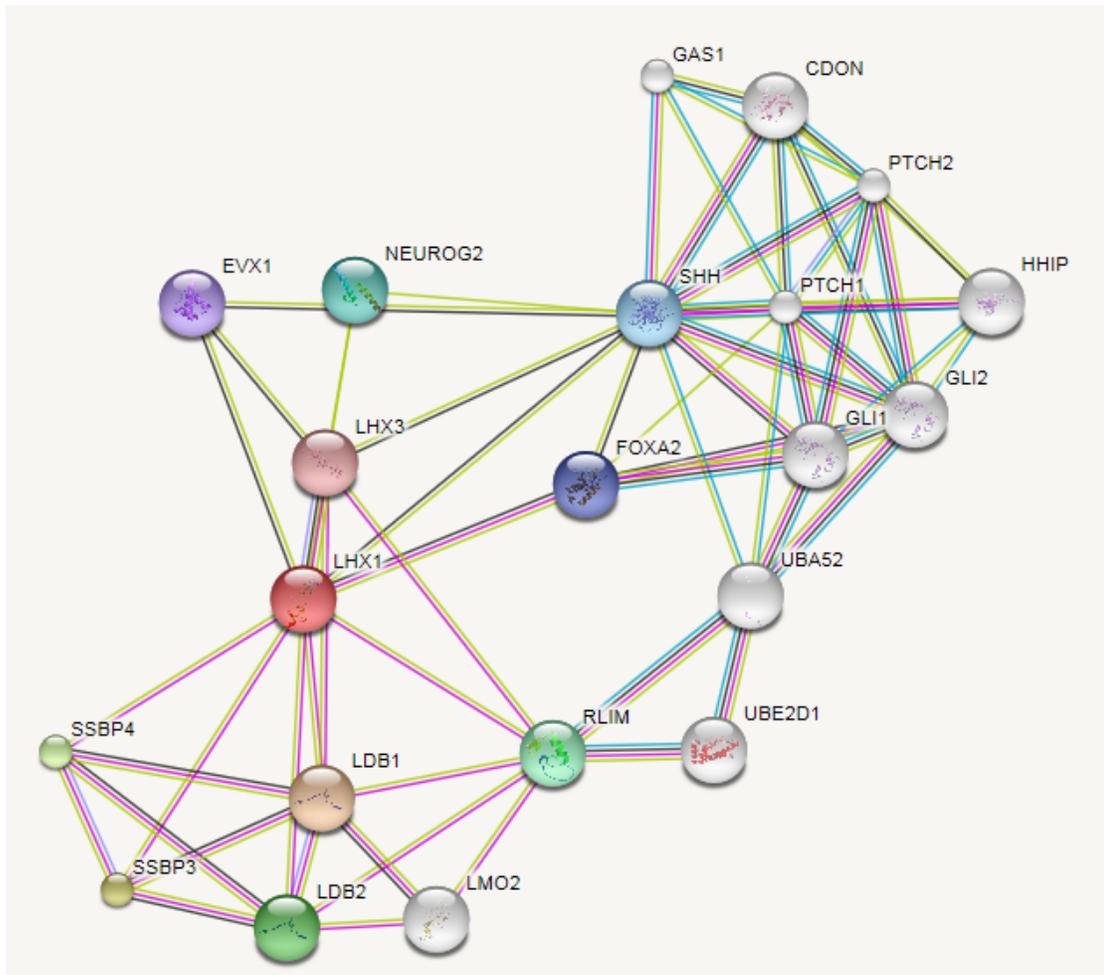
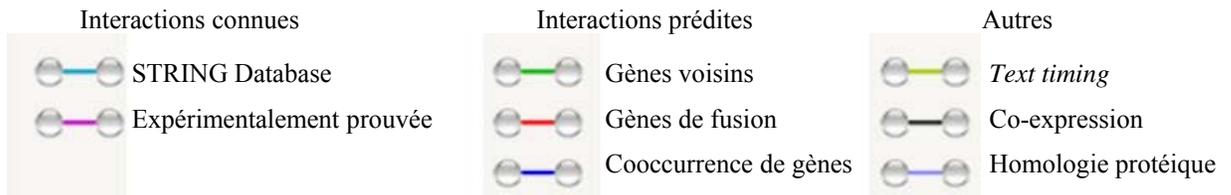


Figure 13: Interactions moléculaires du gène *Lhx1*

Le facteur de transcription *Lhx1* joue un rôle orchestral dans plusieurs processus au cours du développement embryonnaire via des interactions moléculaires directes (*Lhx3*, *FOXA2*, *SHH*) ou en cascade (Les cibles de la voie *SHH*).

Concernant les interactions directes avec *LDB1*, *SSBP3/4*, *RLIM*, elles interviennent comme cofacteurs de *Lhx1* qui influencent ses fonctions.

LDB, LIM domain binding; *SSBP*, single-strand binding protein; *EVX*, even-skipped homeobox; *NEUROG2*, Neurogenin 2; *FOXA2*, forkhead box A2; *HHIP*, hedgehog interacting protein.

D'après STRING Database, protein-protein interaction network

l'homéodomaine de Lim1 avec comme conséquence la transcription des gènes cibles de Otx2 (Nakano *et al.*, 2000).

5.3. Forkhead box A2: FOXA2

FOXA2 (*Forkhead box A2*) appelé aussi HNF-3 β (*hepatocyte nuclear factor*) est un facteur de transcription qui présente un domaine de liaison à l'ADN appelé *Forkhead*. Foxa2 est exprimé dans différentes régions du système nerveux en développement. Foucher *et al* ont montré que Foxa2 interagit directement avec l'homéodomaine de Lim1 (Foucher *et al.*, 2003). De plus, des expériences protéomiques ont identifié un complexe tripartite de facteurs de transcription composé de *Lhx1*, Otx2 et Foxa2 (Costello *et al.*, 2015).

5.4. Single stranded DNA binding proteins: SSBP3 et 4

Selon l'étude de (Huttlin *et al.*, 2017), des interactions protéiques directes ont été identifiées entre *Lhx1*, SSBP3 et 4. Cette étude utilise la spectrométrie de masse de purification par affinité à haut débit pour identifier les partenaires interactifs de 2 594 protéines humaines dans des cellules HEK293T. Les fonctions des protéines SSBP ne sont pas très bien connues. Il a été décrit qu'elles interagissent également avec Ldb1 et qu'elles jouent un rôle important dans le développement (Xu *et al.*, 2007).

5.5. LHX3/ ISL1/ RLIM

Une même étude a montré que *Lhx1* interagit directement avec Lhx3 (*LIM homeobox 3*), Isl1 (*Insulin gene enhancer protein 1*) et RLIM (*RING finger LIM domain-binding protein*). Les trois derniers sont fortement impliqués dans le développement embryonnaire. RLIM code pour une *RING-H2 zinc finger* protéine qui a une fonction ubiquitine ligase qui cible Ldb1. Il a été également montré que RLIM inhibe l'activité fonctionnelle de l'homéodomaine par le recrutement de complexe histone désacétylase (Bach *et al.*, 1999).

6. Régulation et gènes cibles du *Lhx1*

Il a été montré que le facteur Otx2 active directement la transcription de *Lhx1* grâce à deux régions conservées dans le locus *Lhx1* auquel Otx2 peut se fixer. Le développement anormal de la tête embryonnaire chez les mutants conditionnels Otx2 met en évidence l'interaction fonctionnelle entre Otx2 et *Lhx1* pour la formation de la tête (Ip *et al.*, 2014).

Il a été également montré que le facteur développemental Eomesodermin appelé également (*T-box brain protein 2*), agissant en aval de la voie signalisation Smad, active directement la transcription de *Lhx1* (Nowotschin *et al.*, 2013).

Des analyses de profils transcriptionnels et de *ChIP-sequencing* ont identifié les gènes cibles de Lim1, qui regroupent de nombreux marqueurs de développement et de manière intéressante, les composants de la voie de signalisation Wnt qui joue un rôle primordial dans la carcinogenèse rénale. De plus, les sites de liaison du facteur de transcription Lim1 à l'ADN sont principalement des « *enhancer elements* » : Lim1 se lie aux régions activatrices des gènes *Otx2* et *Foxa2* (Costello *et al.*, 2015).

Les gènes *hhex* (*Hematopoietically-expressed homeobox protein*) sont les premiers marqueurs de l'endoderme antérieur qui donne naissance aux organes antérieurs. Il a été montré que les facteurs Siamois/Twin de la famille « *paired homeobox* » stimulent directement la transcription des gènes *Otx2* et *Lim1* qui à leur tour activent la transcription des gènes *hhex* en se fixant à des éléments de réponse Wnt (WRE) situés dans le promoteur des gènes *hhex* (Rankin *et al.*, 2011).

Dans le mésendoderme antérieur, *Lim1* module la transcription des gènes codant pour les régulateurs de la signalisation Wnt tels que *Dkk1* (*Dickkopf-related protein 1*), *Hesx1* (*Homeobox expressed in ES cells 1*), *Cer1* (*Cerberus 1*) et *Gsc* (*germline stem cell*). *Lim1* régule également l'expression de la protocadherin7. Par conséquent, le phénotype sans formation de tête chez les souris mutantes de *Lim1* est lié principalement à une rupture du mouvement des cellules du mésendoderme antérieur par l'absence de modulation de la signalisation Wnt.

Les résultats de RT-qPCR et ChIP-PCR montrent que *Lim1* se lie à une région régulatrice nouvellement identifiée dans *Cer1*. *Dkk1* est aussi une nouvelle cible transcriptionnelle de *Lhx1* qui agit avec LDB1 et SSBP3 (Fossat *et al.*, 2015). Des interactions de *Lim1* avec les éléments dTAAT et pTAAT situés dans le locus *Hesx1* ont été retrouvées (Chou *et al.*, 2006). *Cer1* et *Gsc* ont également été signalés comme étant directement régulés par X-*Lim1* chez *Xenopus*, qui se lie à une région appelée U1 (Sudou *et al.*, 2012).

Le gène X-*Lim1* est régulé au cours de l'embryogenèse précoce par l'activine A *via* un élément de réponse à l'activine (ARE) présent dans le premier intron (Watanabe *et al.*, 2002).

HNF-1 β régule la transcription du *Lhx1*. Deux sites de liaison HNF1 ont été identifiés dans la région promotrice et dans le premier intron du gène X-*Lhx1*. La transactivation HNF-1 β *via* le site de liaison HNF1 dans le promoteur *lhx1* est d'environ 70% (Drews *et al.*, 2011). Cependant d'autres travaux ont montré que HNF-1 β antagonise les effets observés de *Lim1*. Il est possible que la liaison au niveau de l'intron soit responsable d'une inactivation de la transcription de *Lim1*.

D'autres études ont identifié d'autres cibles de *Lim1* impliquées dans la néphrogenèse telles que *chrd* (chordine) (Agulnick *et al.*, 1996) et *PCDH* (protocadhérine) (Hukriede *et al.*, 2003). Une étude a

montré que la perte de Pax6 entraîne la perte de *Lhx1*, suggérant que Pax6 active la transcription de *Lhx1* (Mastick et Andrews, 2001).

7. Profil d'expression

7.1. Au cours du développement

De nombreux travaux ont étudié le profil d'expression de *Lim1* chez différents animaux tels que la grenouille, le rat et la souris.

Lim1 est exprimé très tôt au cours de l'embryogenèse dans la strie primitive et le mésoderme préchordal et plus tard pendant le développement du rein et des parties du système nerveux central. À partir du stade de gastrula, la protéine *Lim1* est détectée dans trois lignées cellulaires: le notochorde, le pronéphros et certaines régions du système nerveux central (Barnes *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1994; Shawlot et Behringer, 1995).

D'autres sites d'expression de *Lim1* ont été retrouvés par la suite tels que l'organe olfactif, la rétine, la vésicule otique, les ganglions dorsaux et les glandes surrénales. Ces observations impliquent le rôle du gène *Lim1* dans la spécification de multiples lignées cellulaires et soulignent la nature conservée du rôle de ce gène chez différents vertébrés (Karavanov *et al.*, 1996).

Lim1 est exprimé selon un modèle dynamique au cours du développement du système urinaire (Barnes *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1994; Karavanov *et al.*, 1998; Tsang *et al.*, 2000). *Lim1* est essentiel à la néphrogenèse. Chez la souris, *Lim1* est exprimé dans le mésoderme intermédiaire à E7.5 et dans le canal néphrique et les tubules mésonéphrotiques à E10.5. *Lim1* est également exprimé dans les métanéphros dans la pointe du bourgeon urétéral dans la région corticale. Dans les tissus métanéphriques liés au mésenchyme, *Lim1* s'exprime dans l'agrégat pré-tubulaire, les corps en forme de virgule et en forme de S et le podocyte du glomérule immature. Toutefois, son expression diminue dans le glomérule mature (Karavanov *et al.*, 1998; Sariola, 2002).

(Guertl *et al.*, 2011) ont étudié l'expression de LIM1 pendant le développement rénal humain à partir de 32 reins embryonnaires humains ainsi que dans des reins dysplasiques. Ils ont constaté que *Lim1* est présent dans les agrégats pré-tubulaires, les corps en forme de S et en forme de virgule ainsi que des glomérules immatures entre 10 et 30 semaines de gestation. Onze reins dysplasiques ne présentaient aucune expression de *Lim1*. Cette étude soutient le concept de rôle causal de la déficience LIM1 dans le développement du rein dysplasique et son rôle crucial dans la néphrogenèse.

Lim1 joue un rôle également dans la formation du mésoderme précoce et la spécification ultérieure d'un phénotype différencié dans les sous-ensembles de cellules du mésonéphros et des neurones

sensoriels du SNC. Dans les embryons de souris, Lim1 est exprimé dans le mésoderme dans la strie primitive. À 7,5 jours, Lim1 est retrouvé dans un motif en forme de fer à cheval à la périphérie du nœud ainsi que des deux côtés de la notocorde immédiatement adjacente. De plus, Lim1 est retrouvé dans le mésoderme latéral et intermédiaire. Plus tard, l'expression se réduit progressivement au mésoderme intermédiaire, aux cordons néphrogènes et éventuellement aux canaux et aux tubules mésonéphrotiques. À 10,5 jours, Lim1 apparaît également dans des régions restreintes du système nerveux central (SNC) associées à la fonction sensorielle. Le diencephale latéral, le cerveau postérieur et les neurones commissuraux présumés dans la moelle épinière dorsale montrent tous une expression de Lim1 (Barnes *et al.*, 1994).

Pendant le développement du système urogénital, l'expression de Lim1 a été documentée dans le conduit de Wolff (mésonéphrique) et les gonades fœtales. Lim1 est exprimé dans l'épithélium du canal de Müller en développement qui engendre les organes de l'appareil reproducteur féminin : l'oviducte, l'utérus, le col et le vagin.

7.2. A l'âge adulte

Chez la souris adulte, Lim1 est exprimé dans le cervelet / médulla, le rein et à des niveaux très bas dans le cerveau (Barnes *et al.*, 1994).

Selon la première étude d'expression de Lim1 chez l'homme publiée en 1997, Lim1 a été détectée dans le cerveau, le thymus et le tissu amygdalien (Dong *et al.*, 1997).

La récente base de données *Human Protein Atlas RNA-seq* de tissus normaux adultes indique une absence d'expression de Lim1 dans 27 tissus représentatifs de tous les principaux organes provenant de 95 individus humains adultes: la glande surrénale, l'appendice, la moelle osseuse, le cerveau, le côlon, le duodénum, l'endomètre, l'œsophage, le tissu adipeux, la vésicule biliaire, le cœur, le rein, le poumon, les ganglions, le pancréas, le placenta, la prostate, les glandes salivaires, la peau, l'intestin, la rate, l'estomac, les testicules, la thyroïde et la vessie. Cependant, 4 échantillons de tissu rénal étaient positifs et une très faible expression était détectée dans 8 échantillons de testicules.

HPA RNA-seq utilise l'analyse quantitative transcriptomique *RNA-sequencing* pour classer l'expression des gènes spécifiques au tissu à travers un ensemble représentatif de tous les principaux organes et tissus humains qui servira de base de données pour les études de la biologie humaine et de la maladie.

Dans un des travaux du laboratoire d'accueil sur le facteur Lim, son expression était absente dans 44 tissus humains du rein normal adulte (Dormoy *et al.*, 2011).

7.3. Dans les lignées cellulaires cancéreuses

Lim1 a été retrouvé également dans des lignées cellulaires de leucémie myéloïde aigue (Dong *et al.*, 1997) ainsi que les lignées du CCC indépendamment du statut VHL (Dormoy *et al.*, 2011).

7.4. Dans les tumeurs

L'expression de Lim1 a été détectée dans 4 des 5 échantillons primaires de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Dong *et al.*, 1997).

(Guertl *et al.*, 2011) ont étudié l'expression de Lim1 dans des néphroblastomes humains (tumeurs rénales de l'enfant). 12 des 32 néphroblastomes analysés ont montré un marquage nucléaire de Lim1. Un néphroblastome régressif avait une expression diffuse de LIM1 dans les structures tubulaires ; tous les autres avaient une positivité focale dans les structures mésenchymateuses blastémales et épithéliales. Ces résultats suggèrent que la persistance de l'expression du facteur néphrogénique Lim1 pourrait contribuer à la pathogenèse de ces lésions.

(Dormoy *et al.*, 2011) ont évalué l'expression de Lim1 dans 44 tissus tumoraux de CCR issus de patients et ont retrouvé une expression quasi-exclusive de Lim1 dans les tumeurs primitives comparativement aux tissus normaux correspondants où Lim1 était absent.

Une surexpression de Lim1 a été retrouvée dans 187 échantillons humains de médulloblastomes (Mumert *et al.*, 2012).

8. Rôle de Lim1 pendant le développement

8.1. Les mouvements cellulaires pendant la gastrulation et les destinées cellulaires

Les embryons de *Xenopus* Lim1 mutants manquent de structures antérieures de la tête et ne parviennent pas à former un axe approprié en raison d'un problème de mouvements cellulaires pendant la gastrulation, même si les identités de cellules mésodermiques sont bien spécifiées. Une perturbation similaire des mouvements cellulaires dans le mésoderme est observée chez les souris Lim1 mutantes. La protocadhérine paraxiale (PAPC) est une glycoprotéine transmembranaire qui joue un rôle dans l'adhésion et les mouvements cellulaires durant la gastrulation (Kuroda, *et al.*, 2002). De manière intéressante, l'expression de la PAPC est perdue dans le mésoderme des embryons de souris et de *Xenopus* Lim1 mutants et la surexpression de Lim1 augmente l'expression de la PAPC. L'apport exogène de la PAPC améliore les effets causés par la perte du Lim1 chez *Xenopus* Lim1 mutant. Ces travaux démontrent ainsi le rôle important de Lim1 dans les mouvements cellulaires et identifient PAPC comme cible de Lim1 (Hukriede *et al.*, 2003). L'étude des destinées développementales des

cellules dans la couche endodermique de l'embryon de souris a révélé un modèle régionalisé de distribution des progéniteurs de l'endoderme du sac vitellin et de l'intestin embryonnaire. En traçant le site d'origine des cellules qui sont attribuées à des régions spécifiques, les progéniteurs endodermiques sont déjà organisés en prévision des destinations respectives. L'étude de la cartographie du devenir cellulaire chez les embryons *Lim1* mutants a révélé que la régionalisation des progéniteurs endodermiques de l'intestin embryonnaire est anormale et que les mouvements cellulaires dans l'endoderme sont entravés. Ces travaux confirment le rôle de *Lim1* dans les mouvements cellulaires et la régionalisation des destinées cellulaires au stade précoce de la vie embryonnaire (Tam *et al.*, 2004).

8.2. Formation de la tête

Les souris *Lim1* KO homozygotes sont dépourvues de structures de tête antérieure mais l'axe du corps restant se développe normalement (Shawlot et Behringer, 1995). *Lim1* est exprimé très tôt dans la région organisatrice des embryons de souris, dans la strie primitive, le mésoderme et le mésendoderme antérieur de l'embryon de souris. À l'aide d'une mutation *Lhx1* conditionnelle, il a été démontré que ce facteur est requis dans le mésendoderme antérieur pour la formation de la tête. *Lim1* permet le mouvement des cellules qui accompagne la formation du mésendoderme antérieur, en partie par la régulation de l'expression de la protocadhérine-7 (*Pcdh7*). Les embryons mutants *Pcdh7* et les embryons portant des mutations conditionnelles de *Lim1* dans le mésendoderme antérieur présentent les mêmes défauts de formation de la tête. Là encore, ce travail montre l'implication de *Lim1* dans les mouvements cellulaires et la formation de la tête (Fossat *et al.*, 2015).

8.3. Le système nerveux

À partir du stade gastrula, la protéine X-*Lim1* a été détectée dans certaines régions du système nerveux central (Taira *et al.*, 1994). Ces observations impliquent le rôle de *Lim1* dans le développement du système nerveux à partir du télencéphale, le diencéphale et le cerveau postérieur (Karavanov *et al.*, 1996). *Lim1* est également nécessaire à l'organisation de la trajectoire des motoneurones dans les membres qui sera détaillé ci-dessous (Kania *et al.*, 2000).

8.4. Coordination de la migration des motoneurones

La carte neuronale topographique apparaît comme une conséquence du choix de la trajectoire axonique corrélée à la localisation du corps cellulaire. La voie de signalisation Reelin est cruciale pour la régulation des processus de migration neuronale et du positionnement dans le cerveau en développement. *Dab1* (*Disabled-1*) est une protéine adaptatrice critique pour la transduction du signal dans la voie Reelin (Tissir et Goffinet, 2003). Une étude a montré que *Lim1* dirige la migration des corps cellulaires et spécifie le choix de la trajectoire axonique des neurones de la colonne motrice latérale (LMC) à travers la régulation de l'expression de *Dab1*. Les embryons de souris avec une perte

conditionnelle de *Lhx1* dans les neurones de la LMC présentait une diminution d'expression de *Dab1* et des anomalies de positionnement axonal et de la migration du corps cellulaires des neurones de la LMC (Palmesino *et al.*, 2010). Cette étude montre le rôle de *Lim1* dans les mouvements cellulaires.

8.5. La différenciation des cellules de Purkinje dans le développement du cervelet

Les cellules de Purkinje sont l'un des principaux types de neurones du cervelet qui est essentiel pour le contrôle des mouvements et de la posture. L'expression de *Lim1* est détectée dans les cellules de Purkinje en développement peu de temps après avoir quitté le cycle cellulaire et migré hors de la zone ventriculaire cérébelleuse. Les souris mutantes dépourvues de fonction de *Lhx1* ont montré une réduction sévère du nombre de cellules de Purkinje. En outre, l'inactivation ciblée de *Ldb1*, cofacteur de *Lim1*, a donné lieu à un phénotype similaire. *Lim1* est donc essentiel dans la différenciation des cellules de Purkinje dans le cervelet de mammifère en développement (Zhao *et al.*, 2007).

8.6. L'appareil reproducteur féminin

Les organes de l'appareil reproducteur féminin des mammifères à savoir les oviductes, l'utérus, le col et le vagin supérieur, proviennent des conduits de Müller, une paire de tubes épithéliaux qui se forment dans le mésonéphros. L'expression et le rôle de *Lim1* dans la formation de l'épithélium du conduit de Müller ont été bien documentés. Les rares femelles *Lim1* mutantes qui survivent jusqu'à la naissance n'ont pas d'utérus et d'oviductes (Kobayashi *et al.*, 2004). Le *knock-out* spécifique de *Lim1* dans les conduits de Müller entraîne un blocage de l'allongement du conduit et une hypoplasie utérine caractérisée par la perte entière de l'endomètre. Il a été montré que *Lim1* agit de manière autonome pour maintenir les cellules progénitrices pour l'allongement des conduits de Müller (Huang *et al.*, 2014). Ces études identifient *Lim1* comme le premier facteur de transcription essentiel dans les cellules souches épithéliales des conduits de Müller pour le développement du tractus reproducteur féminin. De plus, ces études mettent en évidence l'intervention de *Lim1* dans les interactions épithéliales mésenchymateuses pour la différenciation du compartiment tissulaire utérin.

8.7. Les gonades

Le travaux pionniers de (Kobayashi *et al.*, 2004) et de (Shawlot et Behringer, 1995) ont montré que l'inactivation de *Lhx1* entraîne une inhibition de la morphogenèse des gonades, suggérant un rôle de *Lim1* dans la formation des gonades. *Lhx1* est nécessaire pour le développement du mésoderme intermédiaire d'où se différencie la crête gonadique. Avant la détermination du sexe, l'ébauche gonadique est formée comme un primordium bipotentiel avec la capacité de se différencier en testicules ou en ovaires selon la présence ou l'absence du gène *Sry*. Chez les individus mâles,

l'expression du gène de détermination testiculaire SRY par les précurseurs des cellules de Sertoli aboutit à la différenciation de la gonade bipotentielle en testicules. Les expériences *knock-out* ont impliqué cinq gènes dans la formation et la survie du primordium gonadique: *Wt1*, *Sfl*, *Lim1*, *Lhx9* et *Emx2* (Guo *et al.*, 2002). Une autre étude suggère le rôle de *Lim1* dans la spermatogenèse des mammifères. L'auto-renouvellement des cellules souches spermatogoniales des rongeurs est fortement influencé par le facteur GDNF (*Glial Cell Derived Neurotrophic Factor*). Chez la souris, l'activation de GDNF augmente l'expression du *Lhx1*, qui influence l'auto-renouvellement des cellules souches (Oatley et Brinster, 2008). Le rôle ou l'expression de *Lim1* pendant la spermatogenèse chez l'homme n'ont jamais été décrits. La récente base de données *Human Protein Atlas RNA-seq* de tissus normaux adultes a montré une très faible expression de *Lim1* dans 8 échantillons de testicules.

8.8. Rôle dans la néphrogenèse

8.8.1. Spécification du champ des cellules progénitrices rénales

Dans l'embryon des vertébrés, le rein est dérivé du mésoderme intermédiaire. Le facteur de transcription *Lim1* est exprimé très tôt dans le mésoderme intermédiaire et est l'un des premiers gènes à être exprimé dans le mésenchyme néphrétique.

La co-surexpression de *Lhx1* et *Pax-8* a un effet synergique qui aboutit au développement d'un rein hyperplasique et à la formation de tubules pronéphriques ectopiques (Carroll et Vize, 1999; Wu *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que la surexpression de *Lim1* avec son cofacteur *Ldb1* chez *Xenopus* induit une expansion du rein pronéphrique. Cette expansion présente des champs rénaux bien différenciés, notamment des tubules proximaux plus larges et plus importants. Ces résultats démontrent le rôle de *Lim1* dans la spécification du champ rénal et surtout la mise en place des tubules proximaux (Cirio *et al.*, 2011).

8.8.2. Morphogenèse tubulaire

L'organogenèse rénale nécessite la morphogenèse des tubules épithéliaux. Les interactions inductives entre les bourgeons urétéraux ramifiés et le mésenchyme métanéphrique conduisent à des transitions du mésenchyme à l'épithélium et à la morphogenèse tubulaire pour former le néphron, l'unité fonctionnelle du rein.

Bien que presque tous les mutants *Lim1* meurent autour de E10.0 en raison de l'échec de la fusion chorioallantoïde pour la formation du placenta, les rares nouveau-nés *Lim1*-null manquent de métanéphros (Shawlot et Behringer, 1995). Cette agénésie des métanéphros résulte de l'échec de la formation appropriée du conduit néphrique (Tsang *et al.*, 2000), ce qui entraîne secondairement l'absence d'induction des métanéphros. L'utilisation du modèle KO spécifique au tissu a permis de

montrer que Lim1 fonctionne dans des compartiments tissulaires distincts du métanéphros pour le développement correct des bourgeons urétéraux et le modelage des vésicules rénales pour la formation de néphron. Lim1 a des rôles essentiels dans de multiples étapes de la morphogenèse tubulaire épithéliale lors de l'organogenèse rénale.

8.8.3. L'extension du conduit néphrique et la morphogenèse du bourgeon urétéral.

Le conduit néphrique joue un rôle central dans le développement du système urogénital des mammifères. La suppression conditionnelle de Lim 1 dans l'épithélium néphrique au moment de l'apparition du conduit néphrique conduit à une hypoplasie rénale et une hydronéphrose. Les études sur le développement ont révélé que l'extension du conduit néphrique était altérée, que le bourgeon urétéral était plus petit et que la ramification du bourgeon urétéral était réduite. De plus, le conduit néphrique n'était généralement pas maintenu et les canaux de Müller étaient tronqués. L'analyse moléculaire a révélé que l'expression de Pax-2 dans le conduit néphrique n'était pas altérée mais que les expressions de Wnt9b et de l'E-cadhérine étaient nettement modifiées. Ces résultats indiquent que Lim1 est nécessaire à l'extension du conduit néphrique et à la croissance du bourgeon urétéral et suggèrent que Lim1 agit en régulant et en maintenant la différenciation de l'épithélium néphrique (Pedersen *et al.*, 2005).

8.8.4. Formation des néphrons

L'ablation conditionnelle de Lim1 spécifiquement dans le mésenchyme métanéphrique a donné naissance à des souris nouveau-nés qui avaient des reins mais pas de néphrons (Kobayashi *et al.*, 2005). La néphrogenèse est un processus continu qui commence par l'induction du mésenchyme métanéphrique par le bourgeon urétéral, autour du jour embryonnaire E10,5. Le premier néphron mature est observé à E16. L'analyse histologique suggère que le développement des néphrons mutants Lim1 s'arrête au stade de la vésicule néphrique, qui commence autour de E11.0. Lim1 est nécessaire pour un motif correct de la vésicule néphrique (Kobayashi *et al.*, 2005). Le développement de la vésicule néphrique représente un stade de développement important dans lequel la polarité du néphron est établie. La perturbation de ses motifs entraîne une rupture de la formation des structures du néphron telles que les tubules proximaux et l'épithélium glomérulaire (Wang *et al.*, 2003).

8.8.5. La transition épithélio-mésenchymateuse

L'organogenèse rénale est un phénomène très complexe qui nécessite plusieurs étapes de transition épithélio-mésenchymateuse et de branchements multiples du bourgeon urétral. Au cours du développement rénal, Lim1 joue un rôle critique dans l'induction d'un phénotype cellulaire épithélial. Dans une lignée cellulaire mésenchymateuse, la surexpression de Lim1 conduit à une induction de

l'expression de la kératine 7, c'est-à-dire, à une transformation vers un phénotype épithélial. La kératine 7 est typiquement exprimée dans les épithélia simples, y compris les conduits rénaux (Guertl *et al.*, 2011).

8.8.6. Effet de La surexpression de Lim1

Pax-8/2 jouent un rôle important dans la formation du rein embryonnaire aux côtés de Lim1. Ces gènes sont initialement exprimés dans des domaines qui se chevauchent dans la gastrula et les cellules exprimant ces gènes continueront à former le rein. Chez *Xenopus*, l'expression ectopique de Pax-8 ou de Lim1 seuls entraîne le développement de tubules pronéphriques plus gros avec un marquage positif pour les structures des tubules proximaux. La co-surexpression de Pax-8 et Lim1 a un effet synergique et conduit à la formation de structures rénales fortement agrandies et ectopiques. En effet, les structures rénales formées sont plus complexes avec un nombre élevé de branchements. De plus, les tubules pronéphriques ectopiques présentent un marquage très élevé pour le type de tubules proximaux (3G8). Cet effet était synergique plutôt qu'additif. Pax-2 peut également synergiser avec Lim1 mais le profil d'expression de ce gène indique qu'il fonctionne normalement plus tard dans le développement du pronéphros que Pax-8 (Carroll et Vize, 1999). Il est à noter que Pax-8/2 sont surexprimés dans le CCC et sont utilisés en routine pour le diagnostic de CCC. Ces trois gènes agissent en synergie et peuvent jouer un rôle important dans la carcinogenèse rénale.

Le facteur de transcription HNF-1 β (*hepatocyte nuclear factor-1 β*) est un facteur développemental à homéodomaines. Les mutations hétérozygotes dans HNF-1 β chez l'Homme sont associées à des malformations rénales kystiques et à un diabète de type MODY5 (*maturity onset diabetes of the young*) (Bohn *et al.*, 2003; Wild *et al.*, 2000). La surexpression de HNF-1 β dans les embryons de *Xenopus* conduit à une agénésie des tubules et des conduits pronéphrotiques. Comme HNF-1 β , Pax-8 et Lim1 constituent les premiers régulateurs de l'anneau pronéphrique, il est possible qu'ils coopèrent pendant la néphrogenèse précoce. Il a été montré que HNF-1 β peut reverser l'hyperplasie et l'induction du pronéphros ectopique médiées par la surexpression de Pax-8 et Lim1. Il semble que HNF-1 β agisse de manière antagoniste à Pax-8 et à Lim1 dans certains processus pendant la néphrogenèse (Wu *et al.*, 2004).

Comme décrit avant, la surexpression de Lim1 avec son cofacteur Ldb1 induit une expansion du champ rénal bien différencié avec des tubules proximaux plus larges et plus importants (Cirio *et al.*, 2011).

Dans tous ces travaux, la surexpression de Lim1 induit une hyperplasie des tubules proximaux où le CCC trouve son origine. Ceci argumente le rôle oncogénique de Lim1 dans la carcinogenèse rénale où Lim1 est surexprimé (Dormoy *et al.*, 2011).

9. Rôle de Lim1 à l'âge adulte

Lim1 n'est quasiment pas exprimé à l'âge adulte. Son expression est limitée dans des régions discrètes du cerveau dont le rôle a été récemment identifié.

➤ La différenciation des noyaux suprachiasmatiques et le rythme circadien

Le rythme circadien chez les vertébrés est organisé par les noyaux suprachiasmatiques hypothalamiques (NSC). Lim1 est essentiel à la différenciation et à la fonction terminale des NSC. La suppression ciblée de *Lhx1* dans les NSC pendant le développement entraîne une perte des neuropeptides impliqués dans les fonctions circadiennes et par conséquent les souris déficientes en Lim1 présentent des rythmes d'activité circadienne très désorganisés (Bedont *et al.*, 2014).

Les NSC sont stimulés par la lumière mais sont résistants aux changements de température qui eux, stimulent les horloges périphériques (An *et al.*, 2013). Il a été montré que Lim1 stimule l'expression de Vip (*vasoactive intestinal peptide*), qui a un rôle principal dans la synchronisation des horloges cellulaires et l'organisation du rythme circadien (Aton *et al.*, 2005). Une désynchronisation cellulaire est observée dans le NSC déficient en Lim1 qui est liée principalement à la perte de l'expression de Vip (Bedont *et al.*, 2014; Hatori *et al.*, 2014). Les rythmes d'activité circadienne chez les souris déficientes en *Lhx1* sont similaires aux souris déficientes en Vip sous des cycles lumière-sombre. De plus, une impulsion lumineuse à changement de phase entraîne une réduction aiguë de l'expression de Lim1 et de ses gènes cibles. Les souris dépourvues de *Lhx1* dans le NSC sont rapidement déphasées sous un paradigme *jet-lag* et leur comportement se détériore progressivement dans des conditions constantes (Hatori *et al.*, 2014). Une autre étude a comparé les rythmes circadiens du sommeil chez des souris déficientes en *Lhx1*. Ces travaux ont montré la perte du contrôle de la lumière sur le sommeil chez les mutants *Lhx1* (Bedont *et al.*, 2017).

10. Mutation et maladies congénitales

10.1. Rein dysplasique

Une étude a montré l'absence d'expression de Lim1 dans des reins dysplasiques. Cette étude appuie donc le concept d'un rôle crucial de Lim1 dans le développement rénal pendant la vie embryonnaire (Guertl *et al.*, 2011).

10.2. Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH)

Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) se caractérise par une aplasie congénitale de l'utérus et de la partie supérieure du vagin chez des femmes qui ont habituellement des ovaires normaux et un caryotype normal. Le MRKH peut se produire sous une forme isolée (type I) ou en

combinaison avec d'autres malformations associées (type II). Chez environ 6% de ces patientes, des délétions de la région chromosomique 17q12 ont été identifiées. Le gène *Lhx1*, qui se situe dans la région, a été suggéré comme l'agent causal car l'inactivation de *Lhx1* chez la souris provoque un phénotype complexe comprenant une aplasie des conduits de Muller. Des analyses séquentielles de *Lhx1* dans une grande cohorte de patients MRKH montrent une mutation hétérozygote de type frame shift entraînant un codon stop prématuré de Lim1. De ce fait, les mutations hétérozygotes de *LHX1* pourraient être une cause du syndrome MRKH dans un sous-groupe de patients (Ledig *et al.*, 2012).

11. Implication dans la carcinogénèse

Les gènes LIM-HD sont l'une des sous-familles les plus importantes dans le développement de divers organismes. De nombreuses études ont révélé le rôle potentiel de cette sous-famille dans le développement tumoral. Parmi les 12 gènes LIM -HD humains, 10 protéines LIM-HD étaient associées au cancer (Wang *et al.*, 2014). Le facteur de transcription Lim1 a été décrit dans 3 pathologies cancéreuses mais son rôle dans la carcinogénèse rénale a été identifié pour la première fois par le laboratoire d'accueil (Dormoy *et al.*, 2011).

11.1. Nouvel oncogène dans le carcinome à cellules rénales

Le laboratoire d'accueil a récemment montré que Lim1 est une cible transcriptionnelle de SHH/Gli dans le CCC humain (Dormoy *et al.*, 2009) et qu'il est spécifiquement réexprimé dans les lignées cellulaires de CCC humain quel que soit leur statut VHL. Lim1 est également surexprimé dans les tissus tumoraux de tous stades (40 paires de tissus) comparativement aux tissus normaux correspondants où il est absent (Dormoy *et al.*, 2011). En outre, Lim1 a été identifié comme un nouvel oncogène affectant la prolifération, l'apoptose et les mouvements cellulaires (motilité, migration et invasion cellulaires) *in vitro* ainsi que la prolifération et l'apoptose sur le modèle *in vivo* de xénogreffe de CCC implanté en sous-cutané (modèle d'étude non invasif de la croissance tumorale) à partir de lignées tumorigéniques chez la souris *nude* (Dormoy *et al.*, 2011). Ces résultats identifient le facteur Lim1 comme un acteur essentiel de la croissance du CCC et suggèrent qu'il joue un rôle important dans le processus d'invasion tumorale. Pour faire suite à ces travaux, mon travail a été d'étudier le rôle de Lim-1 dans le cancer du rein avancé et donc dans l'invasion métastatique, stade affectant plus de la moitié des patients.

11.2. Néphroblastome

Les néphroblastomes sont des néoplasmes embryonnaires qui ressemblent aux différents stades du développement rénal tant sur le plan morphologique que sur le plan génétique. De nombreux facteurs néphrogéniques impliqués dans la néphrogenèse sont réactivés dans les néphroblastomes tels que Pax-2 et CITED1 (*Cbp/p300-interacting transactivator 1*). Dans cette étude, 12 sur 32 néphroblastomes

analysés ont montré une positivité nucléaire à l'immunomarquage Lim1. Un néphroblastome régressif avait une expression diffuse de Lim1 dans les structures tubulaires ; tous les autres présentaient une positivité focale dans les structures mésenchymateuse, blastémale et épithéliale. L'étude de Guertl *et al* appuie notre axe de recherche que des voies développementales sont réactivées par les cellules cancéreuses et contribuent à la tumorigenèse. Dans un petit sous-ensemble de néphroblastomes, Lim1 pourrait contribuer à la pathogenèse de ces lésions (Guertl *et al.*, 2011).

11.3. Médulloblastome

Les médulloblastomes sont des tumeurs cérébrales malignes qui apparaissent dans le cervelet chez les enfants et diffusent par la suite à travers le liquide céphalo-rachidien aux espaces leptoméningés du cerveau et de la moelle épinière. En raison du mauvais pronostic des patients avec dissémination métastatique, les oncologues pédiatriques ont développé des protocoles thérapeutiques agressifs, combinant chirurgie, radiothérapie crânio-spinale et chimiothérapie à haute dose, qui causent souvent des effets neurotoxiques invalidant à long terme chez les survivants. Mumert *et al* ont montré que la surexpression de Lim1 dans les tumeurs de patients est corrélée avec la forme agressive de médulloblastome ainsi qu'avec le nombre de métastases et une survie la plus courte. De plus, l'expression ectopique de Lim1 dans un modèle murin de médulloblastome induit par SHH favorise la dissémination métastatique. Ceci appuie notre hypothèse sur le rôle de Lim1 dans la progression tumorale (Mumert *et al.*, 2012).

IV. Métastases

Les métastases constituent la principale cause de morbidité et de mortalité par cancer et représentent environ 90% des décès par cancer (Blumenthal, 1996). Le processus métastatique est un processus au cours duquel les cellules cancéreuses diffusent à partir de la tumeur primaire, s'installent et se développent sur un autre site à distance de la tumeur primaire.

L'hypothèse de Stephen Paget en 1889 selon laquelle la métastase dépend de « *seed and soil* » est toujours d'actualité. Il est maintenant admis que la dissémination métastatique et la croissance au site secondaire n'est pas une question de hasard mais plutôt qu'elle est déterminée par la dépendance de «graines» (les cellules cancéreuses) sur un «sol» (l'organe cible) (Damsky *et al.*, 2013). Jusqu'à récemment, la recherche sur le cancer a principalement porté sur le développement de méthodes qui peuvent détecter une tumeur au stade précoce et sur les agents qui inhibent la croissance tumorale. Les progrès dans la détection et le traitement du cancer ont rendu uniquement les tumeurs au stade localisé gérables ou curables. Les formes avancées restent cependant incurables (Wells *et al.*, 2013).

1. Description du processus métastatique

Figure 14

Le développement métastatique est le résultat d'une succession complexe d'événements biologiques et cellulaires appelés «cascade d'invasion-métastase». La cascade implique : le développement de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), le départ des cellules métastatiques de la tumeur primaire (détachement et migration), l'invasion à travers la membrane basale (MB) et la MEC (matrice extracellulaire) entourant la tumeur, l'invasion de la MB soutenant l'endothélium des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques, le passage des cellules métastatiques dans le sang et/ou les vaisseaux lymphatiques, l'adhésion des cellules métastatiques circulantes à l'endothélium des capillaires de l'organe cible, l'invasion des cellules à travers la couche de cellules endothéliales et la MB environnante (Extravasation) et enfin l'installation et la croissance des tumeurs métastatiques sur l'organe cible (Daenen *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012).

La dissémination cellulaire métastatique nécessite que les cellules se détachent de la tumeur primaire (Eccles et Welch, 2007). Dans des circonstances normales, les cellules épithéliales et endothéliales subissent une apoptose lorsqu'elles sont détachées, un phénomène appelé anoïkis (induction de l'apoptose provoquée par le détachement de la MEC) (Sakamoto et Kyprianou, 2010). Il s'agit d'un mécanisme conçu pour protéger l'organisme des cellules qui se trouvent en dehors de leur emplacement anatomique normal. Ainsi, les cellules métastatiques doivent développer un mécanisme

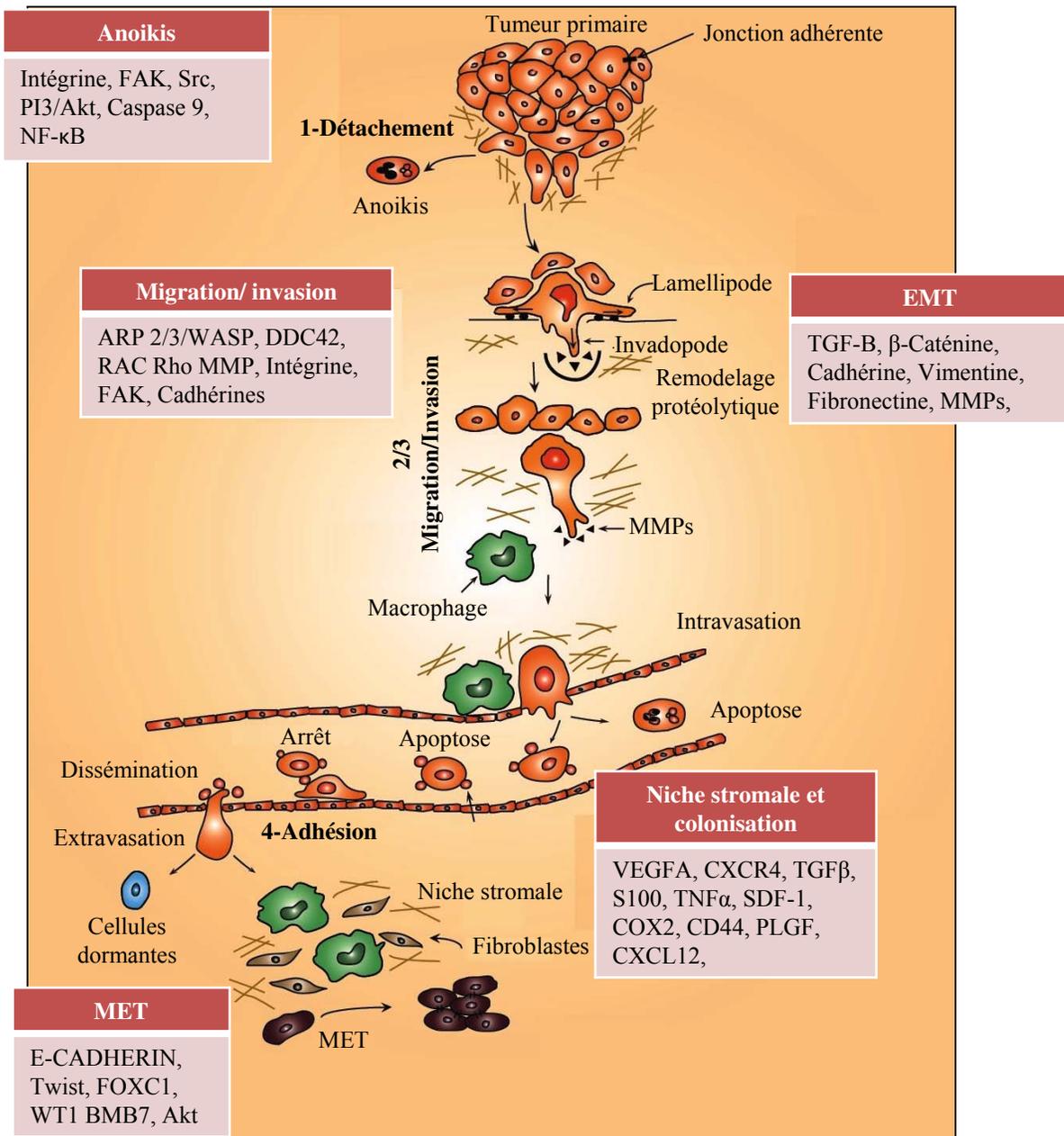


Figure14: Processus métastatique

Les quatre étapes essentielles du processus métastatique sont : le détachement, la migration, l'invasion et l'adhérence. La dissémination métastatique nécessite que les cellules se détachent de la tumeur primaire, et résiste à l'anoïkis. La résistance à l'anoïkis est associée à l'EMT. Le phénotype mésenchymateux permet aux cellules d'augmenter leurs capacités migratoires et invasives grâce à la formation de protrusions invasives (invadopodes). Après intravasation, les cellules tumorales doivent échapper au système immunitaire. Grâce à des signaux chimio-attractants, les cellules invasives décident de s'arrêter et adhèrent à l'endothélium ce qui permet leur extravasation vers l'organe cible. Enfin, afin de proliférer, les cellules tumorales doivent inverser leur phénotype via l'EMT.

FAK, *focal adhesion kinase*; NF-κB: *Nuclear factor-kappa B*; MMPs: métalloprotéases matricielles; TNFα, *tumor necrosis factor α*; cox2, *cyclo-oxygénase 2*.

D'après M.E. Hernández-Caballero, *Molecular Mechanisms of Metastasis: Epithelial-Mesenchymal Transition, Anoikis and Loss of Adhesion*. Additional information is available at the end of the chapter. <http://dx.doi.org/10.5772/55399>:

pour résister à l'anoïkose et survivre lorsqu'elles sont détachées de la MEC ou en l'absence d'une MEC. La résistance à l'anoïkose est associée à des changements de propriétés des cellules tumorales, connues sous le nom de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), caractéristique de la plupart des cellules métastatiques (Alizadeh *et al.*, 2014). Plus précisément, les cellules épithéliales se transforment de cellules hautement différenciées, polarisées et organisées en cellules indifférenciées, isolées et mésenchymateuses avec des propriétés migratoires et invasives (Profumo et Gandellini, 2013). L'EMT permet aux cellules d'augmenter leurs capacités migratoires et invasives grâce à la formation de protrusions invasives. Les protubérances sont les parties étendues formées au bord d'attaque des cellules mobiles (**Figure 15**), (Alizadeh *et al.*, 2014). L'EMT dans les cellules tumorales est transitoire. Avant qu'une cellule métastatique ne s'installe et ne prolifère, elle doit inverser son phénotype mésenchymateux en un phénotype épithélial ; on parle alors de transition mésenchymale épithéliale (MET) (Profumo et Gandellini, 2013).

Les quatre étapes essentielles du processus métastatique sont : le détachement, la migration, l'invasion et l'adhérence. La compréhension de ces quatre étapes contribue à une meilleure connaissance du processus métastatique et à identifier les cibles d'intervention.

1.1. L'adhésion, détachement, migration et invasion

1.1.1. L'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire se réfère essentiellement à la fixation des cellules entre elles (adhésion cellule-cellule) et à leur environnement, principalement la MEC, grâce à des jonctions cellulaires. L'adhésion et le détachement sont des conditions préalables à la motilité cellulaire essentielle au processus métastatique (Wells *et al.*, 2013). L'adhésion est également impliquée dans des mécanismes pour activer la prolifération cellulaire, les voies de survie et la motilité cellulaire à travers les interactions des intégrines avec les molécules en aval (Alizadeh *et al.*, 2014). L'adhésion s'effectue principalement en reliant le cytosquelette intracellulaire entre les cellules (adhésion cellule-cellule) ou en connectant le cytosquelette cellulaire avec des composants de la MEC tels que le collagène, la fibronectine, le fibrinogène et la laminine à travers un groupe de molécules d'adhésion cellulaire (CAM). Les CAM sont des glycoprotéines de surface qui sont typiquement des récepteurs transmembranaires. Les CAM incluent principalement les CAM à base de calcium (cadhérines, intégrines ou sélectines) et les CAM indépendantes du calcium (la superfamille d'immunoglobulines (Ig-SF) et les récepteurs CD44) (Li et Feng, 2011).

1.1.1.1. Les intégrines

Les intégrines sont responsables de l'adhésion cellulaire à la MEC. Elles font partie de la famille des glycoprotéines qui forment des récepteurs hétérodimères pour les molécules de la MEC telles que la

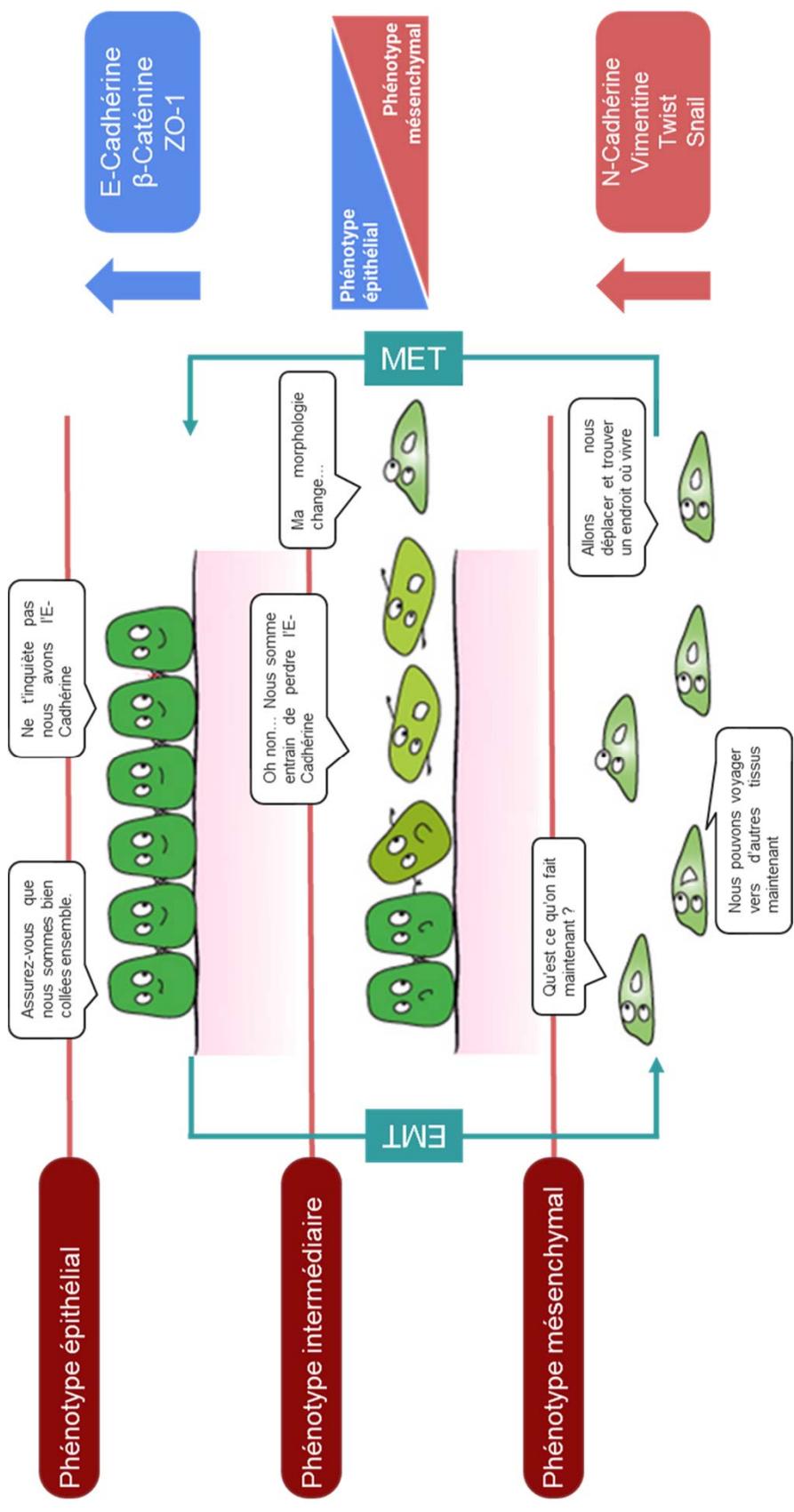


Figure 15: Transition épithélio-mésenchymateuse

De multiples voies peuvent déclencher l'EMT: l'axe PI3/Akt, Wnt/ β -caténine, NF- κ B, TGF- β . La caractéristique commune de ces voies est l'activation des «facteurs de transcription maîtres» (Snail, slug, Zeb-1, Twist) qui programment l'EMT dans les cellules épithéliales, à savoir la régulation négative de l'expression de la E-cadhérine et d'autres gènes liés au phénotype épithélial et l'activation de la transcription des gènes associés au phénotype mésenchymateux. La matrice extracellulaire et les cytokines inflammatoires contribuent également à l'EMT.

ZO-1, *Zona Occludens-1*; Zeb-1, *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*.

fibronectine, la laminine, le collagène, le fibrinogène et la vitronectine. L'intégrine transmet des signaux extracellulaires au réseau intracellulaire et inversement. La transmission est médiée par l'intégrine activée à de nombreuses molécules de signalisation telles que la FAK (*Focal adhesion kinase*), PI3K, ERK1 et 2 / MAPK qui régulent la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose de la tumeur et des cellules endothéliales (Alizadeh *et al.*, 2014). Les intégrines facilitent également le processus par activation des métalloprotéinases matricielles (MMP) (Brooks *et al.*, 1996; Deryugina, Bourdon *et al.*, 1997). Au cours du processus métastatique, la surexpression des intégrines est liée à la progression tumorale (Schlaepfer *et al.*, 1998; Jin et Varner, 2004). Ces différents rôles que jouent les intégrines en font une cible thérapeutique anti-cancéreuse attrayante.

1.1.1.2. Les cadhérines

Les cadhérines constituent une superfamille de glycoprotéines transmembranaires qui assurent une adhésion de type cellule-cellule (Alizadeh *et al.*, 2014). Plus de 20 membres ont été décrits avec une expression spécifique pour chaque type cellulaire tels que les E-cadhérines dans les cellules épithéliales, les N-cadhérines dans les cellules mésenchymateuses (Li et Feng, 2011). Le domaine intracellulaire de l'E-cadhérine est lié au cytosquelette à travers des protéines *linker* (complexe de caténine). La formation d'un complexe E-cadhérine-caténine stabilise l'adhésion cellule-cellule mais déclenche également la transduction d'un signal en aval de PI3K et MAPK (Rivard, 2009). La modification et /ou la perturbation de l'E-cadhérine ou de la caténine réduisent l'adhésion cellulaire (Hazan *et al.*, 2004). La diminution de l'expression d'E-cadhérine est un événement essentiel pour l'EMT retrouvé dans les cellules métastatiques. La perte d'adhésion permet aux cellules tumorales de se disséminer et éventuellement de métastaser. La perte de l'E-cadhérine est également corrélée à la perte de morphologie épithéliale et à l'acquisition du potentiel métastatique par les cellules cancéreuses (Riethmacher *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1999). La reconstitution d'un complexe d'adhésion E-cadhérine fonctionnel supprime les propriétés invasives de plusieurs types de cellules tumorales (Bogenrieder et Herlyn, 2003). La N-cadhérine est l'une des cadhérines mésenchymateuses impliquée dans l'adhésion des cellules au stroma. La N-cadhérine favorise la migration cellulaire et la métastase indépendamment de l'expression et de la fonction de l'E-cadhérine (Nieman *et al.*, 1999). La N-cadhérine est augmentée dans le cancer de la prostate, le cancer du sein et le cancer du foie. Les rôles critiques de la N-cadhérine dans l'adhésion et la migration des cellules tumorales en font une cible attrayante comme thérapie anti-cancéreuse.

1.1.1.3. Les sélectines

Les sélectines sont des molécules d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM) impliquées dans les interactions adhésives des leucocytes. Les sélectines sont impliquées dans les processus de la réponse immunitaire, de l'inflammation et de l'hémostase. Les sélectines sont capables de se lier à tout type de

carcinome humain (Alizadeh *et al.*, 2014), ce qui démontre leur rôle potentiel pour médier les contacts entre les cellules tumorales et le système vasculaire. L'inhibition de l'expression des sélectines entraîne une diminution significative du développement de métastases (Bendas et Borsig, 2012).

1.1.1.4. La superfamille des immunoglobulines (IgSF)

Les IgSF [*Ig-cell adhesion molecules (Ig-CAM)*] constituent un grand groupe de protéines de surface cellulaire impliquées dans l'adhésion des cellules (Barclay, 2003). Un certain nombre de molécules d'IgSF ont été identifiées comme biomarqueurs pour la progression du cancer. Par exemple, la CAM du mélanome (MCAM) a été impliquée dans la progression du cancer du mélanome, du sein et de la prostate (Johnson *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 2011). Et bien d'autres comme LICAM, NCAM, PECAM-1, ALCAM, ICAM-1 ont été liées à des cancers métastatiques incluant le mélanome, le gliome, le sein, l'ovaire, l'endomètre, la prostate et le côlon (Roland *et al.*, 2007; Siesser et Maness, 2009; Wai Wong *et al.*, 2012). Le blocage de NCAM a entraîné une susceptibilité à l'apoptose dans les cellules tumorales pulmonaires murines (Jeziarska *et al.*, 2006). De plus, NCAM, MCAM, ALCAM et LICAM sont augmentées dans les cellules suite à la perte de l'E-cadhérine.

1.1.1.5. Membres de CD44

Les membres de CD44 se caractérisent par une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion cellulaire (cellulaire-MEC) et la signalisation cellulaire (croissance, différenciation, survie et migration) (Webb *et al.*, 1990). L'extrémité N-terminale extracellulaire de CD44 permet la liaison à son ligand physiologique principal HA et à des protéines de la MEC telles que le collagène, la laminine, la fibronectine, la L-sélectine et l'ostéopontine. L'extrémité C-terminale intracellulaire est attachée au cytosquelette d'actine, ezrine et ankyrine, éléments essentiels non seulement dans la migration cellulaire mais aussi dans la transduction du signal. La propriété la plus importante de CD44 est sa capacité à lier HA, un facteur primordial dans le processus métastatique. L'inhibition de la liaison HA -CD44 semble bloquer la progression tumorale *via* l'inhibition de l'angiogenèse, de l'apoptose et de l'invasion (Orian-Rousseau, 2010).

1.1.2. Le détachement cellulaire

Le détachement de cellules se réfère à un processus par lequel les cellules se détachent principalement de la MEC. C'est la première étape requise dans la cascade métastatique (Buchheit *et al.*, 2014). Le détachement cellulaire implique à la fois des forces mécaniques et un clivage protéolytique. La dissociation extracellulaire des adhésions cellule-substrat peut être réalisée par clivage protéolytique des constituants matriciels médiée par des protéases matricielles ou par séparation des récepteurs de leurs substrats matriciels (Kirfel *et al.*, 2004). Le détachement cellulaire des cellules épithéliales de la MEC déclenche simultanément une régulation négative de Bcl-xL (molécule anti-apoptotique) et une

régulation positive du ligand Fas (FasL, molécule pro-apoptotique). C'est ce qui définit l'anoïkis. Les cellules cancéreuses métastatiques ont besoin de développer un mécanisme pour résister à l'anoïkose afin de survivre. Ceci inclut l'altération des systèmes enzymatiques dans les voies de signalisation qui régulent l'anoïkose, tels que les RTK, les facteurs d'EMT et NF- κ B. D'autres mécanismes (indépendants de l'anoïkose) sont mis en jeu par lesquels les cellules épithéliales normales meurent une fois détachées de la MEC. Afin de bloquer le processus métastatique, il est suggéré de cibler ces voies indépendantes et dépendantes de l'anoïkis (Buchheit *et al.*, 2014).

1.1.3. La migration et l'invasion cellulaires

Les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses sont deux paramètres critiques de la cascade métastatique. Les cellules métastatiques pénètrent dans la MEC à travers deux mécanismes différents: la migration cellulaire mésenchymateuse (fibroblastoïde) et la migration des cellules amiboïdes. La migration des cellules mésenchymateuses dépend des activités protéases pour dégrader la MEC pour le passage des cellules. L'inhibition des protéases dégradant la MEC, telles que les MMP, est efficace pour inhiber la migration des cellules mésenchymateuses. La migration cellulaire amiboïde est un processus indépendant des protéases au cours duquel les cellules utilisent des forces mécaniques pour ouvrir un chemin dans la MEC au lieu de la dégrader. Les caractéristiques de la migration des cellules amiboïdes sont l'attachement lâche de la MEC, la perte complète de la polarité cellulaire et la capacité de la chimiotaxie (Spano *et al.*, 2012). La majorité des cancers proviennent de tissus épithéliaux. Le cancer métastatique peut envahir et migrer en tant que cellules individuelles ou en tant que groupe collectif de cellules. Les cellules cancéreuses migrant en tant que cellules individuelles utilisent soit la migration dépendante de la protéase soit la migration indépendante de la protéase ; l'invasion amiboïde est décrite comme le phénotype migratoire le plus rapide par rapport à la migration des cellules mésenchymateuses.

Ces processus impliquent une réorganisation spectaculaire du cytosquelette d'actine et la formation concomitante de protrusions membranaires riches en actine (lamellipodes, filopodes, podosomes et s) au bord d'attaque des cellules mobiles. Les protubérances sont essentielles pour la migration et l'invasion par l'utilisation de forces mécaniques et d'activités protéases.

Les protrusions riches en F-actine comprennent des protubérances non invasives (lamellipode et filopode) et des protrusions invasives (invadopode). Lamellipode et filopode sont présents dans les cellules épithéliales normales tandis que les invadopodes sont surtout observés dans les cellules métastatiques (Alizadeh *et al.*, 2014).

Le cancer métastatique peut envahir et migrer en tant que cellules individuelles ou en groupe collectif de cellules. Les cellules cancéreuses individuelles peuvent employer la migration mésenchymateuse

ou la migration amiboïde. Les cellules collectives n'emploient que la migration des cellules mésenchymateuses. Les cellules individuelles impliquent la perte de polarité épithéliale et acquièrent une morphologie mésenchymateuse par EMT. Les caractéristiques essentielles de l'EMT sont la perturbation des contacts étroits cellule-cellule et l'acquisition d'une morphologie fibroblastoïde, avec une invasion et des interactions cellule-stroma accrues, ainsi que des taux plus lents de division cellulaire. Tout cela peut entraîner la libération de cellules individuelles à partir d'une tumeur épithéliale solide (Alizadeh *et al.*, 2014). Les cellules qui migrent collectivement conservent leurs jonctions cellule-cellule à travers l'expression continue de molécules d'adhésion. Elles migrent sous forme de feuillets, de brins, de tubes ou de grappes et peuvent rester connectées à la tumeur primaire (invasion coordonnée) ou se déplacer en groupes cellulaires détachés ou en grappes (migration de cohortes). Comme pour les cellules invasives simples, les cellules migratrices collectives forment des protrusions membranaires et des adhésions focales médiées par les intégrines. Pour pénétrer dans la MEC, les cellules génèrent un chemin d'invasion en utilisant des adhésions focales médiées par l'intégrine $\beta 1$ et l'expression locale de MMP14 à leur bord d'attaque pour cliver les fibres de collagène et les orienter dans des structures en forme de tube dans lesquelles la masse cellulaire suivante peut migrer (Friedl et Wolf, 2008; Wolf et Friedl, 2009). Cette diffusion groupée de cellules cancéreuses semble être très efficace pour envahir les vaisseaux lymphatiques ou sanguins et la survie cellulaire dans la circulation. La migration cellulaire collective est principalement observée pour les carcinomes basocellulaires et les carcinomes à cellules squameuses de diverses origines (Guan, 2015).

1.2. Le microenvironnement tumoral et la motilité cellulaire

La tumeur doit interagir avec son microenvironnement pour progresser (micro-environnement de la tumeur, TME). Le TME est étroitement impliqué dans les quatre étapes essentielles du processus métastatique (adhésion, détachement, migration et invasion). Structurellement, le TME comprend le stroma environnant et de soutien de la tumeur, les différents effecteurs du système immunitaire, les plaquettes sanguines, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les protéases, les cytokines, les hormones et d'autres facteurs humoraux. Ensemble, ces composants sont impliqués dans la croissance tumorale, l'angiogenèse et le développement métastatique (Bournazou et Bromberg, 2013; Fang et DeClerck, 2013; Goubran *et al.*, 2014; Naora, 2014; Wood, Pernemalm *et al.*, 2014). Les mécanismes d'interactions entre les cellules tumorales et le TME sont complexes et peuvent se diviser en deux catégories: les mécanismes dépendants du contact qui impliquent des molécules d'adhésion cellule-cellule et cellule-MEC et des mécanismes indépendants du contact impliquant des molécules solubles telles que des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines.

1.2.1. *Chimiokines*

Les chimiokines appartiennent à une grande famille de peptides de signalisation solubles induisant une migration des leucocytes (Ebert *et al.*, 2005; Onuffer et Horuk, 2002). Elles régulent principalement la motilité cellulaire dans une variété de cas physiologiques et pathologiques, y compris l'organogenèse des ganglions lymphatiques, l'infection, l'inflammation, la réparation des tissus, l'initiation et la progression du cancer (Kedrin *et al.*, 2007; Bodnar *et al.*, 2009; Wells *et al.*, 2013). Les chimiokines peuvent augmenter la motilité cellulaire des boucles de signalisation autocrine et paracrine dans le processus de métastase du cancer (Do Carmo *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2012). Par exemple, CXCR4, un récepteur de chimiokines, est exprimé dans une variété de cellules cancéreuses telles que le cancer du sein et du rein (Zlotnik, 2006; Gassenmaier *et al.*, 2013). CXCL12, un ligand CXCR4, est fortement exprimé dans les sites métastatiques incluant les poumons, le foie, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. CXCL12 stimule la prolifération et la survie des cellules cancéreuses qui expriment CXCR4 dans l'ovaire, les cellules gliales et le sein (Dewan *et al.*, 2006). Apparemment, l'expression de CXCR4 a été suggérée comme un marqueur de mauvais pronostic dans les cancers du sein et du rein (Kato *et al.*, 2003; Gassenmaier *et al.*, 2013).

1.2.2. *Facteurs de croissance*

En plus de la stimulation de la croissance cellulaire et de la prolifération cellulaire, de nombreux facteurs de croissance comme VEGF, FGF, PDGF, CTGF, HGF et EGF sont pleinement impliqués dans la migration cellulaire, l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, l'EMT et la régulation de l'adhésion cellulaire. Par exemple, la surexpression de l'EGFR augmente de manière significative la motilité et l'intravasation des cellules tumorales (Xue *et al.*, 2006). La voie de signalisation HGF/Met a été impliquée dans une variété de processus cellulaires y compris la motilité cellulaire, le remodelage du cytosquelette d'actine et la sécrétion de MMP (Ma *et al.*, 2003). Le CTGF (*connective tissue growth factor*) a été décrit pour être impliqué dans le remodelage de la MEC, l'angiogenèse, la chimiotaxie, l'adhésion et la migration des cellules ainsi que dans l'expression des MMP. La surexpression de CTGF a été associée au potentiel invasif des cancers du poumon et du sein. La neutralisation de CTGF avec un anticorps a réduit le développement de métastases dans le cancer du pancréas. L'inhibition de l'expression de CTGF pourrait conduire à une inhibition de la migration (Aguiar *et al.*, 2014). Les voies de signalisation des facteurs de croissance ont été des cibles efficaces pour inhiber la croissance tumorale et le développement métastatique (Guan, 2015).

1.2.3. *Les fibroblastes associés au cancer (CAF)*

Les CAF font partie du TME et participent à l'initiation et la progression tumorale (Profumo et Gandellini, 2013). Les CAF favorisent la croissance des tumeurs primaires par la sécrétion d'HGF (Micke et Östman, 2004). Les CAF expriment également SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*),

facteur impliqué dans l'invasion et la migration des cellules cancéreuses (Burger et Kipps, 2006; Luker *et al.*, 2006). La signalisation CAF constitue donc une cible pour le traitement du cancer.

1.2.4. Protéases et MMP

Au moins 500-600 protéases ont été identifiées. Elles assurent différentes fonctions telles que l'activation et l'inactivation d'enzymes, de facteurs de croissance, l'expression des gènes, la différenciation cellulaire, la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et la mort cellulaire. Leur lien avec le cancer a été identifié en 1946 par Fisher, qui a émis l'hypothèse que l'activité protéolytique associée à une tumeur est responsable de la dégradation de la matrice cellulaire et de l'invasion des cellules tumorales dans les tissus normaux environnants. Les principales enzymes responsables de la dégradation matricielle sont les métalloprotéinases matricielles (MMP). En plus des MMP, les serines protéases sont également impliquées (Shuman *et al.*, 2012).

Les MMP sont une famille d'endopeptidases dépendantes du zinc capables de cliver la membrane basale et tous les constituants de la MEC. Elles sont synthétisées comme enzymes inactives et activées à l'extérieur de la cellule par d'autres MMP ou serine protéinases. Les MMP comprennent au moins 26 protéases et sont subdivisées en quatre groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les matrilysines (Alizadeh *et al.*, 2014).

Le rôle des MMP dans les métastases est complexe. En plus du clivage de la MEC, leurs cibles impliquent des récepteurs aux facteurs de croissance, aux cytokines, aux chimiokines, des CAM, des ligands apoptotiques et des facteurs angiogéniques qui contribuent à tous les stades de la progression tumorale (Alizadeh *et al.*, 2014).

2. Ciblage des métastases

Il existe plusieurs raisons qui expliquent l'absence de traitement efficace sur les métastases. Premièrement, les néoplasmes sont biologiquement hétérogènes et contiennent des sous-populations de cellules avec des caractéristiques différentes. Deuxièmement, le processus métastatique sélectionne une petite sous-population de cellules à partir de la tumeur primaire qui est généralement la plus agressive. Troisièmement, l'interaction de la métastase avec le microenvironnement qui peut influencer sa croissance, son invasion et sa réponse aux agents cytotoxiques. Le blocage de l'EMT et/ou l'inversion de la résistance à l'anoïkose sont des approches rationnelles pour bloquer la progression tumorale. (Wells *et al.*, 2013). La motilité cellulaire joue un rôle essentiel dans le processus métastatique. L'interférence avec la motilité cellulaire devient une approche attrayante pour le traitement du cancer métastatique. Les approches comprennent principalement l'inférence des interactions des CAM avec leurs cibles et les voies de signalisation associées, et l'interférence de la

formation et de la fonction d'invadopodes (Wells *et al.*, 2013). Comme décrit précédemment, le TME joue un rôle essentiel dans le processus métastatique. De vastes efforts de recherche ont été réalisés pour cibler la communication des tumeurs avec le TME. Divers composants de TME ont été ciblés. Ils comprennent l'inhibition des protéases, l'interférence avec les processus inflammatoires, l'inhibition de la signalisation intégrine, l'interférence avec les processus d'hypoxie et le remodelage de la MEC (Wells *et al.*, 2013).

Malgré les efforts de recherche approfondis sur le traitement du cancer, la survie globale n'a pas été considérablement améliorée chez les patients atteints de cancer métastatique. Ceci est principalement dû au fait que le traitement prédominant du cancer se concentre sur l'inhibition de la croissance de la tumeur primaire, avec peu d'effet sur les métastases. Des succès limités ont été obtenus en termes de traitement des métastases cancéreuses, bien que les nouveaux médicaments anticancéreux ciblent aussi bien la tumeur primaire que la métastase. L'avancée rapide de la compréhension des métastases cancéreuses au niveau des leviers moléculaires et cellulaires ainsi que des voies de signalisation fournit de nombreuses cibles potentielles pour l'intervention de la métastase du cancer. Compte-tenu de la complexité de la cascade métastatique du cancer, telles que les voies indépendantes de l'anoikis, la migration de type cellules mésenchymateuses (protéase-dépendante) par rapport à la migration de type cellules amiboïdes (sans protéase), une combinaison qui inhibe les éléments multiples dans la métastase du cancer est requise. En outre, une inhibition simultanée de la croissance et de la métastase du cancer sera probablement nécessaire pour produire des résultats thérapeutiques cliniquement efficaces.

3. Les métastases dans le CCC

3.1. Les médiateurs biologiques des métastases

Les mécanismes biologiques qui sont impliqués dans le développement des métastases dans le CCR sont peu connus et de nombreuses études sont en cours. Dans ce chapitre, j'ai fait un recueil de tous les travaux qui ont décrit les processus impliqués dans le CCR métastatique.

Au niveau macromoléculaire, une étude a suggéré que des microvésicules dérivées de tumeur (qui se séparent du site primaire) peuvent participer à la dissémination métastatique par voie sanguine. Ces microvésicules provenant des cellules souches cancéreuses CD105+ semblent véhiculer des ARNm pro-angiogéniques et des microARN qui stimulent l'angiogenèse et la progression tumorale dans le CCR (Grange *et al.*, 2011).

Le système immunitaire joue également un rôle critique dans l'évolution des métastases. Dans les modèles précliniques de CCR, l'infiltration des neutrophiles dans les poumons s'accompagne d'une

suppression des métastases pulmonaires (López-Lago *et al.*, 2013). Inversement, la perte de chimiokines neutrophiles dans le poumon s'accompagne d'une augmentation des métastases pulmonaires.

D'autres cellules immunitaires ayant des effets négatifs sur l'immunité antitumorale, comme les MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*), ont montré un effet pro-angiogénique et pro-métastatique dans les modèles précliniques de CCR (Finke *et al.*, 2011).

Au-delà de ces événements macromoléculaires, plusieurs médiateurs moléculaires ont été identifiés. Dans le CCC portant des mutations au niveau du gène VHL, il a été proposé que la protéine CDCP1 contenant un domaine CUB peut favoriser le développement de métastases (Razorenova *et al.*, 2011). CDCP1 est régulé par des voies dépendantes de HIF et entraîne l'activation de la protéine kinase C- δ (PKC δ), ce qui augmente la migration cellulaire. L'expression de MUC1, une glycoprotéine liée à la membrane, est également dépendante de HIF; le blocage de MUC1 a montré une diminution marquée de l'invasion cellulaire et de la migration dans le CCR *in vitro* (Aubert *et al.*, 2009).

Divers récepteurs de chimiokines semblent également être surexprimés dans le CCC. Une augmentation de l'expression de CXCR4 et de son ligand CXCL12 a été associée à une augmentation de la dissémination métastatique dans des études précliniques (Struckmann *et al.*, 2008).

Les métastases osseuses se développent chez environ 30% des patients atteints de CCR ; elles représentent la complication la plus fréquente et la plus morbide chez les patients. L'os est un réservoir pour divers facteurs de croissance tels que le TGF- β 1. Il a été montré que TGF- β 1 stimule la croissance des cellules de métastases osseuses (Kominsky *et al.*, 2007). De plus, une surexpression de MMP13 a été retrouvée dans les métastases osseuses, qui peut être stimulée par le TGF- β 1 abondant dans la matrice osseuse (Kominsky *et al.*, 2008).

STIP1 (phosphoprotéine 1 induite par le stress) présente des niveaux d'expression élevée dans les tissus primitifs et métastatiques osseux de CCR. Cette augmentation est corrélée à un mauvais statut clinique chez les patients. La protéine STIP1 stimule la migration et l'invasion cellulaire dans le CCR par voie autocrine ainsi que la différenciation des ostéoclastes à travers la voie paracrine et l'augmentation de la cathepsine K (CTSK), enzyme clé de la résorption osseuse (Jiang Wang *et al.*, 2017).

La ghréline est une molécule régulatrice de l'appétit qui favorise la libération de l'hormone de croissance. L'expression de ghréline est observée dans les tubes proximaux et distaux (Mori *et al.*, 2000). Récemment, des niveaux élevés de ghréline ont été détectés dans le CCR métastatique et sont corrélés à un mauvais pronostic. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'inhibition de

l'expression de la ghréline a réduit la migration cellulaire et le développement de métastases *via* la régulation de l'E-cadhérine et Snail (Lin *et al.*, 2015).

CSN5 (*COP9 Signalosome Subunit 5*) est un co-activateur de c-Jun. L'augmentation de l'expression de CSN5 est associée à un mauvais pronostic dans le CCR. Il a été montré que CSN5 favorise la progression métastatique dans le CCR *in vivo* et *in vitro* en inhibant la dégradation de ZEB1, protéine clef de l'EMT (Zhang *et al.*, 2017).

MCPIP1 (*Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1*) régule négativement plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 et IL-12, IL-8) ainsi que CXCL12 et le VEGF. Une étude a montré que MCPIP1 est diminué dans le CCR métastatique. Dans des modèles précliniques de CCR, des niveaux faibles de MCPIP1 corrèlent avec le développement de métastases pulmonaires (Ligeza *et al.*, 2017).

L'ARN 886 non codant (nc886) est surexprimé dans les tissus CCR humains. Il a été montré que nc886 favorise l'invasion cellulaire dans le CCR *via* l'activation de la voie JAK2/STAT3 (Lei *et al.*, 2017).

MRCCAT1 est un long ARN non codant (lncRNA) fortement exprimé dans les tissus métastatiques de CCC. MRCCAT1 est un facteur pronostique indépendant dans le CCC. L'inhibition de MRCCAT1 inhibe le développement des métastases *in vivo*. Sur le plan mécanistique, MRCCAT1 réprime NPR3 et active la voie de signalisation p38-MAPK (Li *et al.*, 2017).

HEIRCC est un autre long ARN non codant fortement exprimé dans les tissus de CCR. La forte expression de HEIRCC est étroitement associée aux caractéristiques cliniques de la tumeur, à savoir : une grande taille, une faible différenciation et une métastase lymphatique. Le *knock-out* de HEIRCC supprime la migration et l'invasion cellulaires ainsi que la transition EMT *in vitro* (Xiong *et al.*, 2017).

HOTAIR est un autre long ARN non codant considéré comme un oncogène dans de multiples cancers. Une surexpression de HOTAIR corrélée avec la progression tumorale a été retrouvée dans des tissus de CCR. L'étude de (Hong *et al.*, 2017) suggère que HOTAIR favorise la migration et l'EMT dans le CCR *via* la signalisation de miR-217 / HIF-1 α / AXL, ce qui peut constituer une nouvelle cible pour le diagnostic et la thérapie de la maladie du CCR.

Décorine (DCN) est un composant important de la MEC synthétisé par les fibroblastes. L'expression de DCN est diminuée dans les tissus du CCR et cette diminution est inversement corrélée à la taille de la tumeur. La surexpression de DCN inhibe le développement de métastases *in vivo* en augmentant l'expression de P21 et de l'E-cadhérine (Xu *et al.*, 2016).

La voie de signalisation GAS6/AXL, déjà abordée, est directement régulée par HIF. Des travaux récents ont montré que la voie GAS6/AXL favorise le développement de métastases dans le CCC à travers l'activation de SRC et MET. Cliniquement, l'expression d'AXL dans le CCC corrèle avec le caractère agressif de la tumeur (Rankin *et al.*, 2014).

DLL4, ligand de la voie Notch Delta-like 4, joue également un rôle important dans l'angiogénèse. DLL4 est surexprimé dans l'endothélium et la voie Notch est constitutivement active dans le CCR. De manière intéressante, des cascades DLL4/Notch/Hey1/MMP9 reliant l'endothélium aux cellules cancéreuses dans les métastases ont été identifiées. L'étude clinique a indiqué que la métastase hématogène tumorale et l'expression de Hey1 et MMP9 étaient en corrélation avec DLL4. De plus, au cours de la surveillance de la maladie à 4 ans, le taux élevé de DLL4 était associé à un risque plus élevé de développer des métastases (Huang *et al.*, 2014).

Le protéoglycane versicane (VCAN) favorise la progression tumorale et le développement des métastases dans plusieurs cancers. Des preuves récentes suggèrent que VCAN est une cible importante du gain chromosomique 5q, une des anomalies génétiques les plus répandues dans CCC. Une augmentation de l'expression de VCAN a été retrouvée dans les tissus de CCC et corrèle avec le développement de métastases et une mauvaise survie globale à 5 ans après une néphrectomie radicale. L'inhibition de VCAN diminue considérablement la migration et l'invasion cellulaires et est associée à une réduction de MMP7 et de CXCR4 (Mitsui *et al.*, 2017).

Il a été montré que la protéine ligase de l'ubiquitine E3C (UBE3C) est un facteur propice pour les métastases dans le CCR *via* l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. L'expression d'UBE3C est augmentée dans les tissus CCC et cette forte expression est associée à une survie plus courte. Le *knock-out* de l'expression d'UBE3C inhibe la migration et l'invasion *in vitro*. L'UBE3C favorise l'accumulation nucléaire de la β -caténine, conduisant à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Wen *et al.*, 2015).

WSB1 (*WD repeat and SOCS box-containing protein 1*) est un régulateur négatif de pVHL en favorisant son ubiquitinylation et sa dégradation protéasomique, avec comme conséquence l'accumulation des facteurs HIF. Dans le CCR, il a été montré que l'inhibition de WSB1 diminue les mouvements cellulaires et le développement des métastases (Kim *et al.*, 2015).

IL-8 est fortement exprimée dans le CCR métastatique et pourrait induire l'EMT et donc l'invasion métastatique en augmentant l'expression de N-cadhérine et en diminuant l'expression de l'E-cadhérine (Zhou *et al.*, 2016).

La molécule d'adhésion MCAM et son partenaire d'interaction matricielle extracellulaire, la laminine alpha 4 (LAMA4), sont impliqués dans la dissémination métastatique. Elles sont apparues comme les gènes les plus exprimés dans l'endothélium des tumeurs CCR et cette augmentation est associée à une survie médiocre. Le MCAM apparaît comme hautement spécifique dans le CCR et fortement induit par le VEGF, très abondant dans cette maladie (Wwragg *et al.*, 2016).

La comparaison du profil d'expression entre les métastases et les tumeurs primaires de grade 1 a identifié 43 ensembles de gènes avec une régulation élevée et 96 ensembles de gènes avec une régulation négative dans les métastases. En outre, la comparaison des métastases avec des tumeurs primaires de grade 3 a montré 20 ensembles de gènes régulés positivement et 149 ensembles de gènes régulés négativement dans les métastases. Dans cette étude, il apparaît que les voies régulées négativement dans les métastases sont les voies impliquées dans l'adhésion intercellulaire, l'adhésion à la MEC et l'apoptose et que celles régulées positivement sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, le métabolisme énergétique et la migration cellulaire. Ce profil d'expression confère aux cellules métastatiques une forte résistance aux agents cytotoxiques et un potentiel migratoire plus élevé comparativement aux tumeurs primaires (Maruschke *et al.*, 2013).

(Wuttig *et al.*, 2009) ont comparé les profils d'expression des métastases pulmonaires de CCC avec la tumeur primaire correspondante. Leur étude a identifié 810 gènes exprimés différemment parmi lesquels les gènes MMP7 et MMP9, CXCR3, CD10, Bcl2 et CD44. Là encore, la plupart des gènes dérégulés dans les métastases sont ceux qui favorisent la dissémination métastatique, comme l'angiogenèse, la migration cellulaire, la motilité cellulaire et l'adhésion cellulaire. En outre, ces auteurs ont mis en évidence 167 gènes avec une expression différentielle entre les métastases synchrones ou métachrones.

Abbas *et al.*, ont analysé un ensemble de 45 gènes associés à l'angiogenèse et ont déterminé que la plupart des gènes présentaient des profils d'expression similaires dans les tumeurs primaires et les métastases. (Abbas *et al.*, 2014)

D'autres auteurs se sont concentrés sur les microARN (miARN), petits ARN sans codage de protéines qui régulent l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du développement cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Les miARN qui ont des effets pro-métastatiques ou anti-métastatiques ont été appelés métastamirs (Hurst *et al.*, 2009). Les chercheurs ont détecté des différences dans l'expression de miRNAs dans les métastases par rapport aux tumeurs primaires et ont constaté que l'expression de miRNAs dépendait du site métastatique. A titre d'exemple, le miR-199b était fortement plus exprimé dans les métastases pulmonaires comparativement aux métastases cérébrales (White *et al.*, 2011). Wotschofsky *et al.*, ont confirmé la

régulation négative générale des miARN dans les échantillons métastatiques (Votschovsky *et al.*, 2016).

White *et al.*, se sont intéressés aux voies métaboliques dérégulées dans les métastases et ont trouvé que les voies de la glycolyse, de la gluconéogenèse, du métabolisme des pyruvates et du cycle de l'acide citrique étaient les plus dérégulées. Ces données montrent que les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme et passent de la respiration aérobie à la respiration anaérobie. Il est suggéré que le phénotype glycolytique survient dans les métastases à cause des épisodes hypoxiques transitoires. Les cellules cancéreuses effectuent alors une glycolyse et résistent à l'hypoxie, ce qui favorise leur survie et leur croissance (White *et al.*, 2014).

Stickel *et al.*, ont montré que les métastases étaient similaires aux tumeurs primaires, au niveau de la présentation du ligand HLA, mais les métastases à distance ont montré des quantités plus élevées de molécules HLA de classe I par rapport aux métastases des ganglions lymphatiques locaux (Stickel *et al.*, 2011).

Concernant le profil d'expression de PD-L1, Jilaveanu *et al.*, ont montré une expression élevée dans les métastases (Jilaveanu *et al.*, 2014). D'autres auteurs ont, quant à eux, montré que le niveau d'expression de PD-L1 n'était pas différent entre les tumeurs primaires et les métastases (Callea *et al.*, 2015).

Lee et Choe ont examiné l'expression de EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) qui réprime les gènes régulant la prolifération tumorale, l'invasion et l'angiogenèse (Simon et Lange, 2008). Ces auteurs ont montré que le niveau d'expression de EZH2 est similaire entre les métastases et les tumeurs primaires (Lee et Choe, 2012) alors que (Xu *et al.*, 2013) ont trouvé une surexpression de EZH2 dans les métastases par rapport au tissu tumoral primitif et que cette expression était plus forte dans les métastases à distance (foie et cerveau) comparativement aux métastases pulmonaires.

Il est clair que de nombreuses études ont montré des résultats divergents concernant la biologie des tumeurs. Cela est principalement lié à l'hétérogénéité intra et intertumorale typique du CCR en plus de l'inaccessibilité à la totalité de la tumeur ou la faible taille des cohortes. La prise en compte de cette hétérogénéité avec un meilleur échantillonnage de tissu cancéreux sont nécessaires pour améliorer l'exploitation des données.

Cette hétérogénéité peut expliquer également les variations génomiques retrouvées entre tumeur primaire et métastase correspondantes faisant penser à la possibilité d'une relation clonale.

3.2. Les changements génomiques

Plusieurs auteurs ont tenté d'identifier les changements génétiques qui sont à la base de la progression métastatique du CCR humain. Bissig *et al.* ont révélé que les tumeurs primaires et leurs métastases correspondantes n'étaient jamais identiques. Les changements génomiques retrouvés fréquemment dans les métastases mais pas dans les tumeurs primaires correspondantes comprenaient des pertes dans les chromosomes 3p (25%), 4q (28%), 6q (28%), 8p (31%) et 9p (47%) et des gains dans les chromosomes 17q (31%) et Xq (28%). De plus, une amplification génique de haut niveau a été identifiée sur le chromosome 11q22-23. Une fonction anormale des gènes dans ces régions peut contribuer au processus métastatique. Nous rappelons que le facteur de transcription Lim1 est situé dans le chromosome 17q et qu'il joue un rôle oncogénique dans le CCC (Dormoy *et al.*, 2011). Le nombre moyen d'aberrations dans les ganglions lymphatiques et les métastases pulmonaires était plus faible que dans les autres métastases hématogènes, ce qui suggère que la diffusion hématogène est liée à une acquisition d'altérations génomiques complexes et cumulatives (Bissig *et al.*, 1999).

Le nombre d'aberrations génétiques détectées est plus élevé dans les métastases que dans le CCR primaire. Ceci est conforme à la théorie selon laquelle la progression métastatique du CCR est due à une accumulation de changements génétiques. L'absence de changements génétiques partagés suggère également la possibilité qu'une relation clonale d'un progéniteur en commun. Selon une analyse statistique, des changements génétiques partagés dans les couples métastases et tumeurs appariés, ont été retrouvés chez 58% des patients (Bissig *et al.*, 1999).

(Gerlinger *et al.*, 2012) ont retrouvé des différences de mutations entre les tumeurs primaires et leurs métastases correspondantes et ont mis en évidence des signes d'hétérogénéité intratumorale. Un seul échantillon de biopsie tumorale possède une minorité des aberrations génétiques présentes dans une tumeur entière. Les clones cellulaires avec des changements génétiques spécifiques aux métastases peuvent donc représenter des populations cellulaires mineures au sein de la tumeur primaire.

Selon une autre étude, le séquençage du gène suppresseur de tumeur VHL a montré que chez 40% des patients, le statut VHL était différent entre la tumeur primaire et la métastase. Il arrive parfois de trouver que la tumeur primaire présente un VHL sauvage alors que le gène est muté dans la métastase. Par ailleurs, lorsque le gène VHL est muté à la fois dans la tumeur primaire et la métastase, la mutation était identique (Vaziri *et al.*, 2012).

V. Objectifs

La recherche actuelle met l'accent sur l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents au CCR. L'identification de nouvelles voies/marqueurs régulant la prolifération, la différenciation et l'invasion des cellules cancéreuses est un axe majeur pour définir de nouvelles options thérapeutiques dans le CCC. L'équipe d'accueil a montré le rôle oncogénique des voies signalétiques PI3K/Akt et NF- κ B, qui interviennent aussi lors de la néphrogenèse. Plus récemment, l'équipe a également montré que la voie néphrogénique Sonic Hedgehog (SHH)-Gli est réactivée et oncogénique dans le CCC. Avec les résultats d'autres investigateurs, obtenus de manière concomitante et montrant l'implication de voies/marqueurs néphrogéniques (Notch, Pax-2...) dans la progression du CCC, il est devenu clair que des similitudes mécanistiques existent entre tumorigenèse et néphrogenèse, c'est cette hypothèse qu'avait émise mon laboratoire d'accueil. Plusieurs cibles transcriptionnelles de Gli ont été mises en évidence dont le facteur de transcription néphrogénique Lim1, impliqué dans la mise en place des tubules proximaux où le CCC trouve son origine. Lim1 a été identifié par la suite par le laboratoire comme un nouvel oncogène favorisant la croissance tumorale du CCC humain.

Dans ce précédent travail, des résultats préliminaires ont suggéré un rôle de Lim1 dans les mouvements cellulaires ; ceci avait été étudié uniquement sur les lignées 786-0 et Caki1. Sur la base de ces travaux, et le fait que Lim1 joue un rôle primordial dans les mouvements cellulaires au cours de l'organogenèse rénale, l'hypothèse a donc été émise que Lim1 pourrait être impliqué dans la dissémination métastatique du CCC.

L'objectif général de ce travail de thèse était d'étudier le rôle de Lim1 dans le cancer du rein humain avancé et donc dans la progression métastatique, avec 4 objectifs spécifiques:

Premier objectif spécifique/Etude in vitro: (i) Etendre l'étude des effets observés de l'inhibition de Lim1 sur les mouvements cellulaires (migration/invasion/ motilité) à d'autres lignées de CCC (ACHN, Caki2 et A498). (ii) Afin d'avoir une vision plus complète des cibles de Lim1, nous avons étudié par Western blot l'effet de l'extinction de Lim1 sur un panel de cibles impliquées dans les différentes étapes du processus métastatique à savoir, l'invasion et l'adhésion cellulaires et l'EMT. (iii) Nous avons également étudié l'impact de Lim1 sur la capacité des cellules isolées à former des colonies.

Deuxième objectif spécifique/Etude ex vivo: Etudier par Western blot et immunohistochimie (IHC) l'expression de Lim1 dans les paires de tumeurs primaires et métastases associées de CCR obtenues en collaboration avec le service de Chirurgie urologique du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg.

Troisième objectif spécifique/Étude in vivo: Confirmer le rôle invasif de Lim1 dans le développement de métastases dans un modèle invasif murin de CCC humain chez la souris *nude*.

Quatrième objectif spécifique/Partie translationnelle: Il s'agit d'une collaboration avec des chimistes de la faculté de pharmacie de Strasbourg dans le but de développer un inhibiteur de Lim1 utilisable chez l'homme à base de siRNAs ciblant Lim1 véhiculés par des systèmes nanométriques. Cette partie a consisté à vérifier l'efficacité de l'approche nanométrique à véhiculer les siRNAs *in vitro* et *in vivo*.

Ce mémoire de thèse rapporte les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse et qui ont abouti à deux publications soumises.

La première publication est présentée dans le chapitre 3 et correspond aux résultats obtenus dans les trois premiers objectifs spécifiques sur la définition du rôle de Lim1 dans le processus métastatique dans le CCC.

La deuxième publication est présentée dans le chapitre 4 et représente le versant translationnel de notre cible thérapeutique Lim1 et qui répond au 4^{ème} objectif spécifique à savoir le développement d'inhibiteur chimique de Lim1 en clinique.

Un grand chapitre en annexes est consacré aux différentes approches abordées au cours de ma thèse pour la mise en œuvre du modèle invasif et qui retrace ma démarche scientifique pour essayer de répondre au troisième objectif scientifique.



Chapitre II

Matériels et Méthodes



I. Etude *in vitro*

1. Les lignées cellulaires humaines

Les lignées cellulaires de CCC humain 786-0, A498 (déficientes en VHL) et ACHN, Caki2 (exprimant le VHL) sont obtenues chez ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, Etats Unis). L'ensemble des lignées est maintenu dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Gibco, Life technologies, Saint Aubin, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco) et 1% d'un mélange Pénicilline/Streptomycine (Pen/Strep, Gibco) à 37°C, en atmosphère humide avec 10% de CO₂.

2. Inhibition de l'expression de Lim1 par RNA interférence

Tableau 10

Les lignées cellulaires sont dispersées dans des plaques 6 puits (100 000 cellules/puits) ou 24 puits (20000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont transfectées de 24h à 120h avec le siRNA ciblant l'exon 2 de Lim1 (siLhx, Life technologies, Saint Aubin, France) ou le siRNA contrôle (siCtl, Life technologies) en utilisant l'agent de transfection jetPRIME[®] selon les instructions du fournisseur (Polyplus transfection, Illkirch, France). Nous avons également testé des cellules non transfectées ou transfectées avec l'agent de transfection seul en contrôle. L'efficacité de transfection est déterminée par étude de l'expression de Lim1 par RT-qPCR et Western blot à chaque temps.

3. Vérification de l'extinction de l'expression de Lim1

L'efficacité de l'extinction de Lim1 est vérifiée par étude de l'expression de Lim1 par RT-qPCR et Western blot de 24-120h. La technique de Western blot sera détaillée dans la partie Cf. I.5. Analyse de l'expression des protéines d'invasion.

3.1. Extraction des ARNs

Les ARNs totaux sont extraits par la technique au TRIzol (*Invitrogen, Thermo Fisher scientific, Illkirch-Graffenstaden, France*) selon le protocole défini par le fournisseur. Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet de lyser les cellules et de dissoudre les composants cellulaires tout en préservant l'intégrité des ARNs. Les cellules sont mises en contact avec un volume de TRIzol qui est fonction de la surface du puits en cm² (1 ml pour 10 cm²). Afin d'assurer une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont laissés à reposer pendant 10 min à température ambiante. Après addition de chloroforme (200µl pour 1ml de TRIzol), le mélange est agité vigoureusement à la main pendant 15 sec et mis au repos pendant 15 min

siRNA	Source	Brin sens 5'>3'	Brin antisens 5'>3'
siLhx	<i>Life technologies</i>	CCGGUGUUUCGGUACCAAATT	UUUGGUACCGAAACACCGGAA
siCtl	<i>Life technologies</i>	CGUACGCGGAAUACUUCGATT	UCGAAGUAUUCGCGUACGTT
siLuc	<i>Eurogentec</i>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT	UCGAAGUACUCAGCGUAAGTT

Tableau 10: Liste des siRNAs utilisés dans les études

à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C à 12000g pendant 15 min, permettant la séparation du mélange en trois phases : une phase organique inférieure contenant les protéines, une interphase contenant l'ADN et une phase aqueuse supérieure transparente contenant les ARNs. La phase aqueuse contenant les ARNs est alors récupérée et précipitée par addition d'isopropanol (500 µL pour 1 ml de TRIzol de départ). Les tubes sont agités et incubés pendant 10 min à température ambiante puis centrifugés à 4°C à 12000g pendant 10 min. Les culots sont ensuite lavés avec 1 ml d'éthanol 75%, séchés à l'air puis repris dans de l'eau « *RNase et DNase free* » (10 à 50 µL selon la taille du culot). Les concentrations des ARNs totaux sont déterminées par l'absorbance à 260 nm (Nanodrop, *Thermo Fisher Scientific*) et la pureté des échantillons d'ARN est calculée selon le rapport des valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm. Un rapport absorbance à 260 nm/absorbance à 280 nm compris entre 1,8 et 2 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par les protéines.

3.2. Transcription réverse

L'obtention des ADNc totaux est réalisée par transcription réverse (RT) sur 1 µg d'ARN total. La réaction se fait dans un volume final de 20 µL contenant 4 µl de 5x *Iscrip reaction mix* (qui apporte les amorces non spécifiques p(dT)₁₅ et les désoxynucléotides triphosphates) et 1 µl de transcriptase réverse et de l'eau « *RNase et DNase free* » qsp 20 µl selon le protocole du fournisseur (*Iscrip™ cDNA synthesis script*, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Le mélange réactionnel est ensuite soumis à un cycle de 5 minutes à 25°C, 30 minutes à 42°C, 5 minutes à 85°C et maintenu à 4°C en fin de réaction (*MasterCycler*, Eppendorf, Montesson, France).

3.3. Quantification par *real-time polymerase chain reaction*

Tableau 11

Les ADNc spécifiques des ARNm étudiés ont été amplifiés en utilisant le kit «*Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix*» (Bio-Rad). Des courbes de standardisation ont été préparées pour chaque gène étudié, par dilution en cascade d'un mélange d'échantillons d'ADNc. Le milieu réactionnel (10 µl) contenait 5 µl de *Sso Advanced universal SYBR Green supermix*, 0,5 µM de chaque couple d'amorce sens-antisens spécifiques de chaque gène étudié et 2,5 µl d'eau «*Nuclease Free*» et 2 µl d'ADNc. Le *Sso Advanced universal SYBR Green supermix* contient une ADN polymérase modifiée, fusionnée à un domaine Sso7d de liaison à l'ADN double brin, qui permet de stabiliser les complexes polymérase/ADN matrice, des dNTPs, du MgCl₂ et la sonde SYBR Green I. Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la qPCR a été réalisée en 40 cycles de dénaturation (10 sec à 95°C), d'hybridation et de polymérisation (30 sec à 60°C). Un contrôle négatif a systématiquement été réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau de qualité PCR (*RNase et DNase*

Cible	Fournisseur	Amorce sens 5'>3'	Amorce antisens 5'>3'
<i>Lhx1</i> pour la RT-qPCR	<i>Biorad</i>	Inconnue / désignée par le fournisseur	Inconnue / désignée par le fournisseur
Cyclophiline	<i>Eurogentec</i>	TTTCATCTGCACTGCCAAG	TCGAGTTGTCCACAGTCAGC
18s	<i>Eurogentec</i>	CTCCACAGGAGGCCTACAC	CTTCGGCCCACACCCTTAAT
<i>Lhx1</i> pour le nombre de copies	<i>Eurogentec</i>	ATGAAATGCCTGATGCCTCT	ATTGACTCTGGGGGACACTG

Tableau 11: Liste des amorces utilisées dans les études

free). Chaque échantillon a été analysé en duplicata et quantifié avec le logiciel d'analyse (CFX, Bio-Rad). L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux d'un gène de ménage, la cyclophiline dans notre cas.

4. Etude des mouvements cellulaires

4.1. Etude de la motilité cellulaire par « *Wound Healing Assay* »

Les cellules sont dispersées dans des plaques de 24 puits (100 000 cellules/puits). Après 24h et à 80% de confluence, elles sont transfectées comme décrit précédemment. Le lendemain de la transfection, une cicatrice est réalisée au centre du puits à l'aide d'une pointe de pipette de 1ml stérile. Les débris cellulaires de cette blessure sont éliminés par 2 rinçages successifs au PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Gibco). Un nouveau milieu frais est ajouté aux cellules. La capacité des cellules à coloniser la zone centrale est évaluée en prenant des clichés photographiques sous microscope inversé (Nikon eclipse TE200, Champigny sur Marne, France) juste après la blessure (t0) puis à 12h et 24h. Le pourcentage de la couverture de la zone centrale est calculé en divisant la surface centrale occupée par les cellules à 12h ou 24h par la surface initiale de la blessure au t0.

4.2. Etude de l'invasion et de la migration cellulaire dans des chambres de Boyden

L'étude de l'invasion et de la migration cellulaires est basée sur l'utilisation d'inserts (membrane poreuse / taille des pores 8µm) respectivement recouverts ou non avec du matrigel (BD Biosciences, Le Pont de Clay, France) qui remplace la matrice extracellulaire. Dans cet essai, nous mesurons la capacité des cellules à digérer le matrigel et à traverser la membrane pour l'invasion et nous mesurons la capacité des cellules à passer à travers les pores pour la migration.

La veille du test, les cellules sont transfectées et privées de sérum. Pour l'invasion, les inserts sont coatés avec du matrigel à 100µg/cm² puis incubés une nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules transfectées ou non sont mises en suspension dans du DMEM seul, puis 50 000 cellules sont déposées à l'intérieur des inserts (Millipore, Molsheim, France) placés dans une plaque 24 puits contenant du milieu DMEM supplémenté de 10% de SVF. Le sérum joue le rôle de chimioattractant pour les cellules. Les plaques ainsi montées sont incubées de 24h à 48h.

Le nombre de cellules ayant migré de la face supérieure du filtre à la face inférieure est évalué par la technique de coloration au cristal violet. Après 24h et 48h d'incubation, les inserts sont lavés avec du PBS puis fixés dans du paraformaldéhyde à 4% (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) pendant 20 minutes. Les inserts sont alors lavés encore une fois avec le PBS et les cellules n'ayant pas migré sont enlevées en grattant la partie supérieure de l'insert à l'aide d'un coton-tige. Les inserts sont

colorés par le cristal violet (Sigma-Aldrich) à 0,1% pendant 20 min. L'excès de la coloration est éliminé par plusieurs lavages avec de l'eau déminéralisée. La coloration au cristal violet des cellules est ensuite extraite avec une solution d'acide acétique à 33% (v/v). La lecture de l'absorbance se fait à 590 nm à l'aide du spectrophotomètre μ Quant (Bio-Tek Instruments, Inc. Vermont, USA). L'intensité de la coloration est proportionnelle aux cellules migrantes et invasives.

5. Analyse de l'expression des protéines d'invasion

5.1. Extraction de protéines à partir de cellules en culture

Un tampon de lyse est préparé extemporanément à partir d'un aliquot de tampon RIPA (50mM tris-HCl, 150mM NaCl, pH=8) et supplémenté de : 0,1% SDS (Euromedex, Souffelweyersheim, France), 0,5% de déoxycholate (Sigma-Aldrich), 1% de NP40 (Sigma-Aldrich), et 0,05% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma-Aldrich).

Après lavage des cellules adhérentes avec du PBS, 200 μ l de tampon de lyse sont ajoutés à chaque puits (plaque 6 puits). Après 20 minutes d'incubation sur la glace, les cellules sont grattées puis l'ensemble est récupéré dans un tube eppendorf pour être centrifugé pendant 20 minutes à 4°C à une vitesse de 14000 g. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse. Un aliquot de la suspension protéique est gardé pour le dosage.

5.2. Dosage

Le dosage des protéines est réalisé par l'utilisation du Kit Pierce[®] *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher scientific) selon le protocole établi par le fournisseur. Brièvement, le principe est basé sur la capacité des protéines à réduire le Cu²⁺ en Cu⁺ en milieu alcalin. L'acide bicinchonique (BCA) est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu⁺, qui forme un complexe coloré (pourpre). L'intensité de la coloration est mesurée à 562 nm avec le spectrophotomètre μ Quant. L'absorbance de chaque échantillon est rapportée à une gamme étalon établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine.

5.3. Western blot

Tableau 12

Après ajout du tampon de charge de Laemmli (contenant 5% de 2 β -mercaptoéthanol) à l'échantillon protéique (mélange v:v du tampon et de l'échantillon), les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 6 minutes. Les extraits sont ensuite déposés (20 μ g) sur un gel de polyacrylamide de 8-12% (acrylamide/bisacrylamide 30%, tris 1M, SDS 10%, APS 10%, TEMED.) Les protéines sont séparées par électrophorèse (migration à 150V pendant 40min à 1h20). Le transfert est réalisé sur membrane de Polyvinylidene fluoride (PVDF) à l'aide du système de transfert «TransBlot[®] Turbo[™]» (Biorad).

	Anticorps	fournisseur	Source	Dilution
1	Lim1	Abcam	monoclonal, souris	1/3000
		Invasion cellulaire		
2	ADAMTS-1	Santa cruz	Monoclonal, souris	1/100
3	MMP1	R&D	Monoclonal, souris	1/250
4	MMP2	R&D	Monoclonal, souris	1/610
5	MMP3	R&D	Monoclonal, souris	1/660
6	MMP8	Thermo scientific	Polyclonal, lapin	1/3000
7	MMP9	R&D	Monoclonal, souris	1/500
8	TIMP-1	R&D	Monoclonal, souris	1/720
		Transition épithélio-mésenchymateuse		
9	E-Cadhérine	BD Biosciences	Monoclonal, souris	1/2000
10	N-Cadhérine	GeneTex	Polyclonal, lapin	1/3000
11	β -Caténine	Santa Cruz	Polyclonal, chèvre	1/100
12	Snail1	Santa Cruz	Polyclonal, chèvre	1/100
13	Twist1/2	Gene Tex	Polyclonal, lapin	1/500
14	ZO-1	Invitrogen	Monoclonal, souris	1/500
15	Vimentine	Thermo scientific	Polyclonal, lapin	1/3000
		Adhésion cellulaire		
16	FAK	Millipore	Monoclonal, souris	1/500
17	Fibronectine	BD Biosciences	Monoclonal, souris	1/5000
18	Intégrine- α 5	Gene Tex	Polyclonal, lapin	1/1000
19	Paxilline	Invitrogen	Monoclonal, souris	1/500
20	α -Tubuline	Abcam	Monoclonal, souris	1/5000
21	β -Tubuline	Sigma Aldrich	Monoclonal, souris	1/20000
22	β -Actine	Sigma Aldrich	Monoclonal, souris	1/20000
		Facteurs pro-métastatiques		
23	Angiogénine	Santa Cruz	Polyclonal, lapin	1/100
24	Artémine	Abcam	Monoclonal, lapin	1/1000
25	CXCR4	Thermo scientific	Polyclonal, lapin	1/100
26	SDF-1	Thermo scientific	Polyclonal, lapin	1/100
		Contrôle de charge		
27	GAPDH	Sigma Aldrich	Monoclonal, souris	1/20000

Tableau 12: Liste des anticorps utilisés dans les études

Après rinçage pendant 10 min sous agitation dans du tampon salin Tris-Tween 0,05% (TBST), la membrane est saturée pendant 1h sous agitation à température ambiante dans du TBS-Tween contenant 5% de lait (TBST-lait). La membrane est ensuite incubée la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à la dilution optimale dans le TBST-lait. La membrane est ensuite lavée trois fois sous agitation dans le TBST puis incubée 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la peroxydase (*horse-radish peroxydase*), dilué dans le TBST. Après trois lavages avec le TBST, le complexe d'anticorps est révélé par chimioluminescence avec le kit de détection Luminata™ (Millipore). L'imageur « Fusion FX7 » (Vilber-Lourmat, Collégien, France) permet l'acquisition du signal de chimioluminescence pour une exposition optimale des membranes et une capture d'image par caméra CCD refroidie.

6. Etude de la capacité des cellules isolées à former des colonies par « Colony Forming Assay »

Après 24h de transfection, les cellules transfectées ou non sont mises en suspension etensemencées à 300 cellules/puits dans des plaques 6 puits en triplicata. Après deux semaines d'incubation, les colonies sont fixées au PFA 4% et colorées avec le cristal violet à 0.2% et ensuite comptées.

7. Etude statistique

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm s.e.m. L'analyse statistique est effectuée selon le cas en utilisant le t test de *Student*, ANOVA *one-way* ou *two-way* suivi d'un test de Student-Newman-Keul pour les comparaisons multiples. P <0,05 est considéré comme significatif. (*' Représente P <0,05, '**' représente P <0,01, '***' représente P <0,001).

II. Etude *ex vivo*

1. Les tissus humains

Tableau 13

Les tissus tumoraux métastatiques et primitifs correspondants ont été obtenus en collaboration avec le Service de Chirurgie Urologique (Pr Hervé Lang) et les Départements d'Hémo-Oncologie (Dr Philippe Barthelemy) et de Pathologie (Dr Véronique Lindner) des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Strasbourg, France, après obtention du consentement éclairé des patients.

Nous disposons d'une cohorte de 22 patients avec un diagnostic de CCR. Le sexe ratio homme/femme est de 1,44. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 58,3 ans (entre 40 et 86 ans). La tumeur primaire était disponible pour 20 patients, dont deux avaient récidivé (au total 22 tumeurs primitives). Les patients sont anonymisés de P1-22, dans l'ordre du stade pTNM.

Ces patients ont développé une ou plusieurs métastases viscérales et osseuses synchrones, diagnostiquées en même temps que la tumeur primaire ou asynchrones, diagnostiquées moins d'un an jusqu'à douze ans après le diagnostic de CCR. Au total, 30 métastases ont été analysées par IHC et/ou Wb. Immédiatement après la résection chirurgicale, les tissus ont été soit congelés et maintenus dans de l'azote liquide soit conservés dans le formol pour le diagnostic histopathologique de routine. Pour 14 patients, les pièces opératoires étaient conservées uniquement dans le formol. Pour 1 patient, les tissus étaient conservés uniquement dans l'azote liquide. Pour 7 patients, les tissus étaient conservés dans l'azote liquide et dans le formol.

Les tumeurs ont été classées selon la classification pTNM de la 8ème édition de l'UICC: 4 pT1a, 2 pT1b, 2 pT2a, 2 pT2b, 9 pT3a, et 1 pT4. Pour deux patients, seules les biopsies étaient disponibles, correspondant au stade clinique cT3a et cT4. Pour deux patients, nous disposons uniquement des métastases et pas d'informations sur leur tumeur primaire, donc pas de stade pTNM correspondant. Le carcinome primitif a montré un grade de Fuhrman compris entre 2 à 4. Parmi les tumeurs, quatre ont présenté une composante sarcomatoïde identifiée également dans la métastase correspondante.

Patient	Primitif		Date intervention	Stade pTNM 2016	Composante sarcomatoïde	Site métastatique	Date d'intervention	Métastase	
	Formol	Azote						Formol	Azote
P1	X	X	2010	pT1aNxM1		Surrénale	2010	X	X
P2	X		2009	pT1aNxM+		Poumon	2013	X	
	X		2013	pT1aNxM+					
P3	X		1999	pT1b Nx Mx		Plèvre	2011	X	
			2000	pT1a N0 Mx					
P4	X		2008	pT1bNxM+		Bronches	2013	X	
P5	X		2011	pT2a Nx Mx		Poumon	2011	X	
						Surrénale	2010	X	X
P6	X	X	2010	pT2aNxMx	X	Poumon	2011	X	
						Poumon	2011	X	
						Poumon	2011	X	
						Poumon	2011	X	
P7	X		2007	pT2bN0M+		Parotide	2007	X	
P8	X		2014	pT2bNxMx	X	Poumon	2014	X	
P9	X		2008	pT3aN0M+		Foie	2009	X	
P10	X		2007	pT3aN0M+		Os	2011	X	
						Trachée	2012	X	
P11	X		2008	pT3aN1M+	X	Os	2008	X	
P12	X	X	2014	pT3aN0M1		Os	2013	X	
						Surrénale	2014	X	X
P13	X		2010	pT3a Nx Mx		Poumon	2012	X	
P14	X		2011	pT3a Nx Mx		Poumon	2011	X	
P15	Nécrotique	X	2008	pT3aN1Mx		Ganglion	2008	Nécrotique	X
P16	Nécrotique	X	2007	pT3aN0Mx		Surrénale droite	2010	Nécrotique	X
P17	Nécrotique	X	2010	pT3a N1 Mx	X	Ganglion	2010	Nécrotique	Nécrotique
P18	X		2010	Clinique cT3Nx		Poumon	2010	X	
P19	X		2007	pT4NxM+		Sous cutané	2008	X	
P20	X		2013	Clinique cT4Nx		Os	2013	X	
						Os	2006	X	
						Poumon	2008	X	
						Os	2005	X	
P21				Non disponible		Surrénale	2012	X	Nécrotique
P22				Non disponible		Surrénale gauche	2010		X

Tableau 13: Cohorte de patients pour l'étude *ex vivo*

2. Etude de l'expression de Lim1 dans les métastases de CCR

2.1. Western blot

2.1.1. Extraction de protéines à partir des tissus

Dans le cas des tissus tumoraux issus de patients, une étape préalable de broyage est nécessaire. L'échantillon de tissu tumoral congelé dans l'azote liquide est coupé en petits morceaux sur une plaque préalablement posée sur de la carboglace. Ces morceaux sont ensuite déposés dans un tube eppendorf avec une bille métallique afin de permettre le broyage à l'aide d'un homogénéiseur (MM400 Retsch, Haan, Allemagne) ; 2 fois 30 sec à 30 oscillations/sec). Après broyage, le tampon de lyse est directement ajouté dans le tube. Les échantillons sont ensuite incubés à 4°C sous agitation pendant 30 min afin de finaliser la lyse, puis une centrifugation de 20 min à 14000g et 4°C est réalisée.

2.1.2. Dosage et Western blot

Les protéines sont dosées par la technique BCA et l'expression de Lim1 est étudiée par Wb comme préalablement décrit dans la partie *in vitro* (Cf. I.5. Analyse de l'expression des protéines d'invasion).

2.2. Immunohistochimie

Les tissus tumoraux sont directement fixés dans du formol à 10% tamponné puis inclus en paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont réalisées à partir des blocs de paraffine pour chaque échantillon puis déposées sur des lames (Superfrost® Plus Micro Slide VWR, Fontenay sous Bois, France). Toutes les étapes d'immunomarquage sont réalisées par l'automate Ventana BenchMark Ultra (Roche Systems Tucson, États-Unis) avec une étape de prétraitement dans une solution d'EDTA à pH 8,3 pendant 30 mn (CC1 : *Cell Conditioning 1*, Ventana Roche System) suivie d'une incubation avec l'anticorps monoclonal de souris antiLim1 (Abcam, Cambridge, Royaume Uni) dilué au 1/100^{ème} pendant 32 minutes à 36°C. La révélation est réalisée avec le système de révélation UltraView incluant un chromogène DAB (UltraView Universal DAB Detection Kit, Ventana Roche Systems).

Les résultats de l'immunohistochimie sont exprimés en H-score (Histo-score). C'est une approche semi-quantitative qui évalue le pourcentage de cellules tumorales pour chaque intensité de marquage nucléaire. Chaque intensité est attribuée par un + dans l'ordre croissant (0 / + / + / ++ / +++). La somme des H-scores individuels pour chaque niveau d'intensité est calculée, en utilisant la formule suivante: $H\text{-Score} = 1 \times (\% \text{ de cellules avec une intensité } 1+) + 2 \times (\% \text{ de cellules avec une intensité } 2+) + 3 \times (\% \text{ de cellules avec une intensité de } 3+)$.

3. Etude statistique

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm s.e.m. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le t test de *Student* pour comparer le H-score des métastases et celui de la tumeur primitive correspondante. $P < 0,05$ est considéré comme significatif.

III. Etude *in vivo*

1. Mise en œuvre du modèle métastatique *in vivo*

Afin d'étudier le rôle invasif de Lim1, il était nécessaire de développer un modèle *in vivo* permettant (i) le développement de métastases (ii) leur visualisation par imagerie et (iii) l'inhibition conditionnelle de Lim1.

1.1. La visualisation des métastases

1.1.1. Transfection et établissement des clones luciférase

Pour l'étude *in vivo*, nous avons choisi deux lignées cellulaires de CCC humain, une exprimant le VHL (Caki2) et une déficiente en VHL (786-0). Les lignées 786-0 et Caki2 ont été transfectées avec le plasmide pGL4.50 luc2/CMV/hygromycine (Promega, Charbonnière-Les-Bains, France) en utilisant le jetPRIME[®] selon les instructions du fournisseur. Les pools cellulaires luciférase obtenus après transfection sont maintenus dans du milieu complet supplémenté avec l'antibiotique de sélection, en l'occurrence l'hygromycine à 200µg/ml (Gibco). Les clones luciférase sont établis après dilution des pools dans des boîtes de Pétri (500 cellules/boîte) et la sélection des clones se fait par repiquage des colonies bien isolées.

1.1.2. Caractérisation et sélection des clones luciférase

1.1.2.1. Imagerie par bioluminescence

Les clones cellulaires 786-0 et Caki2 exprimant la luciférase sontensemencés dans des plaques 6 puits (200 000cellules/puits). Après 24 heures, les milieux de culture sont supplémentés avec la luciférine (substrat de la luciférase) à 150 µg/ml (Promega). Les plaques sont incubées 10 minutes dans le noir, le temps nécessaire pour l'oxydation du substrat sous l'action de la luciférase responsable de l'émission de photons. L'intensité du signal bioluminescent est alors évalué à l'aide de l'imageur « Fusion FX7 » (Wilber-Lourmat) qui permet l'acquisition du signal pour une exposition de 6 min, et une capture d'image.

1.1.2.2. Etude de la croissance cellulaire

1.1.2.2.1. La densité cellulaire

La densité des cellules 786-0 et Caki2 *Wild type* (Wt) et des clones luciférase est évaluée par la méthode de coloration au cristal violet. Le principe est basé sur la fixation du cristal violet aux noyaux des cellules. L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules. Dans le cadre de cette étude, les cellules sont dispersées dans des plaques 24 puits (20 000 cellules/puits) et mises en

culture pendant 24 à 120h. A chaque temps, les cellules sont fixées avec du PFA à 4 % (Sigma Aldrich) pendant 20 min puis sont colorées avec le cristal violet à 0,1% pendant 20 min. Après traitement à l'acide acétique à 33%, la coloration est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 590 nm. L'intensité obtenue est proportionnelle à la densité cellulaire.

1.1.2.2.2. *La prolifération cellulaire*

La prolifération des cellules 786-0 et Caki2 Wt et des clones luciférase est évaluée par la méthode d'incorporation du BrdU (Bromodéoxyuridine). Ce test repose sur l'incorporation du BrdU dans le brin d'ADN néo-synthétisé à la place de la Thymidine dans les cellules prolifératives. Le test est effectué selon le protocole du Kit Calbiochem® (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Dans ces expériences, les cellules sont dispersées dans des plaques de 96 puits (3000 cellules/puits). Après 24, 48, 72 et 96h, les cellules sont supplémentées en BrdU pendant 2h puis fixées pendant 30 min. Après fixation, les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-BrdU dilué au 1/100 pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase qui en présence du substrat tétraméthylbenzidine (TMB) donne une coloration mesurée au spectrophotomètre à 450 et 540 nm, dont l'intensité est proportionnelle au BrdU incorporé dans les noyaux donc à la prolifération.

1.1.2.2.3. *L'apoptose*

La mort cellulaire par apoptose des cellules 786-0 et Caki2 Wt et des clones luciférase est évaluée par cytométrie en flux (FACS pour *Fluorescence Activated Cell Sorting*) après double marquage à l'Annexine-V et l'iodure de propidium (IP). Ce double marquage permet de distinguer l'apoptose de la nécrose et de quantifier ces deux phénomènes. L'Annexine-V marque la phosphatidylsérine qui bascule du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane lors de l'apoptose. L'IP est un intercalant de l'ADN permettant de visualiser l'ADN des cellules nécrotiques dont les membranes plasmiques sont rompues. Pour la mesure de l'apoptose cellulaire, les cellules sont dispersées dans des boîtes de culture et cultivées jusqu'à 95% de confluence. Les cellules flottantes et adhérentes sont alors récupérées et mises en suspension dans un tampon d'incubation dont la composition est la suivante : 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ et 10 mM de tampon HEPES, 0,5% de Annexine-V (Roche Diagnostics, Meylan, France) et 5 µg/ml de IP (Sigma-Aldrich), à raison de 100 µl/500 000 cellules. Après incubation à l'obscurité à 4°C pendant 10 min, le mélange est centrifugé 3 min à 930g et le culot contenant les cellules est alors fixé à l'obscurité dans 200 µl de formol 1% à 4°C pendant 10 min. Après centrifugation pendant 3 min à 930g, les cellules sont resuspendues dans 200 µl de tampon d'incubation. L'analyse des échantillons est ensuite réalisée à l'aide du FACScan (Becton Dickinson, New York, Etats-Unis) et l'exploitation des résultats est réalisée par le logiciel FCSEXPRESS (De Novo Software, Los Angeles, CA, Etats-Unis).

1.2. Inhibition conditionnelle de Lim1

1.2.1. Short Hairpain RNA (shRNA)

1.2.1.1. shRNA inductible à la doxycycline

1.2.1.1.1. Construction et multiplication du plasmide

Figure 16

La première étape de la construction a été la linéarisation du plasmide (pSingle-tTS-shRNA) (Clontech, Ozyme, Saint-Quentin- en-Yvelines, France) après une double digestion avec les enzymes de restriction HindIII et XhoI (Roche Diagnostics). La fraction linéaire est alors extraite avec le Kit QIAquick[®] Gel extraction selon les instructions du fournisseur (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) après séparation sur gel d'agarose 1%. Les oligonucléotides shRNA ciblant Lim1 (shLhx), shRNA ciblant la luciférase (shLuc) et shRNA Contrôle (shCtl) sens et antisens sont hybridés puis clonés dans le plasmide linéaire grâce à une T4 ligase (Invitrogen, *Thermo Fisher scientific*) après une incubation de 1h à 26°C (extrémités cohésives) selon les instructions du fournisseur Clontech. Quatre µl du mélange réactionnel sont déposés sur gel d'agarose 1% et analysés pour vérifier la ligation. Les oligonucléotides sens et antisens des shRNA utilisés sont présentées dans le **Tableau 14** (*Eurogentec*, Angers, France).

Les plasmides d'intérêt sont incorporés dans des bactéries *Escherichia coli* (*Invitrogen, Thermo Fisher scientific*) compétentes par transformation. Brièvement, les bactéries en présence du plasmide d'intérêt subissent un choc thermique à 37°C pour faciliter la pénétration du plasmide. La sélection des bactéries transformées se fait par ensemencement des bactéries dans un milieu de culture contenant l'ampicilline à 50 µg/ml (Sigma-Aldrich,) et seules les bactéries transformées pourront se multiplier car le plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline. La multiplication des bactéries permet l'amplification du nombre de plasmides qui, après lyse cellulaire, seront extraits et purifiés dans les colonnes de purification « Nucleobond[®]Xtra Maxi» selon les instructions du fournisseur (Macherey-Nagel, Hoerd, France). La présence des oligonucléotides shLhx, shLuc et shCtl est vérifiée après digestion d'une fraction du plasmide purifié et séparation sur gel ainsi que par séquençage SANGER chez GATC Biotech (Mulhouse, France).

1.2.1.1.2. Les clones stables doublement transfectés

➤ Etablissement des clones doublements transfectés

Les clones 786-0 et Caki2 luciférase sont dispersés dans des plaques 6 puits (200 000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont transfectées avec le plasmide pSingle-tTS-shLhx ou le plasmide pSingle-

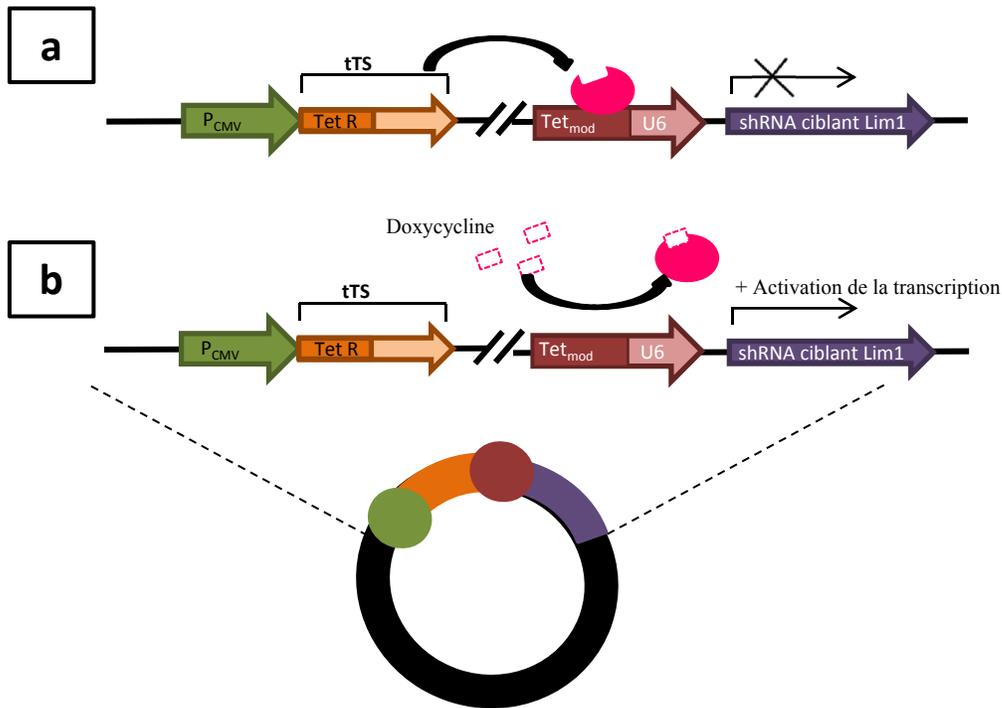


Figure 16: Principe du système shRNA inducible

La protéine tTS (*tetracycline/doxycycline-controlled transcription silencer*) est exprimée constitutivement sous le contrôle du promoteur CMV. (a) En l'absence de l'inducteur Doxycycline, la protéine tTS se lie étroitement aux séquences tetO (*tet Operator*) dans les éléments de réponse à la tétracycline TRE (*tetracycline response element*) ce qui bloque la transcription du shRNA sous le contrôle du promoteur U6 en aval. (b) Lorsque la Doxycycline est ajoutée au milieu de culture, tTS se dissocie du TRE, levant ainsi la suppression de la transcription ce qui active la transcription du shRNA par le promoteur U6 à haut niveau. Les shRNA ciblant *lim1* vont alors interférer avec l'ARNm du *Lim1* et induire un silencing conditionnel avec le traitement doxycycline.

Cible	Fournisseur	oligonucléotide sens 5'>3'	oligonucléotide antisens 5'>3'
<i>Lhx1</i>	<i>Eurogentec</i>	TCGAGGCCGGTGTTCGGTACCAAAT TCAAGAGATTGGTACCGAACACCG GTTTTTA	AGCTTAAAAAACCGGTGTTCGGTAC CAAATCTTTGAATTGGTACCGAAA CACCGGCC
Luciférase	<i>Eurogentec</i>	TCGAGGGGACGAGGACGAGCACTTCT TCAAGAGAGAAGTGCTCGTCCTCGTC CTTTTTTACGCGTA	AGCTTAAAAAAGGACGAGGACGAGC ACTTCTCTTTGAAGAAGTGCTCGTC CTCGTCCCC
Contrôle	<i>Eurogentec</i>	TCGAGGGACGCGTAACCTCTGTATTT CAAGAGAATACAGAGTTACGCGTCCT TTTTTA	AGCTTAAAAAAGGACGCGTAACCTC TGTATTCTTTGAAATACAGAGGTTA CGCGTCCC

Tableau 14: Liste des oligonucléotides shRNA utilisés pour la construction du vecteur inducible pSingle-tTS-shRNA

tTS-shCtl (Clontech) à l'aide du jetPRIME[®] selon le protocole du fournisseur Polyplus. L'établissement des clones doublement transfectés se fait comme précédemment par repiquage des colonies isolées. Les clones doublement transfectés sont maintenus dans du DMEM supplémenté de 10% de *Tet System Approved FBS*, (Gibco) et de 1% du mélange (Pen/Strep) ainsi que des antibiotiques de sélection: l'hygromycine à 200µg/ml (Gibco) et la néomycine à 500 µg/ml (Sigma-Aldrich). La sélection des clones se fait par la suite selon la sensibilité à la doxycycline.

➤ *Pré-sélection des clones doublement transfectés par imagerie par bioluminescence*

Les clones doublement transfectés établis subissent une première sélection par imagerie par bioluminescence comme décrit précédemment (Cf. III.1.1.2.1. Imagerie par bioluminescence) afin de vérifier que le deuxième vecteur n'affecte pas l'expression de la luciférase

➤ *Sélection des clones doublement transfectés sensibles à la doxycycline*

Les clones et les pools 786-0 et Caki2 doublement transfectés (Luc/shLhx) sontensemencés dans des plaques 24 puits à 20 000 cellules/puits. Après 24h, les cellules sont traitées ou non (Ctl) avec de la doxycycline (*Thermo Fisher scientific*) à 1µg/ml. Les cellules Wt et les clones luciférase ont été également traités dans les mêmes conditions et utilisées comme contrôle.

Après 48h de traitement, les ARNs totaux des cellules sont extraits avec la technique du TRIzol et l'expression de Lim1 est étudiée par RT-qPCR comme préalablement décrit dans la partie *in vitro* (Cf. I.3. Vérification de l'extinction de l'expression de Lim1).

1.2.1.1.3. Les transfections transitoires

Les clones 786-0 et Caki2 luciférase sont dispersés dans des plaques 24 puits (20 000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont transfectées avec le plasmide pSingle-tTS-shLuc (Clontech) en utilisant le jetPRIME[®]. Quatre heures après transfection, les cellules sont traitées avec différentes concentrations de doxycycline 0-4µg/ml afin d'établir la concentration optimale pour l'induction de l'expression du shLuc. L'efficacité de l'extinction de la luciférase est évaluée à 48h et 72h de traitement par imagerie de bioluminescence comme décrit avant.

Les cellules 786-0 et Caki2 Wt sont également transfectées transitoirement avec le plasmide pSingle-tTS-shLhx dans les mêmes conditions et traitées 4h après transfection avec 1µg/ml de doxycycline pendant 24-72h. L'efficacité de l'extinction de l'expression de Lim1 est évaluée par RT-qPCR comme décrit avant.

1.2.1.2. shRNA constitutifs

1.2.1.2.1. Multiplication et extraction du plasmide

Tableau 15

Nous avons utilisé 5 clones de bactéries MISSION® *shRNA Bacterial Stock* (Sigma-Aldrich) hébergeant des plasmides exprimant des shRNA constitutifs ciblant 5 régions distinctes de Lim1 clonés dans le vecteur pLKO.1-puro. Les bactéries sont multipliées puis isolées dans des boîtes de Pétri en présence de carbénicilline 100µg/ml (*Thermo Fisher scientific*) selon les instructions du fournisseur. Une colonie isolée de chaque clone shRNA est repiquée et multipliée à grande échelle afin d'amplifier le nombre de plasmides qui, après lyse cellulaire, seront extraits et purifiés dans les colonnes de purification « Nucleobond ®Xtra Maxi » selon les instructions du fournisseur (Macherey-Nagel).

1.2.1.2.2. Vérification de l'efficacité des shLhx constitutifs

Les lignées cellulaires 786-0 et Caki2 sontensemencées dans des plaques 24 puits (20 000 cellules/puits) puis transfectées de 24h à 120h avec les 5 vecteurs différents de shRNA ciblant Lim1 (pLKO.1-puro-shLhx) ou le vecteur shRNA Contrôle (MISSION pLKO.1-puroTurboGFP™, Sigma-Aldrich) en utilisant l'agent de transfection jetPRIME® selon les instructions du fournisseur. Le shRNA Contrôle utilisé est un shRNA ciblant la GFP et ne peut reconnaître aucune séquence du génome humain. L'efficacité de l'extinction de l'expression de Lim1 avec les différents vecteurs shLhx est étudiée par RT-qPCR comme décrit précédemment.

1.2.1.2.3. Vérification de l'efficacité des shGFP par microscopie à fluorescence

Les cellules 786-0 et Caki2 ont été transfectées avec un vecteur codant pour la turboGFP sous le contrôle d'un promoteur CMV (MISSION TRC2 pLKO.5-puro-CMV-TurboGFP™, Sigma-Aldrich) en utilisant le jetPRIME®. La turboGFP est une variante améliorée de la protéine fluorescente verte copGFP clonée à partir de la copepoda *Pontellina plumata*. Après 24h de la première transfection, les cellules sont transfectées une deuxième fois avec le vecteur codant pour un shRNA ciblant la turboGFP (shGFP) MISSION pLKO.1-puroTurboGFP™ (Sigma-Aldrich). Les cellules sont observées sous microscope inversé à fluorescence (Nikon eclipse TE200) 24h et 48h après la deuxième transfection afin de vérifier l'efficacité de l'extinction de la fluorescence de la turboGFP (Excitation: 482nm ; Emission: 502nm). Le pourcentage de cellules fluorescentes est évalué par le logiciel *Image J*.

Produit Sigma-Aldrich	Vecteur	Séquence shRNA 5'>3'	Cibles
<i>LHX1</i> MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock TRCN0000015013	<i>pLKO.1</i>	CCGGGAACGACTTCTCCGG TGTTTCTCGAGAAACACCGG AAGAAGTCGTTCTTTTT	Lim1 exon1 + exon 2
<i>LHX1</i> MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock TRCN0000015014	<i>pLKO.1</i>	CCGGGTGCTGTGAATGTA TGCAACTCGAGTTGCATTA CATTCACAGCACTTTTT	Lim1 exon 2
<i>LHX1</i> MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock TRCN0000015015	<i>pLKO.1</i>	CCGGGTGCAAAAGAGAACA GCCTTCTCGAGAAGGCTGTT CTCTTTGGCAACTTTTT	Lim1 exon 4
<i>LHX1</i> MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock TRCN0000015016	<i>pLKO.1</i>	CCGGCCCTTCTCCTTCTACGG AGATCTCGAGATCTCCGTAG AAGGAGAAGGGTTTTT	Lim1 exon 1
<i>LHX1</i> MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock TRCN0000015017	<i>pLKO.1</i>	CCGGGTCTGCAAAGAGGATT ACCTACTCGAGTAGGTAATC CTCTTTGCAGACTTTTT	Lim1 exon 2
MISSION <i>pLKO.1-puro</i> <i>TurboGFP™</i> shRNA Control	<i>pLKO.1</i>	CCGGCGTGATCTTACCGAC AAGATCTCGAGATCTTGTCG GTGAAGATCACGTTTTT	turboGFP

Tableau 15: Liste des vecteurs utilisés exprimant un shRNA constitutif

1.2.2. Système LoxP/ Recombinase Cre-ER inducible au tamoxifène

Edition génomique ciblée par CRISPR/Cas9

Figure 17

La technologie de CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated system*) est une nouvelle stratégie de modification génique ciblée d'une grande précision, basée sur les découvertes de l'équipe de Charpentier et Doudna sur l'immunité adaptative bactérienne. En effet, il s'agit à la base d'un mécanisme de défense immunitaire bactérien contre les phages et plasmides invasifs. Les CRISPR sont des séquences d'ADN répétées et séparées par des fragments de gènes étrangers intégrés dans le génome bactérien lors d'une première introduction. Lors d'une seconde introduction de ces mêmes acides nucléiques étrangers au sein de la bactérie, il y a activation de la transcription des locus CRISPR en un long précurseur de CRISPR RNA (pré-crRNA) qui, après clivage enzymatique, donnent des crRNAs capables de s'hybrider spécifiquement avec les séquences virales ou plasmidiques exogènes. La reconnaissance des séquences exogènes par les crRNA entraîne leur clivage par une nucléase de la famille des protéines Cas (*CRISPR-associated protein*) et donc l'élimination du corps étranger. Ils confèrent ainsi une résistance adaptative aux phages et aux plasmides étrangers. Ce mécanisme a ensuite été exploité pour faciliter l'ingénierie génomique dans les cellules eucaryotes en spécifiant simplement une séquence génomique de 20 nt à cibler dans un ARN guide qui va orienter une nucléase à cliver l'ADN cible avec une grande précision.

L'objectif de cette partie est d'introduire une séquence LoxP en amont et en aval du gène Lhx1, afin de l'inactiver de façon conditionnelle grâce à une recombinase Cre-ER activée par le tamoxifène. Trois éléments sont nécessaires pour le développement de cette stratégie :

- Un RNA guide (sgRNA: *single guide RNA*) reconnaissant le site génomique de clivage. Le sgRNA est composé de crRNA qui est complémentaire avec la séquence guide et d'un domaine auxiliaire de transactivation (tacrRNA : *trans-activating crRNA*).
- La nucléase Cas9 (*CRISPR associated protein 9*), une endonucléase qui coupe l'ADN double brin.
- Une matrice de recombinaison sous forme d'oligonucléotides donneurs de la séquence LoxP au cours de la réparation dirigée homologue (HDR).

Un autre élément essentiel pour le clivage est un motif appelé PAM (*Protospacer-adjacent motif*) qui se trouve immédiatement en aval de la région cible à l'extrémité 3'. Il s'agit d'un motif de trois nucléotides de type NGG qui est présent dans l'ADN cible mais pas dans le crRNA qui le cible.

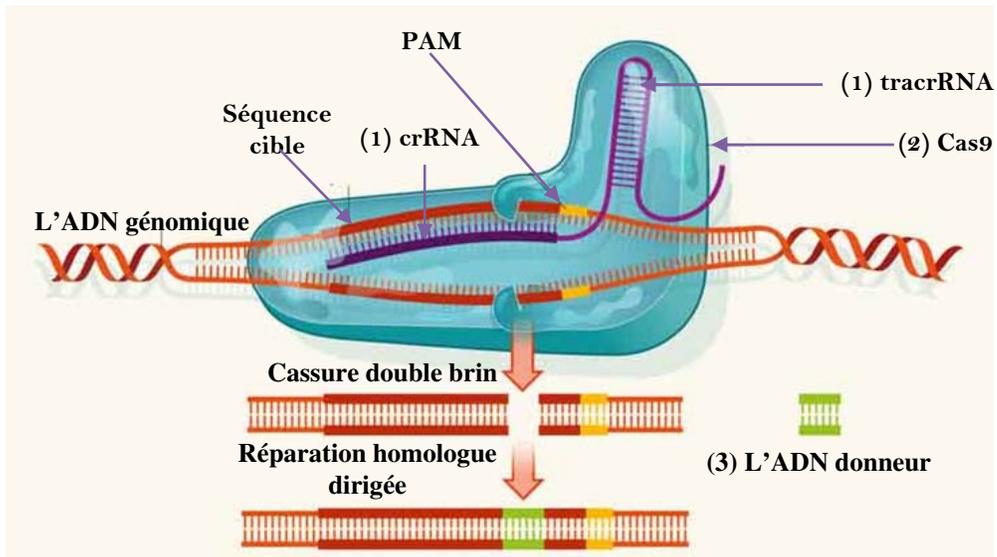


Figure 17: Principe de la technologie CRISPR/Cas9

Trois éléments sont nécessaires pour le développement de cette stratégie: (1) Un RNA guide (sgRNA: *single guide RNA*) reconnaissant le site génomique de clivage. Le sgRNA est composé de crRNA qui est complémentaire avec la séquence guide et d'un domaine auxiliaire de transactivation (tracrRNA : *trans-activating crRNA*). (2) La nucléase Cas9 (*CRISPR associated protein 9*), une endonucléase qui coupe l'ADN double brin. (3) L'ADN donneur porteur de la modification qui servira de matrice pour la réparation dirigée homologue (HDR). Un autre élément essentiel pour le clivage est un motif appelé PAM (*Protospacer-adjacent motif*) qui se trouve immédiatement en aval de la région cible à l'extrémité 3'. Il s'agit d'un motif de trois nucléotides de type NGG qui est présent dans l'ADN cible mais pas dans le crRNA qui le cible.

Le sgRNA se fixe sur l'ADN génomique par complémentarité entre le crRNA et la séquence cible. La Cas 9 reconnaît le complexe formé avec le motif NGG et grâce au domaine tracrRNA, elle s'active et coupe l'ADN double brin.

1.2.2.1. Les vecteurs sgRNA/Cas9

1.2.2.1.1. Choix des séquences cibles (*target guide*) et design des séquences crRNA

Nous avons utilisé un outil en ligne pour le choix des séquences cibles « <http://tools.genome-engineering.org> » (Ran *et al.*, 2013). Il suffit d'introduire la région que l'on veut cibler, environ 1kpb de la région d'intérêt en amont et en aval du gène *Lhx1*. Le site permet d'identifier toutes les cibles appropriées de 20pb directement en amont de n'importe quel motif NGG (PAM). Cet outil identifie également les sites de clivage hors cible « *off target* », c'est-à-dire que le RNA guide peut induire des clivages non spécifiques en dehors de la séquence cible.

Deux séquences ont été choisies en amont du gène *Lhx1* et deux autres séquences ont été choisies en aval du gène *Lhx1*. Le choix était basé essentiellement sur le nombre de sites *off-target* ainsi que leur localisation. De ce fait, nous avons choisi les séquences qui avaient le minimum de sites *off-target* et en dehors des gènes importants.

Après avoir choisi les séquences cibles de 20pb, les oligonucléotides sens et antisens du crRNA sont définis selon les instructions du fournisseur afin de permettre le clonage directionnel dans le vecteur GeneArt® CRISPR Nuclease Vector. (*Life technologies*). Les amorces utilisées sont représentées dans le **Tableau 16** (*Eurogentec*). La séquence PAM n'est pas incluse dans les amorces oligonucléotidiques. Des oligonucléotides contrôle double brins fournis par le kit GeneArt® ont été également utilisés.

1.2.2.1.2. Construction des vecteurs sgRNA/Cas9

Les oligonucléotides sens et antisens des 4 crRNA définis ainsi que les oligonucléotides contrôles sont hybridés puis clonés dans le plasmide linéaire grâce à une T4 ligase après une incubation de 10 min à 25°C (extrémités cohésives) selon les instructions du fournisseur. Les plasmides d'intérêt sont incorporés dans des bactéries puis extraits et purifiés comme décrit préalablement. La présence des oligonucléotides crRNA est vérifiée par séquençage en utilisant l'amorce sens du promoteur U6 fournie par le kit (5'- GGACTATCATATGCTTACCG -3').

1.2.2.1.3. Détection du clivage par les vecteurs sgRNA/Cas9

Figure 18

Comme précisé précédemment, nous avons construit 4 vecteurs sgRNA/Cas9. Afin de vérifier si les crRNA conçus sont capables de couper l'ADN double brin de manière efficace, nous avons utilisé le kit de détection de clivage GeneArt® *Genomic Cleavage Detection Kit* (*Life technologies*). Ce kit

	Fournisseur	Target guide	oligonucléotide sens 5'>3'	oligonucléotide antisens 5'>3'	Cibles
sgRNA1	<i>Eurogentec</i>	AGAGGGACAA CTCCGTGCGG AGG	AGAGGGACAAC TCCGTGCGGGT TTT	CCGCACGGAGT TGTCCTCTCG GTG	89 pb en amont du gène <i>Lhx1</i> (région non caractérisée)
sgRNA2	<i>Eurogentec</i>	AGTCACAAC CGCGGCCGCC TGG	AGTCACAAC GCGGCCGCCGT TTT	GGCGGCCGCGA GTTGTGACTCG GTG	278 pb en amont du gène <i>Lhx1</i> (région non caractérisée)
sgRNA3	<i>Eurogentec</i>	ACGGTATCAG TTAAATCCAC AGG	ACGGTATCAGT TAAATCCACGT TTT	GTGGATTTAAC TGATACCGTCG GTG	196 pb en aval du gène <i>Lhx1</i> (région non caractérisée)
sgRNA4	<i>Eurogentec</i>	TAGAAAGCCG GATTATCTAT AGG	TAGAAAGCCGG ATTATCTATGTT TT	ATAGATAATCC GGCTTTCTACG GTG	423pb en aval du gène <i>Lhx1</i> (région non caractérisée)
sgRNA Ctl	<i>Life technologies</i>	Aucune cible	CATTTCTCAGT GCTATAGAGTT TT	TCTATAGCACT GAGAAATGCGG TG	Aucune cible

Tableau 16: Liste des oligonucléotides crRNA utilisés pour la construction vecteur sgRNA/Cas9

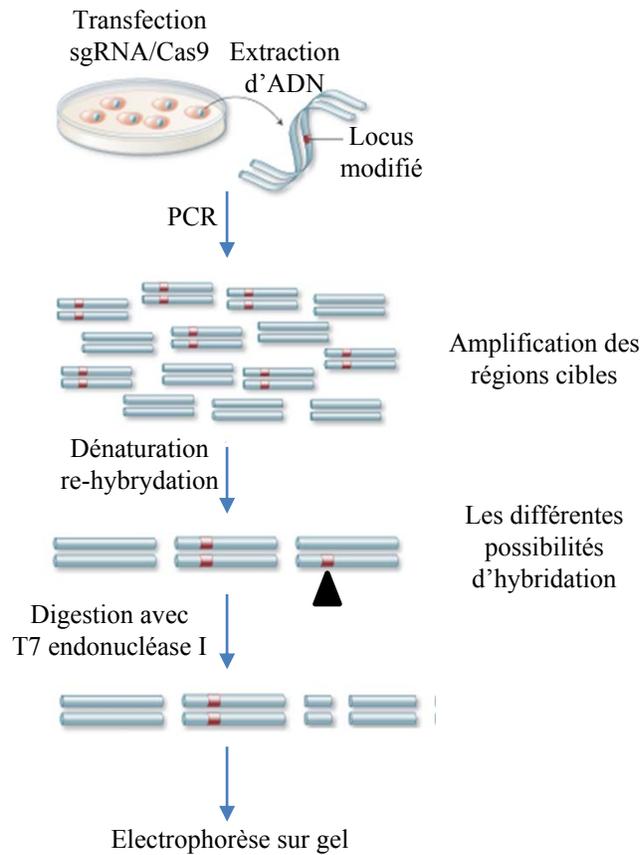


Figure 18: Principe de la détection du clivage

Après clivage efficace de l'ADN double brin par la Cas9, des insertions génomiques aléatoires sont créées par les mécanismes de réparation cellulaire. Les régions génomiques où se situent les cassures sont amplifiées par PCR. Les produits de PCR sont dénaturés et ensuite re-hybridés de manière à ce que des incompatibilités (*mismatch*) soient générées sous forme de duplex hétérogènes. Les *mismatch* sont ensuite détectés et clivés par une enzyme spécifique (T7 endonucléase I). Les produits de digestion enzymatique sont séparés par électrophorèse sur gel. Un clivage efficace correspond à la présence de 2 bandes et l'absence de *mismatch* correspond à l'absence de clivage.

permet la détection du clivage spécifique de l'ADN cible génomique. Le principe est basé sur le fait qu'après clivage efficace de l'ADN double brin par la Cas9, des insertions génomiques sont créées par les mécanismes de réparation cellulaire. Les régions génomiques où se situent les cassures sont alors amplifiées par PCR. Les produits de PCR sont dénaturés et ensuite re-hybridés de manière à ce que des incompatibilités (*mismatch*) soient générées sous forme de duplexes hétérogènes. Les *mismatch* sont ensuite détectés et clivés par une enzyme spécifique, puis les bandes qui en résultent sont analysées par électrophorèse sur gel. Un clivage efficace correspond à la présence de 2 bandes, et l'absence de *mismatch* correspond à l'absence de clivage.

Les cellules 786-0 et Caki2 sontensemencées dans des plaques 6 puits (200 000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont transfectées avec les différents plasmides : sgRNA1/Cas9, sgRNA2/Cas9, sgRNA3/Cas9, sgRNA4/Cas9 ainsi que le sgRNA/Cas9 contrôle. Après 24h de transfection, les cellules sont lysées et l'ADN total est extrait grâce à un tampon de lyse spécifique fourni par le kit GeneArt® (*Cell Lysis Buffer/Protein Degradation mix*). Les régions d'intérêt en amont et en aval du gène *Lhx1* qui incluent le site de clivage sont amplifiées par PCR avec des amorces spécifiques (**Tableau 17**) selon le protocole du fournisseur. Les produits de PCR double brins sont dénaturés à 95°C pendant 5 min ensuite re-hybridés selon un programme de décroissance progressive de température de -2°C/sec (95°C -85°C) ensuite de -0.1°C/sec (85°C -25°C). Cette étape permet d'hybrider de manière aléatoire les fragments de PCR avec et sans insertion pour former des duplexes d'ADN hétérogènes. Après ce cycle de dénaturation-hybridation, les produits de PCR sont directement mis en contact avec l'enzyme de détection de clivage. Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% à 150v pendant 30 min.

1.2.2.2. Design de la matrice pour la réparation homologue dirigée/ séquences ssODNs

Tableau 18

Les séquences d'oligonucléotides qui serviront de matrice pour la HDR après la cassure d'ADN double brin ont été définies manuellement. Ce sont des séquences simple brin de 138pb qui comprennent dans l'ordre, de l'extrémité 5' à l'extrémité 3': 49pb d'homologie avec le génome en amont de la cassure, la séquence LoxP à insérer suivi d'un site de restriction EcoRI (partie centrale) et 49pb d'homologie en aval de la cassure. Le site EcoRI servira de rapporteur pour l'insertion des sites LoxP. Le clivage par la Cas9 se fait 3 paires de bases après le motif PAM. La cassure double brin est réparée par le système de recombinaison dirigée homologue (HDR) en utilisant les séquences ssODNs comme matrice de réparation, il en résulte l'insertion de la séquence LoxP+ EcoRI au site de clivage.

	Amorce sens 5'>3'	Amorce antisens 5'>3'	Taille du produit Wt	Taille du produit avec insertion	Taille du produit Après digestion EcoRI
Paire 1 En amont du gène <i>Lhx1</i> (Eurogentec)	AAACCCAG ATTGGCCAC CAC	GTTGCTTAG GTTTCCCCG CT	387pb	427pb	Compatible avec sgRNA1/ssODN1 Bande1: 353 Bande2: 74
Paire 2 En aval du gène <i>Lhx1</i> (Eurogentec)	GCCTTGGCT ATGGCTGAA AC	CCTTCTGGG GAACTTCAA AGGTA	504pb	544pb	Compatible avec sgRNA4/ssODN4 Bande1: 359 Bande2: 191

Tableau 17: Liste des amorces utilisées pour la recherche de la réparation homologue dirigée

	Compatibilité	Fournisseur	Séquence 5'>3' Bras d'homologie(49pb)-- <u>LoxP</u> +site <u>EcoRI</u> --Bras d'homologie (49pb)
ssODN1	<i>sgRNA1</i>	<i>Eurogentec</i>	GACTGGGCTGGGGCGGTAGGGAAGGAGCGAGTGCGCCTGGCT GCCTCCG <u>ATAACTTCGTATAATGTATACTATAACGAAGTTATG</u> <u>AATTC</u> CACGGAGTTGTCCCTCTCTGTTTTTCGATTGACACAAAC ACTTCTCCAAA
ssODN2	<i>sgRNA2</i>	<i>Eurogentec</i>	GGAGGCAGACAGAGCGTGGGCCGAGCGATGCGGGGCTGTGCG CCCAGGC <u>ATAACTTCGTATAATGTATACTATAACGAAGTTAT</u> <u>GAATTC</u> GGCCCGGAGTTGTGACTGGAGCCACGATGCACGGCC AGGCGCGGTGAGA
ssODN3	<i>sgRNA3</i>	<i>Eurogentec</i>	TTTTCTCTGTGGCTTCCTGCTGTTATTAGCTACAGATTTACATCC TGTG <u>ATAACTTCGTATAATGTATACTATAACGAAGTTATGAAT</u> <u>TTC</u> GATTTAACTGATACCGTTGAAGAGATGTTTGCTGATAAGTT AATATAGA
ssODN4	<i>sgRNA4</i>	<i>Eurogentec</i>	TAATACATAGTTAGAGGTGGTCCTTTTCAGTTTCATTTTCATTTTC CTATA <u>ATAACTTCGTATAATGTATACTATAACGAAGTTATGAA</u> <u>TTC</u> GATAATCCGGCTTTCTAATTTGGTAGTTTGAAGATAATGT AAAGGCTT

Tableau 18: Liste des ssODNs conçus pour la réparation homologue dirigée

1.2.2.3. Transfert des gènes

1.2.2.3.1. *Transfection*

Les clones 786-0 et Caki2 exprimant la luciférase sont ensemencés dans des plaques 6 puits à 200 000 cellules/puits. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées avec le vecteur sgRNA/Cas9 et les ssODNs correspondant en utilisant l'agent de transfection jetPRIME[®] selon les recommandations du fournisseur. Des transfections successives ont également été réalisées, à savoir une première transfection des cellules avec les vecteurs sgRNA/Cas seuls, et 4h après, les milieux de culture sont changés et les cellules sont transfectées avec les ssODNs correspondants.

Après 24h de transfection, les plaques sont observées au microscope à fluorescence (Nikon) afin de vérifier l'efficacité de transfection grâce au rapporteur OFP (*orange fluorescence protein*) présent dans le vecteur sgRNA/Cas9.

1.2.2.3.2. *Electroporation*

Le principe consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires pour augmenter la perméabilité membranaire et donc faciliter l'internalisation des vecteurs. Cinq millions de cellules 786-0 et Caki2 sont resuspendues dans 100 µl de solution T fournie avec le Kit T (Amaxa[®] *Cell Line Nucleofector*[®] Kit T, LONZA, Bâle, Suisse). Les quantités nécessaires de vecteur sgRNA/Cas9 et ssODNs correspondant sont ajoutées à la suspension cellulaire et le tout est transféré dans des cuvettes spéciales pour la nucléofection. Après sélection du programme 3 (T-030) dans l'appareil de nucléofection Nucleofector II Amaxa[®] (LONZA), la cuvette bien fermée est placée dans le support. Directement après l'application du programme qui dure quelques secondes, les cellules sont transférées dans du milieu neuf tiède et mises en culture. Comme contrôle positif, nous avons utilisé le pmaxGFP[®] Vector fourni avec le kit dans les mêmes conditions. L'efficacité de la nucléofection est vérifiée le lendemain au microscope à fluorescence inversé (Nikon) grâce aux rapporteurs GFP pour le contrôle positif et OFP pour le vecteur sgRNA/Cas9.

1.2.2.3.3. *Tri cellulaire et établissement des clones*

24h après transfection ou nucléofection, les cellules adhérentes sont récupérées et resuspendues dans le tampon PBS 1X stérile et filtré contenant : 1 mM d'EDTA, 25 mM de HEPES et 1% de FBS. Les cellules ayant reçu le vecteur sgRNA/Cas9 sont OFP positives. L'OFP a une excitation maximale de 548 nm et une émission de 560 nm. Le tri cellulaire est réalisé à l'aide d'un trieur (BDFACS ARIA II de Becton-Dickinson) équipé d'un laser de 488nm pour l'excitation et d'un filtre de 575 nm pour l'émission. Les cellules triées sont directement collectées dans du milieu complet et mises en culture. Les clones sont établis comme décrit précédemment, après dilution des cellules triées dans des boîtes

de Pétri (500 cellules/boîte) et la sélection des clones se fait par repiquage des colonies bien isolées après 15 jours de culture.

1.2.2.4. Vérification de l'insertion des séquences LoxP

1.2.2.4.1. Extraction d'ADN génomique

Pour la vérification de l'insertion des séquences LoxP, les ADNs génomiques sont extraits à partir des clones ou des pools cellulaires. Les cellules adhérentes sont récupérées dans 500µl de tampon de lyse (50mM Tris, 5mM EDTA, 1% SDS, 200mM NaCl) en présence de 1mg/ml de protéinase K (Sigma-Aldrich) et incubées une nuit dans un bain marie à 65°C. Après addition du même volume d'un mélange phénol/chloroforme (v/v), les tubes sont agités vigoureusement à la main pendant 15 sec et centrifugés à 4°C à 20000 g pendant 2 min. La phase aqueuse supérieure contenant les ADNs est alors récupérée et précipitée par addition de 1ml d'éthanol pur. Les tubes sont agités et centrifugés à 4°C à 10000 g pendant 5 min. Les culots sont ensuite lavés avec 1 ml d'éthanol 70%, séchés à l'air puis repris dans de l'eau « *DNase free* » (10 à 50 µL selon la taille du culot). Les concentrations des ADNs totaux sont déterminées par l'absorbance à 260 nm (Nanodrop, *Thermo Fisher Scientific*). Un rapport absorbance à 260 nm/absorbance à 280 nm égale à 1,8 indique l'absence de contamination de la préparation par l'ARN et les protéines.

1.2.2.4.2. Amplification des régions cibles par PCR

Les régions cibles en amont et en aval du gène *Lhx1* ont été amplifiées en utilisant le kit KAPA HiFi (KAPA BIOSYSTEMS, Clinisciences, Nanterre, France). Le milieu réactionnel (25 µl) contenait 5 µl du 5X KAPA HiFi Buffer, 0.75µl du 10 mM KAPA dNTP Mix, 0,5 µM de chaque couple d'amorces sens-antisens spécifiques de chaque région cible du génome (**Tableau 17**), 10-100ng de l'ADN génomique, 1µl de la KAPA HiFi DNA polymérase et qsp 50µl d'eau « *RNase DNase free* ». La KAPA HiFi DNA Polymerase est une nouvelle ADN polymérase conçue pour avoir une affinité accrue pour l'ADN et une grande processivité intrinsèque. Elle est utilisée pour sa haute fidélité. Les taux d'erreur sont 100 fois inférieurs à ceux de la Taq polymérase sauvage. Après une première dénaturation à 95°C pendant 3 min, la PCR en temps final est réalisée en 35 cycles de dénaturation (20 sec à 98°C), d'amorçage (15 sec à 60°C) et de polymérisation (15 sec à 72°C).

1.2.2.4.3. Digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose

Grâce au site rapporteur ajouté après les séquences LoxP, nous pouvons vérifier la présence d'une réparation homologue par simple digestion enzymatique des produits d'amplification par PCR avec l'enzyme EcoRI en amont et aval du gène *Lhx1*. La présence d'une digestion totale correspond à une insertion du LoxP sur les deux allèles *Lhx1*, une digestion partielle à une insertion hétérologue et l'absence de digestion à une absence de réparation homologue dirigée. Les produits de PCR (0.2 µg)

sont digérés pendant 20 min à 37°C (MasterCycler, Eppendorf) dans un milieu réactionnel de 20µl contenant 2µl du *10X FastDigest Green Buffer*, 1µl de *FastDigest EcoRI* enzyme et qsp 20µl d'eau (*DNase free*) selon le protocole du fournisseur (*Thermo Fisher scientific*). Les produits de digestion sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du BET (bromure d'éthidium, Sigma-Aldrich) pendant 25min à 150V. L'imageur «Fusion FX7» permet l'acquisition de la fluorescence pour une exposition optimale des gels aux rayons UV, et une capture d'image par une caméra CCD refroidie.

1.2.2.4.4. Séquençage Sanger

Une deuxième méthode pour la vérification de la présence ou pas de l'insertion des sites LoxP a été utilisée. Il s'agit du séquençage direct des produits de PCR.

Les produits de PCR sont préparés à une concentration de 10 à 50 ng/µl et les amorces sens correspondant aux régions en amont et en aval du *Lhx1* sont diluées à une concentration de 10 pmol/µl. Les paires de produits de PCR/Amorce sont envoyées pour le séquençage Sanger avec le service *SUPREMERUN tube* chez GATC Biotech qui assure un séquençage express *overnight*.

1.2.2.5. Quantification du nombre de copies du gène *Lhx1*

Afin de connaître le nombre de copies (NC) du gène *Lhx1* présent dans les cellules cancéreuses utilisées, le gène *Lhx1* est amplifié à partir de l'ADN génomique des cellules 786-0 et Caki2 et le NC obtenu est comparé à celui de la lignée du rein normal HK2.

Les cellules HK-2 (ATCC) sont maintenues dans du DMEM/F12 (Gibco) supplémenté en SVF à 10%, en antibiotiques (Pen/Strep, 1%), en L-Glutamine (2 mM, Gibco) et par une solution contenant de l'insuline (5 µg/ml), de la transferrine (5 µg/ml) et du sélénium (5 ng/ml) (ITS, Gibco). Les cellules HK-2 sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Tout d'abord, une PCR en temps final est réalisée avec le Kit KAPA HiFi (KAPA BIOSYSTEMS) à partir de l'ADN génomique des cellules HK2 avec des amorces spécifiques du gène *Lhx1* (séquence qui chevauche l'exon et intron pour ne pas amplifier l'ARN). Les cellules HK2 représentent notre référence de cellules rénales normales avec 2 allèles du gène *Lhx1*. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose à 1%. La bande correspondante à l'amplicon est extraite et purifiée sur colonne (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey Nagel). Les produits de PCR purifiés sont dosés au Nanodrop à 260 nm. A l'aide d'un convertisseur en ligne (*URI Genomics & Sequencing Center*), les quantités en nanogramme sont transformées en nombre de copies. Une gamme de standardisation en nombre de copies est préparée par dilution en cascade des produits de PCR (10⁶ à 10² copies).

La même quantité d'ADN génomique des cellules 786-0, Caki2 et HK2 est amplifiée par PCR en temps réel, cette fois ci en présence de la gamme de standardisation et en utilisant le kit «*Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix*» (Bio-Rad) comme décrit précédemment avec les amorces sens et antisens spécifiques du gène *Lhx1* (**Tableau 11**).

1.2.3. L'antisens de *Lim1*

Nous avons pensé également à utiliser une autre méthode d'inhibition conditionnelle de *Lim1*. Il s'agit de l'introduction d'un vecteur qui exprime l'antisens de *Lim1* sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline. Le mode d'action du système antisens est simple : après transcription, l'antisens vient se lier à l'ARNm de *Lim1* qui devient inaccessible aux facteurs impliqués dans sa traduction et empêche alors la production de la protéine. Avant de tester la forme conditionnelle du système antisens, nous avons décidé de tester d'abord son efficacité à inhiber *Lim1* sous forme constitutive.

1.2.3.1. Construction du vecteur antisens sous le contrôle d'un promoteur constitutif

Nous avons utilisé le vecteur pCMV6-XL5-*LHX1* (Origene, Clinisciences) qui exprime *lim1* sous le contrôle du promoteur CMV. La séquence codante se trouve flanquée de deux sites de restriction EcoRI (site de clonage). Après digestion du vecteur pCMV6-XL5-LHX avec EcoRI, le produit de digestion est séparé sur gel et la bande correspondant à la séquence de *Lim1* (1342pb) est coupée et purifiée. Le vecteur vide pCMV6-XL5 est linéarisé par une digestion avec l'enzyme EcoRI (site unique). La linéarisation est maintenue par traitement du vecteur linéaire avec une phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich) qui enlève les groupements phosphates en 5'. L'insert *Lim1* est alors cloné dans le vecteur vide pCMV6-XL5, linéarisé grâce à une T4 ligase (Invitrogen). L'insertion de la séquence *Lhx1* se fait de façon aléatoire et la vérification de l'inversion se fait par séquençage (GATC Biotech). Le vecteur est ensuite incorporé dans des bactéries, extrait et purifié comme décrit précédemment.

1.2.3.2. Vérification de l'efficacité du vecteur antisens

Les cellules 786-0 sontensemencées dans des plaques 24 puits pour des analyses RT-qPCR (50 000 cellules/puits) et dans des plaques 6 puits pour des analyses Western blot (200 000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont transfectées pendant 48h et 72h avec les vecteurs pCMV6-XL5-AS et pCMV6-XL5-empty en utilisant l'agent de transfection jetPRIME® selon le protocole du fournisseur. Les ARNs totaux et les protéines sont extraits pour des analyses RT-qPCR (Cf. I.3. Vérification de l'extinction de l'expression de *Lim1*) et Western blot (Cf. I.5. Analyse de l'expression des protéines d'invasion) respectivement afin de vérifier la faisabilité du système AS comme décrit précédemment.

1.3. Le développement de métastases

1.3.1. Validation du modèle invasif orthotopique

1.3.1.1. Le modèle orthotopique

L'expérimentation animale est réalisée dans le respect des règles de bioéthique et de la législation française. Les souris mâles *nude* athymiques SWISS nu-/- (*Charles River Laboratories*, l'Arbresle, France) sont maintenues dans des conditions aseptisées : les cages, la litière ainsi que l'eau et la nourriture sont autoclavées. Les souris âgées de 4 semaines à leur arrivée subissent une semaine d'habituation avant le début de toute expérimentation.

Les souris sont préalablement anesthésiées par un mélange xylazine/kétamine (xylazine 4 mg/kg + kétamine 64,25 mg/kg; ROMPUN® 2%, IMALGENE® 500 ; Centravet, Nancy) par injection intramusculaire pour une anesthésie de 30 min, le temps nécessaire pour la chirurgie. Un million de cellules 786-0 ou Caki2, exprimant la luciférase, en phase exponentielle de croissance, sont injectées chez la souris sous la capsule rénale. Un volume maximal de 20µl de la suspension cellulaire est injecté à l'aide d'une seringue Hamilton, et une aiguille de 30G.

1.3.1.2. Imagerie par bioluminescence

Le suivi de l'évolution tumorale en termes de croissance et d'invasion métastatique a été fait par imagerie de bioluminescence grâce à la luciférase exprimée par les cellules cancéreuses. A la fin de la chirurgie et toutes les semaines, un mélange luciférine-kétamine-xylazine (xylazine 4 mg/kg + kétamine 64,25 mg/kg-luciférine 150mg/kg) est préparé et injecté par voie intrapéritonéale. 10 min après l'injection, les souris sont soumises à l'imagerie. L'imageur « Fusion FX7 » (Vilber-Lourmat) permet l'acquisition du signal bioluminescent pour une exposition optimale et une capture d'image par caméra CCD refroidie.

1.3.2. Validation du modèle invasif par voie intra-veineuse

Pour ce modèle, nous avons utilisé le protocole décrit par (Jeong *et al.*, 2015), qui permet le développement de métastases pulmonaires 3 semaines après l'injection des cellules cancéreuses par voie intraveineuse. Ce modèle a été également validé par notre laboratoire avant l'étude proprement dite. En bref, un million de cellules 786-0 ou Caki2 sont injectées par voie intraveineuse dans la veine latérale de la queue de souris femelles *nude* BALB/c (*Charles River Laboratories*) âgées de 6 semaines sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (CSP, Cournon d'Auvergne, France). Les souris sont sacrifiées 3 semaines après l'injection et les poumons sont prélevés et fixés pour des analyses histopathologiques à l'hématoxyline-éosine (Cf. II.2.2. Immunohistochimie).

2. Etude du pouvoir invasif de Lim1 *in vivo*

2.1. Culture cellulaire et transfection

Les lignées cellulaires 786-0 et Caki2 sont dispersées dans des boîtes de Petri (100mm) à 500 000 cellules/boîte dans du milieu complet sans antibiotiques. Après 24h, les cellules sont transfectées avec siLhx ciblant l'exon 2 ou siCtl (*in vivo ready*, Life technologies) en utilisant l'agent de transfection jetPRIME® selon le protocole du fournisseur (Polyplus transfection). Nous avons également gardé des cellules non transfectées pour le groupe contrôle.

24h après transfection, les cellules adhérentes sont récupérées par trypsinisation et des suspensions cellulaires sont préparées pour chaque condition (non transfectée, siLhx, siCtl) dans du PBS stérile à 1×10^6 de cellules/100µl. L'efficacité de la transfection est également vérifiée par RT-qPCR à partir de l'excédent de cellules.

2.2. Implantation des cellules

Le jour de l'implantation des cellules, 30 souris femelle *nude* BALB/c sont randomisées en 6 groupes (5 souris/groupe). Un million de cellules 786-0 ou Caki2 avec les différentes conditions (non transfectées, transfectées avec siLhx, transfectées avec siCtl) sont injectées selon le protocole validé ci-dessus. Les souris sont euthanasiées trois semaines après et les poumons sont récupérés et fixés pour les analyses histopathologiques.

2.3. Analyses histopathologiques

Les poumons sont analysés macroscopiquement et microscopiquement. Après inclusion en paraffine, des sections de 4 µm d'épaisseur sur 5 niveaux ont été réalisées puis colorées avec Hématoxyline & Eosine pour l'analyse histopathologique. Le nombre ainsi que le diamètre des nodules micrométastatiques pulmonaires ont été évalués sur les différentes sections.

3. Analyse statistique

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm s.e.m. L'analyse statistique est effectuée selon le cas en utilisant le t test de *Student*, *ANOVA one-way* ou *two-way* suivi d'un test de Student-Newman-Keul pour les comparaisons multiples. $P < 0,05$ est considéré comme significatif. ('*' Représente $P < 0,05$, '**' représente $P < 0,01$, '***' représente $P < 0,001$).

IV. Etude translationnelle

Les nanofibres polydiacétyléniques

Ce sont des vecteurs synthétisés et fournis par le Dr Patrick Neuberg (Laboratoire V-SAT, Vecteurs: Synthèse et Applications Therapeutiques, Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-UdS, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France, Responsable Dr Jean-Sergé Rémy).

Les lipides diacétyléniques basés sur une longue chaîne hydrocarbonée C25 peuvent s'auto-assembler en une variété de formes supramoléculaires en tubes ou en micelles. La photo-polymérisation de ces lipides par irradiation UV forme des systèmes très stables dits PDA (PolyDiAcetylenic). Dans ce travail, nous avons utilisé l'organisation supramoléculaire en forme de tubes, appelée nanofibres polydiacétyléniques (PDA-Nfs). Ces PDA-Nfs photo-polymérisés ont l'avantage d'être très stables et autofluorescents, permettant de vérifier au microscope leur internalisation cellulaire. Les spectres d'excitation et d'émission sont respectivement 550 et 646 nm. Ils ont une taille maximale de 780nm. Les analyses de complexation des molécules de siRNAs anioniques avec les PDA-Nfs montrent un rapport N / P autour de 4. Ce rapport définit la teneur totale en amines des fibres par rapport au nombre de groupes phosphates présents dans le siRNA.

1. Vérification de l'efficacité des nanofibres *in vitro*

1.1. Les lignées cellulaires

Pour cette partie, nous avons utilisé la lignée cellulaire de CCC humain 786-0 déficiente en VHL cultivée dans les conditions habituelles, ainsi que des clones stables de cellules 786-0 exprimant la luciférase (transfectées avec pGL4.50 luc2-CMV-hygromycine, Promega) ou surexprimant Lim1 (transfectées avec pVITRO2-LGFP-*Lhx1*, *InvivoGen*, Toulouse, France) maintenus dans le même milieu additionné d'hygromycine (200 µg / ml, Gibco).

1.2. Extinction des gènes

Les cellules 786-0 Wt et les clones 786-0 exprimant la luciférase ou surexprimant Lim1 sont ensemencés dans des plaques 24 puits (25 000 cellules /puits) et cultivés pendant 24h. Les complexes PDA-Nfs/siLhx, PDA-Nfs/siCtl ou PDA-Nfs /siLuc (siRNAs ciblant la luciférase, *Eurogentec*) ont été préparés dans un tampon HBG (*Hepes Buffered Glucose*: 20 mM d'Hepes, 5% de glucose, pH =7,4) et incubés pendant 1 heure à température ambiante (étape de maturation). Différentes concentrations de PDA-Nfs ont été testées avec 10nM de siRNA. Après maturation, les complexes PDA-Nfs/siRNAs sont ajoutés aux cellules en absence de sérum. Après 4h de traitement, les milieux sont supplémentés avec 10% de sérum.

Les cellules sont également transfectées avec les mêmes siRNAs à 10nM et dans les mêmes conditions, en utilisant le réactif jetPRIME® selon les instructions du fabricant Polyplus. L'efficacité de transfection est déterminée par RT-qPCR et par imagerie de bioluminescence après 48h.

1.3. Vérification de l'internalisation des PDA-Nfs par microscopie à fluorescence

Afin de vérifier l'internalisation des vecteurs PDA-Nfs, après 24h de traitement, le milieu de culture est changé après 2 lavages au PBS. Les plaques sont ensuite observées sous microscope inversé à fluorescence (Nikon) grâce à l'autofluorescence des PDA-Nfs.

1.4. Etude de l'extinction de la luciférase par imagerie de bioluminescence

Après 48 h de transfection, le milieu de culture des cellules 786-0 exprimant la luciférase est supplémenté avec la luciférine à 150 µg / ml (Promega) et les plaques de culture sont incubées pendant 10 minutes dans le noir avant l'imagerie. L'intensité du signal bioluminescent est ensuite évaluée à l'aide de l'imageur "Fusion FX7" (Vilber-Lourmat) comme décrit ci-dessus.

1.5. Etude de l'extinction de l'expression de Lim1 par RT-qPCR

Après 48h de traitement, les ARNs totaux des cellules sont extraits avec la technique du TRIzol (*Invitrogen*) et l'expression de Lim1 est étudiée par RT-qPCR comme préalablement décrit dans la partie *in vitro* (Cf. I.3. Vérification de l'extinction de l'expression de Lim1).

1.6. Etude de la cytotoxicité des PDA-Nfs par la technique du cristal violet

Afin d'évaluer la cytotoxicité des PDA-Nfs, nous avons étudié la densité cellulaire par la méthode de coloration au cristal violet. Le protocole est identique à celui utilisé pour l'étude de la croissance cellulaire (Cf. III.1.1.2.2.1. La densité cellulaire).

2. Vérification de l'efficacité des nanofibres *in vivo*

2.1. Modèle d'étude *in vivo*/Les xénogreffes sous-cutanées

Les expériences sont réalisées sur des souris *nude* athymiques mâles SWISS nu-/- âgées de 5 semaines au début de l'étude. L'implantation en sous-cutanée des cellules 786-0 a été réalisée à partir de cellules en phase exponentielle de croissance (80% de confluence). Dix millions de cellules 786-0 sont injectés, sous anesthésie gazeuse (isoflurane), sous la peau du dos de la souris au niveau de la région interscapulaire (implantation en sous-cutané non invasive). Lorsque le volume des tumeurs atteint 300 mm³, généralement 6 semaines après l'injection, nous commençons les traitements. Le volume des tumeurs a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse électronique puis calculé selon la formule suivante: longueur x largeur x épaisseur x 0,5236 (Massfelder *et al.*, 2004).

2.2. Traitement *in vivo*

D'une manière générale, les souris sont randomisées en 3 groupes de volume tumoral équivalent: un premier groupe de 4 souris contrôle ne recevra pas le traitement, un deuxième groupe de 5 souris recevront les complexes PDA-Nfs/siCtl et un groupe de 6 souris recevra les complexes PDA-Nfs/siLhx.

Une quantité de 0,2 mg de siRNAs par kg de souris est d'abord diluée dans du tampon HBG stérile et filtré puis complexée avec les PDA-Nfs à un ratio N / P = 6. Les mélanges sont incubés pendant 1h à température ambiante. Il s'agit d'une étape de maturation nécessaire pour la formation des complexes PDA-Nfs/siRNAs.

Le traitement consiste en une injection unique par voie intrapéritonéale (ip) des complexes PDA-Nfs/siRNAs correspondant à chaque groupe. Après 48h de traitement, les souris sont euthanasiées sous anesthésie et les tumeurs sont récupérées après dissection des régions nécrotiques et la totalité de la tumeur est conservée dans l'azote liquide. La moitié de la tumeur est dédiée aux extractions d'ARNs pour des analyses quantitatives de RT-qPCR et l'autre moitié est dédiée aux extractions de protéines pour des analyses de Western blot.

2.3. Etude de l'expression de Lim1 par RT-qPCR

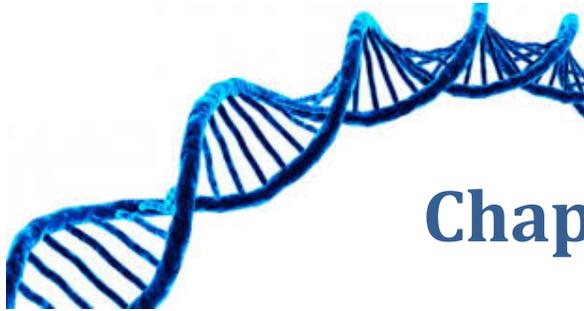
Afin d'éviter les problèmes d'hétérogénéité tumorale, la moitié de la tumeur a été découpée en six morceaux et les ARNs sont extraits sur chaque morceau. L'ARN total a été extrait à l'aide du TRIzol (*Invitrogen*). Les tissus tumoraux congelés ont d'abord été broyés à l'aide d'un homogénéiseur avec une bille préalablement placée dans chaque tube. 1 ml de TRIzol a ensuite été ajouté. La suite de l'extraction et l'étude de l'expression de Lim1 par RT-qPCR se poursuivent comme décrit précédemment pour l'étude *in vitro* (Cf. I.3. Vérification de l'extinction de l'expression de Lim1).

2.4. Etude de l'expression de Lim1 par Western blot

Les extractions protéiques des tissus tumoraux et les préparations des membranes ont été réalisées comme détaillé préalablement dans l'étude *ex vivo* (Cf. II.2. Etude de l'expression de Lim1 dans les métastases de CCR). Les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec la dilution appropriée de l'anticorps primaire: anti-Lim1 (1/3000^{ème}; Abcam). En contrôle de charge protéique, nous avons utilisé l'anticorps anti β -actine (1/20000^{ème}, Sigma-Aldrich). L'anticorps secondaire conjugué à la HRP approprié a été utilisé. L'immunoréaction est révélée par chimioluminescence avec un kit de détection Luminata™ (Millipore).

2.5. Analyse statistique

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm s.e.m. L'analyse statistique est effectuée selon le cas en utilisant le t test de *Student*, ANOVA *one-way* ou *two-way* suivi d'un test de Student-Newman-Keul pour les comparaisons multiples. P <0,05 est considéré comme significatif. ('*' Représente P <0,05, '**' représente P <0,01, '***' représente P <0,001).



Chapitre III

**Implication du facteur
développemental Lim1 dans
l'invasion métastatique**



I. Publication

The Lim1 oncogene as a new therapeutic target for metastatic human renal cell carcinoma

(Hamaidi *et al.*, 2017)

Manuscrit en révision (*Oncogene*)

The Lim1 oncogene as a new therapeutic target for metastatic human renal cell carcinoma

Imène Hamaidi¹, Catherine Coquard¹, Sabrina Danilin^{1,5}, Valérien Dormoy^{1,6}, Claire Béraud², Sylvie Rothhut¹, Mariette Barthelmebs¹, Véronique Lindner³, Hervé Lang⁴ and Thierry Massfelder^{1*}

¹INSERM UMR_S1113, Section of Cell Signalisation and Communication in Kidney and Prostate Cancer, INSERM and University of Strasbourg, School of Medicine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, 67085 France; ²UROLEAD SAS, School of Medicine, Strasbourg, 67085 France; ³Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Strasbourg-Hautepierre, Department of Pathology, Strasbourg, 67098 France; ⁴Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Department of Urology, Strasbourg, 67091 France

⁵Current address: Firalis, Huningue, 68330 France;

⁶Current address: INSERM UMR_S903, Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims

* To whom correspondence should be addressed: Thierry Massfelder, Tel: 333-68-85-34-56; Fax: 333-68-85-34-59; E-mail: massfeld@unistra.fr

Key words: Lim1, human renal cell carcinoma, tumorigenesis, metastasis, invasion, mouse xenograft models

Abbreviations: RCC, renal cell carcinoma; CCC, conventional renal cell carcinoma; VHL, von Hippel-Lindau

Running title: Lim1 in advanced renal cell carcinoma

Abstract

Metastatic clear cell renal cell carcinoma (CCC) remains incurable despite advances in the development of anti-angiogenic targeted therapies and the emergence of immune checkpoints inhibitors. We have previously shown that the sonic hedgehog-Gli signaling pathway is oncogenic in CCC allowing us to identify the developmental Lim1 transcription factor as a Gli target and as a new oncogene in CCC regulating cell proliferation and apoptosis, and promoting tumor growth. In this previous study, preliminary in vitro results also suggested that Lim1 may be implicated in metastatic spread. Here we investigated the potential pro-metastatic role of Lim1 in advanced CCC (1) in vitro using a panel of CCC cell lines expressing or not the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and (2) ex vivo in 30 CCC metastatic tissues including lymph nodes, lung, skin, bone and adrenal metastases and (3) in vivo, using a metastatic model by IV injection of siRNA-transfected cells into Balb/c nude. Our in vitro results reveal that Lim1 knockdown time-dependently decreased CCC cell motility, migration, invasion and clonogenicity by up to 50% regardless of their VHL status. Investigating the molecular machinery involved in these processes, we identified a large panel of Lim1 targets known to be involved in cell adhesion (Paxillin, fibronectin), epithelial-mesenchymal transition (Snail1, Twist1/2), invasion (MMP1/2/3/8/9) and metastatic progression (CXCR4, SDF-1, ANG-1). Importantly, Lim1 was found constitutively expressed in all metastatic. The H-score in metastatic tissues being significantly superior to the score in the corresponding primary tumor tissues (P value= 0.0006). Furthermore, we showed that Lim1 silencing blocks pulmonary metastasis development in our in vivo metastatic model of human CCC. Taken together, these experiments strengthen the potential therapeutic value of Lim1 targeting as a promising novel approach for treating metastatic human CCC.

INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most malignant tumors and clear cell RCC (CCC), among all subtypes of RCC, is the most common and aggressive one. Approximately 40% of patients with RCC will die of metastasis. At diagnosis, metastases are often already present, due to the asymptomatic nature of kidney cancer, and relapse after nephrectomy is common.¹ RCC metastases are surgically difficult to remove. They are resistant to radiotherapy and systemic therapies including hormone therapy, chemotherapy and immunotherapy based on interleukin-2 and interferon alpha. Several targeted therapies including the VEGF-neutralizing antibody bevacizumab, the receptor tyrosine kinase inhibitors sunitinib, sorafenib and axitinib, and more recently cabozantinib, and the mTOR inhibitors everolimus and temsirolimus have been approved for the treatment of metastatic RCC disease over the past 10 years.² However, to date, metastatic RCC remains largely incurable.³ New therapeutic approaches are currently being evaluated based on immune checkpoints inhibitors such as Nivolumab anti-PD-1 (Programmed cell death protein 1) monoclonal antibody anti-CTLA-4 and anti-PD-1/PD-L1 antibodies, alone or in combination with targeted therapies; although gain have been observed in terms of overall survival with these approaches, there are still no tumor regression and cure.⁴

There is again an interest in the scientific and medical communities—for the discovery of novel therapeutic targets. We have previously shown the oncogenicity of the developmental signaling pathway sonic hedgehog (SHH)-Gli and its orchestral role in stimulating other signaling pathways and markers, such as the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway that we previously evidenced as an important pathway for kidney carcinogenesis.^{5,6} In addition, in this previous work, we have identified various Gli targets, among them the Lim1 transcription factor, that we have subsequently shown to be a new oncogene in human CCC.⁷ Lim1, a LIM homeobox protein, is an important actor during development as well,

being already expressed at the gastrula stage and being involved thereafter in the head and in the uterus and the vagina development.⁸⁻¹³ In addition, Lim1 governs anterior mesendoderm, node, and midline development together with Otx2 (Orthodenticle homeobox 2), Foxa2 (forkhead box A2), and its cofactor Ldb1(LIM domain binding protein1), and is an important actor of kidney development regulating the expression of genes from both proximal and distal kidney structures,^{14,15} being for example involved in the definition of the renal proximal tubule, from which CCC arises. In the adult in human, expression of Lim1 is restricted to some regions of the brain, the thymus and in the endometrial epithelium and stroma.^{8,16} Lim1 has been reported to be overexpressed in gastric and pancreatic cancers and in chronic leukemia¹⁷⁻¹⁹ and to be reactivated in nephroblastoma and in medulloblastoma.^{20,21} In addition, it has been identified as a susceptibility gene for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma.²² Interestingly, in medulloblastoma, Lim1 was identified as a functional genomic driver for metastatic dissemination.²¹ In our previous work, we have shown that Lim1 is exclusively expressed in CCC tumors compared to normal corresponding tissues; the mechanisms underlying its oncogenic activities involved proliferative and anti-apoptotic properties in vitro in cultured cells and on tumor growth in CCC-bearing nude mice models. Preliminary results also revealed that Lim1 may be involved in cell movements and thus that it may be part of the machinery leading to metastasis.⁷ The mechanism of such potential pro-metastatic activity of Lim1 has to be fully defined.

Obviously, our understanding of the mechanism that underlies CCC progression is critical for new drug development. Research on RCC invasion and metastasis mechanisms has a high priority due to the poor prognoses of RCC patients with metastatic disease. Recent works described that matrix metalloproteinases (MMPs) or enzymes that degrade components of the extracellular matrix and basement membrane, such as heparanase, are involved in advanced tumoral stages and that factors involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), such as

Snail and Slug, are also involved in metastatic stages through down-regulation of E-cadherin and up-regulation of MMPs.²³ We have shown that Lim1 is involved in the constitutive activation of oncogenic signaling pathways, including the PI3K/Akt pathway, that has also been shown to be linked to metastatic disease.^{6,24-26}

The present work focused on the effect of Lim1 in migration and invasion of CCC cells both in vitro and in vivo, in addition to its clinical relevance. We illustrated that Lim1 promoted metastasis development.

RESULTS

Lim1 silencing inhibits cell movements in a panel of human CCC cell lines

In our previous work, preliminary results showed that Lim1 is involved in cell movements in 2 CCC cell lines (786-0 and Caki1). We thus investigated this aspect in an additional panel of human CCC cell lines. No pharmacological inhibitor of Lim1 has yet been developed so that we silenced Lim1 expression using specific siRNAs targeting Lim1.

In the previous study on Lim1 we used 3 siRNAs, *siLhx1ex1*, *siLhx1ex2* and *siLhx1ex3* targeting exon 1, 2 and 3 respectively.⁷ No difference in results was observed between the three siRNAs in the present work we. We decided to continue our investigation using with *siLhx1ex2* that we are calling here *siLhx1*.

Lim1 knockdown efficiency with *siLhx1* (50nM) was confirmed by RT-qPCR (Supplementary Figure 1a-c) and Western blot (Supplementary Figure 1d) showing a reduction of Lim1 expression raising up to 90% at all time points tested, ranging from 24h to 96 or 120h, in all 3 cell lines. Transient transfection with siCtl (50nM) did not alter Lim1 expression. These results indicated specificity and efficiency of Lim1 silencing.

Cell motility was assessed by wound healing assay. The transient transfection with *siLhx1* decreased ACHN cell motility by around 60% at 12h or 24h post-transfection (Figure 1a). Similar results were obtained in Caki2 (50%) cells (Figure 1b) and A498 (40%) cells (Figure 1c). Cell migration and invasion were analyzed using transwell assays and inhibited at 24h or 48h post-transfection with *siLhx1* respectively by 50% and 40% in ACHN cells (Figure 2a,d), by 50% and 60% in Caki2 cells (Figure 2b,e) and by 50% and 60% in A498 cells (Figure 2c,f). Thus, Lim1 silencing decreased cell movements in all cell lines tested regardless of the VHL status.

Lim1 is involved in the expression of various proteins regulating cell movements and EMT

The above results prompted us to investigate the molecular mechanisms sustained by Lim1 to regulate cell movements. We then analyzed the expression of markers associated with invasiveness and EMT in all 3 cell lines (Figure 3, Supplementary Figure 2, Supplementary Figure 3, and Supplementary Table 1). Lim1 expression was knockdown for 24 to 96h and many targets were dysregulated in a time-dependent manner, with an expression profile quite similar from one cell line to another. Lim1 targets include: MMPs (1/2/3/89), proteins involved in EMT (Snail1, Twist1/2) or cell adherence (fibronectin, Paxillin, FAK), and proteins known as pro-metastatic (CXCR4, SDF-1, ANG-1). We only observed some differences time-dependent in the regulation of some of these targets depending on the cell line considered. These results strongly suggest that Lim1 is involved in cell movements and regulates a large panel of proteins involved in invasiveness and EMT to achieve these effects. Clearly, these results argue the pro-metastatic potential of Lim1.

Lim1 induces clonogenicity in human CCC cells

We also performed colony forming assays to assess another property required for the development of distant metastasis, i.e. clonogenicity. This assay provides a straightforward method to assess the transforming potential of an oncogene. Our experiments revealed that Lim1 knockdown significantly reduced colony formation by up to 60%, 85% and 70% in ACHN, Caki2 and A498, respectively (Figures 4a-c). In addition to the results presented above on cell movements, these experiments strengthen the potential pro-metastatic activity of Lim1 in human CCC.

Lim1 is constitutively expressed in metastatic CCC tissues

We have previously shown that Lim1 is constitutively reexpressed in tumor tissues based on the analysis of 44 tumoral/normal corresponding CCC tissue pairs.⁷ In this latter study, we did not observe differences in Lim1 expression depending on the tumor stage and grade. Here, we investigated matched primary and metastasis tissue pairs for Lim1 expression either by Western blot when fresh or frozen tissues were available or immunohistochemistry when tissues were only available in paraffin blocks. Lim1 was shown to be expressed in all primary and metastatic tissues regardless of the site of metastasis (Figure 5a-d). IHC staining showed that Lim1 was expressed in 18/19 primary samples and in 24/26 metastatic samples. For the primitive CCC samples, the H-score was distributed from 0 to 170 and for the metastases, from 0 to 240 showing higher expression of Lim1 in metastatic tissues compared to matched primary tumor tissues. The comparison of H-score between primitive and metastatic tissue was possible in only 17 patients who had the primary tumor and the corresponding metastatic tissue. The staining was variable within the different tumoral areas in a same tumor, both in primary tumor tissues and metastases, (Figure 5b-d). Western blot analysis showed Lim1 expression in the 4 primary samples and in the 6 metastatic samples available. Four cases of tumor tissues harboring sarcomatoid components were available but no marked Lim1 staining was observed compared to the rest of the tissues; obviously, more cases will be needed to assess a possible link between Lim1 staining and sarcomatoid tumor cells.

Lim1 is part of the machinery leading to metastasis development

We next investigated the effects of Lim1 on metastasis development *in vivo*. Caki2 or 786-0 cells in which Lim1 was knockdown with *siLhx1* (In Vivo Ready siRNA targeting exon 2) were injected intravenously into the lateral tail vein of Balb/c nude mice. We choose to use *in vivo* ready siRNA, which is more stable than the standard, to ensure a long-lasting inhibition

of Lim1 expression. Lim1 expression was analyzed from cell suspensions used for mice injection and RT-qPCR show Lim1 inhibition by more than 90% with *siLhx1* in both cell lines (Figure 6a).

After 3 weeks, all mice were euthanized, and lungs were collected from each mouse. Macroscopic view and histologic analysis were conducted to assess the presence of metastasis. Through qualitative and quantitative analysis, there was a meaningful reduction in number and size of pulmonary micro-metastases in mice implanted with Lim1-depleted Caki2 or 786-0 cells (Figure 6b and 6c) compared to the corresponding controls. There were between 3 to 6 and 1 to 6 pulmonary nodules in mice receiving untransfected and siCtl-transfected Caki2 and 786-0 cells, respectively, while, remarkably, the number of nodules found in the lungs of mice receiving *siLhx1*-transfected cells was between 0 and 1 for Caki2 cells, and no nodules were detected for 786-0 cells. A representative nodule is also depicted (Figure 6d). Therefore, the in vivo studies demonstrate that Lim1 stimulates the metastatic properties of CCC cells. Thus, targeting Lim1 may have great therapeutic potential for treating human CCC.

DISCUSSION

Cancer metastasis is a multistep process in which malignant cells escape from the primary tumor to colonize distant, secondary sites.²⁷ Until the past decade, the treatment options for patients with metastatic CCC were extremely limited. Although life expectancy raised significantly with targeted therapies, at metastatic stages, human CCC remains largely incurable. The genetic changes and the biological mechanisms that drive RCC metastasis are relatively unknown.

The emerging idea is that tumors hijack developmental signaling pathways, for their own growth. During renal tumorigenesis, Pax1/2 (paired box gene 2), Lim1 (LIM-domain homeobox xenopus 1) and WT1 (Wilms tumor protein) transcription factors, and the Sonic Hedgehog (SHH), Notch and Wnt signaling pathways are reactivated. It has been shown that the blockade of the SHH-Gli signaling pathway induces cancer cell death. In addition, recent evidence suggests that a SHH paracrine mechanism mediating tumor-mesenchymal interactions may lead to metastasis. Targeting the SHH-Gli pathway has shown promising *in vivo* results on tumor growth in gastric cancers, pancreas cancers, prostate cancers, breast cancers and medulloblastoma.²⁸ We previously demonstrated that the SHH pathway is specifically re-expressed in human CCC and that its targeting results in tumor growth inhibition by inhibiting tumor cells proliferation and inducing apoptosis.⁵ In this previous study, we also showed that the SHH-Gli signaling pathway interacts with various oncogenic and developmental pathways including the PI3K/Akt, the NF- κ B (nuclear factor-kappa B), and the MAPK (mitogen-activated protein kinases) pathways which have been shown to be critical for CCC.^{6,29} These studies are reminiscent of what is observed during kidney development.

Importantly, we identified Lim1 as a Gli (glioma-associated oncogene) target in this disease. LIM homeobox genes are an important subfamily of homeobox genes which encode

LIM-homeodomain proteins featuring two LIM domains in their amino termini and a centrally located homeodomain allowing interactions with specific DNA elements in target genes. Among 12 human LIM homeobox genes, 10 LIM-homeodomain proteins have been reported to be associated with cancer, including Lim1. Thus, besides its primordial roles during development, it has been reported that Lim1 is reactivated or overexpressed in some cancer types.¹⁷⁻¹⁹ No reports went deeper into its possible involvement in their pathogenicity and metastatic spread except studies in medulloblastoma.²¹ In human CCC, we have shown that Lim1 is exclusively reexpressed in tumor tissues compared to corresponding normal tissues in 44 tissue pairs. Our results indicated that Lim1 acts as an oncogene, regulating cell proliferation and apoptosis, similarly to the main effects observed with the SHH-Gli pathway. Additionally, preliminary results suggested that Lim1 blockade induced substantial inhibition of cell movements, although no significant effects were observed on tumor neovascularization.⁷ The absence of effects on tumor neovascularization when inhibiting Lim1 expression might be quite surprising when dealing with a target with potential prometastatic effects; however, we made the same observation previously after inhibition of the PI3K/Akt or the NF- κ B pathways in human CCC,^{6,29} although these pathways have been shown thereafter to be involved in metastatic spread in this pathology.²⁴⁻²⁶

Here we extend our previous results showing that Lim1 is involved in cell motility, migration and invasion in vitro in 3 additional cell lines, i.e. ACHN, Caki2 and A498 cells. Furthermore, through Lim1 depletion experiments we also show that Lim1 regulates clonogenicity of our panel of human CCC cell lines in vitro. Various proteins belonging to the invasion machinery and EMT were shown to be regulated by Lim1. Interestingly, the profile of proteins regulated by Lim1 from one cell line to another, although very similar, also showed some specificity depending on the cell line considered. We expected such results since these cell lines were derived from the tumor of different patients, and because it is now

more and more approved that CCC tumors are heterogeneous from patient to patient and in a single tumor at genetic and molecular levels.³⁰ Clearly, such a result adds some levels of difficulties in the search of active therapies for human CCC. The fact that Lim1 depletion inhibits tumor cell movements of all cell lines tested using similar and probably different molecular pathways argue for a more widespread application of Lim1 targeting for therapeutic intervention in this pathology. In addition, these observations pave the way for additional fields of investigation in the search of the molecular mechanisms accounting for metastasis development in human CCC. For example, the observation that Lim1 is part of the molecular machinery leading to TIMP1 expression identify TIMP1 as a potential new marker of CCC tumorigenesis, as observed recently in lung cancer.^{31,32} The observation that Lim1 is expressed in all CCC-derived pulmonary, pleural, hepatic, bone, node and adrenal metastases tested and the available corresponding primary tumors with an higher level in metastasis compared to the primary tumors (P value 0.0006) showing an expression tropism-towards metastasis arguments further a role of Lim1 in metastasis development. Since patients with tumors containing sarcomatoid components have the worse prognostic with an expected life expectancy of one year, vs. 40 months for patients with tumor with no sarcomatoid components, we expected to find a correlation between Lim1 H-score and sarcomatoid components of tumor tissues, but we did not find such correlation, neither from the primary sites nor from metastasis. However, as mentioned earlier, only four cases were available for this analysis. More cases will be needed to assess whether Lim1 is part of the molecular signature of sarcomatoid areas in human CCC.

Lim1 involvement in metastasis development in vivo environment was clearly demonstrated in the in vivo metastatic model used in the present study. This is a well-known model to directly assess quantitatively and qualitatively the development of metastasis and it has been used with success for human CCC as well.³³ In addition, it is suitable to assess the

role of potential therapeutic targets against which there are no chemical inhibitors available yet. We show here that the metastatic phenotype of human CCC is regulated, at least in part, by Lim1 expression. Compared with the respective controls, considering metastasis number and size, mice receiving *siLhx1ex2* expressing cells developed significantly less lung metastasis.

Thus, we can add Lim1 to the short list of metastasis-promoting markers shown to be involved in metastasis development in human CCC. Among the recently identified markers we can cite SOX4, acting through the induction of EMT (Ref),³⁴ the complement component 1q subcomponent binding protein (C1QBP), acting through the regulation of the GSK3/ β -catenin/L1CAM signaling pathway (Ref),³⁵ caveolin-1, that could act also through the regulation of the β -catenin pathway (Ref),³⁶ the miR-193a-3p, that directly targets PTEN (Ref),³⁷ and the novel lncRNA termed metastatic renal cell carcinoma-associated transcript 1 (MRCCAT1), that acts *via* inhibiting NPR3 and activating p38-MAPK signaling (Ref).³⁸ In addition, comparing early metastatic and non-metastatic CCC samples, it was also discovered that certain differentially expressed genes including JUN, TNF, RHOB, NR4A1, TGF β 2, LAMA1, LAMA2 and LAMA4 were potential target genes associated with early metastatic CCC (Ref).³⁸ In contrast, CD82/KAI1, acts as a metastasis suppressor in human CCC through the TGF- β 1/Smad signaling (Ref),⁴⁰ as it is the case for KLF6, shown paradoxically as promoting metastasis in other cancer types, that acts *via* the transcriptional repression of E2F1.⁴¹ It is interesting to note that although these metastasis-promoting markers have been demonstrated experimentally to be involved in metastatic spread in human CCC, they were not identified at risk loci in genome-wide or meta-analysis studies.⁴² In a recent report characterizing the long non-coding RNA transcriptome in CCC by next-generation deep sequencing, 4 clusters were identified, associated with distinct clinicopathological and genomic features of this disease. The cluster 4 was associated with tumor subtype arising

from the distal tubules of the nephron. *Lhx1* was found to be overexpressed in this cluster compared to the others clusters, consistent with downregulation of its *cis*-acting lncRNAs RP11-283I3, and thus arguing for a role for Lim1 in this kidney cancer subtype. Clearly, further studies will help to better characterize how Lim1, as well as other metastasis-promoting markers, act on metastasis development in this refractory disease, and using different but additional experimental approaches. Although this is an important question, which may also lead to the identification of other metastasis markers, and whatever the mechanism is, they are all potential therapeutic targets for this disease in which almost all patients die from metastasis.

Therefore, targeting Lim1 may be a promising approach to disrupt the molecular machinery leading to metastasis in human CCC. It remains to define how to inhibit Lim1 for therapeutic intervention in humans. In this context, we developed, in close collaboration with chemists a methodological approach allowing delivering siRNAs in cells through iv injection (Unpublished results). When apply to *siLhx1ex2* delivery in human CCC cells in vivo in nude mice, we obtained a 50% inhibition in Lim1 expression in tumors in very preliminary experiments. These first results are encouraging, and further studies are ongoing to assess the feasibility of this approach for therapeutic application.

In summary, combining previous results on tumor growth⁷ with the ones obtained in the present studies, Lim1 possesses several characteristics that make it a highly promising potential therapeutic target for advanced CCC therapy. Lim1 stimulates tumor cell proliferation, migration, invasion, in vivo tumorigenesis and metastatic spread, and inhibits tumor cells apoptosis. In addition, the results reported here may open new gates towards the identification of additional targets with therapeutic potential and also highlight the heterogeneous nature of human CCC tumors. Indeed, depending on the cell line considered, Lim1 regulates different sets of invasive or EMT-inducing proteins, but leading to the same

overall effects on cell movements and metastasis, adding complexity to the search of the mechanisms underlying metastatic spread in human CCC, and thus to the definition of ‘universal’ tools to eradicate metastasis. Further investigations are required to define how the interplay of these molecular pathways and markers lead ultimately to metastasis development. In total, we have shown that Lim1 expression maintains the invasive potential of human CCC tumor cells in vitro and in vivo, which plays a pivotal role in the malignant progression of this cancer type and thus carries highly potent therapeutic implications.

Materials and Methods

Cell lines and cell culture

Human CCC cell lines deficient in VHL (786-0, A498; VHL-) or not (ACHN, Caki2; VHL+) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). They were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeufe, France) at 37°C in a humidified atmosphere of 10% CO₂.

Patients and clinical samples

We analyzed a cohort of 22 patients with RCC metastases (Supplementary Table 2) that were obtained from the Urology Department of the 'Nouvel Hôpital Civil' (Pr. Hervé Lang, Strasbourg, France) or from the Biologic Resource Center (Strasbourg Hospital, France) *via* the Hemato-oncology Department of the Strasbourg University Hospital (Dr Philippe Barthélémy, Strasbourg, France) and the Pathology Department (Dr Véronique Lindner). Surgical total or partial nephrectomy were available for 20 patients, two of them had two tumors (22 tumors), with a men to women ratio 1.44. They were between 40 and 86 years old (average age: 58,3) at the time of diagnosis. Informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the French Human Ethics Committee. One to four paraffin blocks were selected depending of the homogeneity of the tumor. The repartition in the pTNM stage according to the 8th edition of the UICC⁴³ was:

- 4 tumors in pT1a and 2 pT1b stages (including the tumors from the 2 patients that relapsed)
- 2 patients in pT2a and 2 pT2b stages
- 9 patients in pT3a stage
- 1 patient in stage pT4

For two patients, 1 at clinical stage cT3 and the other at cT4, only the tumoral tissue of the biopsy sample was available. Also, for two patients, we only had access to metastasis, and no data on the corresponding primary tumors. The primitive carcinomas showed a Fuhrman grade 2 to 4. Among the tumors with grade 4, four were explained by a sarcomatoid component also identified in the corresponding metastasis.

These patients developed one or more lymph nodes, visceral or bone metastasis (less than one year to 12 years after the diagnosis of the primitive tumors) and for one patient, the diagnosis of the renal cell carcinoma was done on bone metastasis. In total, 30 metastasis were analyzed by immunohistochemistry and/or by Western blot depending on the availability of the tissues, paraffin-embedded or frozen, or both. Thus, for 14 patients, tissues were only conserved in formol, for 1 patient, tissues were only conserved in liquid nitrogen, while for 7 patients tissues were available in formol and liquid nitrogen. Sites of metastases were lung, bone, lymph node, adrenal gland, parotid gland, bronchus, pleura, trachea, skin and liver.

RNA isolation and quantitative real-time PCR analysis

Total RNAs were extracted and reverse transcribed as previously described.⁴⁴ cDNAs were amplified using the ‘SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix’ kit (Biorad) in the CFX Connect™ Real-Time System (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Sense and antisense primers used were for Lim1 (primers designed by Biorad and provided as a mixture) PrimePCR™ SYBR® Green Assay, Bio-Rad) and for cyclophilin A CCACCGCCGAGGAAAACCG (forward primer) and TGGACAAGATGCCAGGACCCGT (reverse primer), (Eurogentec, Angers, France).

Western blot analysis

Western blot assay was performed as previously detailed.⁴⁴ The mouse anti-human Lim1 antibody was purchased from Abcam (Paris, France) and used at 1/3000 dilution. The mouse anti-human housekeeping GADPH was purchased from Sigma-Aldrich/Merck and used at 1/20000 dilution. The information on all other primary antibodies and dilutions used is listed in Supplemental Table 3. The appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used. Immunoreactivity was visualized with the enhanced chemiluminescence immunoblotting detection kit Luminata™ (Merck Millipore, Molsheim, France).

siRNA

Three sets of Lim1 siRNAs were designed targeting different portions of the Lim1 mRNA corresponding to exon 1, 2 (LIM domains) and 3 (Homeodomain). All siRNA were obtained from Life technologies (Saint-Aubin, France). Transfections were performed using jetPRIME® (Polyplus transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, tumor cells were seeded in 24- or 6-well plates or Petri dishes 100nm (for in vivo study), grown for 24h and transiently transfected for 24 to 120h (depending on the experiment) with Lim1 exon-2 targeting siRNA (si*Lhx1*) or control siRNA (siCtl), as precised in the Figures or Figure legends.

Wound healing assay

Wound healing assay was performed as exposed previously.⁷ Briefly, tumor cells were grown in 24-well plates to confluence and transiently transfected with si*Lhx1* or siCtl. After 24h of treatment, the wound was created in the center of the cell monolayer with a sterile plastic scratcher. The ability of the cells to migrate into the wound area was assessed after 12h and 24h by comparing the 0- 12- and 24-h micrographs of several marked points along the

wounded area. The percentage of recovered wound area was calculated by dividing the recovered area after 12h or 24h by the initial wound area at zero time.

Cell migration and invasion assays

Tumor cells were grown for 24h and transiently transfected for 24 to 48h with *siLhx1* or siCtl. The migration and invasion assays cells were performed on Boyden chamber as detailed.^{7,44}

Colony formation assay

Clonogenicity was assessed with a colony-forming assay.⁴⁵ We used A498, ACHN and Caki2 cells transfected with *siLhx1* or siCtl or untransfected. Cells were seeded in 6-well plates at 50% confluence and then transfected with *siLhx1* or siCtl at 50nM. 24h post-transfection, cells were seeded in 6-well plates at 300 cells/well and cultured for 15 days. Colonies on each plate were counted after fixation and coloration by crystal violet.

Histology and immunohistochemistry analysis

Tissues were fixed in 10% neutral-buffered formalin and processed for histologic examination including embedding in paraffin, sectioning, and staining with hematoxylin and eosin. Four μm sections from selected paraffin blocks for each specimen were used for immunohistochemical analysis. This analysis was realized on a Ventana Roche Benchmark XT and with the same antigen retrieval process, in a EDTA citrate buffer (pH 8,3) during 30 min (mild cell conditioning, CC1, Ventana Roche Systems, AZ, USA), followed by incubation with Lim1 mouse monoclonal antibody (clone 2D3 monoclonal, Abcam) at 1/100 dilution during 32 minutes at 36°C and *via* the ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Roche Systems).

Immunohistochemistry results were evaluated by an experienced pathologist and by a semi-quantitative approach assigning an H-score (or “Histoscore”) to tumor samples. The percentage of tumoral cells was determined for each different nuclear staining intensity (0/+/+/+/+/++) and then, the sum of individual H-scores for each intensity level was done, using the following formula: $H\text{-score} = 1 \times (\% \text{ of cells with an intensity } 1+) + 2 \times (\% \text{ of cells with an intensity } 2+) + 3 \times (\% \text{ of cells with an intensity } 3+)$.

Human CCC lung metastasis assay

For in vivo lung metastasis experiments, 1×10^6 of 786-0 or Caki2 cells were intravenously injected into the lateral tail vein of 6-week old female Balb/c nude mice (Charles River Laboratories, L’Arbresle, France). Mice were randomly divided into 3 groups (5 mice per group) for each set of experiments with each cell line. One group was inoculated with untransfected control cells, a second group with cells that were transfected with *siLhx1* (targeting exon 2, in vivo ready, Life technologies), 24h prior to injection and the third group with cells transfected with *siCtl* (in vivo ready, Life technologies) 24h prior to injection. The mice were euthanized 3 weeks after cell injection, lung were harvested and then processed for paraffin-embedded 4 μ m sections (5 levels). These sections were stained with H&E to confirm the presence of metastatic tumors. Metastases were analyzed qualitatively and quantitatively by an experienced pathologist.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical analysis was performed when appropriate using Student’s *t* test, one-way or two-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keul’s test for multiple comparisons. A $P < 0.05$ was considered statistically significant. (‘*’ represents $P < 0.05$, ‘**’ represents $P < 0.01$, ‘***’ represents $P < 0.001$).

Acknowledgments

This study was sponsored by INSERM (recipient TM), the University of Strasbourg (recipient TM) and the Ligue Contre le Cancer (recipient TM). The authors thank Martine MUCKENSTURM, Fabienne REYMANN and Angélique WERCK, from the Department of Pathology, University Hospital, Strasbourg, for their technical assistance in immunohistochemistry.

References

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; **136**: E359-386.
- 2 Escudier B, Porta C, Bono P, Powles T, Eisen T, Sternberg CN, Gschwend JE, De Giorgi U, Parikh O, Hawkins R, Sevin E, Négrier S, Khan S *et al.* Randomized, controlled, double-blind, cross-over trial assessing treatment preference for pazopanib versus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: PISCES Study. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 1412-1418.
- 3 Posadas EM, Limvorasak S, Figlin RA. Targeted therapies for renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol* 2017; **13**: 496-511.
- 4 Mehta K, Patel K, Parikh RA. Immunotherapy in genitourinary malignancies. *J Hematol Oncol* 2017; Apr 24;**10**(1):95.
- 5 Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C *et al.* The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer* 2009; **8**: 123.
- 6 Sourbier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S *et al.* The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2006; **66**: 5130-5142.
- 7 Dormoy V, Béraud C, Lindner V, Thomas L, Coquard C, Barthelmebs M *et al.* LIM-class homeobox gene Lim1, a novel oncogene in human renal cell carcinoma. *Oncogene* 2011; **30**: 1753-1763.
- 8 Barnes JD, Crosby JL, Jones CM, Wright CV, Hogan BL. Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of *Xenopus* Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis. *Dev Biol* 1994; **161**: 168-178.

- 9 Hukriede NA, Tsang TE, Habas R, Khoo PL, Steiner K, Weeks DL *et al.* Conserved requirement of Lim1 function for cell movements during gastrulation. *Dev Cell* 2003; **4**: 83-94.
- 10 Cheah SS, Kwan KM, Behringer RR. Requirement of LIM domains for LIM1 function in mouse head development. *Genesis* 2000; **27**: 12-21.
- 11 Zhao Y, Kwan KM, Mailloux CM, Lee WK, Grinberg A, Wurst W *et al.* LIM-homeodomain proteins Lhx1 and Lhx5, and their cofactor Ldb1, control Purkinje cell differentiation in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 13182-13186.
- 12 Ledig S, Brucker S, Barresi G, Schomburg J, Rall K, Wieacker P. Frame shift mutation of LHX1 is associated with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Hum Reprod* 2012; **27**: 2872-2875.
- 13 Huang CC, Orvis GD, Kwan KM, Behringer RR. Lhx1 is required in Müllerian duct epithelium for uterine development. *Dev Biol* 2014; **389**: 124-136.
- 14 Cirio MC, Hui Z, Haldin CE, Cosentino CC, Stuckenholtz C, Chen X *et al.* Lhx1 is required for specification of the renal progenitor cell field. *PLoS One* 2011; **6**: e18858.
- 15 Costello I, Nowotschin S, Sun X, Mould AW, Hadjantonakis AK, Bikoff EK *et al.* Lhx1 functions together with Otx2, Foxa2, and Ldb1 to govern anterior mesendoderm, node, and midline development. *Genes Dev* 2015; **29**: 2108-2122.
- 16 Ye L, Evans J, Gargett CE. Lim1/LIM1 is expressed in developing and adult mouse and human endometrium. *Histochem Cell Biol* 2012; **137**: 527-536.
- 17 Varis A, Wolf M, Monni O, Vakkari ML, Kokkola A, Moskaluk C *et al.* Targets of gene amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 2625-2629.

- 18 Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron J *et al.* Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003; **63**: 3735-3742.
- 19 Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics* 2010; **5**: 499-508.
- 20 Guertl B, Senanayake U, Nusshold E, Leuschner I, Mannweiler S, Ebner B *et al.* Lim1, an embryonal transcription factor, is absent in multicystic renal dysplasia, but reactivated in nephroblastomas. *Pathobiology* 2011; **78**: 210-219.
- 21 Mumert M, Dubuc A, Wu X, Northcott PA, Chin SS, Pedone CA *et al.* Functional genomics identifies drivers of medulloblastoma dissemination. *Cancer Res* 2012; **72**: 4944-4953.
- 22 Qu LS, Jin F, Guo YM, Liu TT, Xue RY, Huang XW *et al.* Nine susceptibility loci for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma identified by a pilot two-stage genome-wide association study. *Oncol Lett* 2016; **11**: 624-632.
- 23 Mikami S, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Ishida M, Kuroda N *et al.* Recent advances in renal cell carcinoma from a pathological point of view. *Pathol Int* 2016; **66**: 481-490.
- 24 Lin TC, Liu YP, Chan YC, Su CY, Lin YF, Hsu SL *et al.* Ghrelin promotes renal cell carcinoma metastasis via Snail activation and is associated with poor prognosis. *J Pathol* 2015; **237**: 50-61.
- 25 Lin YW, Lee LM, Lee WJ, Chu CY, Tan P, Yang YC *et al.* Melatonin inhibits MMP-9 transactivation and renal cell carcinoma metastasis by suppressing Akt-MAPKs pathway and NF- κ B DNA-binding activity. *J Pineal Res* 2016; **60**: 277-290.

- 26 Zhao Z, Liu H, Hou J, Li T, Du X, Zhao X *et al.* Tumor Protein D52 (TPD52) Inhibits Growth and Metastasis in Renal Cell Carcinoma Cells Through the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Oncol Res* 2017; **25**:773-779.
- 27 Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; **147**: 275-292.
- 28 Stanton BZ, Peng LF. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol Biosyst* 2010; **6**: 44-54.
- 29 Sourbier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N *et al.* Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2007; **67**: 11668-11676.
- 30 Beksac AT, Paulucci DJ, Blum KA, Yadav SS, Sfakianos JP, Badani KK. Heterogeneity in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017; pii: **S1078-1439**: 30216-30218.
- 31 Xia Y, Yeddula N, Leblanc M, Ke E, Zhang Y, Oldfield E *et al.* Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 257-265.
- 32 Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;**7**:3113-3119.
- 33 Jeong DE, Song HJ, Lim S, Lee SJ, Lim JE, Nam DH *et al.* Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis. *Oncotarget* 2015; **6**: 33046-33064.

- 34 Ruan H, Yang H, Wei H, Xiao W, Lou N, Qiu B *et al.* Overexpression of SOX4 promotes cell migration and invasion of renal cell carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol* 2017; **51**: 336-346.
- 35 Wang Y, Fu D, Su J, Chen Y, Qi C, Sun Y *et al.* C1QBP suppresses cell adhesion and metastasis of renal carcinoma cells. *Sci Rep* 2017; **7**: 999.
- 36 Yerokhin VA, Shabaev VM. Nuclear Recoil Effect in the Lamb Shift of Light Hydrogenlike Atoms. *Phys Rev Lett* 2015; **115**: 233002.
- 37 Liu L, Li Y, Liu S, Duan Q, Chen L, Wu T *et al.* Downregulation of miR-193a-3p inhibits cell growth and migration in renal cell carcinoma by targeting PTEN. *Tumour Biol* 2017; **39**: 1010428317711951.
- 38 Li JK, Chen C, Liu JY, Shi JZ, Liu SP, Liu B *et al.* Long noncoding RNA MRCCAT1 promotes metastasis of clear cell renal cell carcinoma via inhibiting NPR3 and activating p38-MAPK signaling. *Mol Cancer* 2017; **16**: 111.
- 39 Yang H, Huo P, Hu G, Wei B, Kong D, Li H. Identification of gene markers associated with metastasis in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2017; **13**: 4755-4761.
- 40 Zhu J, Liang C, Hua Y, Miao C, Zhang J, Xu A *et al.* The metastasis suppressor CD82/KAI1 regulates cell migration and invasion via inhibiting TGF- β 1/Smad signaling in renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; May 23.
- 41 Gao Y, Li H, Ma X, Fan Y, Ni D, Zhang Y *et al.* KLF6 Suppresses Metastasis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma via Transcriptional Repression of E2F1. *Cancer Res* 2017; **77**: 330-342.
- 42 Scelo G, Purdue MP, Brown KM, Johansson M, Wang Z, Eckel-Passow JE *et al.* Genome-wide association study identifies multiple risk loci for renal cell carcinoma. *Nat Commun* 2017; **8**: 15724.

- 43 Delahunt B, Egevad L, Samaratunga H, Varma M, Verrill C, Cheville J *et al.* UICC drops the ball in the 8th edition TNM staging of urological cancers. *Histopathology* 2017; **71**: 5-11.
- 44 Béraud C, Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Béthry A, Hochane M *et al.* Targeting FAK scaffold functions inhibits human renal cell carcinoma growth. *Int J Cancer* 2015; **137**: 1549-1559.
- 45 Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006; **1**: 2315-2319.

Figure legends

Figure 1. Lim1 depletion inhibits cell motility in human CCC in vitro. Cells were transiently transfected with either *siLhx1ex2* (*siLhx1*) or control siRNA (siCtl), both at 50 nM, or not transfected (Ctl). Cell motility was then quantitatively analyzed and expressed in percentage of the cell surface in the wound area as a function of the time after the scratch, that is, 12 and 24 h. **(a)** Quantification of the effect of Lim1 depletion on ACHN cell motility (left panel). Representative pictures of the wound area at 0, 12 and 24 h after the scratch (right panel). Scale bars correspond to 50 μ m. **(b)** Quantification of the effect of Lim1 depletion on Caki2 cell motility. **(c)** Quantification of the effect of Lim1 depletion on A498 cell motility. Results are shown as mean \pm s.e.m., n = 4 in triplicata; *** P < 0.001 from corresponding siCtl.

Figure 2. Lim1 silencing decreases human CCC cell migration and invasion in vitro. Cells were transiently transfected with either *siLhx1ex2* (*siLhx1*) or control siRNA (siCtl) both at 50 nM, or not transfected (Ctl). Cell migration was analyzed at 24 and 48h post-transfection using transwell inserts as detailed in Materials and Methods **(a)** in ACHN cells, **(b)** in Caki2 cells and **(c)** in A498 cells. Cell invasion was then analyzed at 24 and 48h post-transfection using Matrigel-coated transwell inserts **(d)** in ACHN cells, **(e)** in Caki2 cells and **(f)** in A498 cells. Results are shown as mean \pm s.e.m., (as pourcentage of corresponding Ctl) n = 4 in triplicata; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 from corresponding siCtl.

Figure 3. Lim1 regulates a large panel of proteins involved in cell movements. ACHN cells were transiently transfected with *siLhx2ex1* (*siLhx1*) at 50 nM for 48 to 120h, and the expression of various **(a)** metalloproteinases and TIMP1, and proteins known to be involved in **(b)** EMT and **(c)** cell adherence or **(d)** proteins known as acting as pro-metastatic factors, was analyzed by Western blot. Anti-GAPDH antibody was used for visualization of protein gel loading. Representative gels from at least 3 experiments are depicted in the Figure.

Figure 4. Lim1 silencing decreases human CCC cell clonogenicity. Cells were transiently transfected with either *siLhx1ex2* (*siLhx1*) or control siRNA (*siCtl*), both at 50 nM, or not transfected (*Ctl*). Clonogenicity was assessed 15 days post-transfection by counting cell colonies as detailed in Materials and Methods. **(a)** Quantification of the effect of Lim1 depletion on the number of ACHN cell colonies (left panel). Representative pictures of the colonies in plates after cell coloration as detailed in Materials and Methods (Right panel) **(b)** Quantification of the effect of Lim1 depletion on the number of Caki2 cell colonies. **(c)** Quantification of the effect of Lim1 depletion on the number of A498 cell colonies. Results are shown as mean±s.e.m., n = 4 in triplicata; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ from corresponding *siCtl*.

Figure 5. Lim1 is expressed in CCC metastatic and primary tissues with higher level of expression in metastasis. **(a)** Lim1 expression was analyzed in tumoral tissues of 6 patients, in both primary tumor tissues and corresponding metastasis for 4 patients and in metastatic tissues for 2 patients, depending on tissues availability as explained in Materials and Methods. Representative gels from at least 3 experiments are depicted in the Figure. Madr: Metastasis, adrenal; Mln, Metastasis, lymph node **(b)** For patient RCC12, Lim1 expression was analyzed by immunohistochemistry in primary tumor (upper images) and corresponding lung metastasis (lower images) at two magnifications. Lim1 H-score was 7.5 in primary tumor tissue and 130 in the metastasis. Scale bars correspond to 50µm for the lower magnifications (left images) and 20µm for the higher magnifications (right images). **(c)** Lim1 expression analysis by immunohistochemistry in RCC16 patient's primary tumor (upper images) and corresponding skin metastasis (lower images) at two magnifications. Lim1 H-score was 22.5 in primary tumor tissue and 240 in the metastasis. Scale bars correspond to 50µm for the lower magnifications (left images) and 20µm for the higher magnifications (right images). **(d)** Quantitative analysis of Lim1 staining according to H-score in primary and metastatic tissues

depending on availabilities of the tissues (RCC5 only metastatic tissues were available). Results are shown as mean±s.e.m. when multiple primary sites were available for the same patients or multiple metastases for a single primary tumor.

Figure 6. Lim1 silencing reduces the development of pulmonary micro-metastatic nodules in vivo. Human Cells Caki2 or 786-0 were transiently transfected with either *siLhx1ex2* (*siLhx1*, in vivo ready) or siCtl (siCtl), both at 50 nM, or not transfected (Ctl) 24h prior the injection. 1 million of cells were injected i.v in the tail vein of BalB/c nude mice and 3 weeks after, mice were euthanized, and lungs were harvested and analyzed for the presence of metastases. **(a)**. Efficiency of Lim1 silencing in Caki2 and 786-0 cells that were injected in mice. **(b)**. Comparison of numbers of pulmonary micro-metastatic nodules in mice receiving untransfected Caki2 cells and in mice receiving Caki2 cells transfected with siCtl (Ctl + siCtl, n = 9 and in mice receiving Caki2 cells transfected with *siLhx1* (*siLhx1*, n = 4), as expressed as percent from Ctl + siCtl (Left panel). The diameters of each nodule was measured and expressed on average per mouse and then on average per group (μm) (Right panel). **(c)**. Comparison of numbers of pulmonary micro-metastatic nodules in mice receiving untransfected 786-0 cells and in mice receiving 786-0 cells transfected with siCtl (Ctl + siCtl, n = 9) and in mice receiving 786-0 cells transfected with *siLhx1* (*siLhx1*, n = 4), as expressed as percent from Ctl + siCtl (Left panel). As for Caki2 micro-metastases, the diameters of-each nodules were measured and expressed on average per mouse and then on average per group (μm) (Right panel). Results are shown as mean±s.e.m. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ from corresponding Ctl + siCtl. **(d)**. Representative pictures of a pulmonary micro-metastatic nodules. The arrow shown points to micro-metastatic nodule in lung. Scale bars correspond to 500 μm for the lower magnifications (left image) and 50 μm for the higher magnifications (right image).

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1. The *siLhx1ex2* (*siLhx1*) is highly efficient in human CCC cell lines. Human CCC cell lines were transfected for 24 to 120h with *siLhx1ex2* (*siLhx1*) or *siCtl* and *Lim1* expression was analyzed at mRNA and protein levels. **(a-c)** *Lim1* expression at the mRNA level in cells transfected with *siCtl* (*siCtl*) or the *siLhx1ex2* (*siLhx1*) in ACHN, Caki2 and A498 cells, respectively. Results are shown as mean±s.e.m., as percentage of corresponding *siCtl*, n = 4 in triplicate; ***P < 0.001 from corresponding *siCtl*. **(d)** Western blot analysis of *Lim1* expression in all 3 cell lines. Representative gels are depicted for each cell line.

Supplementary Figure 2. *Lim1* regulates a large panel of proteins involved in cell movements in Caki2 cells. Cells were transiently transfected with either *siLhx1ex2* (*siLhx1*) at 50nM or untransfected (Ctl) for 48 to 120h, and the expression of various **(a)** metalloproteinases and TIMP1, and proteins known to be involved in **(b)** EMT and **(c)** cell adherence or **(d)** proteins known as acting as pro-metastatic factors, was analyzed by Western blot. Representative gels from at least 3 experiments are depicted in the Figure.

Supplementary Figure 3. *Lim1* regulates a large panel of proteins involved in cell movements in A498 cells. Cells were transiently transfected with either *siLhx1ex2* (*siLhx1*) at 50nM or untransfected (Ctl) for 48 to 120h, and the expression of various **(a)** metalloproteinases and TIMP1, and proteins known to be involved in **(b)** EMT and **(c)** cell adherence or **(d)** proteins known as acting as pro-metastatic factors, was analyzed by Western blot. Representative gels from at least 3 experiments are depicted in the Figure.

Figure 1

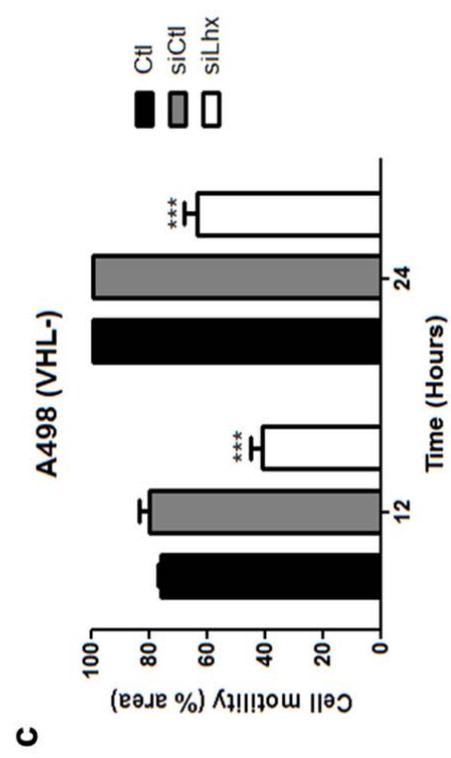
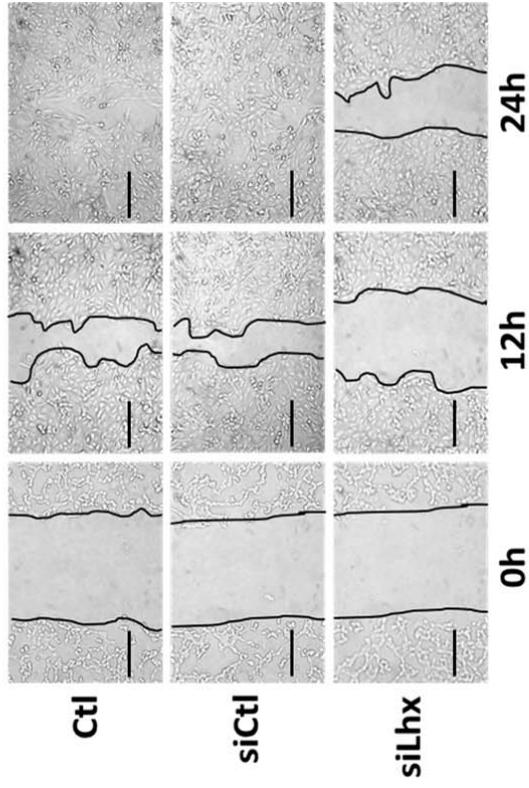
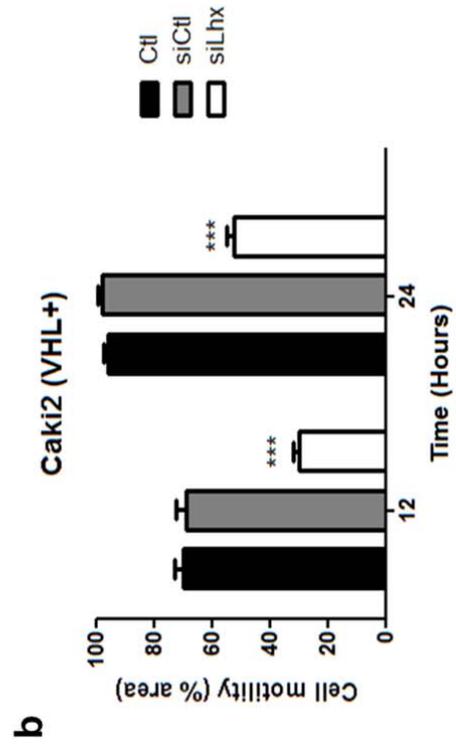
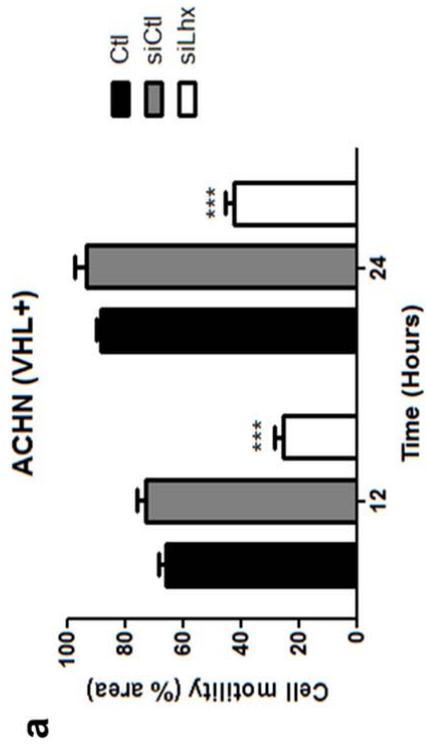


Figure 2

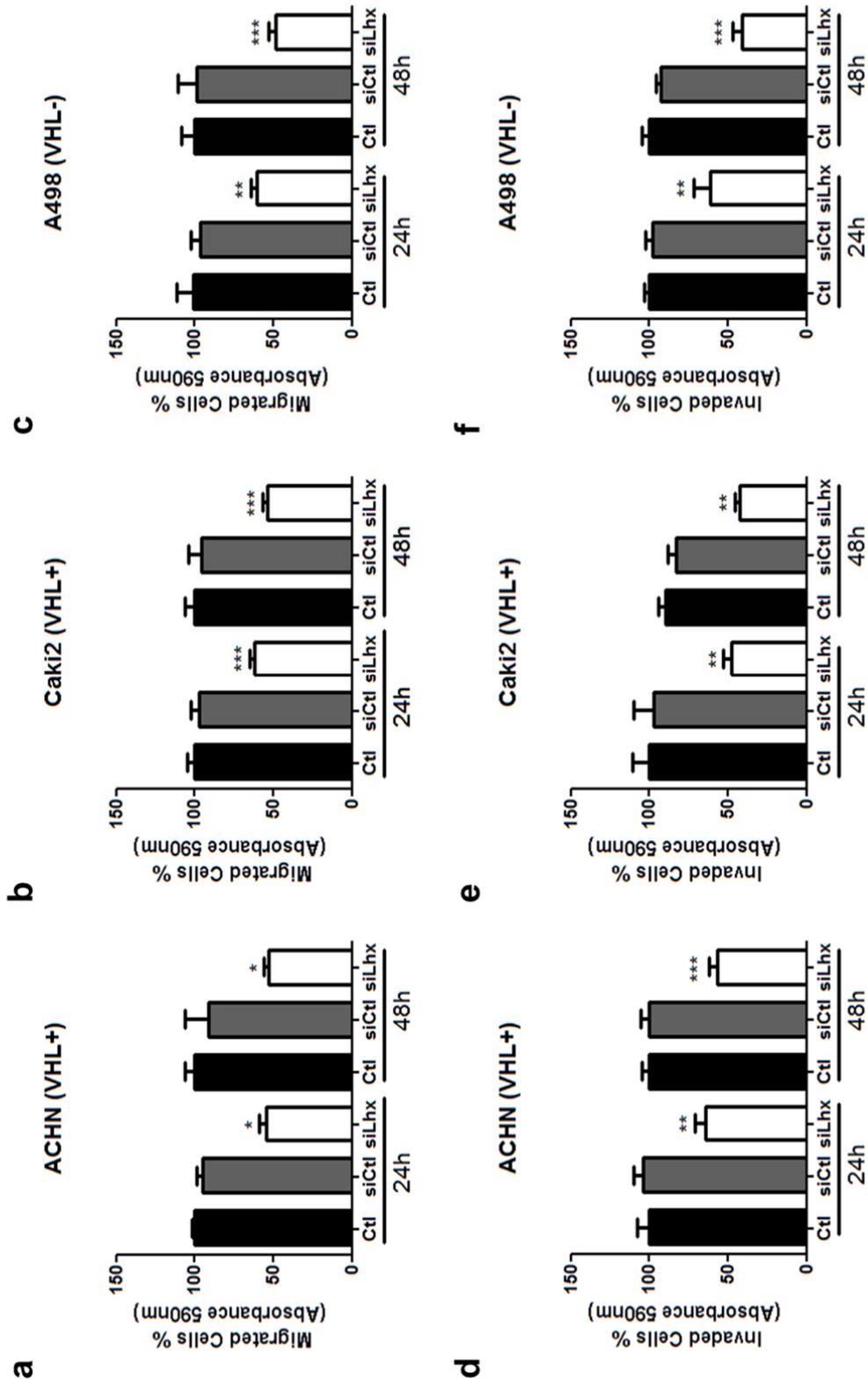


Figure 3

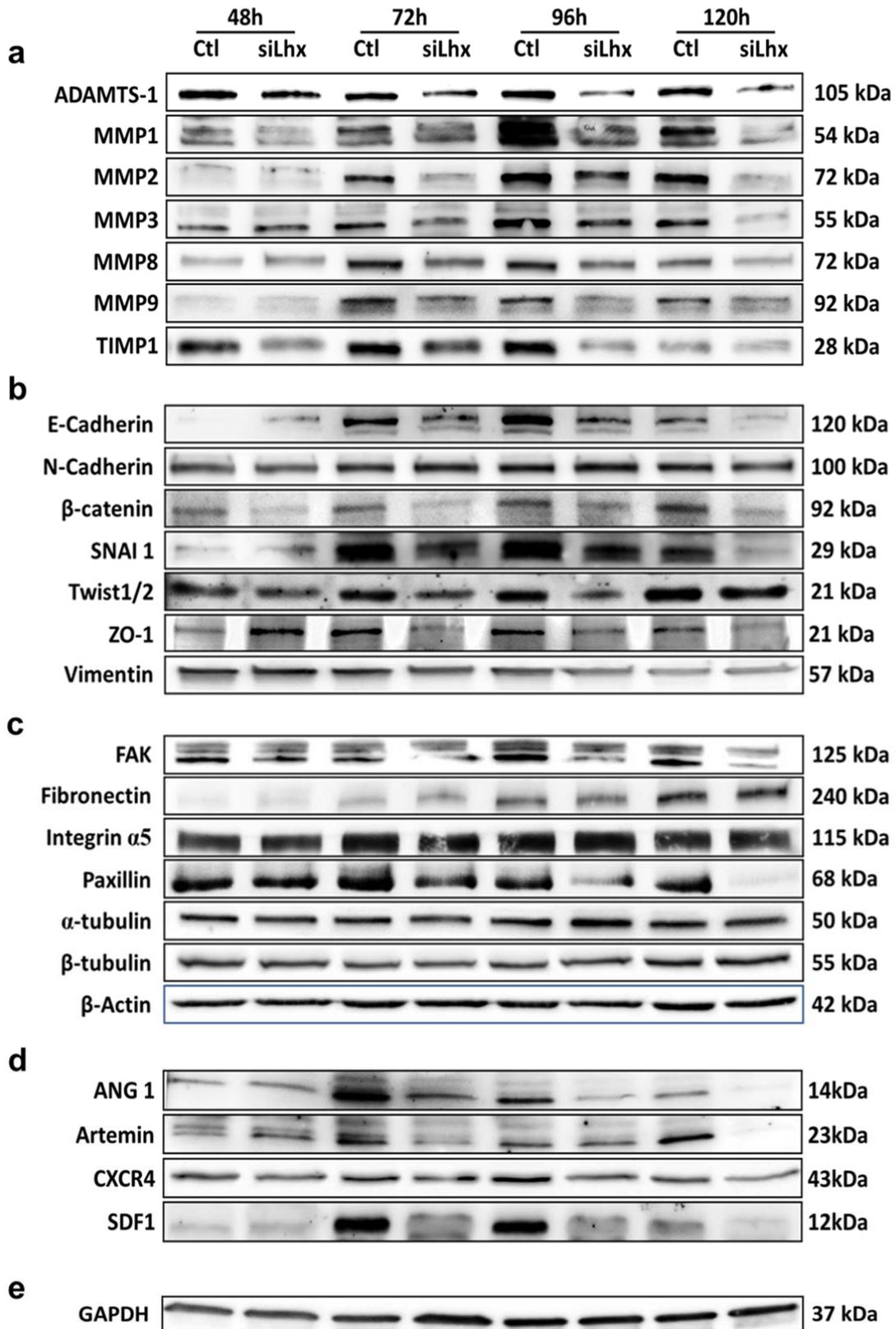


Figure 4

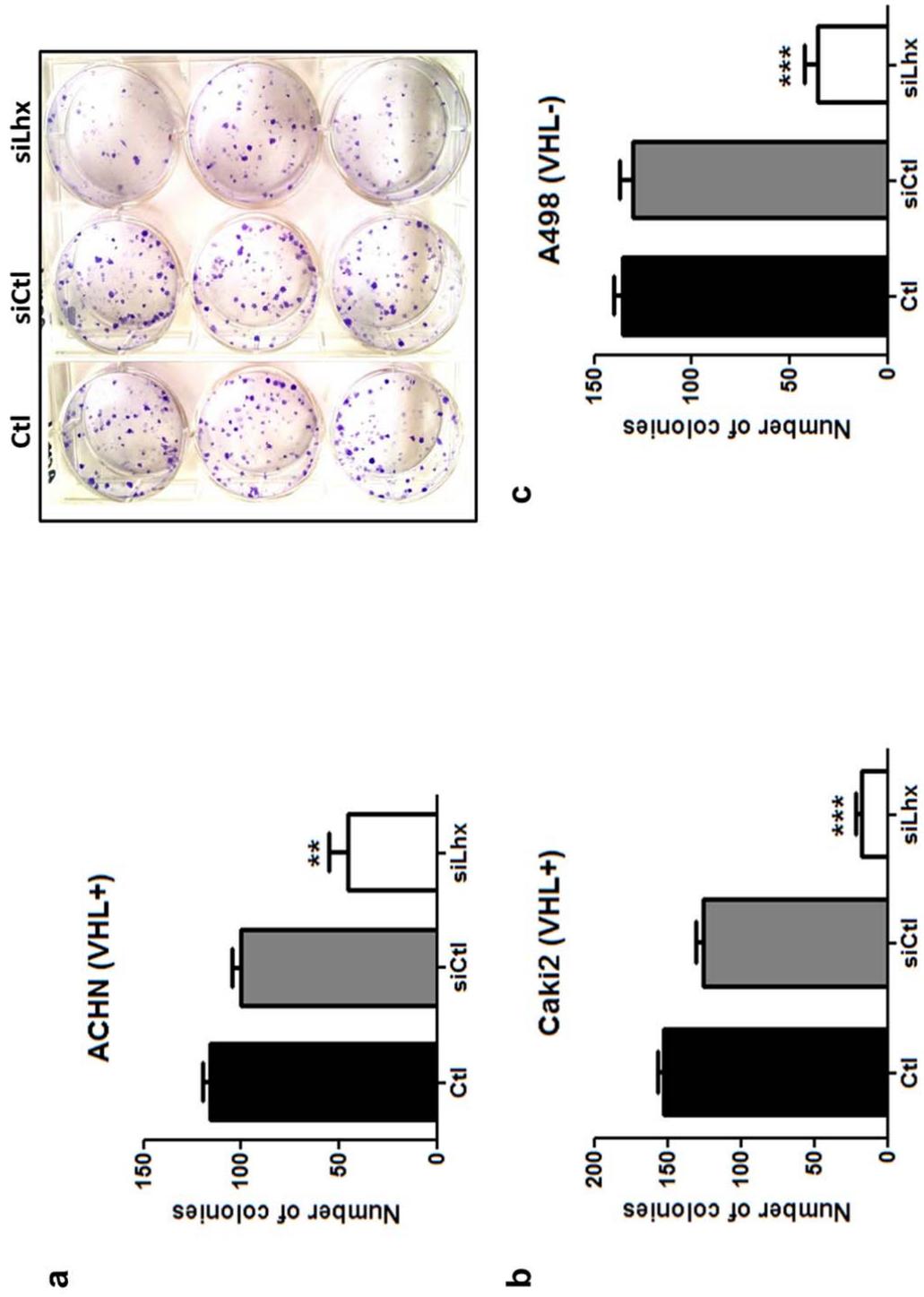
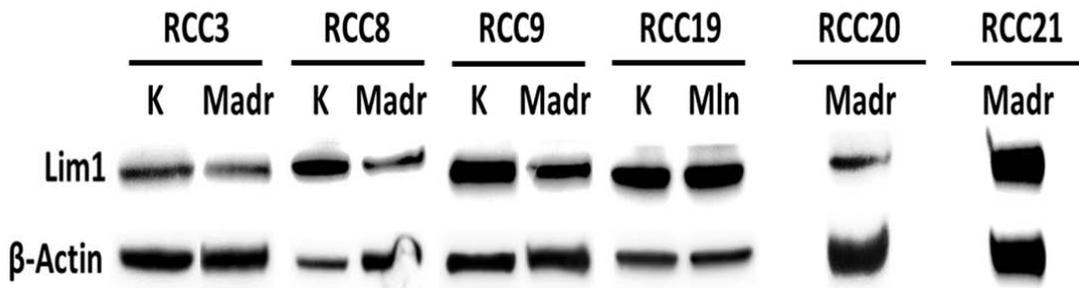
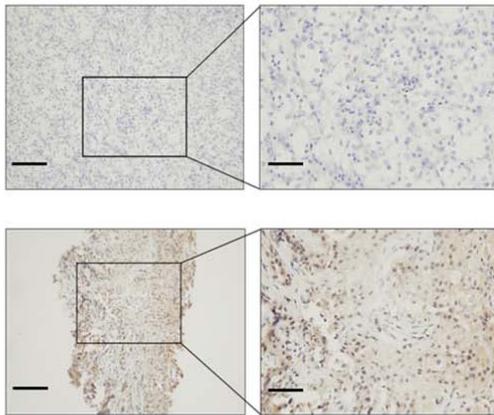


Figure 5

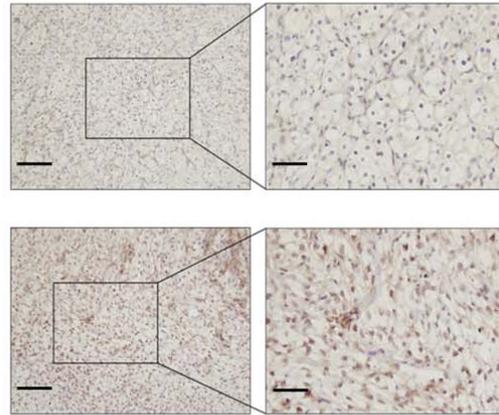
a



b



c



d

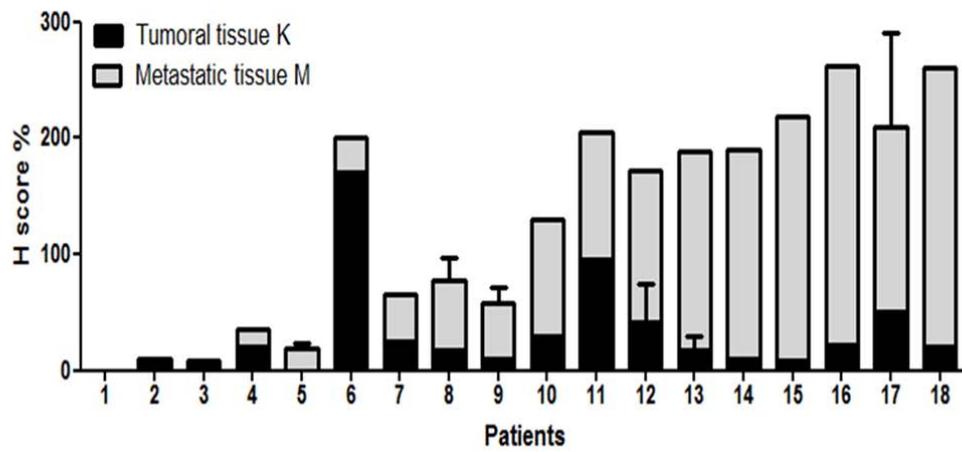
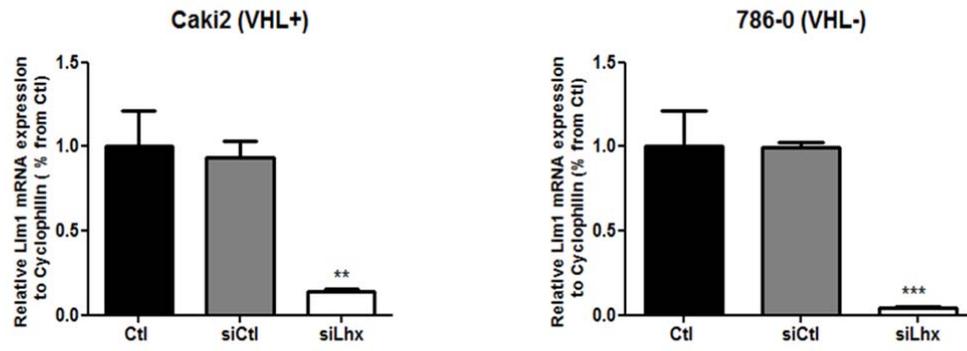
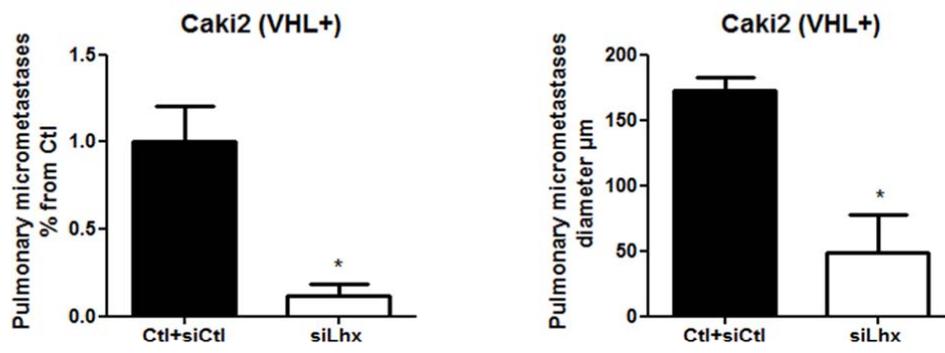


Figure 6

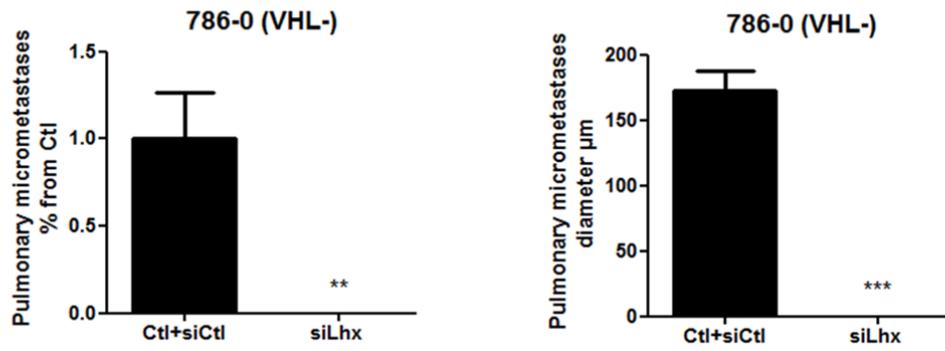
a



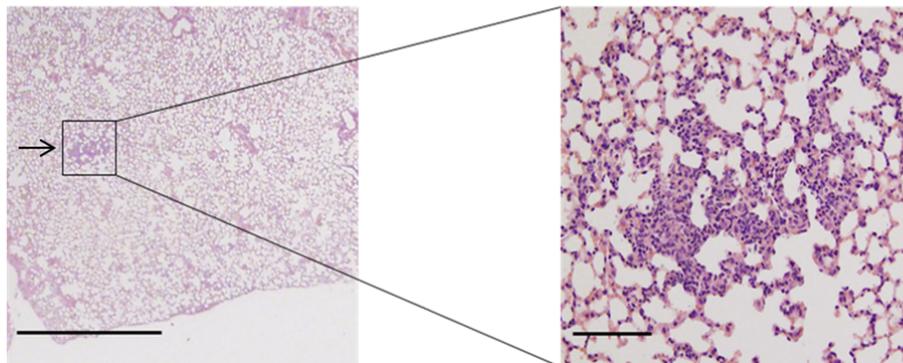
b



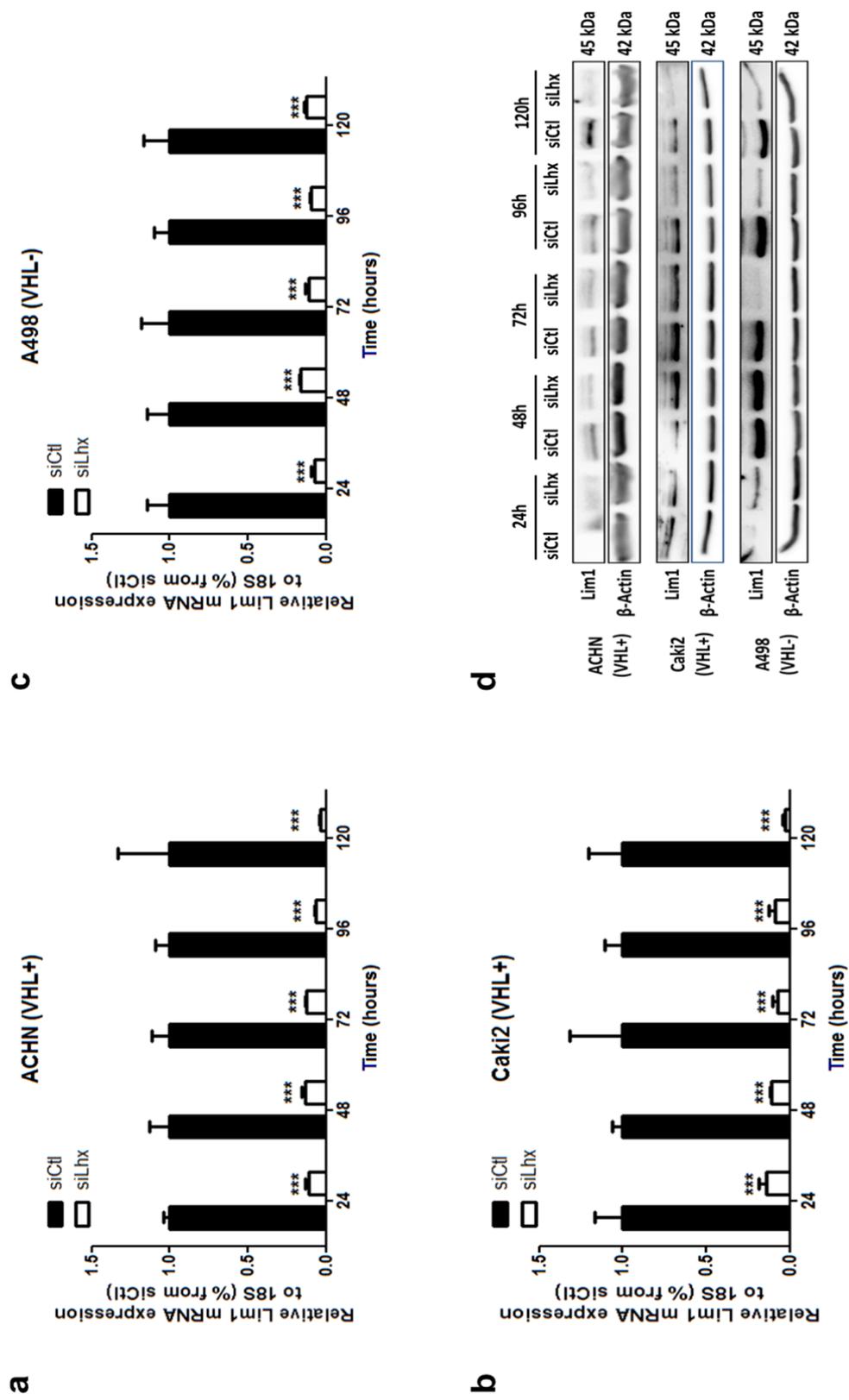
c



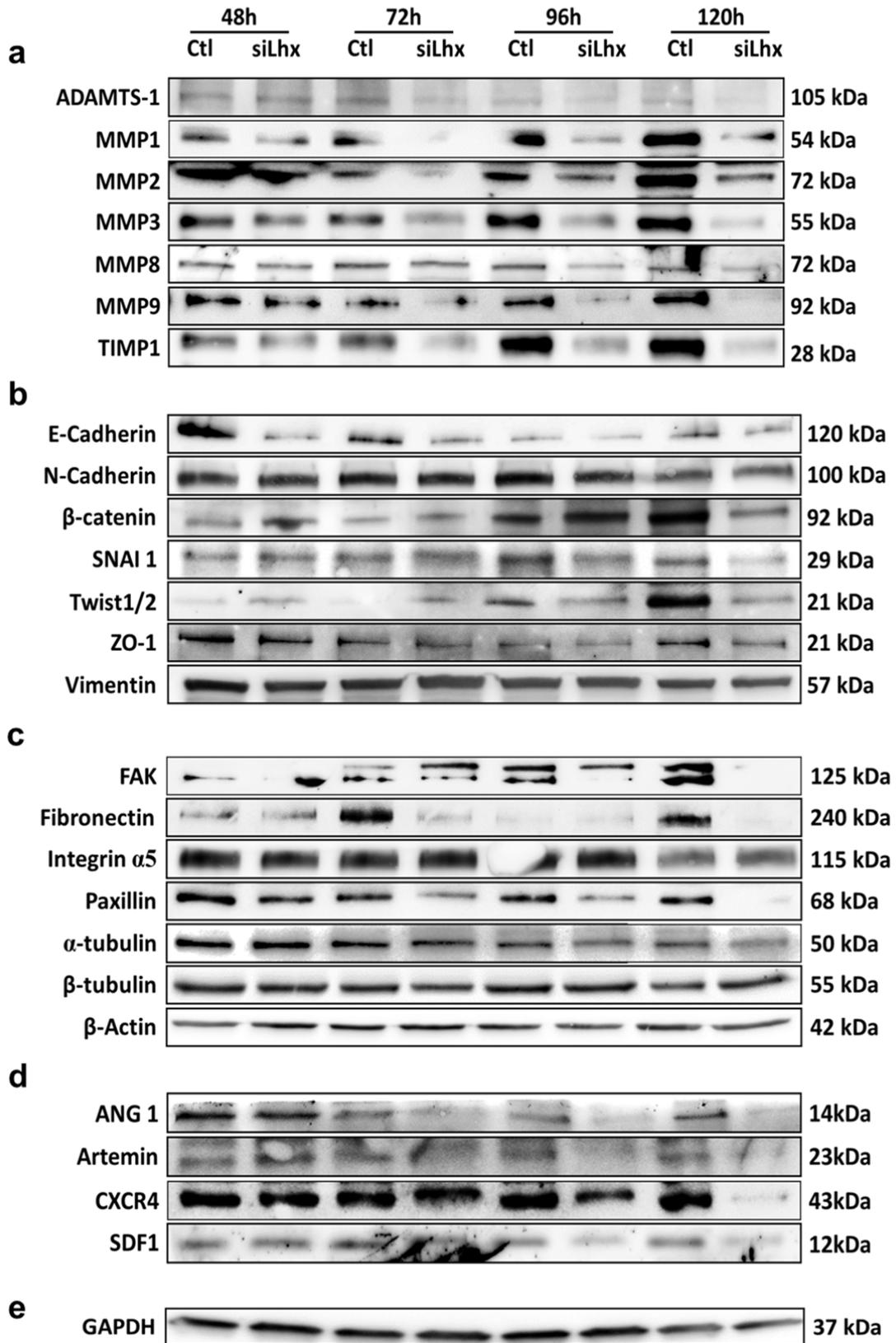
d



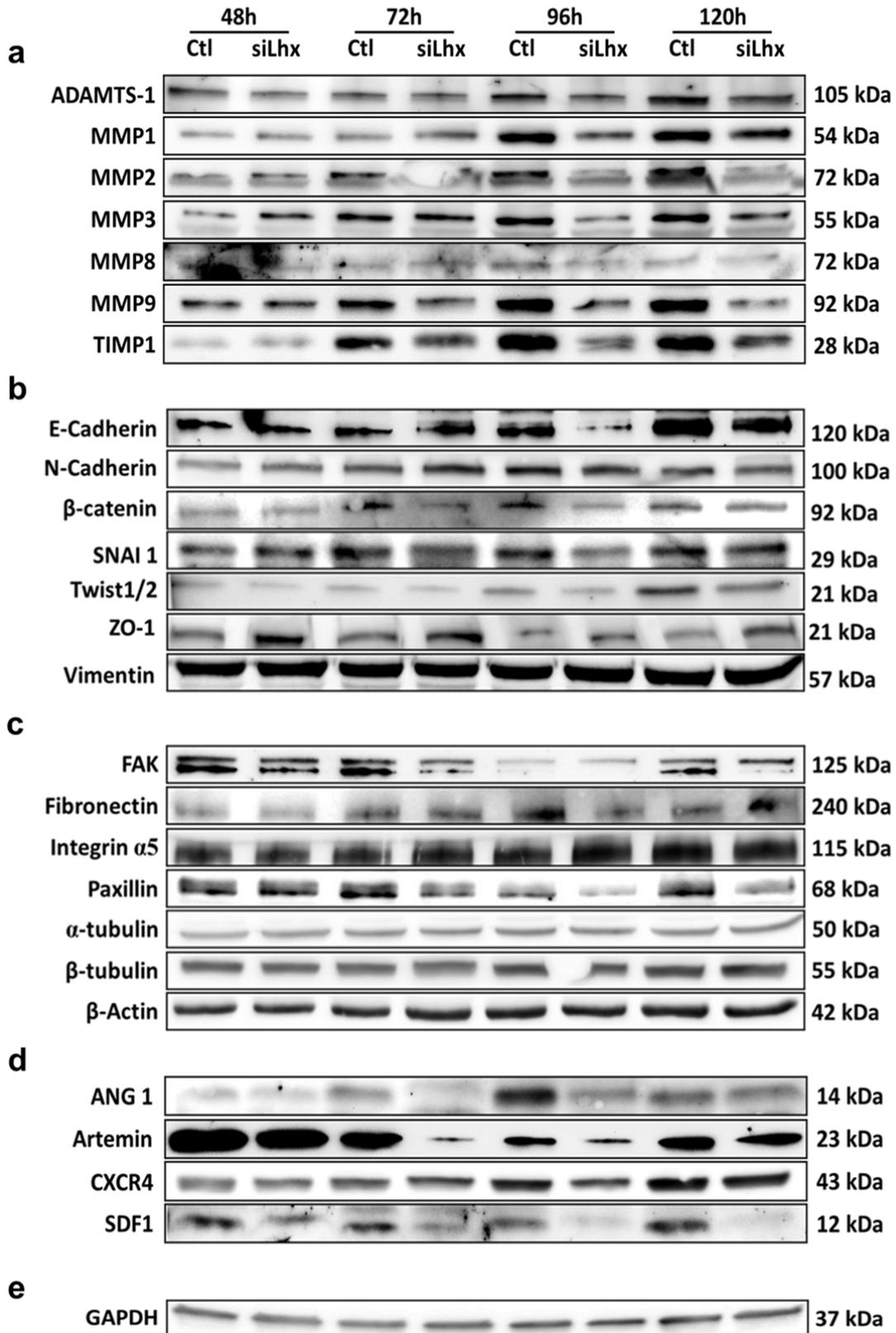
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Table 1. Lim1 regulates the expression of a large panel of proteins involved in cell movements. A similar profile of expression was observed in all 3 cell lines.

	ACHN	Caki2	A498	Δ
Metalloproteinases				
ADAMTS-1	⬇	⬇	⬇	
MMP1	⬇	⬇	⬇	
MMP2	⬇	⬇	⬇	
MMP3	⬇	⬇	⬇	
MMP8	⬇	⬇	⬇	
MMP9	⬇	⬇	⬇	
TIMP1	⬇	⬇	⬇	
EMT				
E-Cadherin	⬇	⬇	⬇	
N-Cadherin	→	→	→	
β-catenin	⬇	⬇	⬇	
Snail 1	⬇	⬇	⬇	
Twist 1/2	⬇	⬇	⬇	
ZO-1	⬇	⬇	↗	*
Vimentin	→	→	→	
Adherence				
FAK	⬇	⬇	⬇	
Fibronectin	→	⬇	⬇	*
Integrin α5	→	→	→	
Paxillin	⬇	⬇	⬇	
α-tubulin	→	⬇	→	*
β-tubulin	→	→	→	
β-actin	→	→	→	
Pro-metastatic factors				
Angiogenin	⬇	⬇	⬇	
Artemin	⬇	⬇	⬇	
CXCR4	⬇	⬇	⬇	
SDF-1	⬇	⬇	⬇	

Supplementary Table 2. Patient tumor and metastasis characteristics of the cohort. ‘X’ indicates the availability of the primary and the corresponding metastatic tissues in formol and in frozen stock for immunohistochemistry and Western blot studies, respectively.

ID	Date of surgery	TNM stage	Fuhrman grade	Sarcomatoid components	Primary tissues		Metastatic sites	Date of metastasis surgery	Metastatic sites	
					Formol	Liquid nitrogen			Formol	Liquid nitrogen
RCC1	2010	Clinical cT3Nx	2		X		Lung	2010	X	
RCC2	2007	pT2bN0M+	3		X		Parotid	2007	X	
RCC3	2010	pT1aNxM1	3		X	X	Adrenal	2010	X	X
RCC4	2011	pT3a Nx Mx	3		X		Lung	2011	X	
RCC5		Not available	Not available				Bone	2005	X	
							Bone	2006	X	
							Lung	2008	X	
							Adrenal	2012	X	Necrotic Not exploitable
RCC6	2013	Clinical cT4Nx	4		X		Bone	2013	X	
RCC7	2011	pT2a Nx Mx	2		X		Lung	2011	X	
RCC8	2014	pT3aN0M1	3		X	X	Bone	2013	X	
							Adrenal	2014	X	X
							Adrenal	2010	X	X
RCC9	2010	pT2aNxMx	4			X	Lung	2011	X	
							Lung	2011	X	
							Lung	2011	X	
							Lung	2011	X	
RCC10	2010	pT3a Nx Mx	3		X		Lung	2012	X	
RCC11	2008	pT1bNxM+	3		X		Bronchus	2013	X	
RCC12	2009	pT1aNxM+	3		X	X	Lung	2013	X	
							Lung	2013	X	
RCC13	1999	pT1b Nx Mx	4		X	X	Pleura	2011	X	
RCC14	2014	pT2bNxMx	4	X	X		Lung	2014	X	
RCC15	2008	pT3aN0M+	3		X		Liver	2009	X	
RCC16	2007	pT4NxM+	3		X		Skin	2008	X	
RCC17	2007	pT3aN0M+	3		X		Bone	2011	X	
RCC18	2008	pT3aN1M+	4	X	X		Trachea	2012	X	
RCC19	2010	pT3aN1Mx	4	X	X	Necrotic Not exploitable	Bone	2008	X	
RCC20		Not available	Not available				Lymph node	2010	Necrotic Not exploitable	Necrotic Not exploitable
RCC21	2007	pT3aN0Mx	4	X	X		Adrenal	2010	Necrotic Not exploitable	Necrotic Not exploitable
RCC22	2008	pT3aN1Mx	3		X		Lymph node	2008	Necrotic Not exploitable	Necrotic Not exploitable

Supplementary Table 3. Source of antibodies, species and dilutions used in Western blot experiments.

	Source of antibody	Species and dilution used
Metalloproteinases		
ADAMTS-1	Santa Cruz Biotechnology/Clinisciences (Nanterre, France)	Monoclonal, rabbit, 1/100
MMP1	R&D Systems (Lille, France)	Monoclonal, mouse, 1/250
MMP2	R&D Systems	Monoclonal, mouse, 1/610
MMP3	R&D Systems	Monoclonal, mouse, 1/660
MMP8	Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France)	Polyclonal, rabbit, 1/500
MMP9	R&D Systems	Monoclonal, mouse, 1/500
TIMP1	R&D Systems	Monoclonal, mouse, 1/720
EMT		
E-Cadherin	GeneTex, Inc./Euromedex (Souffelweyersheim, France)	Monoclonal, mouse, 1/2000
N-Cadherin	GeneTex, Inc./Euromedex	Polyclonal, rabbit, 1/3000
β-catenin	Santa Cruz Biotechnology/Clinisciences	Polyclonal, goat, 1/100
Snail 1	Santa Cruz Biotechnology/Clinisciences	Polyclonal, goat 1/100
Twist 1/2	GeneTex, Inc./Euromedex	Polyclonal, rabbit, 1/500
ZO-1	Thermo Fisher Scientific	Monoclonal, mouse, 1/500
Vimentin	Thermo Fisher Scientific	Polyclonal, rabbit, 1/3000
Adherence		
FAK	Merck Millipore (Molsheim, France)	Monoclonal, mouse, 1/500
Fibronectin	BD Biosciences (Le Pont de Claix, France)	Monoclonal, mouse, 1/5000
Integrin α5	GeneTex, Inc./Euromedex	Polyclonal, rabbit, 1/1000
Paxillin	Thermo Fisher Scientific	Monoclonal, mouse, 1/500
α-tubulin	Abcam (Paris, France)	Monoclonal, mouse, 1/5000
β-tubulin	Sigma-Aldrich/Merck (Lyon, France)	Monoclonal, mouse, 1/20000
β-actin	Sigma-Aldrich/Merck	Monoclonal, mouse, 1/20000
Pro-metastatic factors		
Angiogenin	Santa Cruz Biotechnology/Clinisciences	Polyclonal, rabbit, 1/100
Artemin	Abcam	Monoclonal, rabbit, 1/1000
CXCR4	Thermo Fisher Scientific	Polyclonal, rabbit, 1/5000
SDF-1	Thermo Fisher Scientific	Polyclonal, rabbit, 1/500

II. Résumé

Le facteur de transcription développemental Lim1 joue un rôle crucial dans l'organogenèse et plus particulièrement dans la néphrogenèse et la mise en place des tubules proximaux, où le CCC trouve son origine. Il joue un rôle important dans les mouvements cellulaires et la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la morphogenèse rénale. Des travaux précédents de l'équipe ont montré que la voie SHH est réactivée dans le CCC et que Lim1 est une des cibles de cette voie. Par la suite, l'équipe a identifié Lim1 comme oncogène, régulant la croissance tumorale dans le CCC. Dans cette étude, des résultats préliminaires indiquaient un rôle de Lim 1 dans les mouvements cellulaires de deux lignées de CCC, suggérant son implication dans la dissémination métastatique.

Dans ce travail de thèse, nous avons investigué cet aspect à la fois *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Aucun inhibiteur chimique de Lim1 n'étant disponible, nous avons eu recours à la stratégie de de RNA interférence pour les études *in vitro* et *in vivo*.

In vitro, les résultats montrent que le *silencing* de Lim1 diminue la motilité, la migration et l'invasion cellulaires ainsi que la capacité des cellules à former des colonies dans l'ensemble des lignées étudiées indépendamment du statut VHL des cellules. Nous avons pu également identifier un panel très large de cibles de Lim1 impliquées dans les différentes étapes du processus métastatique à savoir l'adhésion cellulaire (Paxilline, fibronectine), l'EMT (Snail1, Twist1/2), la migration et l'invasion cellulaires (MMP1/2/3/8/9). Ces résultats confirment donc l'impact de Lim1 sur les mouvements cellulaires *in vitro* indépendamment du statut VHL et précisent les mécanismes moléculaires à l'origine de ces effets. Les résultats précédents du laboratoire ont montré l'expression spécifique de Lim1 dans 44 tumeurs primitives de CCC comparativement aux tissus sains rénaux correspondants où Lim1 est absent. Dans ce travail, nous avons montré que Lim1 est exprimé de manière constitutive dans tous les tissus métastatiques et les tumeurs primaires d'origine, et que son expression est significativement plus élevée dans la métastase par rapport à la tumeur primaire. De manière importante, nos résultats *in vivo* indiquent que le *silencing* de Lim1 réduit le nombre et la taille des foyers métastatiques pulmonaires dans notre modèle invasif.

En conclusion, ce travail démontre le rôle invasif de Lim1 *in vivo* et son implication dans la dissémination métastatique. En combinant les résultats précédents du laboratoire sur le rôle de Lim1 dans la croissance tumorale avec son rôle dans la dissémination métastatique, Lim1 possède plusieurs caractéristiques qui en font une cible thérapeutique très prometteuse pour le traitement du CCC avancé.

III. Discussion

L'identification de nouvelles voies et de nouveaux marqueurs régulant la prolifération, la différenciation et l'invasion des cellules cancéreuses est un axe majeur pour définir de nouvelles options thérapeutiques en particulier dans le CCC. En se concentrant sur les voies prolifératives, anti-apoptotiques et angiogéniques, le laboratoire d'accueil avait initialement montré que les voies PI3K/Akt et NF- κ B étaient constitutivement actives dans le CCC et qu'elles sont oncogéniques dans cette pathologie indépendamment du statut VHL (Soubrier *et al.*, 2006, 2007). Ces mêmes voies interviennent dans le développement et interagissent avec de nombreuses voies développementales. Sur ces observations, le laboratoire avait émis l'hypothèse que les cellules tumorales réactivent et/ou réexpriment des voies et des marqueurs du développement pour leur propre croissance, et probablement pour leur invasion et leur résistance aux traitements. Les travaux du laboratoire d'accueil sur les voies développementales ont montré que la voie néphrogénique Sonic Hedgehog (SHH)-Gli est réactivée et oncogénique dans le CCC. Par ailleurs, d'autres investigateurs ont pu montrer que les voies développementales Notch et Wnt et le facteur néphrogénique Pax-2 sont impliqués dans la carcinogenèse rénale (Sjölund *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2009). Plusieurs cibles de Gli ont pu être identifiées dans les travaux du laboratoire, comme les facteurs de transcription développementaux Pax-2 et Lim1 (Dormoy *et al.*, 2009). Lim1 fait partie de la sous-famille des gènes *LIM homeobox*, très impliquée dans le développement. Parmi les 12 gènes humains qui constitue cette sous-famille, 10 sont associés au cancer (Wang *et al.*, 2014). Actuellement, le facteur de transcription Lim1 est décrit dans 3 pathologies cancéreuses mais son rôle dans la carcinogenèse rénale a été identifié pour la première fois par le laboratoire d'accueil (Dormoy *et al.*, 2011).

En effet, les travaux du laboratoire ont identifié Lim1 comme un nouvel oncogène dans le CCC. (Dormoy *et al.*, 2011) ont montré que Lim1 est exprimé spécifiquement dans les tumeurs primitives de patient et impacte les capacités prolifératives et apoptotiques de la cellule cancéreuse aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Dans cette étude, des résultats préliminaires indiquent que Lim1 favorise les mouvements cellulaires sur deux lignées de CCC *in vitro*, suggérant son implication dans la dissémination métastatique.

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés au rôle invasif de Lim1 dans la progression tumorale en précisant les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

La première étape de ce travail de thèse a consisté à compléter les travaux précédents du laboratoire sur le rôle de Lim1 dans les mouvements cellulaires sur d'autres lignées cellulaires de CCC. Aucun inhibiteur chimique n'étant disponible et les modalités d'activation de Lim1 n'étant pas connues, nous avons opté pour la stratégie d'ARN interférant en transfection transitoire. Nous avons ainsi montré que

l'extinction du gène *Lhx1* induit une diminution des capacités migratoires, invasives et clonogéniques des cellules cancéreuses ACHN, Caki2 (VHL+) et A498 (VHL-) de plus de 50% et ceci indépendamment du statut VHL.

Au cours du développement, Lim1 joue un rôle crucial dans les mouvements de plusieurs types cellulaires. Les souris Lim1 mutantes sont acéphales, principalement à cause d'un problème de migration cellulaire au cours de l'organogenèse. Il a été montré que Lim1 active l'expression de la protocadhérine qui est impliquée dans l'adhésion et les mouvements cellulaires au cours du développement (Hukriede *et al.*, 2003). Un rôle de Lim1 dans la migration des corps cellulaires ainsi que leur axone a été identifié pendant la vie embryonnaire (Palmesino *et al.*, 2010). De plus, la capacité de la cellule isolée à former une colonie est une des propriétés requises dans la progression tumorale et elle reflète la capacité des cellules invasives à former une néoplasie dans les sites périphériques.

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu par Lim1 dans ces processus, nous nous sommes intéressés aux cibles jouant un rôle dans la progression tumorale. Nous avons ainsi montré par Western blot que l'extinction de Lim1 *in vitro* diminue l'expression d'un panel très large de protéines impliquées dans différentes étapes du processus métastatique (incluant l'invasion cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'EMT) ainsi que l'expression d'autres facteurs connus pour leur rôle pro-métastatique.

Parmi les cibles les plus importantes retrouvées dérégulées par Lim1, nous avons identifié CXCR4, qui joue un rôle critique dans la dissémination métastatique et dont l'expression est augmentée dans plusieurs échantillons de CCR humain (Schrader *et al.*, 2002). La surexpression de CXCR4 favorise la dissémination métastatique des cellules tumorales vers les organes secondaires exprimant le SDF-1, tels que le cerveau, le poumon, le foie et l'os, qui sont rappelons-le les sites métastatiques classiques du CCR.

De manière intéressante, nous avons montré que SDF-1 est également dérégulé par Lim1, laissant penser que Lim1 peut jouer un rôle dans l'implantation des cellules tumorales au niveau des sites métastatiques *via* l'activation de l'expression de SDF-1 (Pan *et al.*, 2006).

De plus, nos résultats indiquent que les MMP2/9 sont également régulées par Lim1. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Struckmann *et al.* qui montre une corrélation positive entre les niveaux d'expression de CXCR4 et MMP2/9 dans des tumeurs primaires de CCC (Struckmann *et al.*, 2008).

La protéine Snail est largement impliquée dans la différenciation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses pendant le développement embryonnaire. Nos résultats montrent que le *silencing* de Lim1 diminue l'expression de Snail, faisant apparaître Snail comme une autre cible potentielle de

Lim1. Les cellules épithéliales qui surexpriment Snail acquièrent un potentiel métastatique et invasif *via* la surexpression de MMP2/9. Snail est régulé par la phosphorylation d'Akt, qui est constitutivement active et régulée par Lim1 dans le CCC (Soubier *et al.*, 2006; Dormoy *et al.*, 2011). De manière intéressante, (Mikami *et al.*, 2011) *et al* ont montré que le niveau d'expression des protéines Snail est corrélé avec le niveau d'expression de MMP2/9 ainsi qu'avec le stade et l'agressivité de la maladie chez les patients atteints de CCR. Le facteur de transcription Twist, régulateur important de la morphogenèse embryonnaire, joue un rôle critique dans l'agressivité de nombreux cancers. Son niveau d'expression est corrélé au grade, au stade, au développement de métastases ainsi qu'à l'expression de MMP2 dans le CCR (Ohba *et al.*, 2014). Nos résultats vont également dans ce sens. Nous avons montré que l'extinction de Lim1 diminue l'expression de TWST1/2. De plus, le profil d'expression de MMP2 est similaire à celui de Twist1/2.

Par ailleurs, nous avons été surpris au départ de trouver que l'inhibition de Lim1 était associée à une inhibition de TIMP-1, d'autant plus que plusieurs MMP étaient parallèlement inhibées. Toutefois, cet équilibre inattendu entre MMP/TIMP a été retrouvé dans plusieurs cancers. Des données plus récentes indiquent une double fonction de TIMP. Une corrélation positive a été retrouvée entre un niveau d'expression élevé de TIMP et une survie médiocre dans certaines tumeurs malignes humaines comme celles du côlon, du sein et du poumon. Dans le CCR, l'augmentation de l'expression de TIMP1 est un facteur de mauvais pronostic lié à une survie courte (Kallakury *et al.*, 2001). Ainsi, nos résultats renforcent l'idée de cette implication paradoxale de TIMP. Les mécanismes qui interviennent dans cet effet paradoxal de TIMP1 dans la progression tumorale ne sont pas complètement compris et font l'objet de plusieurs investigations. Des travaux récents indiquent que TIMP1 favorise la survie cellulaire *via* la régulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et une diminution de l'activité NF- κ B (Guedez *et al.*, 1998).

ADAMTS1 est une métalloprotéinase décrite pour son double rôle pro ou antitumoral. Son expression est souvent diminuée dans les tumeurs primitives mais sa surexpression est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers (Casimiro *et al.*, 2012; De Arao Tan *et al.*, 2013). Dans cette étude, nous avons trouvé une diminution de l'expression d'ADAMTS1 avec l'inhibition de Lim1.

D'autres cibles connues pour leur rôle pro-métastatique dans d'autres cancers ont été identifiées telles que l'artémisine qui active et agit en synergie avec Twist pour promouvoir la progression tumorale (De Arao Tan *et al.*, 2011). Là encore, l'expression de Twist1/2 suit celle d'artémisine.

L'EMT et la MET sont reconnues comme des événements critiques dans le processus métastatique. De même, l'organogenèse rénale est un phénomène très complexe qui nécessite plusieurs étapes de MET et EMT. Le rôle de Lim1 dans la MET est bien établi. Lim1 joue un rôle primordial dans l'induction

du phénotype épithélial au niveau du mésenchyme métanéphrique au cours de la formation des tubules des néphrons. En effet, la surexpression de Lim1 dans une lignée mésenchymateuse conduit à une induction de l'expression de la kératine 7, un marqueur épithélial (Pedersen *et al.*, 2005; Guertl *et al.*, 2011).

Dans ce travail, nous avons mis en évidence que les molécules associées à un phénotype épithélial telles que l'E-cadhérine, la β -caténine et ZO-1 sont diminuées avec l'inhibition de Lim1. Ceci confirme donc le rôle de Lim1 dans l'induction du phénotype épithélial. Concernant son implication dans l'induction du phénotype mésenchymal, nous n'avons pas retrouvé d'effet de Lim1 sur l'expression de la N-cadhérine et la vimentine malgré l'influence de Lim1 sur l'expression de Snail et Twist. Cette absence d'effet pourrait être liée au modèle *in vitro* qui ne reflète pas le micro-environnement *in vivo*. De plus, Twist et Snail peuvent avoir un rôle dans la dissémination métastatique *via* leurs autres fonctions à savoir l'activation de l'expression des MMPs comme détaillé plus haut.

A côté de son implication dans le maintien des jonctions adhérentes cellulaires avec l'E-cadhérine (profil épithélial), la β -caténine dans la voie Wnt/ β -caténine a un rôle bien établi dans la carcinogenèse rénale. La signalisation Wnt est constitutivement active dans le CCR et régule positivement la β -caténine. Effectivement, une expression altérée de β -caténine a été retrouvée dans le CCR. La β -caténine cytoplasmique a été identifiée comme le candidat le plus prometteur associé à un stade avancé et un statut clinique défavorable chez les patients atteints de CCR (Kruck *et al.*, 2013). Elle est considérée comme une molécule clé de la carcinogenèse rénale *via* l'activation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. En outre, le rôle de la voie Wnt/ β -caténine a été rapporté dans l'EMT pendant le développement embryonnaire et la carcinogenèse, suggérant que ce ne sont pas les mêmes mécanismes mis en jeu par la β -caténine (Ueno *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). De plus, des analyses de *ChIP-sequencing* ont identifié parmi les gènes cibles directs de Lim1, de nombreux composants de la voie de signalisation (Costello *et al.*, 2015). D'autres études d'interactions génétiques étayent cette hypothèse, que l'activité de *Lhx1* et la voie de signalisation Wnt / β -caténine sont liées (Fossat *et al.*, 2015).

Concernant ZO-1, en plus de sa fonction dans les jonctions serrées (profil épithélial), un rôle dans la motilité cellulaire a été identifié dans le cancer du poumon où ZO-1 est surexprimé. Il a été montré que la surexpression de ZO-1 est médiée par le TGF- β (Lee *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter que le TGF- β est également dérégulé par l'inhibiteur de Lim1 sur la base des travaux précédents du laboratoire (Dormoy *et al.*, 2011). En effet, il a été montré que TGF- β joue un rôle critique dans la croissance tumorale du CCC (Ananth *et al.*, 1999) ainsi que dans le développement des métastases rénales osseuses (Kominsky *et al.*, 2007) retrouvées chez environ 30% des patients atteints de CCR.

Plusieurs études ont montré que la FAK et la Paxilline sont importantes pour la migration cellulaire et participent à l'assemblage dynamique et au *turnover* des adhésions focales (Kanteti *et al.*, 2015). Dans ce travail de thèse, nous montrons que la FAK et la Paxilline sont diminuées avec l'extinction de Lim1. De plus, la fibronectine, un composant de la MEC, se trouve également inhibée par le *silencing* de Lim1. La fibronectine est essentielle à l'adhésion cellulaire, à la migration *via* la transduction du signal médiée par son récepteur transmembranaire, l'intégrine α -5 qui, d'après nos résultats, ne semble pas être affectée par l'inhibition de Lim1. Une étude a montré que la surexpression de la fibronectine dans le CCR est associée à un taux de mortalité élevé chez les patients (Béraud *et al.*, 2015; Steffens *et al.*, 2012).

L'étape suivante de notre étude a consisté à étudier l'expression de Lim1 dans des échantillons de tissus tumoraux métastatiques et primaires issus de patients atteints de CCR. Dans la pratique clinique, les métastases sont rarement opérées mais surtout biopsiées. De ce fait, l'expression de Lim1 a été étudiée principalement par IHC à partir de biopsies et pour quelques patients, par Western blot à partir des extraits protéiques. Nous montrons pour la première fois une expression de Lim1 dans tous les tissus métastatiques en plus des tumeurs primitives d'origine. En IHC, nous avons pu comparer le H-score entre les tissus métastatiques et les tumeurs primaires correspondantes, ce qui n'avait pas été fait jusque-là. Les résultats ont montré de manière intéressante une surexpression de Lim1 significativement plus élevée ($P=0.0006$) dans la métastase comparativement à la tumeur primaire d'origine. Pour certains patients dont le tissu tumoral était disponible dans l'azote et le formol, les résultats IHC et Wb étaient similaires. Nos observations suggèrent une corrélation entre le H-score de Lim1 dans la métastase et le stade TNM mais malheureusement qui n'est pas statistiquement significative à cause de l'hétérogénéité de la distribution du nombre de métastases par stade. Il est donc possible de considérer Lim1 comme un marqueur pronostique et d'agressivité dans le CCC humain. Ces conclusions nécessitent évidemment une confirmation sur un plus grand nombre d'échantillons en incluant d'autres paramètres cliniques, le stade clinique, la survie, le nombre de ganglions envahis.

Plusieurs équipes ont cherché à identifier les changements génétiques à la base de la progression métastatique du CCR humain. Leurs travaux révèlent que les tumeurs primaires et leurs métastases correspondantes ne sont jamais identiques. Un gain dans le chromosome 17q+ est fréquemment retrouvé dans les métastases mais pas dans la tumeur primaire correspondante. Une fonction anormale des gènes dans ces régions pourrait contribuer au processus métastatique. Rappelons que le gène *Lhx1* est situé dans cette région. La surexpression de Lim1 dans les métastases est donc probablement liée à une duplication du gène ou à son activation constitutive liée à une perturbation dans cette région (Bissig *et al.*, 1999).

La dernière étape de notre étude visait à confirmer le rôle invasif de Lim1 *in vivo* dans un modèle d'implantation de cellules tumorales par voie intra-veineuse. Ce type d'injection permet le développement rapide de métastases pulmonaires. Nos résultats ont montré que l'extinction de Lim1 a permis de réduire le nombre et la taille de nodules micrométastatiques pulmonaires.

Une autre étude a démontré le rôle de Lim1 dans le développement de métastases dans le médulloblastome où l'expression ectopique de Lim1 induite par l'activation de la voie SHH favorise la dissémination métastatique dans un modèle murin. De plus, une surexpression de Lim1 a été retrouvée dans le médulloblastome humain, qui est corrélée avec un nombre élevé de métastases et une survie courte chez les patients (Mumert *et al.*, 2012). Ceci appuie donc notre hypothèse sur le rôle invasif de Lim1.

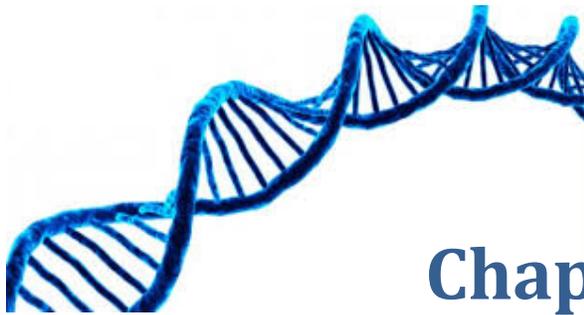
Toute cette étude a été réalisée sur deux types de lignées de CCC humain, une exprimant un VHL sauvage et une autre déficiente pour le VHL. La possibilité que la présence d'un VHL actif intervienne dans la réponse observée à l'inhibition de Lim1 ou dans les mécanismes mis en jeu dans un contexte métastatique *in vivo* ne peut être exclue ou négligée en vue d'une application thérapeutique. Tous les travaux précédents du laboratoire n'ont cependant pas démontré de corrélation entre le statut VHL des cellules et l'effet de l'inhibition des différents voies/acteurs étudiés impliqués dans la croissance du CCC, y compris pour le rôle oncogénique de Lim1. De même, dans ce travail de thèse, les effets observés de l'inhibition de Lim1 sur les mouvements cellulaires semblent indépendants du statut VHL.

Nous voulons souligner un des arguments qui confirme la contribution de Lim1 dans la carcinogenèse rénale en association avec les facteurs Pax qui sont surexprimés dans le CCC et utilisés en routine pour le diagnostic IHC du CCC. L'expression ectopique de Pax-8 ou de Lim1 seul, chez *Xenopus*, entraîne le développement de tubules pronéphriques plus gros avec un marquage positif pour les structures de tubules proximaux (Cirio *et al.*, 2011). La co-surexpression de Pax-8 et Lim1 a un effet synergique et conduit à la formation de structures rénales fortement hyperplasiées et ectopiques. Cet effet était synergique plutôt qu'additif. Il a été montré que la surexpression de Pax-2 peut également synergiser avec Lim1 (Carroll et Vize, 1999). Ces trois gènes, qui se trouvent surexprimés dans le CCC, peuvent agir en synergie pendant la carcinogenèse rénale. Un autre point important est que HNF-1 β peut jouer un rôle suppresseur de tumeur en inhibant ces trois facteurs. Des mutations hétérozygotes de HNF-1 β sont associées à une forme héréditaire de tumeurs rénales (MODY5). De plus, la dérégulation de HNF-1 β est considérée comme un marqueur d'agressivité et de mauvais pronostic dans le CCR (Buchner *et al.*, 2010). La surexpression de HNF-1 β dans les embryons de *Xenopus* conduit à une agénésie des tubules et des conduits pronéphriques. De plus, l'apport exogène de HNF-1 β peut contourner l'hyperplasie et l'induction du pronéphros ectopique médié par la surexpression de Pax-8 et Lim1. Ces travaux suggèrent que HNF-1 β agit de manière antagoniste à

Pax-8 et Lim1 pendant la néphrogenèse (Wu *et al.*, 2004). Des sites de liaison HNF1 ont été identifiés dans la région promotrice et dans le premier intron du gène *Xenopus Lhx1*. Il est alors possible que cette liaison soit responsable d'une inactivation de la transcription de Lim1 et que la perte de HNF-1 β conduise à une surexpression de Lim1, et donc directement impliqué dans la carcinogenèse rénale (Drews *et al.*, 2011).

En combinant les résultats précédents du laboratoire sur le rôle de Lim1 dans la croissance tumorale avec les résultats de ce travail sur son rôle dans la dissémination métastatique, il devient donc intéressant de considérer Lim1 comme une cible potentielle très prometteuse pour l'innovation thérapeutique associée au CCR. De plus, l'analyse de son expression dans les métastases pourrait être proposée comme marqueur pronostique dans le CCR avancé. Nous rappelons que Lim1 n'est exprimé chez l'adulte que dans des régions discrètes du cerveau, du thymus et de l'endomètre (Dong *et al.*, 1997) et que le seul rôle connu dans les NSC est le maintien du rythme circadien (Hatori *et al.*, 2014). Le fait qu'il soit exprimé spécifiquement dans les tissus tumoraux et métastatiques présage de l'innocuité de l'inhibition de Lim1 et du ciblage spécifique de la tumeur et de la métastase contrairement aux thérapies anticancéreuses systémiques qui ciblent aussi bien la cellule cancéreuse que la cellule saine, ce qui explique l'importance des effets indésirables et la mauvaise tolérance clinique.

Aucun inhibiteur de Lim1 n'est disponible en clinique. Le développement d'inhibiteurs chimiques d'un facteur de transcription prendrait plusieurs années, sans assurance de succès. Dans ce cadre, nous avons envisagé une approche translationnelle innovante applicable en clinique à savoir, l'utilisation de siRNAs ciblant Lim1 véhiculés par des systèmes nanométriques. Cette étude transcriptionnelle est abordée dans le chapitre suivant.



Chapitre IV

Partie translationnelle



I. Publication

Polydiacetylenic Nanofibers as new siRNA vehicles for in vitro and in vivo delivery

(Neuberg., Hamaidi *et al.*, 2017)

Manuscrit en révision (Nanoscale)



Polydiacetylenic Nanofibers as new siRNA vehicles for in vitro and in vivo delivery

Journal:	<i>Nanoscale</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Neuberg, Patrick; Université de Strasbourg, UMR 7199 Hamaidi, Imène; INSERM-Université de Strasbourg, France, Laboratory "Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques" (VSDS) Danilin, Sabrina; CNRS - Uds, UMR 7199; INSERM-Université de Strasbourg, France, Laboratory "Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques" (VSDS) Ripoll, Manon; University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, UMR7199 Nothisen, Marc; University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, UMR7199 Wagner, Alain; Université Louis Pasteur de Strasbourg, Laboratoire des Systèmes Chimiques Fonctionnels, UMR 7199 Kichler, Antoine; University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, UMR7199 Massfelder, Thierry; INSERM-Université de Strasbourg, France, Laboratory "Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques" (VSDS) Remy, Jean-Serge; University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, UMR7199</p>

Illkirch, July 7th 2017

Dear Editor,

We wish to submit for publication in **Nanoscale** our manuscript describing a new form of photopolymerized polydiacetylenic nanofibers (PDA-Nfs) which are completely unexplored nanomaterials in the field of the delivery of biomolecules. Here we describe how such PDA-Nfs have been optimized for an efficient delivery of siRNA leading to specific RNA interference *in vitro* as well as *in vivo* (subcutaneous mouse tumor model).

Our newly described PDA-Nfs are obtained by photo-polymerization of relatively simple diacetylenic surfactants bearing primary amines as a headgroup coupled on short oligoethylene spacers. These surfactants self-assemble into a highly photosensitive gel under specific described conditions. Short UV-irradiation leads to the formation of polymerized nanofibers, which can interact with siRNA by electrostatic interaction.

We recently described the successful use of PDA micelles optimized for RNA interference (Ripoll *et al.* 2016). The micellar form of some of these diacetylenic surfactants proceeds only to low degree of polymerization, resulting in remaining monomer surfactants after photopolymerization, which have to be removed by intensive dialysis steps. The newly described PDA-Nfs, contrary to the micellar form, lead to high degrees of polymerization, proven by the self-fluorescence properties of the PDA-Nfs, acknowledging for the formation of an extended conjugated system.

Therefore, we optimized the delivery conditions allowing for specific RNA interference of the luciferase reporter gene. In a third step, we silenced an endogenous gene in 786-O cell line. This 786-O cell line is particularly relevant as it represents the mostly used model to study Clear Cell renal Cell carcinoma (CCC). This is the most common and aggressive form of kidney cancer in adult, and remains resistant to current anticancer therapies. Dr. Massfelder's group has recently identified the developmental transcription factor Lim-1 as an oncogene in CCC regulating tumor growth. The selected 786-O cell line expresses constitutively the Lim-1 oncogene at high levels. *In vitro*, the PDA-Nfs/siLim1 efficiently silenced by more than 80% the expression of the Lim-1 oncogene in the 786-O human kidney cancer cell line.

Finally, we tested the efficacy of the nanofibers to carry small interfering RNA *in vivo*. Nude mice bearing subcutaneous human 786-O tumors were treated by a single intraperitoneal injection of PDA-Nf/siLim. RT-qPCR and Western blot analysis showed a significant decrease of Lim-1 expression in PDA-Nfs/siLim1 group, compared to PDA-Nfs/siCtl. Notably the PDA-Nfs have been able to deliver siRNA away from the site of injection, into subcutaneous located tumors.

Taken together, we found that PDA-Nfs are a promising new class of self-organized siRNA vectors. Therefore we believe that a journal such as "Nanoscale" with a readership especially interested in new nanomaterials would be a suitable media to publish our results.

Yours sincerely,

Dr. Remy Jean-Serge



Nanoscale

COMMUNICATION

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Polydiacetylenic Nanofibers as new siRNA vehicles for *in vitro* and *in vivo* delivery

P. Neuberger^a, I. Hamaidi^b, S. Danilin^b, M. Ripoll^a, M. Nothisen^a, A. Wagner^c, A. Kichler^a,
T. Massfelder^{b*}, J.-S. Remy^{a*}

Polydiacetylenic nanofibers (PDA-Nfs) obtained by photopolymerization of surfactant 1 were optimized for intracellular delivery of small interfering RNAs (siRNAs). PDA-Nfs/siRNA complexes efficiently silenced the oncogene Lim-1 in the renal cancer cells 786-O *in vitro*. Intraperitoneal injection of PDA-Nfs/siLim1 downregulated Lim-1 in subcutaneous tumor xenografts obtained with 786-O cells in nude mice. Thus, PDA-Nfs represent an innovative delivery system for *in vivo* delivery of siRNAs.

Since the discovery of ARN interference in 1998 by Andrew Z. Fire et Craig C. Mello, many attempts have been made to translate this strategy towards new approaches in the treatment of cancers in particular through specific silencing of deregulated oncogenes, responsible for cancer growth.^{1,2} Nevertheless, despite enormous efforts in the design of carriers for siRNA, therapeutic success has been hampered by the low efficiency of siRNA delivery when used *in vivo*. Contrary to the transfection of DNA molecules, the smaller siRNA molecules show less affinity towards transfection agents, so their intracellular delivery by classical transfection agents such as cationic polymers is reduced.³ The siRNA molecules present small beta-helices being rod-like structures. Their stiffness and small size accounts for reduced cooperative electrostatic binding to the transfection agents.^{3,4}

Many attempts have been made to increase the affinity of the delivery vehicle for the small siRNA molecules by introducing stabilizing groups in the transfectant.⁵ This can be achieved by introduction of hydrophobic or aromatic groups in cationic polymers, helping to create a pre-organized structure, presenting non-covalent chain interactions (π -stacking and van der Waals bonding).⁴ Cationic amphiphiles on the other hand may be stabilized by a precipitation method, based on the formation of small sized cholesterol-rich cores that are surrounded by the cationic molecule forming so-called SNALPs (stable lipidic nucleic acid particles).⁶ These pre-organized platforms show great promise for *in vivo* and clinical applications.^{7,8}

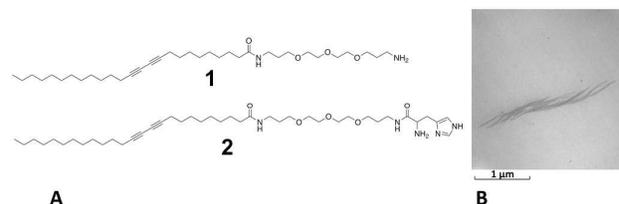


Figure 1: A) structure of diacetylenic surfactant **1** and histidine analogue **2**. **B)** Low voltage electron microscopy of PDA-Nfs.

Here, we report on a novel polymeric platform for the delivery of siRNAs. Diacetylenic surfactants, based on a long C₂₅ hydrocarbon chain containing conjugated triple bonds, are able to self-assemble into a variety of supramolecular forms, which can be cross-linked by photopolymerization. The diacetylenic system can be polymerized upon UV irradiation forming so-called PDA (PolyDiAcetylenic) systems. The group of E. Doris realized pioneering work on PDA based micellar systems for drug delivery.^{9,10} Our group recently described that diacetylenic surfactants, which are forming micelles, can be photo-polymerized efficiently and be used for the delivery of biologically active molecules. Variations on the polar headgroups allow for fine-tuning and optimization of their

^a V-SAT Laboratory, Vectors: Synthesis and Therapeutic Applications, Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France.

^b Laboratory "Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques" (VSDS), Team 3 "Signalisation et communication cellulaires dans les cancers du rein et de la prostate" - UMR_S 1113, INSERM-Université de Strasbourg, France.

^c Laboratory of Bio-Functional Chemistry (BFC), Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France.

* corresponding authors Dr. T. Massfelder massfeld@unistra.fr; Dr. J.-S. Remy remy@unistra.fr

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of chemical synthesis, preparation of PDA-Nfs and biophysical characterization, detailed *in vitro* and *in vivo* results]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

delivery properties. Indeed, short cationic headgroups of the micelle forming PDA surfactants conferred them capabilities for gene delivery while neutral oligo-ethylene groups favor hydrophobic drug formulation.^{11,12} On the other hand, the introduction of pH sensitive imidazole groups allowed for efficient *in vitro* siRNA delivery.¹³ Nevertheless, the degree of polymerization of these surfactants present in the micelles is low, as they show no significant UV absorption proving absence of an extended polymerized conjugated system. In the present work we report on the generation of a new form of the PDA system that forms highly polymerized hyperconjugated polydiacetylenic nano-fibers (PDA-Nfs). In order to increase the affinity of the siRNA molecules for the delivery systems we directed our efforts towards the extension of the degree of polymerization and size of the PDA-Nfs.

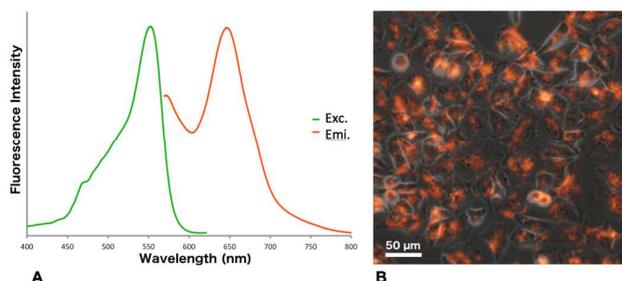


Figure 2: **A)** Fluorescence excitation (green) and emission (orange) spectra of trioxamine-Nfs (**1**). **B)** Fluorescence microscopy of A549-Luc cells transfected with PDA-Nfs/siRNA showing an overlay of phase contrast picture and fluorescence image. A strong internalization of PDA-Nfs/siRNA complexes (with a N/P=13 and a final siRNA concentration of 10 nM) is observed after 24 hours by fluorescence microscopy using the autofluorescence of the PDA-Nfs.

In initial screening and formulation assays, we indeed observed that some of the diacetylenic surfactants we had synthesized, spontaneously reorganized in gel-like structures upon prolonged storage at 5°C. A similar gelation of PDA surfactants has already been described on propargyl-ammonium PDA surfactants.¹⁴ The previous nano-gels become extremely photosensitive and polymerize into deep blue microfibers upon short irradiation times at 254 nm. Whereas the micellar form of these diacetylenic surfactants require irradiation times of several hours, only a few minutes or even seconds will completely polymerize the PDA-nano-gels. Upon this initial observation we expected some of these highly polymeric structures to be good candidates for delivery of biomolecules as their colloidal stability is supposedly enhanced by covalent bonds. We first attempted to form a nano-gel with the described histidine C₂₅ diyne surfactant (**2**), which had been designed for siRNA delivery under its polymerized PDA-micellar form.¹³ As expected, this molecule is able to form a nanogel upon storage at 5°C. Photopolymerization of this gel at 254 nm leads to extremely long microfibers, extending over 50 μm long distances (**ESI figure S1**). It is obvious that intracellular delivery of nanomaterials requires smaller sizes

than the cells themselves. Formulation assays with a diverse set of diacetylenic surfactants showed that the achiral C₂₅ diyne-amine (**1**) is the best candidate as it is forming photopolymerized nanofibers, which break loose upon pH reversal to acidic pH and upon heating and sonication. The micro-fibers formed with histidine surfactant (**2**), on the other hand, could not be fragmented under similar, and even harsher conditions.

The amphiphile (**1**) has been synthesized by activation of the commercial C₂₅-diyne-*oic* acid by formation of its activated N-hydroxysuccinimide ester. The NHS ester has been isolated by extraction, and has been used for the coupling onto the unprotected 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine used in slight excess. The desired mono-coupling product has been isolated and separated from bi-coupling product by silica gel chromatography using methanol/ammonia/dichloromethane gradient as described in supplementary information. The mono-coupling product (**1**, **figure 1A**) was directly obtained under its desired unprotonated form by silica gel chromatography.

The formulation proceeded by first dissolving the amine in warm ethanol under sonication in order to form a concentrated ethanolic solution. This was filtered over a cotton plug to remove polymerized contaminants that formed upon storage of the monomer surfactant. This solution was introduced in ethanol-water mixtures, in order to form final 30% ethanol solutions. These were placed at 5°C, where the surfactant is forming a gel-like solution. This gel was highly photosensitive and was polymerized under hard UV-light at 254 nm in a UV-Crosslinker by irradiation for 10 minutes in small Petri dishes or 6-well cell culture plates (**see figure S4**).

This initial photopolymerization of surfactant (**1**) formed a hyperconjugated system that strongly absorbs in visible light, showing a dense blue color. It then turned crimson red-colored when physical or chemical strains was exerted: acidification of the medium, heating and sonication (**see ESI for detailed experimental description and figure S5**). In this second step the dark-blue precipitate dissociated into the desired PDA-Nfs. The observed color transition was in accordance with descriptions in the literature, in which PDA systems are used as biosensors: a physical or chemical stimulus induces the blue-red color change, such as used for diagnosis of prostate cancer.¹⁵

We further characterized these formulations by physicochemical methods, such as UV-Vis and fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering and electron microscopy (**see ESI for detailed biophysical characterization data and figure 1B**).

The fluorescence absorption and excitation spectra are shown in **figure 2A**. Interestingly the maximum excitation wavelength is separated by a wide bandwidth between 550 and 646 nm (Stokes shift of about 100 nm).

The hydrodynamic diameter of the PDA-nanofibers was measured by dynamic light scattering experiments (**ESI figure S6A**). Their mean size by intensity is 780 nm. The same fiber solution diluted 10-fold showed a zeta potential of +52 mV, confirming the presence of positively charged amine functions

at the outer side of the nanofibers (ESI figure S6B). Low voltage electron microscopy allowed for a more detailed view on the internal lathe-like structure of these PDA-Nanofibers (ESI figure S5B).

Thanks to fine tunings of the preparation method, homogenous batches of small controlled sized nanofibers were obtained as detailed in supplementary information.

Complexation of anionic siRNA molecules in neutral buffer conditions, and analysis by gel electrophoresis show that siRNA is complexed at N/P values around 4. This ratio defines the total amine content of the fibers versus the number of phosphate groups present in the siRNA (ESI figure S7). Interestingly, similar complexation has been achieved with extensively dialyzed nanofibers, where all residual monomer is removed, confirming again indirectly the high polymerization efficiency under the conditions of nanofiber preparation (see ESI for dialysis purification and complexation assays).

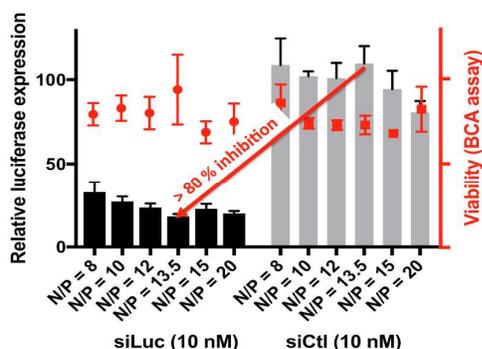


Figure 3: siLuc delivery in A549-Luc cell line at 10 nM siRNA concentration and various N/P ratios (optimal N/P for this cell line at N/P 13.5 shows a silencing of 82%). Viability is measured by total protein quantification and compared to untreated cells.

In a next step, the nanofibers were evaluated for their siRNA delivery capabilities on cultured cells. The strong intrinsic fluorescence facilitates direct observation by fluorescence microscopy. High internalization of the positively charged PDA-Nfs alone (not shown), as well as of complexes formed between siRNA and the nanofibers (figure 2B) could be evidenced. This shows the potential of this system for delivering biomolecules. In order to prove the cytosolic delivery of siRNA, which is conditioned by endosomal escape, we used human lung carcinoma cells stably expressing the luciferase reporter gene (A549-Luc). The binary complexes between siRNA and nanofibers "PDA-Nf/siRNA" were realized by 1 hour incubation in HBG buffer (20 mM Hepes Buffered Glucose). The silencing efficiency was measured by comparing the residual expression with a control siRNA formulated in the same conditions. Up to 80% silencing could be obtained with 10 nM siLuc (siRNA targeting the luciferase expression; at N/P values from 12 to 20; see figure 3). Total protein quantification of transfected cells, compared to untreated ones, shows low toxicity of the PDA-Nfs formulated siRNAs. Thus, the A549-Luc

cell line allowed for the selection of the best performing batches, which were used in the subsequent experiments.

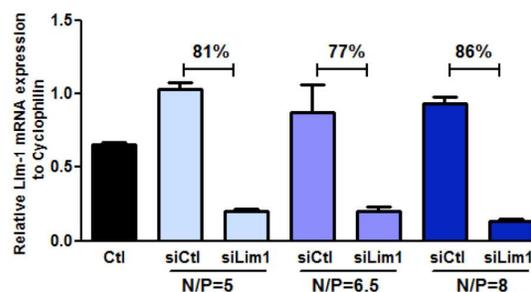


Figure 4: Reduced expression level of endogenous Lim-1 gene in 786-O cells after 48 h treatment with specific (siLim1) and control siRNA at 10 nM siRNA concentration and various concentrations of PDA-Nfs (N/P = 5 to N/P = 8).

In order to verify the effectiveness of the PDA-Nfs on another cell line, the 786-O human renal cancer cells were selected. To find out the optimal delivery conditions of siRNA into 786-O cells, a luciferase expressing 786-O-Luc cell line was used. As with the A549-Luc cell line, a highly efficient silencing of luciferase was observed in 786-O-Luc cells, as indicated by direct bioluminescence imaging of the cell culture plates. The optimal N/P values (between N/P 5 and 10) were lower than those found for A549-Luc cells (see SI for bioluminescence assay and cell density measurements after crystal violet staining).

Clear Cell renal Cell carcinoma (CCC) is the most common and aggressive form of kidney cancer in adult, and remains resistant to current anticancer therapies. 786-O cell line represents the most used model to study CCC. Dr. Massfelder's group has recently identified the developmental transcription factor Lim-1 as an oncogene in CCC regulating tumor growth.^{16,17} The selected 786-O cell line expresses constitutively the Lim-1 oncogene.¹⁶

We evaluated the capacity of PDA-Nfs to silence endogenous Lim-1 in 786-O. As shown in figure 4, the PDA-Nf allowed for an inhibition of the expression of Lim-1 by more than 80% at various PDA-Nfs concentrations. The relative expression of Lim-1 has been measured by qPCR analysis in comparison to cyclophilin used as a reference gene (48 hours treatment at 10 nM siLim1 concentration; figure 4). The RNA interference efficiency has been calculated by comparing the level of Lim-1 expression on PDA-Nfs/siLim1 treated cells to that of PDA-Nfs/siCtl.

In order to evaluate the capacity of the PDA-Nfs to silence a gene that is even higher expressed, we used a stable 786-O clone, overexpressing Lim-1 by up to 80 times. This clone was treated with 10 nM of siLim1 and siCtl complexed with 4 μM amine concentration of PDA-Nfs (N/P = 10). RT-qPCR analysis shows a decrease of Lim-1 expression by approx. 90% (ESI figure S10).

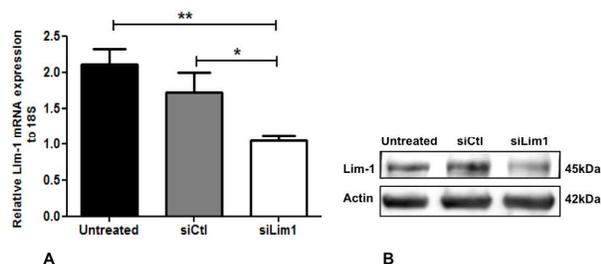


Figure 5: *In vivo* silencing efficiency of siRNA targeting Lim-1 oncogene (siLim1) in subcutaneous xenografted 786-O cells in nude mice. (A) qPCR quantification of the expression level of Lim-1 gene relative to the housekeeping gene 18S. Average results shown as mean \pm s.e.m., Untreated $n=4$, PDA-Nfs/siCtl $n=5$, PDA-Nfs/siLim1 $n=6$; ** $P<0.01$ from Ctl; * $P<0.05$ from siCtl (B) Western blot analysis of the expression level of the Lim-1 gene as compared to the actin protein. Each plot represents a pool of all tumor extracts from the same group.

Finally, we tested the efficacy of nanofibers to carry small interfering RNA *in vivo*. Nude mice bearing subcutaneous human 786-O tumors were treated by a single intraperitoneal injection of PDA-Nf/siLim ($n=6$), PDA-Nfs/siCtl ($n=5$) complexes or untreated ($n=4$). Forty eight hours after treatment, animals were euthanized and the tumors were harvested. Each tumor was cut in 2 parts, one for Western blot analysis, and the other part for RT-qPCR analysis. To avoid current problems of tumor heterogeneity, 6 extracts were processed for each part, and analyzed individually, as well as after having pooled the samples. RT-qPCR analysis showed a significant decrease of Lim-1 expression in PDA-Nfs/siLim1 group compared to PDA-Nfs/siCtl (see **figure 5A**; and ESI for statistical analysis). These results were confirmed by Western blot analysis on the pooled samples. We clearly observed a decrease of Lim-1 expression in PDA-Nfs/siLim group compared to PDA-Nfs/siCtl or untreated groups (**Figure 5B**, experimental details in ESI).

Conclusion

In the present work, we were able to show for the first time that PDA-Nfs can be promising delivery agents for siRNAs. Surfactant (1) allows for the generation of relatively small nanofibers that are able to internalize efficiently into cells. The PDA nanofibers associated with a siRNA targeting a reporter gene (luciferase gene in A549-Luc and 786-O-Luc cell lines) lead to a very efficient silencing.

In vitro, the PDA-Nfs/siLim1 efficiently silenced by more than 80% the expression of the Lim-1 oncogene in the 786-O human kidney cancer cell line. Furthermore, when administered intraperitoneally, the PDA-Nfs has been able to deliver siRNA away from the site of injection, into subcutaneous located tumors.

Taken together, we found that PDA-Nfs are a promising new class of self-organized siRNA vectors.

Notes and references

This PDA-Nanofiber system is patented in 2016 under: EP16305367. We thank the Labex Medalis and FRM Foundation for post-doctoral grants for PN and SD. M.R. received financial doctoral support from the University of Strasbourg.

- 1 M. E. Davis, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 659–668.
- 2 K. A. Howard, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 710–720.
- 3 A.-L. Bolcato-Bellemin, M.-E. Bonnet, G. Creusat, P. Erbacher and J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 16050–16055.
- 4 P. Neuberg and A. Kichler, *Adv. Genet.*, 2014, **88**, 263–288.
- 5 G. Creusat and G. Zuber, *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.*, 2008, **9**, 2787–2789.
- 6 L. C. Gomes-da-Silva, N. A. Fonseca, V. Moura, M. C. Pedroso de Lima, S. Simões and J. N. Moreira, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 1163–1171.
- 7 S. Y. Wu, A. Singhanian, M. Burgess, L. N. Putral, C. Kirkpatrick, N. M. Davies and N. a. J. McMillan, *Gene Ther.*, 2011, **18**, 14–22.
- 8 G. Ozcan, B. Ozpolat, R. L. Coleman, A. K. Sood and G. Lopez-Berestein, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015, **87**, 108–119.
- 9 N. Mackiewicz, E. Gravel, A. Garofalakis, J. Ogier, J. John, D. M. Dupont, K. Gombert, B. Tavitian, E. Doris and F. Ducongé, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 2011, **7**, 2786–2792.
- 10 E. Gravel, B. Thézé, I. Jacques, P. Anilkumar, K. Gombert, F. Ducongé and E. Doris, *Nanoscale*, 2013, **5**, 1955–1960.
- 11 E. Morin, M. Nothisen, A. Wagner and J.-S. Remy, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 1916–1923.
- 12 P. Neuberg, A. Perino, E. Morin-Picardat, N. Anton, Z. Darwich, D. Weltin, Y. Mely, A. S. Klymchenko, J.-S. Remy and A. Wagner, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, 2015, **51**, 11595–11598.
- 13 M. Ripoll, P. Neuberg, A. Kichler, N. Tounsi, A. Wagner and J.-S. Remy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 30665–30670.
- 14 E. Morin, J.-M. Guenet, D. D. Díaz, J.-S. Remy and A. Wagner, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 12495–12500.
- 15 I. K. Kwon, J. P. Kim and S. J. Sim, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 1548–1553.
- 16 V. Dormoy, C. Béraud, V. Lindner, L. Thomas, C. Coquard, M. Barthelmebs, D. Jacqmin, H. Lang and T. Massfelder, *Oncogene*, 2011, **30**, 1753–1763.
- 17 V. Dormoy, D. Jacqmin, H. Lang and T. Massfelder, *Anticancer Res.*, 2012, **32**, 3609–3617.

Polydiacetylenic Nanofibers as new siRNA vehicles for *in vitro* and *in vivo* delivery

Patrick Neuberger^a, Imène Hamaidi^b, Sabrina Danilin^b, Manon Ripoll^a, Marc Nothisen^a, Alain Wagner^c, Antoine Kichler^a, Thierry Massfelder^{b*}, Jean-Serge Remy^{a*}

a. V-SAT Laboratory, Vectors: Synthesis and Therapeutic Applications, Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France.

b. Laboratory “Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques” (VSDS), Team 3 “Signalisation et communication cellulaires dans les cancers du rein et de la prostate” - UMR_S 1113, INSERM-Université de Strasbourg, France.

c. Laboratory of Bio-Functional Chemistry (BFC), Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France.

*Corresponding authors: Dr. Thierry Massfelder massfeld@unistra.fr; Dr. Jean-Serge Remy remy@unistra.fr

Chemistry Part:	2
Materials and methods:	2
Synthesis of surfactant (1): C25-diyne-trioxaamine, (N-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)pentacos-10,12-diyne)amide:	3
Analysis of C25-diyne-trioxaamine:	4
High resolution mass spectroscopy coupled to liquid chromatography: LC-HRMS	4
Formulation and physicochemical characterization	4
Formulation and photopolymerization of Polydiacetylenic nanofibers	4
Electron microscopy of the PDA-Nfs (LVEM)	5
UV-VIS spectra of Nanofibers	6
Fluorescence spectroscopy of PDA Nanofibers	6
Size analysis by dynamic light scattering (DLS)	7
Gel retardation assay	7
Biology part:	8
Materials and methods	8
siRNA used <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experiments	8
Cell culture	9
A549-Luc cell line	9
786-O cell line	9
RNA interference	9
A549-Luc cell line	9

786-O cell line	10
Luciferase quantification	10
Quantification with automated luminometer	10
Quantification by bioluminescence imaging	11
Cell density	11
Real-time quantitative PCR analysis	11
<i>In vivo</i> experiments	11
Xenograft tumor Model	11
Western blot analysis	12
Statistical analysis	12
References:	12
SI Figures	13

Chemistry Part:

Materials and methods:

10,12-pentacosediynoic acid, N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), N,N-diisopropylethylamine, 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Column chromatography was performed on silica for chromatography: Silicagel 60 (40-63 μm) Geduran Si60 (Merck, Darmstadt, Germany). The progress of all reactions and column chromatography was monitored by thin-layer chromatography (TLC). TLC was performed with Merck silica gel 60 F254 pre-coated plates and visualized by UV absorption and/or stained with a solution of vanillin – H_2SO_4 stain, Dragendorff reagent, ninhydrin or iodine vapors. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Ultrashield plus 400 Spectrometer (operated at 400 or 100 MHz). The ^1H NMR chemical shifts are reported in parts per million, using the signal for residual solvent protons (7.27 for CDCl_3 , 3.31 for MeOD) as reference. The ^{13}C NMR chemical shifts are reported in parts per million, using the signal for residual solvent protons as reference (77.23 for CDCl_3 , 48.95 and for MeOD). Data were represented as follows, chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet and m = multiplet), integration and coupling (J in Hz). High Resolution Mass Spectra (HRMS) were obtained using an Agilent Q-TOF (time of flight) 6520. NMR analysis and Mass analysis were done by the analytical platform (GDS 3670, CNRS & Université de Strasbourg) at the Faculty of Pharmacy.

Synthesis of surfactant (1): C25-diyne-trioxaamine, (N-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)pentacosyl)pentacosyl-10,12-diyneamide:

Commercial 10,12-pentacosadiynoic acid (1 equivalent, 10 g, 26.7 μmoles , Mw 374.6; Sigma-Aldrich,) and N-hydroxysuccinimide (1.63 equivalent, 5 g, 43.4 μmoles ; Mw 115.09) were dissolved in dichloromethane (200 mL) and purged with argon. 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.49 eq, 8.3 g, 43.3 μmol ; Mw 191.7) was added as a solid, followed by slow drop-wise addition of dry N,N-diisopropylethylamine (1.49 eq, 7 mL, 5.18 g, 40 μmol). The mixture was stirred overnight at room temperature in brown glassware, which protects the reagents from light. Solvents and excess amine were evaporated in a rotary evaporator, then dissolved again in dichloromethane (200 mL) and extracted with distilled water (100 mL). Aqueous phase was re-extracted with dichloromethane (200 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered on a paper disc under vacuum, evaporated in a rotary evaporator and dried under vacuum. The obtained white solid (12.54 g, 26.6 μmoles , Mw 471.67) is the expected NHS ester obtained in quantitative yield was confirmed by NMR analysis.

This activated hydroxysuccinimidyl ester was used in the next step with no further purification.

The NHS ester (4.716 g, 10 μmoles , Mw 471.67) was dissolved in 200 mL dichloromethane (stabilized with amylene). 1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecane (4.4 g, 20 μmoles , Mw 220.3), dissolved in 200 mL dichloromethane was added at room temperature. The reaction was stirred for 24 hours. Methanol (20 mL) was added to dissolve the formed precipitate. The reaction mixture was purified directly, without evaporation, on a silica gel column, equilibrated with 5% methanol 0.5% NH_4OH in dichloromethane (column with a diameter of 5 cm and 17 cm length). Column was first eluted with a mixture of methanol/dichloromethane/ammonia 5:94:0.5 (400 mL), then with methanol/dichloromethane/ammonia (10:89:1). Two Dragendorff positive products were isolated. A major side product resulting from bi-coupling reaction (1.2 g, 26%, Mw 933.48) eluted in the first head fractions. The second corresponded to the desired mono-coupling product (3.7 g, 64% isolated yield, Mw 576.91). TLC analysis of the fractions was done with methanol/dichloromethane/ammonia 9:90:1 elution and staining with Dragendorff reagent. Bi-coupling product was poorly soluble in methanol, and NMR analysis was done in

deuterated chloroform. The desired mono-coupling product was analyzed by NMR analysis at a concentration of 10 mg in 0.75 mL deuterated methanol-4D, and by NMR analysis of a sample in a MeOD-4d/10% TFA (trifluoroacetic acid) mixture to better resolve overlapping signals.

Analysis of C₂₅-diyne-trioxaamine:

¹H NMR (400 MHz, MeOD 10% TFA) δ 3.64-3.71 (m, 8H), 3.59-3.64 (m, 2H), 3.53 (t, *J*=5.8 Hz, 2H), 3.27 (t, *J*=6.6 Hz, 2H), 3.11 (t, *J*=6.4 Hz, 2H), 2.26 (t, *J*=6.6 Hz, 4H), 2.20 (t, *J*=7.4 Hz, 2H), 1.91-1.99 (m, 2H), 1.73-1.82 (m, 2H), 1.73-1.82 (m, 2H), 1.47-1.57 (m, 4H), 1.39-1.46 (m, 4H), 1.29-1.37 (m, 23H, alkyls), 0.90 (t, *J*=6.8 Hz, 3H) ppm.

See Figure S2: ¹H-NMR analysis of the surfactant (1)

¹³C NMR (100 MHz, MeOD 10% TFA) δ 76.6, 76.5, 70.0, 69.7, 69.6, 69.0, 68.3, 65.0, 38.7, 36.3, 35.7, 31.7, 29.3-28.1, 26.7, 25.6, 22.3, 18.3, 13.0 ppm.

High resolution mass spectroscopy coupled to liquid chromatography: LC-HRMS

Observed mass: 576.48527 (theoretical 576.48661; score 96.91%); 100% purity by LC-MS (from +ESI total ion current)

See Figure S3: LC-HRMS analysis of the surfactant (1)

Formulation and physicochemical characterization

Formulation and photopolymerization of Polydiacetylenic nanofibers

A concentrated solution of C₂₅-diyne-trioxaamine was prepared by dissolving the amine in ethanol at 60°C under sonication (60 mg/6 mL). This warm solution was filtered through a cotton pad (in a glass pipette, to remove minor polymerized contaminants) and injected into ethanol-water (12 mL/42 mL) mixtures to obtain final 30% ethanolic solutions at a concentration of 1 mg/mL trioxaamine. This solution was placed at 5°C for 18 hours, where it transformed into an opaque gel-like suspension. UV-polymerization was performed on 5 mL batches in a UV-Crosslinker (Bio-Link BLX-E254, 5 x 8 W 254 nm tubes). The batches were UV irradiated in open 6-well culture plates for 10 minutes at 254 nm. During the UV-irradiations

the suspensions turned dark blue. See Figure S4: Photo-polymerization of ethanolic solutions of surfactant (1).

The dark-blue suspensions were acidified by adding 50 μL diluted chlorhydric acid (1 N) to each of the 5 mL batches, which were transferred in 15 mL Falcon tubes. The suspensions were then heated under sonication at 55°C for 1 hour. This led to a drastic color change. The suspensions turned crimson red, and the polymerized aggregates dissociated into small nano-fibers. These are highly fluorescent. Their homogeneity can be assessed by direct observation by fluorescence microscopy (rhodamine filter set, 600 fold magnification). UV-Vis spectra of each batch were recorded on 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suspensions in water. The samples with highest optical density OD were selected for further biological evaluation.

See Figure S5: (A) Formation of the fluorescent crimson red Nanofibers PDA-Nfs

Dialysis of Polydiacetylenic nanofibers (PDA-Nfs)

A small batch was extensively dialyzed for 72 hours in a dialysis cassette (Float-A-Lyzer G2 MWCO 3500) in 1 L 30% ethanol/water solution acidified with 1 mL concentrated hydrochloric acid. This procedure aimed to remove all traces of remaining monomer. Dialyzed and non-dialyzed samples showed unchanged siRNA complexation ability (see gel retardation assay Figure S7).

Electron microscopy of the PDA-Nfs (LVEM)

The samples of PDA-nanofibers were analyzed by low voltage transmission electron microscopy at 5 kV with the benchtop Low-voltage Electron Microscope LVEM5 (Delong instruments). Observation at low voltage 5000 V permits the direct observation with high contrast of objects composed only of light elements without using heavy metal staining or shadowing. This way native structures of organic materials that exist in solution can be observed directly. For optimum contrast, we used Ultrathin carbon grids with 3 – 4 nm thickness (Ultrathin C Type-A grids from TED Pella INC). The protective formvar layer was removed by dipping the grids in chloroform following manufacturer's instructions. The carbon grids were then ionized in a Glow discharge system ELMO for EM grids (Cordouan technologies). A glow discharge treatment with air renders the hydrophobic carbon film surface negatively charged and hydrophilic, which allows for optimal wetting with the

sample solutions and attachment of analyzed nanomaterial (that is positively charged in our case, with positive zeta potential). The parameters used are as follows: 25 seconds flow of plasma discharge at 0.1 – 0.15 mbar atmosphere and 1.2 – 1.4 mA. Ionized grids were treated for 1 minute with 5 μ L samples at 1 mg/mL surfactant concentration, dried over filter paper and analyzed directly without further preparation with the LVEM5 in TEM mode at 150 000 – 200 000 fold magnification. [See figure 1B in main text.](#)

UV-VIS spectra of Nanofibers

UV-Vis spectra were recorded with the double beam spectrometer Cary 100 Bio UV-Vis (ELO50-73007; Varian). Nanofiber suspensions were diluted in pure water (30 μ g polymerized C₂₅diyne-trioxaamine in 1 mL water). The absorption maxima were determined (λ_{max} .) from these spectra.

The red biologically active form has the following spectral characteristics:

$$\lambda_{\text{max}(1)} = 506 \text{ nm (OD = 0.660)} ; \epsilon_{506 \text{ nm}} = 220 (100 \text{ mL} \times \text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$$

$$\lambda_{\text{max}(2)} = 547 \text{ nm (OD = 0.836)} ; \epsilon_{547 \text{ nm}} = 279 (100 \text{ mL} \times \text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$$

[See Figure S5: \(C\) UV-Vis absorption spectrum of the diluted PDA-Nfs solution.](#)

Fluorescence spectroscopy of PDA Nanofibers

Fluorescence emission and excitation spectra were recorded on Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-5301. The maximum excitation and excitation wavelengths were first determined in a step-wise approach. The corresponding excitation and emission spectra were then recorded using the most efficient excitation and emission wavelengths using the following parameters: the excitation spectrum was recorded from 400 nm to 630 nm, at the maximum emission wavelength of 646 nm. A split width of 10 nm for both emission and excitation, low sensitivity and slow scan speed were used as standard settings. The emission spectrum was recorded from 565 nm to 800 nm at the maximum excitation of wavelength of 550 nm. A split width of 10 nm for both emission and excitation, low sensitivity and slow scan speed were used as standard settings.

$$\lambda_{\text{excit(max)}} = 550 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emission(max)}} = 646 \text{ nm}$$

Notably, a large energy gap (> 100 nm) separates fluorescence emission maximum from excitation maximum (Stokes shift). See Figure 2 (main text)

Size analysis by dynamic light scattering (DLS)

The mean size of the PDA-nanofibers was determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). The samples were diluted in water (10 µg in 1 mL). We used following settings for size determination and for zeta-potential measurement: refractive index of the particles 1.43; viscosity of the solvent 0.8872 cP; dielectric constant 78.5 at 25°C. The mean size of the biologically active PDA-nanofibers was 778 nm (center weighed by number, mean of 5 measurements) and 744 nm center weighed by volume, mean of 5 measurements) showing a low polydispersity index PDI of 0.66. Setting the following specifications: automatic sampling; refractive index of water; temperature = 25°C. The values correspond to average size ± standard deviation of three runs. The zeta potential of the same sample showed to be as high as 52.5 mV (mean of 3 runs). See Figure S6 (A) and (B) Dynamic light scattering (DLS) and Zeta-potential measurement of the PDA-Nfs (Nanosizer, Malvern Instruments).

Gel retardation assay

Fluorescently labelled siRNA (Cy5-siLuc, 23.8 pmoles siRNA, equivalent to 1000 pmoles phosphate groups 'P') were incubated with increasing amounts of PDA-nanofibers in Hepes Buffered Glucose (HBG, pH 7.5, completed to 20 µL). The resulting siRNA-nanofiber complexes have increasing N/P ratio ranging from 1/1 to 7/1. N/P ratios are defined by the number 'N' of amine groups from the trioxamine Nanofibers (being positively charged), versus the number 'P' of negatively charged phosphate groups present in the siRNA (P). Using a constant concentration of 23.8 pmoles siRNA an N/P = 1 ratio was obtained by adding 0.6 µL of the PDA-Nf solution (1 mg/mL, 1.6 mM) containing 1000 pmoles monomer. For the different N/P values, simple multiples of the nanofiber solution were used accordingly. After 1 hour incubation time at 25°C we added 3 µL 50% Glycerol in HBG solution to each sample, then loaded them onto a 1.2% agarose gel in Tris-Acetate buffer (pH 7.5, 40 mM). The electrophoresis of the siRNA-nanofiber complexes was performed at 80 V during a run time of 30 minutes. The electrophoresis gel was analyzed with the

ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare Lifescience Inc) using Red Epi light (630 nm) and R670 Cy5 filter. For N/P values > 4 no free siRNA could be detected. Free uncomplexed siRNAs such as shown in the left lane (see figure) migrate as a discrete band. Moreover the dialyzed nanofibers showed the same complexation potential as the non-dialyzed PDA-Nf solution. See Figure S7 (A) and (B): Complexation of siRNA by the PDA-Nfs analyzed by gel retardation assays.

Biology part:

Materials and methods

siRNA used *in vitro* and *in vivo* experiments

siRNA were synthesized by Eurogentec, provided in annealed form and HPLC purified.

Sequences are as follows with: **TT** (DNA bases)

siLuc:

GI3-ssSIRNA: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A **TT**-3' (sense strand)

GI3-asSIRNA: 5'-U CGA AGU ACU CAG CGU AAG **TT**-3' (antisense strand)

siLuc4.5:

GI4.5-TT –ssRNA: 5'- GGA CGA GGA CGA GCA CUU C **TT**-3'(sense strand)

GI4.5-TT –asRNA: 5'-GAA GUG CUC GUC CUC GUC C **TT**-3' (antisense strand)

siLim1:

Lim-ssSIRNA: 5'-CCGGUGUUUCGGUACCAA**TT**-3' (sense strand)

Lim-asSIRNA: 5'-UUUGGUACCGAAACACCGGAA-3'(antisense strand)

siCtl:

Ctl-ssSIRNA: 5' -CGU ACG CGG AAU ACU UCG **ATT**-3' (sense strand)

Ctl-asSIRNA: 5'-U CGA AGU AUU CCG CGU ACG **TT**-3' (antisense strand)

siLuc-Cy5 :

ssSIRNA: 5'- Cy5-CUU ACG CUG AGU ACU UCG **ATT**-3' (sense strand)

asSIRNA : 5'-U CGA AGU ACU CAG CGU AAG **TT**-3' (antisense strand)

Cell culture

A549-Luc cell line

A549-luc cells that stably express the reporter gene luciferase were established by Dr. J.-L. Coll's group (Institut Albert Bonniot, Université de Grenoble), by transfecting the human lung carcinoma cells A549 (CCL-185; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) with pGL3-Luc plasmid (Clontech, Mountain View, CA, USA). Cells are grown in RPMI 1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% FBS (Eurobio), 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin, Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France) and maintained under 800 µg/mL of G418 selection antibiotic (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

786-O cell line

The human renal cancer cell line 786-O, of the CCC type, was obtained from American Type Culture Collection (Manassas). Cells were maintained in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Gibco) in a 10% CO₂ atmosphere. 786-O cells stably transfected either with pGL4.50[luc2/CMV/hygromycin] (Promega), or pVITRO2-LGFP-Lim1 (InvivoGen, Toulouse, France) were also used and maintained in the same medium supplemented with the antibiotic hygromycin for selection of transfectants (200 µg/mL, Gibco).

RNA interference

A549-Luc cell line

Twenty-four hours prior to transfection, 2.5×10^4 A549 Luc cells were seeded per well in 24-well tissue culture plates (Corning, NY, USA). The required amounts of siRNA duplexes were diluted up to 100 µL in HBG (Hepes Buffered Glucose: 20 mM Hepes pH 7.5, 5% glucose, sterile filtered). Nanofiber solutions were added and the samples were mixed and incubated 60 min at room temperature to favor association between siRNA and PDA-nanofibers. Targeting luciferase (siLuc) or control (siCtl) siRNA-nanofiber solutions were then added onto the cells in serum free medium. After 4 h of incubation, the medium was replaced by fresh RPMI medium containing 10% serum. For initial screening, experiments were done in duplicate, and then confirmed in quadruplicate assays. [See Figure 3 in main text Efficacy of](#)

Nanofibers (PDA-Nfs) to silence luciferase reporter gene in A549-Luc cell line at 10 nM concentration.

786-O cell line^{1,2}

As with the previous cell line 786-O wt or expressing luciferase or overexpressing Lim-1 cells were seeded in 24-well plates (25 000 cells/mL) and grown for 24 h. Complexes of PDA-Nfs/Lim-1-targeting siRNA (siLim1, Life technologies, Courtaboeuf, France), or control siRNA (siCtl, Life technologies) or luciferase-targeting siRNA (siLuc4.5, Eurogentec, Angers, France) were also prepared in HBG buffer and matured for 1 h. Cells were transfected in the absence of serum and after 4 h, serum was added (10% fetal bovine serum). Luciferase or Lim-1 expression was analyzed after 48 hours.

Commercial transfection agent jetPRIME™ (POLYPLUS-transfection, Illkirch, France) was chosen as positive control at 10 nM siRNA concentration using standard protocols from POLYPLUS-transfection, siRNA complexes being formed in provided jetPRIME buffer.

Luciferase quantification

Quantification with automated luminometer

Luciferase gene expression was determined on cell lysates (100 µL 1/5 diluted lysis buffer: Promega Cell Culture Lysis 5x Reagent). The luciferase activity was quantified on 2 µL of cell lysate (after a 5 minutes centrifugation at 14000 g) in white 96-well plates with the Centro LB luminometer (Berthold, Thoiry, France). Following parameters were used: 50 µL of the luciferase substrate (Luciferase Assay Substrate, Promega, France) were automatically distributed ahead of each measurement, plate shaken for 3 seconds then bioluminescence was quantified over 1 second. Luciferase activity was compared to non-transfected cells and with cells being transfected with control siRNA (siCtl, non-matching sequence).

Protein concentration in cell lysate was measured by using BCA assay kit (Interchim, Montluçon, France), according to manufacturer's instructions on 15 µL cell lysates. After expressing the luciferase activity as relative light units integrated over 10 s per mg of cell protein (RLU/10 s/mg protein), the luciferase gene silencing was calculated relative to the luciferase activity of non-transfected A549-luc cells.

Quantification by bioluminescence imaging

After 48 h of transfection, the culture medium of 786-O cells expressing luciferase was supplemented with luciferin at 150 µg/mL (Promega) and the cell plates were incubated for 10 minutes in the dark before imaging. This period of time allows the oxidation of the luciferin and the emission of quantifiable photons by the action of the luciferase. The intensity of the bioluminescence is then evaluated using the "Fusion FX7" imager (Vilber-Lourmat, Collegien, France) allowing the acquisition of the signal after 5 minutes of exposure and an Image capture with a cooled CCD camera.

Cell density

To evaluate the cytotoxicity of PDA-Nfs, we assessed cell density using the crystal violet staining method. Cells were fixed with 10% paraformaldehyde (Sigma-aldrich) and then stained with 0.1% crystal violet dye (Sigma-aldrich). After treatment with acetic acid at 33%, the coloration was measured with a UV-Vis spectrophotometer (Cary, Varian Instruments) at 590 nm. The intensity of coloration obtained is proportional to the cell density

Real-time quantitative PCR analysis

786-O cells and tumors total RNAs were extracted using the Trizol method according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Fisher scientific). Then, 1 µg of total RNA were reverse transcribed using non-specific primer p(dT)15 according to the supplier's protocol (IscripTM cDNA synthesis script, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Complementary DNAs specific for each mRNA were amplified using the 'SsoAdvancedTM Universal SYBR[®] Green Supermix' kit (Biorad) in the CFX ConnectTM Real-Time System (Biorad). Sense and antisense primers used were as follows: Lim-1 (primers designed by Biorad and provided as a mixture) PrimePCRTM SYBR[®] Green Assay, Bio-Rad), cyclophilin A (forward primer: CCACCGCCGAGGAAAACCG; reverse primer: TGGACAAGATGCCAGGACCCGT), 18S (forward primer: CTCCACAGGAGGCCTACAC; reverse primer: CTTCGGCCACACCCTTAAT, Eurogentec).

In vivo experiments^{1,2}

Xenograft tumor Model

All animal studies were in compliance with the French animal use regulations. A total of 10 million 786-O cells were injected subcutaneously into the skin of the back of 4-weeks-old athymic male mice (SWISS nu-/nu-; Charles River Laboratories, l'Arbresle, France). After one

month and when 786-O tumors had grown to an overall volume of 300 mm³, mice were randomized in three groups. The protocol was intra-peritoneal (ip) injection of PDA-Nfs/siLim1 or PDA-Nf/siCtl complexes at 0.2 mg of siRNA per kg of mouse and a N/P = 6 ratio of PDA-Nfs. After 48h of treatment, animals were euthanized and the tumors were harvested and snap-frozen for PCR or Western blot analysis.

Western blot analysis

Protein extraction and membrane preparation were performed as described (Massfelder *et al.*, 2004)^{1,2}. Membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate dilution of the primary antibody: anti-Lim1 (1:3000; abcam, Cambridge, UK). For visualization of protein gel loading, an anti-β-actin (1:20000; Sigma-aldrich) antibody was used. The appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used. Immunoreactivity was visualized with the enhanced chemiluminescence immunoblotting detection kit (Millipore, Molsheim, France). **See Figure 5B in main text: Efficacy of PDA-Nanofibers (PDA-Nfs) to carry small interfering RNA *in vivo* by Western blot analysis**

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± s.e.m. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keul’s test for multiple comparisons. A *P*<0.05 was considered significant (statistical analysis done with Prism 7™ scientific software by GraphPad™).

See Figure S10: Efficacy of PDA nanofibers (PDA-Nfs) to carry small interfering RNA *in vivo* by qPCR.

References:

- 1 V. Dormoy, D. Jacqmin, H. Lang and T. Massfelder, *Anticancer Res.*, 2012, **32**, 3609–3617.
- 2 V. Dormoy, C. Béraud, V. Lindner, L. Thomas, C. Coquard, M. Barthelmebs, D. Jacqmin, H. Lang and T. Massfelder, *Oncogene*, 2011, **30**, 1753–1763.

SI Figures

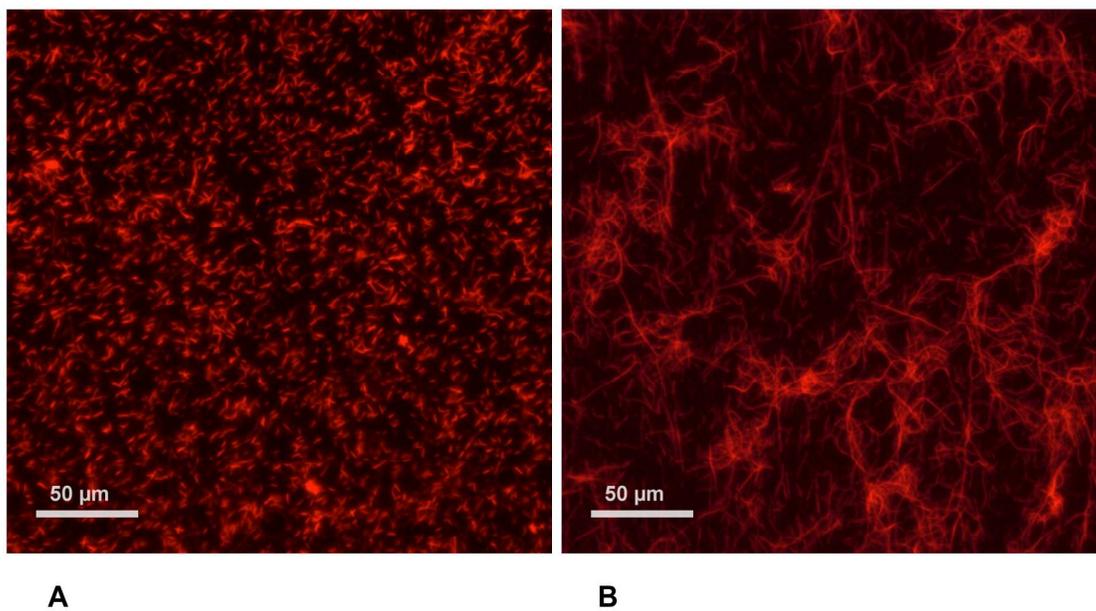


Figure S1: Fluorescence microscopy of **(A)** small PDA nanofibers PDA-Nfs formed with surfactant **(1)**, **(B)** long microfibers formed with histidine grafted analogue **(2)**.

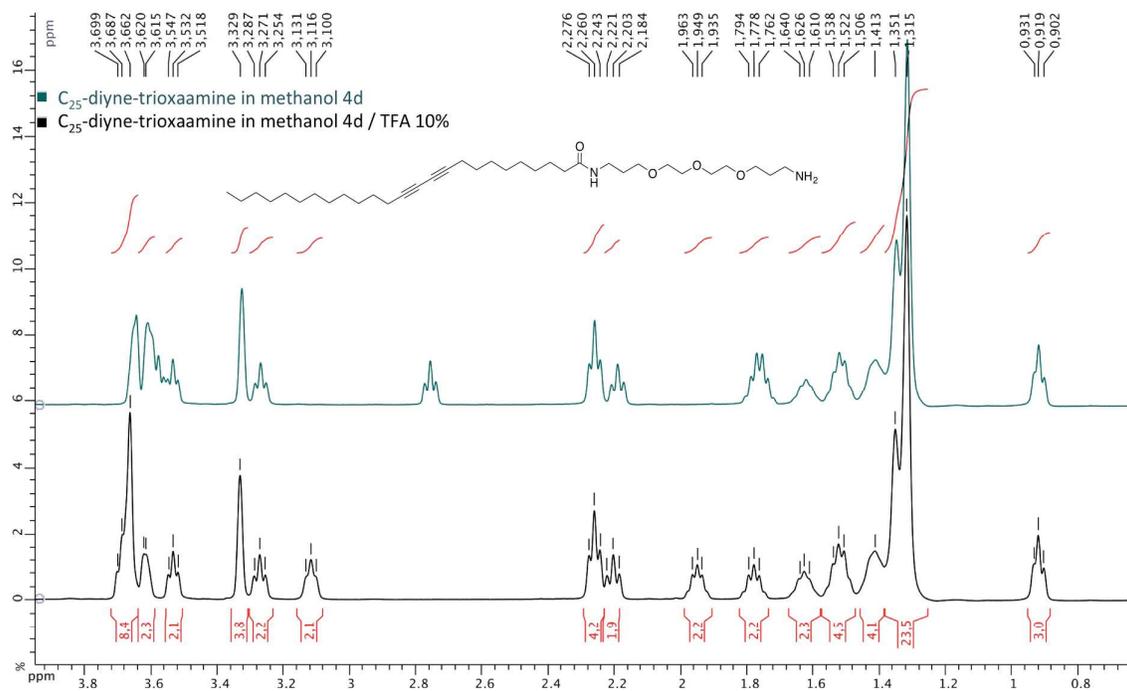


Figure S2: ¹H-NMR analysis of surfactant (**1**). In the upper part is given the spectrum of the neutral form, as isolated by chromatography; in the lower part is given the spectrum of the protonated surfactant (**1**) after addition of TFA in the deuterated methanol.

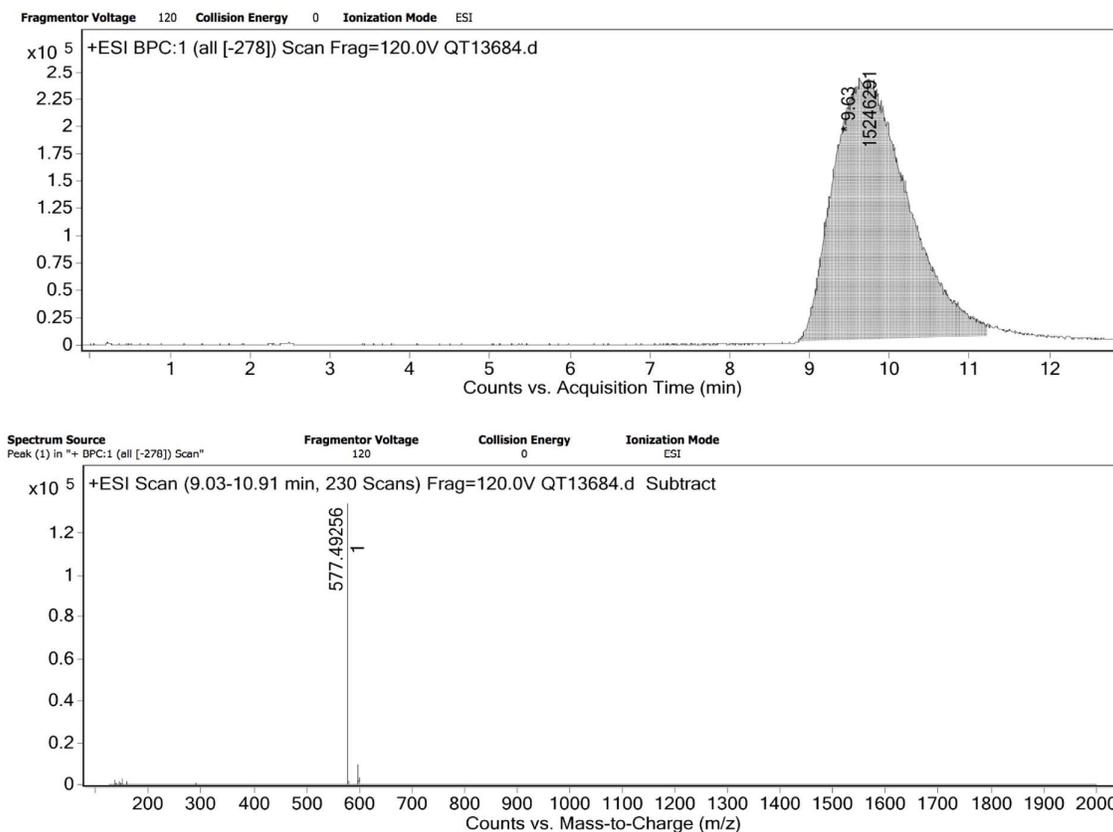


Figure S3: LC-HRMS analysis of surfactant (**1**). In the upper part is given the positive +ESI total ion from the chromatogram. In the lower part are shown the mass peaks in the peak. The exact mass $M+^1H^+$ 577.49256 ion confirms the molecular formula of the molecule (score 96.91%).

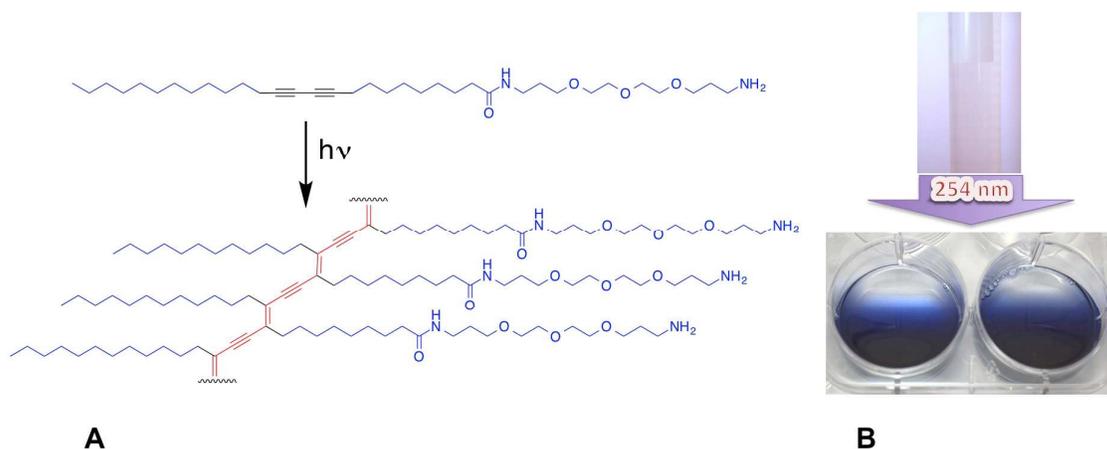


Figure S4: Photo-polymerization of ethanolic solutions of surfactant (**1**). The chemical structure of the conjugated polymer is given in (**A**); in (**B**) we show the initially formed suspension of the blue polymerized fibers (polymerized in sterile 6-well cell culture plates).

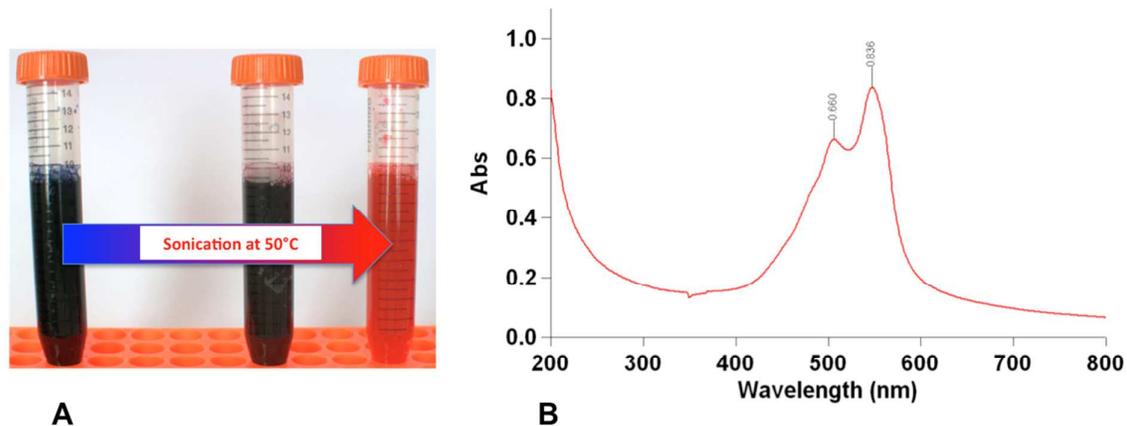


Figure S5: (**A**) Formation of the fluorescent crimson-red Nanofibers PDA-Nfs out of the initially blue solution, (**B**) UV-Vis absorption spectrum of the diluted PDA-Nfs solution (30 $\mu\text{g/mL}$).

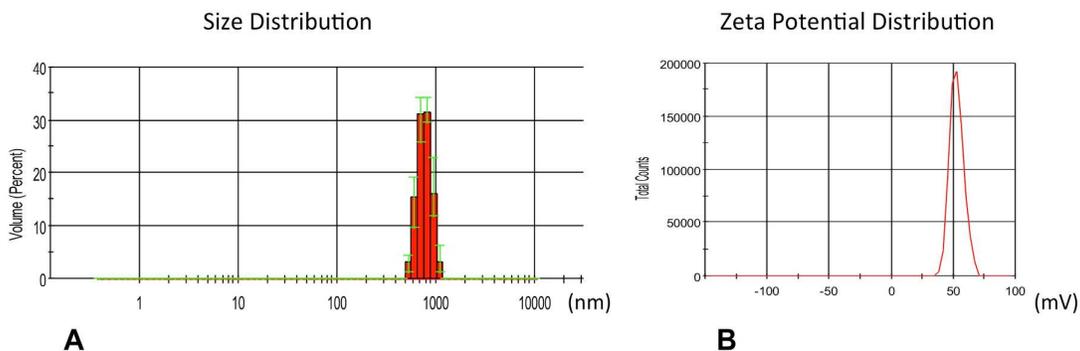


Figure S6: (A) Dynamic light scattering (DLS) (Nanosizer, Malvern Instruments) showing a mean size of the PDA-Nfs around 780 nm; (B) Zeta-potential measurement of the PDA-Nfs (Nanosizer, Malvern Instruments) showing a high positive value of 52 mV .



Figure S7: (A) Complexation of siRNA by the PDA-Nfs analyzed by gel retardation assays, with fluorescently labeled Cy5-siRNA. The siRNAs are completely complexed at $N/P > 4$ (ratio between amino groups of PDA-Nfs and negatively charged phosphate groups of PDA-Nfs). (B) the siRNA complexation potential of dialyzed fibers is unchanged compared to non-dialyzed PDA-Nfs, showing indirectly absence of monomer in non-dialyzed PDA-Nf solution.

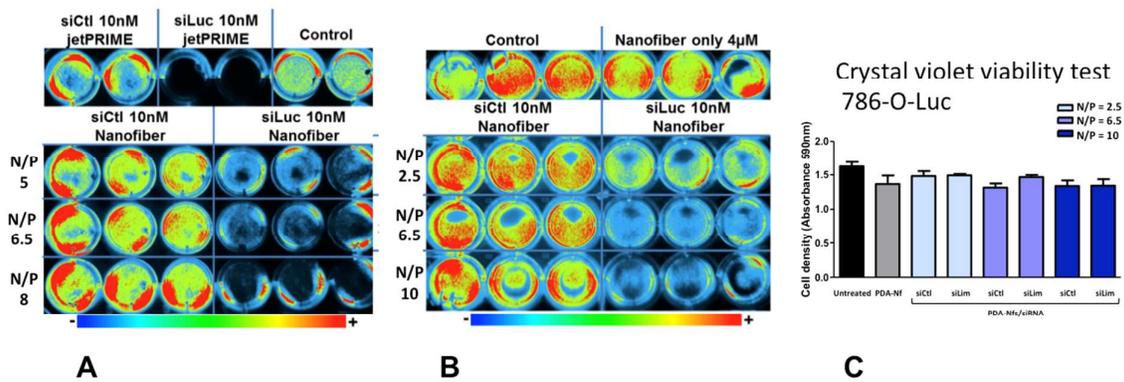


Figure S8: Efficacy of PDA-Nanofibers (PDA-Nf) to carry small interfering RNA *in vitro*. (A and B) Bioluminescence imaging of the 786-O cells expressing the luciferase reporter gene that have been transfected for 48 hours with PDA-Nf-siRNA at various N/P ratios of PDA-Nfs. Visualization has been done on live cells after direct addition of luciferin substrate. So the luciferase expression is quantified by measuring the bioluminescent signal due to oxidation of luciferin substrate. In the two plates (A) and (B) each line has constant PDA-Nfs N/P ratio nanofibers concentration ranging from 2.5 to 10; on the left triplicates of each plate are the cells transfected with control siRNA (siCtI), on the right side triplicate are the conditions with the Luc targeting siRNA (siLuc) showing a high silencing of the luciferase expression. In the plate (A), the silencing efficiency of luciferase using the transfection agent jetPRIME routinely used is comparable to PDA-Nf. (C) The cytotoxicity of PDA-Nf was assessed by crystal violet staining after verification of the luciferase silencing by bioluminescence imaging (B plate). Results are expressed with the absorbance at 590 nm and shown as mean \pm s.e.m., n=3.

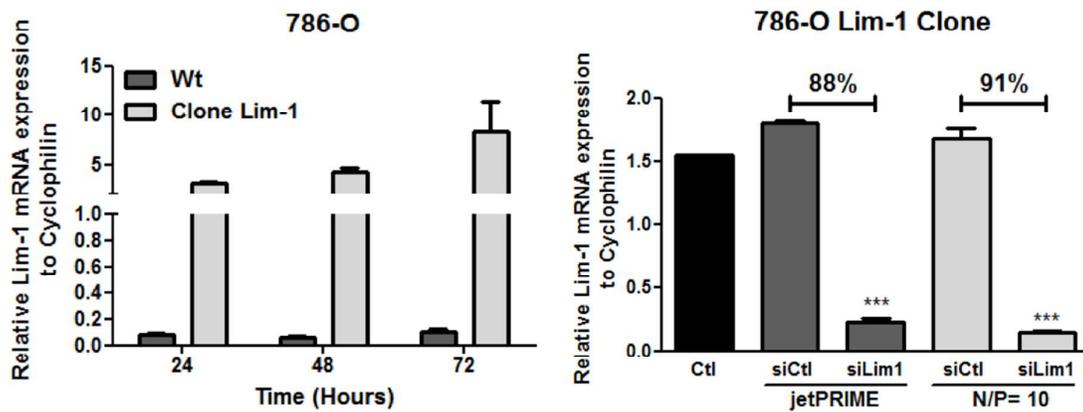


Figure S9: Efficacy of PDA-Nanofibers (PDA-Nfs) to carry small interfering RNA *in vitro*.

(A) Lim-1 mRNA relative expression was measured by real-time quantitative RT-PCR on total RNAs from wildtype 786-O cells (Wt) or 786-O clone overexpressing Lim-1. Results are shown as mean \pm s.e.m., n=4. (B) Lim-1 mRNA relative expression was measured by real-time quantitative RT-PCR on total RNAs from 786-O clone over-expressing Lim-1 transfected with PDA-Nfs/siLim1 versus PDA-Nfs/siCtl complexes at 10 nM siRNA concentrations and at optimum PDA-Nfs concentration (N/P=10). The transfection reagent jetPRIME[®] (POLYPLUS-transfection, Illkirch, France) was used as a positive control. 91% inhibition could be obtained with the PDA-Nfs/siLim system ($100\% - 100 \times \frac{\text{Expression with siLim1}}{\text{Expression with siCtl}}$). Cyclophilin expression was used as housekeeping gene and to calculate the relative expression of Lim-1. Results are shown as mean \pm s.e.m., n=3; ***P<0.001 from siCtl.

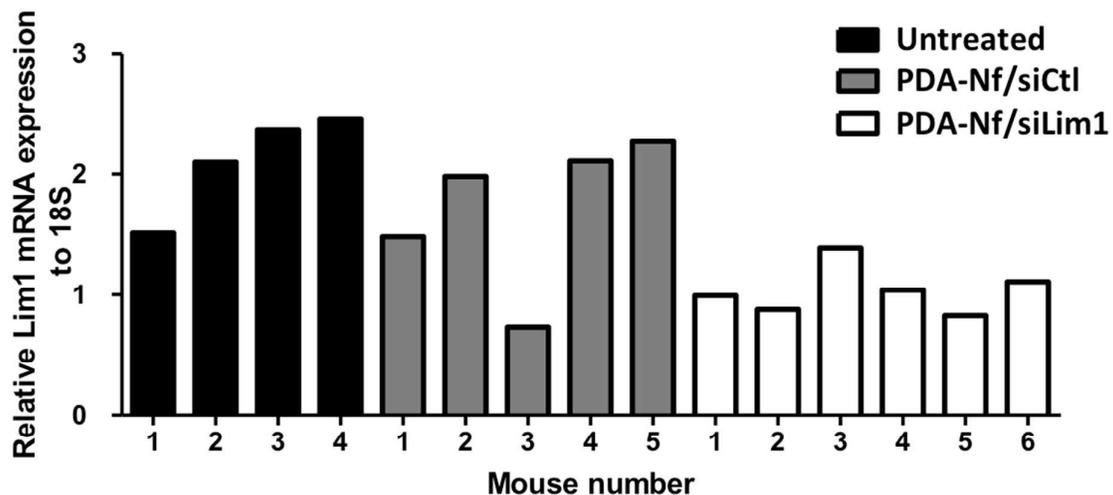
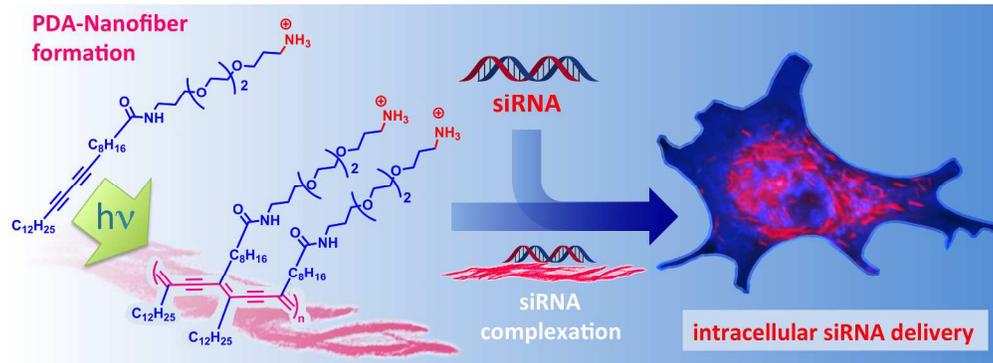


Figure S10: Efficacy of PDA-Nfs to carry small interfering RNA *in vivo* by qPCR (individual values; mean values have been reported in figure 5B in main text)

Nude mice bearing subcutaneously human 786-O tumors were treated (i.p) with PDA-Nfs/siLim1 (targeting Lim-1 expression), PDA-Nf/siCtl complexes or untreated. Efficiency of Lim-1 silencing was analyzed by real time quantitative RT-PCR. 18S expression was used as housekeeping gene and to calculate the relative expression of Lim-1.



1057x384mm (72 x 72 DPI)

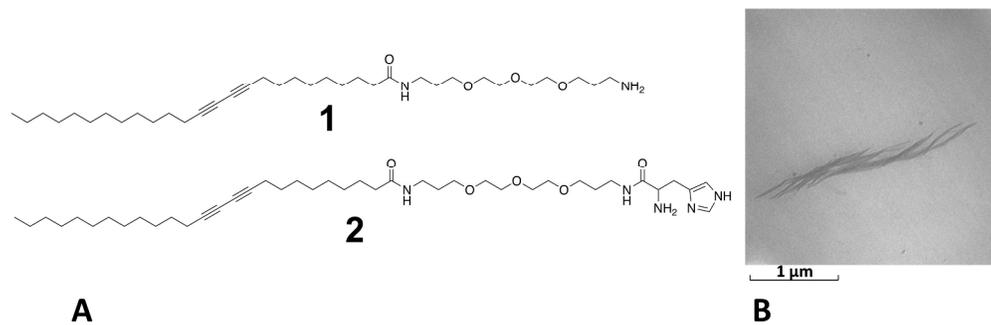


Figure 1: A) structure of diacetylenic surfactant 1 and histidine analogue 2. B) Low voltage electron microscopy of PDA-Nfs.

1056x347mm (72 x 72 DPI)

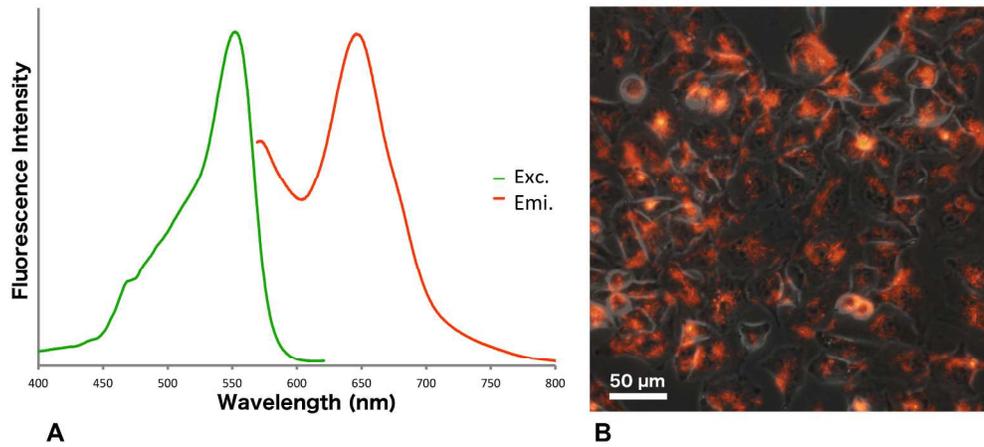


Figure 2: A) Fluorescence excitation (green) and emission (orange) spectra of trioxamine-Nfs (1). B) Fluorescence microscopy of A549-Luc cells transfected with PDA-Nfs/siRNA showing an overlay of phase contrast picture and fluorescence image. A strong internalization of PDA-Nfs/siRNA complexes (with a N/P=13 and a final siRNA concentration of 10 nM) is observed after 24 hours by fluorescence microscopy using the autofluorescence of the PDA-Nfs.

1055x477mm (72 x 72 DPI)

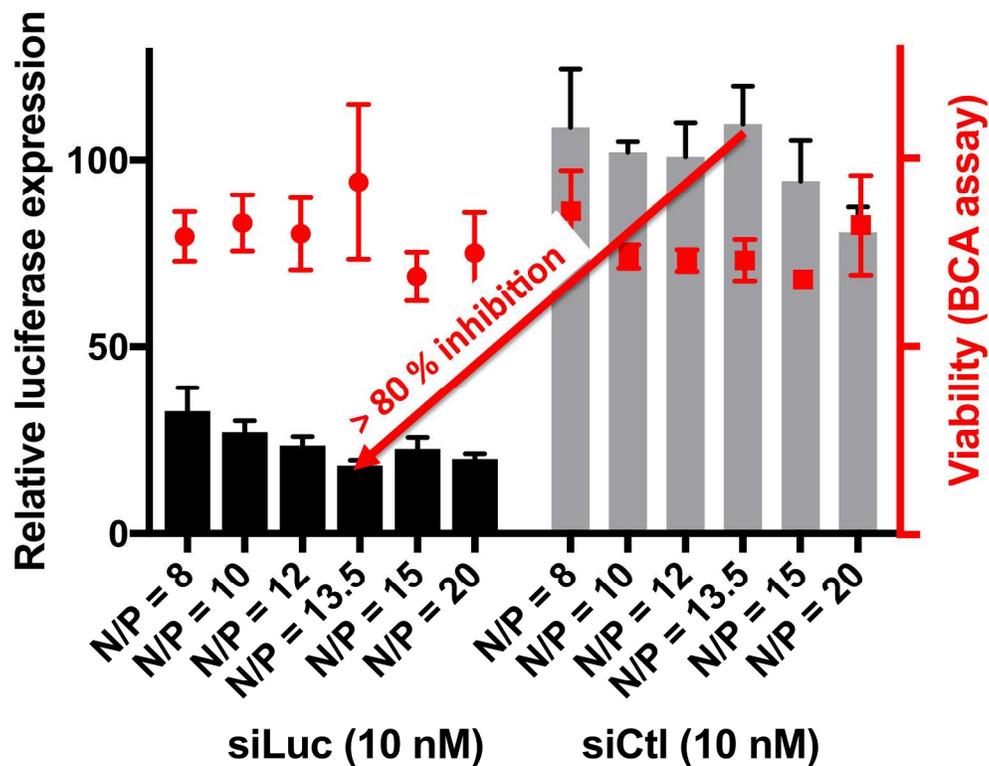


Figure 3: siLuc delivery in A549-Luc cell line at 10 nM siRNA concentration and various N/P ratios (optimal N/P for this cell line at N/P 13.5 shows a silencing of 82%). Viability is measured by total protein quantification and compared to untreated cells.

944x738mm (72 x 72 DPI)

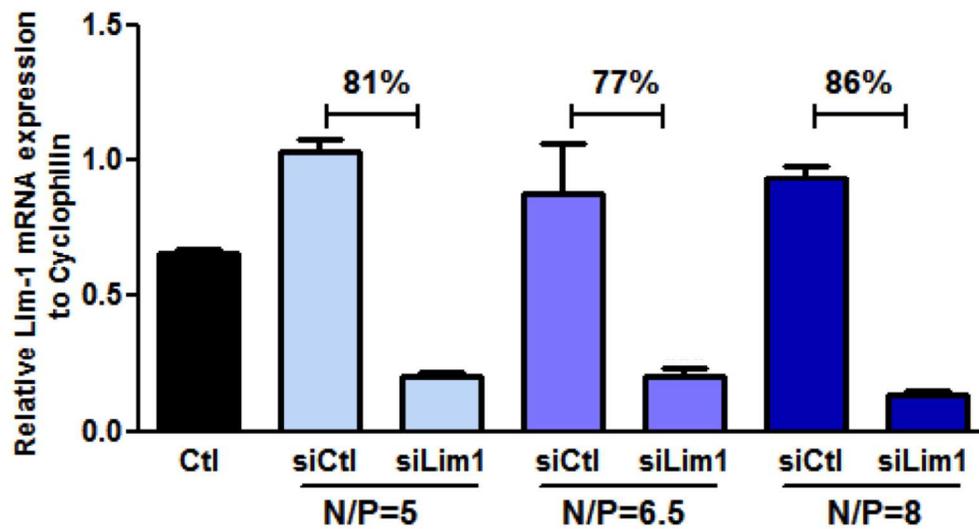


Figure 4: Reduced expression level of endogenous Lim-1 gene in 786-O cells after 48 h treatment with specific (siLim1) and control siRNA at 10 nM siRNA concentration and various concentrations of PDA-Nfs (N/P =5 to N/P = 8).

998x536mm (72 x 72 DPI)

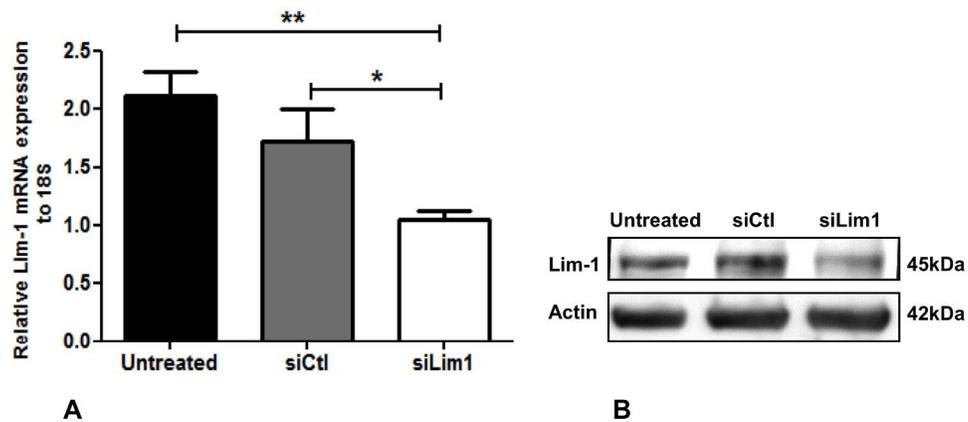


Figure 5: In vivo silencing efficiency of siRNA targeting Lim-1 oncogene (siLim1) in subcutaneous xenografted 786-O cells in nude mice. (A) qPCR quantification of the expression level of Lim-1 gene relative to the housekeeping gene 18S. Average results shown as mean \pm s.e.m., Untreated n=4, PDA-Nfs/siCtl n=5, PDA-Nfs/siLim1 n=6; **P<0.01 from Ctl; *P<0.05 from siCtl (B) Western blot analysis of the expression level of the Lim-1 gene as compared to the actin protein. Each plot represents a pool of all tumor extracts from the same group

1012x440mm (72 x 72 DPI)

II. Résumé

En parallèle de l'étude sur le rôle de Lim1 dans la progression tumorale dans le CCC, nous avons voulu développer un outil d'extinction de l'expression de Lim1 innovant pouvant être utilisable en thérapie chez l'homme. En effet, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'inhibiteurs chimiques de Lim1. Cette approche translationnelle a été réalisée en collaboration avec une équipe de la faculté de pharmacie (Laboratoire V-SAT, Vecteurs: Synthèse et Applications Thérapeutiques, Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-UdS, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France, Responsable Dr Jean-Serge Rémy), avec pour objectif d'évaluer la capacité d'une nouvelle génération de nanoparticules à véhiculer les siRNAs *in vitro* et *in vivo*.

Les lipides diacétyléniques sont définis par une longue chaîne hydrocarbonée C25 et peuvent s'auto-assembler sous formes supramoléculaires en tubes ou en micelles. Ces lipides peuvent être photopolymérisés par irradiation UV en formant des systèmes dits PolyDiAcétyléniques (PDA) très stables. Dans ce travail, nous avons utilisé l'organisation supramoléculaire en forme de tubes appelée nanofibres polydiacétyléniques (PDA-Nfs). Après synthèse chimique, plusieurs lots ont été établis. Le screening a d'abord été fait sur la lignée de carcinome pulmonaire A549 exprimant la luciférase. Ces PDA-Nfs sont très stables et présentent des propriétés fluorescentes, permettant de vérifier l'efficacité de leur internalisation dans les cellules par de simples observations au microscope à fluorescence. Les meilleurs lots de PDA-Nfs ont été évalués par la suite par notre équipe. L'étude consistait à évaluer la capacité des PDA-Nfs à véhiculer les siRNAs *in vitro* et *in vivo* en utilisant une lignée de CCC humain. *In vitro*, nous avons vérifié leur efficacité à véhiculer les siRNAs sur la lignée de CCC 786-0 exprimant la luciférase. Ensuite, nous les avons utilisés pour éteindre l'expression de Lim1 sur des cellules 786-0 Wt et des cellules surexprimant Lim1. *In vivo*, nous avons étudié l'efficacité de ces PDA-Nfs à véhiculer les siRNAs dans un modèle de xénogreffe en sous-cutané de CCC humain chez la souris *nude*.

Ces vecteurs se sont révélés efficaces à véhiculer les siRNAs et à éteindre l'activité luciférase et l'expression de Lim1 de plus de 90% *in vitro*. De plus, nous n'avons pas observé de cytotoxicité de ces vecteurs *in vitro*, présage de leur innocuité. *In vivo*, dans un modèle de xénogreffe en sous-cutané de CCC humain chez les souris *nude*, une injection unique en ip de complexe PDA-Nfs/siLhx a permis une inhibition significative de l'oncogène Lim1, mise en évidence par RT-qPCR et Western blot.

En conclusion, ces résultats permettent d'identifier les PDA-Nfs comme un nouvel outil de délivrance de siRNAs très prometteur. D'autres études d'évaluation et d'optimisation sont nécessaires pour une meilleure délivrance de siRNAs *in vivo* avant leur utilisation en clinique.

III. Discussion

Les pathologies cancéreuses, les maladies héréditaires et orphelines sont des défis pour la médecine. L'arsenal thérapeutique actuel est essentiellement constitué de molécules chimiques ciblant les protéines, les lipides ou les sucres sans spécificité étroite et dont l'élaboration est longue *et aléatoire*. Le CCC métastatique reste une maladie incurable et résistante aux thérapies, et ce malgré les thérapies anti-angiogéniques actuelles et le développement des nouvelles immunothérapies. Dans le travail précédent, nous avons démontré l'implication de Lim1 dans l'invasion métastatique du CCR et nous avons élucidé les mécanismes par lesquels il intervient dans ce processus. Son expression quasi exclusive dans la tumeur primaire et métastatique est un présage de l'innocuité de l'inhibition de Lim1 et d'un ciblage spécifique de la tumeur et de la métastase contrairement aux thérapies anticancéreuses actuelles qui ciblent aussi bien la cellule cancéreuse que la cellule saine, ce qui explique l'importance des effets indésirables et la mauvaise tolérance clinique. Lim1 fait partie de la grande famille des protéines à domaine LIM qui sont exprimées de façon ubiquitaire et impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Kadmas et Beckerle, 2004). Cette famille présente des analogies structurales au niveau du motif très conservé LIM. La possibilité de développer un inhibiteur chimique de Lim1 reste limitée par le fait qu'il s'agit d'un facteur de transcription présentant des analogies avec les autres membres de sa famille, d'où un réel problème de spécificité. Le développement de tels outils serait certes important mais prendrait plusieurs années pour un coût non négligeable et sans assurance de succès ni de spécificité.

L'ARN interférence a apporté un nouveau regard sur les thérapies du futur en offrant de vastes options thérapeutiques. A l'inverse des molécules chimiques usuelles, l'ARN interférence permet de cibler très spécifiquement un gène et conduit à son extinction. De plus, à l'inverse des thérapies géniques, l'ARN interférence ne modifie pas le génome de l'individu traité.

A la suite du travail précédent et dans une approche translationnelle, nous avons imaginé une approche innovante applicable en clinique à base de RNA interférence ciblant Lim1 véhiculés par des systèmes nanométriques. Ce travail a été réalisé en collaboration avec une équipe de la faculté de pharmacie (Laboratoire V-SAT, Vecteurs: Synthèse et Applications Thérapeutiques, Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-UdS, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France, Responsable Dr Jean-Sergé Rémy).

Depuis la découverte de l'ARN interférence en 1998 par Andrew Z. Fire et Craig C. Mello (Fire *et al.*, 1998), de nombreuses tentatives ont été réalisées pour transposer cette stratégie en clinique, notamment dans le domaine de la cancérologie, afin de cibler spécifiquement les oncogènes activés (Davis, 2009; Howard, 2009). Malgré d'énormes efforts dans la conception des véhicules de siRNAs, le succès thérapeutique a été entravé par la faible efficacité de la livraison des siRNAs *in vivo* en

raison de l'instabilité de ces petits ARNs dans la circulation sanguine et leur faible affinité pour les agents de transfection (Bolcato-Bellemin *et al.*, 2007).

Les siRNAs présentent de petites hélices β étant des structures en forme de tige. Leur rigidité et leur petite taille confèrent une liaison électrostatique réduite aux agents de transfection (Neuberg et Kichler, 2014). De nombreuses tentatives ont été faites pour augmenter l'affinité du véhicule pour les siRNAs en introduisant des groupes stabilisants dans l'agent de transfection (Creusat *et al.*, 2012).

L'équipe du Dr Jean-Serge Rémy a pu développer une nouvelle génération de véhicules de siRNAs (une première mondiale). Il s'agit de polymères diacétyléniques hyper-conjugués et hautement polymérisés par irradiation UV, ce qui conduit à une réticulation intermoléculaire et à la stabilisation accrue de ces vecteurs et ainsi à une grande affinité pour les siRNAs.

Les lipides diacétyléniques monomères, basés sur une longue chaîne hydrocarbonée C25 contenant des triples liaisons conjuguées, peuvent s'auto-assembler en une variété de formes supramoléculaires en sphères ou en tubes. La photo-polymérisation par irradiation UV des systèmes diacétyléniques conduit à des systèmes dits PDA (PolyDiAcétylénique).

Par ailleurs, un travail pionnier d'une autre équipe a montré l'efficacité des systèmes PDA micellaires pour la délivrance de drogues *in vivo* (MacKiewicz *et al.*, 2011; Gravel *et al.*, 2013). Cependant, dans ces travaux, peu de choses sont détaillées quant à la manière dont le niveau de polymérisation affecte le potentiel de livraison et la cytotoxicité. L'équipe du Dr Jean-Serge Rémy a récemment décrit que les lipides diacétyléniques, qui forment des micelles, peuvent être photo-polymérisés efficacement et être utilisés pour la délivrance de molécules biologiquement actives (Neuberg *et al.*, 2015).

Dans ce travail, nous avons testé l'organisation supramoléculaire en forme de tubes appelée nano-fibres polydiacétyléniques (PDA-Nfs) à véhiculer les siRNAs *in vitro* et *in vivo*. Il est clair que le système micellaire serait plus intéressant par sa très faible taille de l'ordre de quelques μm et sa facilité de circulation *in vivo*. Malheureusement, les travaux préliminaires utilisant ces formes micellaires n'ont pas permis de démontrer leur efficacité à véhiculer des siRNAs dans les lignées cellulaires de CCC *in vitro* malgré toutes les optimisations effectuées. Pourtant, une internalisation active de ces micelles a été démontrée par microscopie à fluorescence. Nous avons émis l'hypothèse que leur efficacité était entravée par un échappement endosomal.

Des essais de formulation de l'équipe du Dr Jean-Serge Rémy avec différents agents de lipides diacétyléniques ont montré que l'achiral C25 diyne-amine est le meilleur candidat pour former des nano-fibres photo-polymérisables. Les lipides diacétyléniques, une fois placés à 5°C, forment une solution de type gel qui traduit leur auto-polymérisation. Ce gel est fortement photosensible, une étape

d'irradiation sous lumière UV à 254 nm est réalisée pendant 10 minutes. Cette photo-polymérisation initiale forme un système hyper-conjugué qui absorbe fortement la lumière visible montrant une couleur bleu dense. L'application de forces physiques ou chimiques (acidification, chaleur, sonication) induit un changement de couleur : du bleu au rouge pourpre. Dans cette deuxième étape, le précipité bleu foncé se dissocie en PDA-Nfs souhaités.

La caractérisation de ces formulations a permis d'identifier une fluorescence intrinsèque qui facilite l'observation directe par microscopie à fluorescence avec un spectre d'absorption et d'émission respectivement de 550 et 646 nm. Leur taille moyenne est de 780 nm l'équivalent du diamètre d'une mitochondrie, ce qui rend possible leur internalisation dans la cellule.

Effectivement, une internalisation élevée de PDA-Nfs a été démontrée par microscopie à fluorescence. Cela montre l'efficacité de ce système à pénétrer dans les cellules pour la livraison de biomolécules. La solution de nano-fibres diluée 10 fois a montré un potentiel zêta de +52 mV, qui confirme la présence de fonctions amines chargées positivement du côté extérieur, ce qui permet la complexation avec les siRNAs anioniques. Il est important de noter que malgré l'efficacité de l'internalisation de ces systèmes vérifiée par microscopie à fluorescence, l'efficacité de l'administration de siRNAs est conditionnée par un échappement endosomal d'où la nécessité d'évaluer l'efficacité de l'extinction post-transcriptionnelle des siRNAs qu'ils véhiculent.

Des analyses par électrophorèse sur gel ont montré une complexation quasi-totale des molécules de siRNAs avec les PDA-Nfs à des valeurs de N/P autour de 4. Ce rapport définit la teneur totale en amines des PDA-Nfs par rapport au nombre de groupes phosphate présents dans le siRNA (42 phosphates).

Après synthèse chimique, plusieurs lots ont été établis. L'équipe de chimistes a fait le screening des lots efficaces en utilisant la lignée de cellules du carcinome du poumon humain A549-Luc exprimant la luciférase. Le traitement avec les complexes PDA-Nfs/siLuc a montré une extinction de l'activité luciférase jusqu'à 80% avec seulement 10nM de siLuc à partir de N/P=12 de PDA-Nfs. La quantification totale des protéines des cellules transfectées par rapport à celles non traitées permet de renseigner sur la toxicité de ces vecteurs. Les résultats montrent l'absence de toxicité induite par les PDA-Nfs. Les lots les plus performants, ont été validés de cette manière et utilisés pour nos expériences ultérieures.

Dans un premier temps, nous avons vérifié leur efficacité à véhiculer les siRNAs *in vitro* sur la lignée de CCC 786-0 exprimant la luciférase. Ensuite nous les avons utilisés pour éteindre l'expression de

Lim1 sur des cellules 786-0 Wt et des cellules surexprimant Lim1. Enfin, nous avons étudié l'efficacité de ces PDA-Nfs à véhiculer les siRNAs *in vivo* dans un modèle de CCC humain.

In vitro, nous avons montré l'efficacité de ces vecteurs à véhiculer les siRNAs et à éteindre l'expression de la luciférase et de l'oncogène Lim1 de plus de 90%. Cette efficacité du *silencing* est comparable à celle obtenue en routine avec le jetPRIME[®]. Les valeurs N/P optimales étaient inférieures à celles trouvées pour les cellules A549-Luc (N/P entre 5 et 10). Ce qui peut être cellule dépendant. Les études de densité cellulaire par coloration au cristal violet, suggèrent une absence de la cytotoxicité de ces véhicules *in vitro*, présage de leur innocuité *in vivo*. Afin d'évaluer la capacité des PDA-Nfs à inhiber un niveau encore plus élevé d'ARNm, nous avons utilisé un clone stable de 786-0 surexprimant Lim1 jusqu'à 80 fois par rapport au 786-0 Wt. Avec seulement 10 nM de siLhx complexés avec PDA-Nfs à N/P = 10 une diminution de l'expression de Lim1 de 90% a été retrouvée.

In vivo, nous avons vérifié l'efficacité de ces PDA-Nfs à transporter des siRNAs, dans un modèle de xéno greffe en sous cutané de CCC humain chez les souris *nude*. Une injection unique en ip de complexes PDA-Nfs/siLhx (0.2mg/Kg N/P=6) a permis une inhibition significative de l'expression de Lim1 mise en évidence par RT-qPCR et Western blot après 48h de traitement. Le ratio N/P=6 choisi est le N/P optimal retrouvé *in vitro* et il se retrouve dans la marge d'utilisation de l'agent de commercial jetPEI[®] (Polyplus, N/P= 6-8).

Il faut préciser que la totalité de la tumeur a été analysée afin de vérifier l'homogénéité et la reproductibilité des résultats. Chaque tumeur a été coupée en 2 parties, une pour l'analyse Western blot et l'autre partie pour l'analyse RT-qPCR. Les tumeurs rénales sont connues pour leur hétérogénéité. Pour éviter ces problèmes d'hétérogénéité et donc des résultats artéfactuels, six extraits protéiques et d'ARN ont été réalisés pour chaque tumeur et ensuite analysés individuellement et après regroupement de tous les extraits. Tous les résultats étaient similaires entre les extraits, ce qui confirme nos résultats.

Des expériences préliminaires similaires à celles ci-dessus avaient été réalisées avec des cellules 786-0 exprimant la luciférase, xéno greffées en sous-cutané chez la souris *nude*. Là encore, l'injection ip des complexes PDA-Nfs/siLuc avait permis une extinction quasi-totale de l'expression de la luciférase après 48h de traitement. L'efficacité dans ce modèle avait été vérifiée par imagerie de bioluminescence donc pas besoin de sacrifier les souris. L'avantage de ce modèle est la possibilité de renouveler le traitement. Une semaine de *wash-out* était observée, le temps nécessaire pour la dégradation des siLuc déjà présents. Ce résultat était reproductible après chaque traitement. L'ensemble de ces résultats confirment l'efficacité de ces PDA en forme de tube à être véhiculés par la circulation sanguine et à délivrer efficacement les siRNAs au site tumoral.

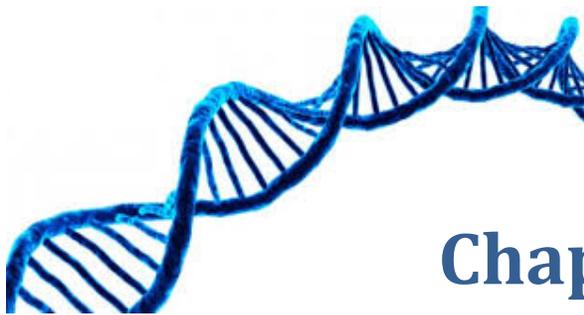
Il est clair qu'une diminution de l'expression de Lim1 de 50% n'est pas satisfaisante, mais il faut savoir qu'il s'agit d'une étude préliminaire et d'une première administration *in vivo* de ces nouveaux outils. Il est possible que les quantités de siRNAs et les ratios N/P ne soient pas suffisantes pour une meilleure efficacité ou alors que l'injection ip altère la biodisponibilité des complexes dans la circulation sanguine et donc dans le site tumoral.

Dans le présent travail, nous avons pu montrer pour la première fois que les PDA-Nfs, une nouvelle classe de véhicules, sont des agents permettant de délivrer des siRNAs *in vivo* très prometteurs aussi bien *in vitro* que *in vivo*, qui pourraient également être utilisés pour inhiber spécifiquement l'expression d'autres gènes, dont les produits d'expression ne peuvent être inhibés que par ARN interférence.

Ce travail est une ébauche d'une nouvelle classe de véhicules de siRNAs jamais décrite auparavant. Des perspectives et des optimisations sont en cours. Il est clair que l'avantage d'une cible comme Lim1 avec cette approche nanométrique, est que ce facteur n'est quasiment exprimé que lors du développement comme précisé dans le chapitre précédent, mais des systèmes vectorisés pourront être développés pour d'autres cibles afin d'engendrer le moins d'effets secondaires tout en gardant une très forte activité antitumorale.

Les *nano-carriers* semblent aujourd'hui être des vecteurs de siRNAs très attirants en pré-clinique mais aucun n'est encore arrivé en phase III. Le premier essai clinique utilisant des nanoparticules pour véhiculer des siRNAs date de 2008, CALAA-01. Il s'agit d'un siRNA ciblant la sous-unité M2 de la ribonucléotide réductase (RRM2). C'est une étude de phase I clôturée en 2012, qui avait pour objectif de vérifier la sécurité de cette drogue par voie iv chez les adultes atteints de tumeurs solides réfractaires aux thérapies standards. Cette étude a montré la sécurité de l'administration de nanoparticules par voie systémique. De plus, les biopsies tumorales des patients ont montré la présence intracellulaire des nanoparticules ainsi qu'une réduction de l'expression de la cible au niveau de l'ARNm et de la protéine (Davis *et al.*, 2010). Depuis cette date, seulement six nouveaux essais cliniques (phase I ou II) dans ce domaine ont été établis (www.clinicaltrials.gov). Les recherches sur la nanotoxicité restent primordiales afin d'assurer la sécurité de ces nouveaux outils en développement clinique (Yildirimer *et al.*, 2011). Les vecteurs de siRNAs anioniques sont souvent des molécules cationiques (polymères ou lipides) connues pour leur toxicité. L'inhibition médiée par les siRNAs est transitoire et nécessite des réinjections pouvant être à l'origine de toxicité cumulative. De plus, l'administration par voie systémique présente le plus fort risque de toxicité généralisée due à une accessibilité à la plupart des organes et un ciblage non spécifique. Il est important de prendre en considération les effets *off-target* des siRNAs qui sont parfois imprévisibles à cause de la similitude structurale entre siRNAs et miRNAs endogènes. De plus, ces séquences nucléotidiques peuvent être

reconnues par les TLR (*Tool-like Receptor*) et les activer, favorisant ainsi l'initiation d'une réponse inflammatoire (Robbins *et al.*, 2009; Sioud, 2014). Jusque-là, aucun problème majeur de toxicité n'a été décrit au vu des premiers essais cliniques utilisant des siRNAs (Xue *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017).



Chapitre V

Conclusion et Perspectives



Les travaux présentés dans ce mémoire avaient pour objectif l'étude du rôle du facteur de transcription Lim1 dans l'invasion métastatique du CCC humain dans le but d'identifier un nouvel axe thérapeutique pour le traitement de cette pathologie jusque-là réfractaire à toute thérapie. En parallèle, dans une approche translationnelle, nous avons cherché à développer un système d'inhibition de Lim1 transposable en clinique pour pallier à l'absence d'inhibiteurs chimiques de Lim1.

L'approche expérimentale basée sur des outils *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo* comprenait trois étapes principales : i) l'étude *in vitro* du rôle de Lim 1 dans les mouvements cellulaires et les mécanismes mis en jeu ii) l'analyse de l'expression de Lim1 dans des échantillons métastatiques de CCC humain iii) l'étude *in vivo* du rôle invasif de Lim1.

Les résultats présentés démontrent le rôle *in vitro* de Lim1 dans les mouvements cellulaires. En effet, l'extinction de l'expression de Lim1 par RNA interférence induit une inhibition jusqu'à 60% de la motilité, de la migration et de l'invasion cellulaires ainsi que de la capacité des cellules à former des colonies *in vitro* et cela indépendamment du statut VHL.

De plus, différents acteurs intervenant dans le processus métastatique sont dérégulés avec l'extinction de Lim1, comme ceux impliqués dans l'adhésion cellulaire (Paxilline, fibronectine), l'EMT (Snail1, Twist1/2), la migration et l'invasion cellulaires (MMP1/2/3/8/9).

De plus, en exploitant de nombreux tissus métastatiques et primitifs de CCC humain, obtenus de par la collaboration étroite du laboratoire d'accueil avec le service de Chirurgie urologique et de Pathologie du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg, nous avons montré une expression constitutive de Lim1 qui était plus élevée dans les métastases rénales comparativement à la tumeur primitive d'origine, argumentant encore plus le potentiel métastatique de Lim1.

Finalement, l'étude *in vivo* a montré que l'extinction de Lim1 diminue le développement et la croissance de métastases pulmonaires.

L'ensemble de ces résultats combiné aux données de la littérature confirme l'implication de Lim1 dans la progression du CCC humain et que Lim1 possède tous les critères qui en font une cible thérapeutique très attirante dans le CCC avancé.

Aucun inhibiteur de Lim1 n'est disponible en clinique Aussi, dans la deuxième partie de mon travail, nous avons collaboré avec une équipe de chimistes de la faculté de pharmacie dans le but de développer un outil d'inhibition de Lim1 applicable en clinique. Il s'agit de siRNAs ciblant Lim1 véhiculés par des systèmes nanométriques.

Ce groupe a développé une nouvelle génération de véhicules de siRNAs à base de polymères diacétyléniques hyper-conjugués et hautement polymérisés par irradiation UV. Ces vecteurs se caractérisent par une réticulation intermoléculaire, une stabilité accrue de ces vecteurs ainsi qu'une grande affinité pour les siRNAs.

Nos résultats ont montré l'efficacité de ces vecteurs à véhiculer les siRNAs et à éteindre l'activité luciférase et l'expression de l'oncogène *Lim1* de plus de 90% dans la lignée 786-0 *in vitro*. De plus, les études de densité cellulaire ont démontré une absence de cytotoxicité de ces véhicules *in vitro*, ce qui présage de leur innocuité *in vivo*.

Enfin, le modèle de xénogreffe en sous-cutané de CCC humain chez les souris *nude* a permis de valider l'approche *in vivo*. En effet, une injection unique en ip de complexe PDA-Nfs/siLhx a conduit à une inhibition significative de 50% de l'oncogène *Lim1* après 48h de traitement.

Au final, nos résultats valident l'efficacité de cette nouvelle génération de vecteurs à véhiculer les siRNAs aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et démontrent la faisabilité de l'inhibition de *Lim1* avec cette approche *in vivo*. Il est clair que l'avantage d'une cible comme *Lim1* avec cette approche nanométrique, est que ce facteur n'est quasiment exprimé que lors du développement. Ceci assure l'innocuité de l'inhibition de *Lim1* et le ciblage spécifique de la tumeur et de la métastase contrairement aux thérapies anticancéreuses actuelles qui ciblent aussi bien la cellule cancéreuse que la cellule saine, ce qui explique l'importance des effets indésirables et la mauvaise tolérance clinique.

En conclusion, nous avons étayé par différentes approches l'implication du facteur néphrogénique *Lim1* dans le développement de métastases et déchiffré les mécanismes empruntés par *Lim1*. De plus, nous avons validé une nouvelle approche de délivrance de RNA interférence *in vivo* dans le but de développer un inhibiteur de *Lim1* applicable en clinique.

Nous rappelons que dans cette étude 30 métastases d'origine rénale ont été incluses. La recherche d'une corrélation entre le H-score de *Lim1* et le stade pTNM n'était pas statistiquement significative à cause de l'hétérogénéité de la distribution du nombre de métastases par stade. Mais visiblement, il existe une tendance à une corrélation positive entre l'intensité du marquage et les stades pTNM. Afin de confirmer cette corrélation, nous envisageons d'élargir notre cohorte sur un nombre plus élevé de métastases. De plus, d'autres corrélations sont à investiguer entre le niveau d'expression de *Lim1* dans les métastases et le statut clinique, la survie, le nombre de ganglions envahis, le nombre de métastases et la différence entre le niveau d'expression dans les métastases pulmonaires/ganglionnaires et les métastases à distance (cérébrales/hépatiques).

Depuis le début de ma thèse, nous avons voulu mettre en évidence le potentiel invasif de Lim1 *in vivo* sur un modèle de xénogreffe orthotopique original permettant (i) le développement de métastases (ii) leur visualisation par imagerie et (iii) l'inhibition conditionnelle de Lim1. J'ai validé la faisabilité du modèle invasif orthotopique avec des métastases visualisables par imagerie suite à une injection de cellules cancéreuses de CCC exprimant la luciférase sous la capsule rénale chez la souris *nude*. Cependant, le principal obstacle concernait l'inhibition conditionnelle de Lim1 *in vivo* du fait de l'absence d'inhibiteurs chimiques. Il y a eu plusieurs tentatives de conception de système d'inhibition conditionnelle qui n'ont pas fonctionné et qui ont été abandonnées. Notre choix s'est donc porté sur l'extinction de son expression par RNA interférence dans un modèle invasif par voie intra-veineuse qui a tout de même confirmé le rôle invasif de Lim1 *in vivo*.

Avec la validation de l'efficacité des systèmes nano-métriques en particulier *in vivo*, nous pouvons poursuivre nos investigations avec le modèle orthotopique qui permettra d'affiner l'implication de Lim1 dans les différentes étapes du processus métastatique.

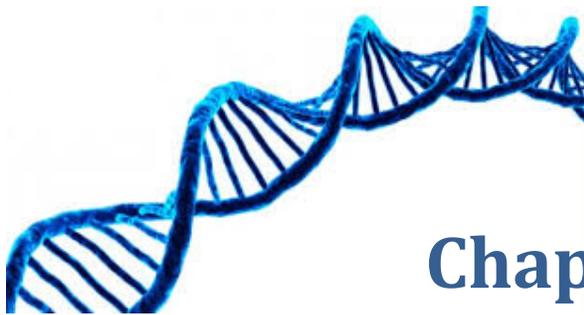
Ce modèle permettra de déterminer l'implication de Lim1 (i) dans le développement de la tumeur primaire (inhibition de Lim1 dès l'implantation des cellules cancéreuses), (ii) sur l'installation des métastases (inhibition de Lim1 une fois la tumeur primaire en place et avant détection des métastases), (iii) sur la croissance des métastases (inhibition de Lim1 après la détection de métastases). De plus, à plus long terme, ce modèle pourra élucider l'intérêt clinique de son ciblage. Pour citer quelques exemples, il peut également être envisagé de mimer le protocole thérapeutique en clinique actuel chez l'homme en réalisant une néphrectomie du rein implanté chez la souris en inhibant Lim1 seul ou en combinaison avec les thérapies ciblées actuelles. Certes, ce modèle n'est pas transposable chez l'homme mais les données générées serviront de bases solides aux études translationnelles et à visée clinique.

A la fin des expériences, l'impact de son inhibition sur les différents processus cellulaires (mouvement, prolifération, apoptose, angiogenèse) sera étudié au niveau des tumeurs primaires et des métastases; par immunohistochimie, RT-qPCR, Western blot et *proteome arrays HTG EdgeSeq Oncology Biomarker Panel Assay* (2560 gènes).

Le laboratoire a établi 30 modèles précliniques du CCR issus de patients. Il s'agit de modèles de xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques de CCR chez des souris *nude*. Le modèle orthotopique a été validé pour le développement de métastases (Lang *et al.*, 2016). Ces modèles constituent un outil précieux pour la conception clinique de nouvelles thérapies. Effectivement, nous envisageons d'étudier l'impact de l'inhibition de Lim1 dans le développement de métastases, dans le modèle orthotopique préclinique dans le but de confirmer l'intérêt clinique de son inhibition dans le CCR.

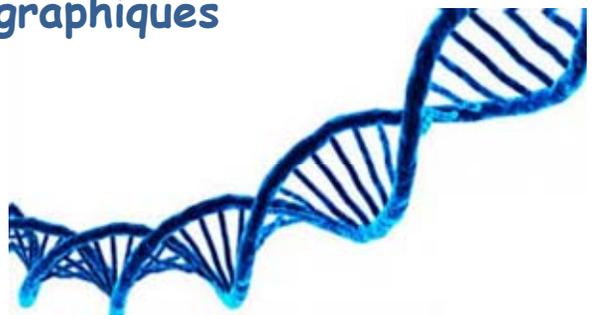
Concernant les résultats de l'approche translationnelle, il est clair qu'une inhibition de 50% de l'expression de Lim1 même significative n'est pas satisfaisante. Des optimisations dans les quantités de siRNAs et des PDA-Nfs sont nécessaires. Plusieurs voies d'administration sont également à investiguer. Une injection IV permettrait probablement une meilleure biodisponibilité des complexes PDA-Nfs/siRNAs qui seront directement disponibles dans la circulation sanguine. Malgré l'absence de cytotoxicité *in vitro*, la toxicité des nanoparticules *in vivo* est redoutable. Des études toxicologiques approfondies *in vivo* sont alors requises pour assurer la sécurité de leur administration en clinique. De plus en dépit de l'absence d'effets de siCtl sur l'expression de Lim1, les effets *off target* sont parfois imprévisibles, il est donc nécessaire de réaliser un RNA *sequencing* pour confirmer la spécificité de l'effet observé. De plus, il est intéressant de confirmer la présence des PDA-Nfs dans la tumeur soit par microscopie à fluorescence après broyage de tissus grâce à leur auto-fluorescence, soit par des analyses histopathologiques.

Il sera également intéressant d'étudier l'effet d'une administration répétée des complexes PDA-Nfs/siLhx en ip sur la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe de CCC en sous-cutané chez la souris *nude* et comparer les résultats avec ceux obtenus dans le travail de Dormoy *et al* 2011.



Chapitre VI

Références bibliographiques



- Abbas, M., Salem, J., Stucki-Koch, A., Rickmann, M., Grunwald, V., Herrmann, T., Hussein, K. (2014). Expression of angiogenic factors is increased in metastasised renal cell carcinomas. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 464(2), 197–202.
- Abdelaziz, A., Vaishampayan, U. (2017). Cabozantinib for Renal Cell Carcinoma: Current and Future Paradigms. *Current Treatment Options in Oncology*.
- Abel, E. J., Culp, S. H., Matin, S. F., Tamboli, P., Wallace, M. J., Jonasch, E., Wood, C. G. (2010). Percutaneous biopsy of primary tumor in metastatic renal cell carcinoma to predict high risk pathological features: Comparison with nephrectomy assessment. *Journal of Urology*, 184(5), 1877–1881.
- Aguiar, D. P., de Farias, G. C., de Sousa, E. B., de Mattos Coelho-Aguiar, J., Lobo, J. C., Casado, P. L., Abreu, J. G. R. (2014). New strategy to control cell migration and metastasis regulated by CCN2/CTGF. *Cancer Cell International*, 14, 61.
- Agulnick, A. D., Taira, M., Breen, J. J., Tanaka, T., Dawid, I. B., Westphal, H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature*, 384(6606), 270–2.
- Akbani, R., Ng, P. K. S., Werner, H. M. J., Shahmoradgoli, M., Zhang, F., Ju, Z., Mills, G. B. (2014). A pan-cancer proteomic perspective on The Cancer Genome Atlas. *Nature Communications*, 5(May), 3887.
- Alizadeh, A. M., Shiri, S., Farsinejad, S. (2014). Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor Biology*.
- Amato, R. J., Hawkins, R. E., Kaufman, H. L., Thompson, J. A., Tomczak, P., Szczylik, C., Harrop, R. (2010). Vaccination of metastatic renal cancer patients with MVA-5T4: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16, 5539–5547.
- An, S., Harang, R., Meeker, K., Granados-Fuentes, D., Tsai, C. A., Mazuski, C., Herzog, E. D. (2013). A neuropeptide speeds circadian entrainment by reducing intercellular synchrony. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(46), E4355-61.
- Ananth, S., Knebelmann, B., Grüning, W., Dhanabal, M., Walz, G., Stillman, I. E., Sukhatme, V. P. (1999). Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. *Cancer Research*, 59(9), 2210–6.
- Anastas, J. N., Moon, R. T. (2012). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(1), 11–26.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415), 770–776.
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmor, A. J., Waschek, J., Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, 8(4), 476–483.

- Aubert, S., Fauquette, V., Hémon, B., Lepoivre, R., Briez, N., Bernard, D., Perrais, M. (2009). MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Research*, 69(14), 5707–5715.
- Bach, I., Carrière, C., Ostendorff, H. P., Andersen, B., Rosenfeld, M. G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes and Development*, 11(11), 1370–1380.
- Bach, I., Rodriguez-Esteban, C., Carrière, C., Bhushan, a, Krones, a, Rose, D. W., Rosenfeld, M. G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nature Genetics*, 22(4), 394–399.
- Barclay, A. N. (2003). Membrane proteins with immunoglobulin-like domains - A master superfamily of interaction molecules. *Seminars in Immunology*.
- Barnes, J. D., Crosby, J. L., Jones, C. M., Wright, C. V, Hogan, B. L. (1994). Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of Xenopus Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis. *Developmental Biology*, 161(1), 168–178.
- Beck, S. D. W., Patel, M. I., Snyder, M. E., Kattan, M. W., Motzer, R. J., Reuter, V. E., Russo, P. (2004). Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 11(1), 71–77.
- Bedont, J. L., LeGates, T. A., Buhr, E., Bathini, A., Ling, J. P., Bell, B., Blackshaw, S. (2017). An LHX1-Regulated Transcriptional Network Controls Sleep/Wake Coupling and Thermal Resistance of the Central Circadian Clockworks. *Current Biology*, 27(1), 128–136.
- Bedont, J. L., LeGates, T. A., Slat, E. A., Byerly, M. S., Wang, H., Hu, J., Blackshaw, S. (2014). Lhx1 Controls Terminal Differentiation and Circadian Function of the Suprachiasmatic Nucleus. *Cell Reports*, 7(3), 609–622.
- Behnes, C. L., Schlegel, C., Shoukier, M., Magiera, I., Henschke, F., Schwarz, A., Loertzer, H. (2013). Hereditary papillary renal cell carcinoma primarily diagnosed in a cervical lymph node: a case report of a 30-year-old woman with multiple metastases. *BMC Urology*, 13(1), 3.
- Bellocco, R., Pasquali, E., Rota, M., Bagnardi, V., Tramacere, I., Scotti, L., La vecchia, C. (2012). Alcohol drinking and risk of renal cell carcinoma: Results of a meta-analysis. *Annals of Oncology*.
- Bendas, G., Borsig, L. (2012). Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International Journal of Cell Biology*.
- Bensalah, K., Leray, E., Fergelot, P., Rioux-Leclercq, N., Tostain, J., Guillé, F., Patard, J.-J. (2006). Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 175(3 Pt 1), 859–63.
- Béraud, C., Dormoy, V., Danilin, S., Lindner, V., Béthry, A., Hochane, M., Massfelder, T. (2015). Targeting FAK scaffold functions inhibits human renal cell carcinoma growth. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 137(7), 1549–59.

- Bergström, A., Hsieh, C. C., Lindblad, P., Lu, C. M., Cook, N. R., Wolk, A. (2001). Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *British Journal of Cancer*, 85(7), 984–990.
- Betsunoh, H., Mukai, S., Akiyama, Y., Fukushima, T., Minamiguchi, N., Hasui, Y., Kataoka, H. (2007). Clinical relevance of hepsin and hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 expression in renal cell carcinoma. *Cancer Science*, 98(4), 491–498.
- Bilim, V., Ougolkov, A., Yuuki, K., Naito, S., Kawazoe, H., Muto, A., Tomita, Y. (2009). Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 101(12), 2005–14.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(12), 915–925.
- Bissig, H., Richter, J., Desper, R., Meier, V., Schraml, P., Schäffer, A. A., Moch, H. (1999). Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *The American Journal of Pathology*, 155(1), 267–74. h
- Bitgood, M. J., McMahon, A. P. (1995). HedgehogandBMPGenes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell–Cell Interaction in the Mouse Embryo. *Developmental Biology*, 172(1), 126–138.
- Blumenthal, E. Z. (1996). On the origin of cancer. *Medical Hypotheses*, 46(6), 581–583.
- Bodnar, R. J., Yates, C. C., Rodgers, M. E., Du, X., Wells, A. (2009). IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 12), 2064–2077.
- Bogenrieder, T., Herlyn, M. (2003). Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, 22(42), 6524–36.
- Bohn, S., Thomas, H., Turan, G., Ellard, S., Bingham, C., Hattersley, A. T., Ryffel, G. U. (2003). Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14(8), 2033–2041.
- Bolcato-Bellemin, A.-L., Bonnet, M.-E., Creusat, G., Erbacher, P., Behr, J.-P. (2007). Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), 16050–5.
- Bonné, A. C. M., Bodmer, D., Schoenmakers, E. F. P. M., van Ravenswaaij, C. M., Hoogerbrugge, N., van Kessel, A. G. (2004). Chromosome 3 translocations and familial renal cell cancer. *Current Molecular Medicine*, 4(8), 849–54.
- Bournazou, E., Bromberg, J. (2013). Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. *JAK-STAT*, 2(2), e23828.
- Bracarda, S., Iacovelli, R., Boni, L., Rizzo, M., Derosa, L., Rossi, M., Hamzaj, A. (2015). Sunitinib administered on 2/1 schedule in patients with metastatic renal cell carcinoma: The RAINBOW analysis. *Annals of Oncology*, 26(10), 2107–2113.

- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q. M., Hwu, W.-J., Topalian, S. L., Hwu, P., Wigginton, J. M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455–65.
- Breen, J. J., Agulnick, A. D., Westphal, H., Dawid, I. B. (1998). Interactions between LIM domains and the LIM domain-binding protein Ldb1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(8), 4712–4717.
- Brierley, J.D., et al. (2017). *TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 8th edn.*
- Brooks, P. C., Strömblad, S., Sanders, L. C., Von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Cheresch, D. A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha\beta 3$. *Cell*, 85(5), 683–693.
- Brugarolas, J. (2014). Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 32(18), 1968–1976.
- Buchheit, C. L., Weigel, K. J., Schafer, Z. T. (2014). Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression. *Nature Publishing Group*, 14(9), 632–641.
- Büchler, P., Gazdhar, A., Schubert, M., Giese, N., Reber, H. A., Hines, O. J., Friess, H. (2005). The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer. *Annals of Surgery*, 242(6), 791–800, NaN-1.
- Buchner, A., Castro, M., Hennig, A., Popp, T., Assmann, G., Stief, C. G., Zimmermann, W. (2010). Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology*, 76(2), 507 e6-11.
- Burger, J. A., Kipps, T. J. (2006). CXCR4: A key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*.
- Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Harlow, E. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60(3), 509–20.
- Callea, M., Albiges, L., Gupta, M., Cheng, S.-C., Genega, E. M., Fay, A. P., Signoretti, S. (2015). Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunology Research*, 3(10), 1158–64.
- Campbell, S. C., Novick, A. C., Belldegrun, A., Blute, M. L., Chow, G. K., Derweesh, I. H., Uzzo, R. G. (2009). Guideline for Management of the Clinical T1 Renal Mass. *The Journal of Urology*, 182(4), 1271–1279.
- Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10), 1113–20.
- Capitanio, U., Cloutier, V., Zini, L., Isbarn, H., Jeldres, C., Shariat, S. F., Karakiewicz, P. I. (2009). A critical assessment of the prognostic value of clear cell, papillary and chromophobe histological subtypes in renal

cell carcinoma: A population-based study. *BJU International*, 103(11), 1496–1500.

Carlomagno, F., Anaganti, S., Guida, T., Salvatore, G., Troncone, G., Wilhelm, S. M., Santoro, M. (2006). BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(5), 326–334.

Carroll, T. J., Vize, P. D. (1999). Synergism between Pax-8 and lim-1 in embryonic kidney development. *Developmental Biology*, 214(1), 46–59.

Casimiro, S., Luis, I., Fernandes, A., Pires, R., Pinto, A., Gouveia, A. G., Costa, L. (2012). Analysis of a bone metastasis gene expression signature in patients with bone metastasis from solid tumors. *Clinical & Experimental Metastasis*, 29(2), 155–64.

Cheng, S. Y., Bishop, J. M. (2002). Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5442–7.

Cheville, J. C., Lohse, C. M., Zincke, H., Weaver, A. L., Blute, M. L. (2003). Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(5), 612–624.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*.

Chou, S. J., Hermes, E., Hatta, T., Feltner, D., El-Hodiri, H. M., Jamrich, M., Mahon, K. (2006). Conserved regulatory elements establish the dynamic expression of Rpx/Hes1 in early vertebrate development. *Developmental Biology*, 292(2), 533–545.

Choueiri, T. K., Escudier, B., Powles, T., Mainwaring, P. N., Rini, B. I., Donskov, F., Motzer, R. J. (2015). Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 373(19), 1814–1823.

Choueiri, T. K., Escudier, B., Powles, T., Tannir, N. M., Mainwaring, P. N., Rini, B. I., Motzer, R. J. (2016). Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(7), 917–927.

Choueiri, T. K., Pal, S. K., McDermott, D. F., Morrissey, S., Ferguson, K. C., Holland, J., Dutcher, J. P. (2014). A phase I study of cabozantinib (XL184) in patients with renal cell cancer. *Annals of Oncology*, 25(8), 1603–1608.

Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 33(5), 543–548.

Chung, B. I., Malkowicz, S. B., Nguyen, T. B., Libertino, J. A., McGarvey, T. W., Liebert, M. A., McGarvey, T. W. (2003). Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma. *DNA and Cell Biology*, 22(8), 533–540.

- Cirio, M. C., Hui, Z., Haldin, C. E., Cosentino, C. C., Stuckenholtz, C., Chen, X., Hukriede, N. A. (2011). Lhx1 is required for specification of the renal progenitor cell field. *PLoS ONE*, 6(4).
- Clague, J., Lin, J., Cassidy, A., Matin, S., Tannir, N. M., Tamboli, P., Wu, X. (2009). Family history and risk of Renal Cell Carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(3), 801–7.
- Clevers, H., Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*.
- Coles, H. S., Burne, J. F., Raff, M. C. (1993). Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development (Cambridge, England)*, 118(3), 777–84.
- Collett, G. D. M., Sage, A. P., Kirton, J. P., Alexander, M. Y., Gilmore, A. P., Canfield, A. E. (2007). Axl/phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits mineral deposition by vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 100(4), 502–509.
- Coppin, C., Porzolt, F., Awa, A., Kumpf, J., Coldman, A., Wilt, T. (2005). Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, (1), CD001425.
- Correas, J. M., Tranquart, F., Claudon, M. (2009). [Guidelines for contrast enhanced ultrasound (CEUS)--update 2008]. *J Radiol*, 90(1 Pt 2), 123–140.
- Costello, I., Nowotschin, S., Sun, X., Mould, A. W., Hadjantonakis, A. K., Bikoff, E. K., Robertson, E. J. (2015). Lhx1 functions together with Otx2, Foxa2, and Ldb1 to govern anterior mesendoderm, node, and midline development. *Genes and Development*, 29(20), 2108–2122.
- Creusat, G., Thomann, J. S., Maglott, A., Pons, B., Dontenwill, M., Guérin, E., Zuber, G. (2012). Pyridylthiourea-grafted polyethylenimine offers an effective assistance to siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 157(3), 418–426.
- Curatolo, P., Bombardieri, R., Jozwiak, S. (2008). Tuberous sclerosis. *Lancet*, 372(9639), 657–668.
- Daenen, L. G. M., Roodhart, J. M. L., Van Amersfoort, M., Dehnad, M., Roessingh, W., Ulfman, L. H., Voest, E. E. (2011). Chemotherapy enhances metastasis formation via VEGFR-1-expressing endothelial cells. *Cancer Research*, 71(22), 6976–6985.
- Dai, X., Mao, Z., Huang, J., Xie, S., Zhang, H. (2012). The CXCL12/CXCR4 autocrine loop increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro. *Oncology Letters*, 5(1), 277–282.
- Damsky, W., Theodosakis, N., Bosenberg, M. (2013). Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene*, 33(19), 2413–2422.
- Davis, A. P., Capecchi, M. R. (1994). Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development (Cambridge, England)*, 120(8), 2187–2198.

- Davis, M. E. (2009). The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: From concept to clinic. *Molecular Pharmaceutics*.
- Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 464(7291), 1067–1070.
- De Arao Tan, I., Ricciardelli, C., Russell, D. L. (2013). The metalloproteinase ADAMTS1: A comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. *International Journal of Cancer*.
- De Arao Tan, I., Ricciardelli, C., Russell, D. L., Banerjee, A., Wu, Z.-S., Qian, P., Lobie, P. E. (2011). ARTEMIN synergizes with TWIST1 to promote metastasis and poor survival outcome in patients with ER negative mammary carcinoma. *Breast Cancer Res.*, 13(6), R112.
- Dehbi, M., Ghahremani, M., Lechner, M., Dressler, G., Pelletier, J. (1996). The paired-box transcription factor, PAX-2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene*, 13(3), 447–453.
- Deryugina, E. I., Bourdon, M. A., Luo, G. X., Reisfeld, R. A., Strongin, A. (1997). Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 1), 2473–82. Retrieved from
- Dewan, M. Z., Ahmed, S., Iwasaki, Y., Ohba, K., Toi, M., Yamamoto, N. (2006). Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(6), 273–276.
- Do Carmo, A., Patricio, I., Cruz, M. T., Carvalheiro, H., Oliveira, C. R., Lopes, M. C. (2010). CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells. *Cancer Biology and Therapy*, 9(1).
- Doberstein, K., Pfeilschifter, J., Gutwein, P. (2011). The transcription factor PAX-2 regulates ADAM10 expression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 32(11), 1713–1723.
- Donehower, L. A., Godley, L. A., Aldaz, C. M., Pyle, R., Shi, Y. P., Pinkel, D., Varmus, H. E. (1995). Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability. *Genes and Development*, 9(7), 882–895.
- Dong, W. F., Heng, H. H., Lowsky, R., Xu, Y., DeCoteau, J. F., Shi, X. M., Minden, M. D. (1997). Cloning, expression, and chromosomal localization to 11p12-13 of a human LIM/HOMEBOX gene, hLim-1. *DNA and Cell Biology*, 16(6), 671–678.
- Dono, R., Zeller, R. (1994). Cell-type-specific nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis. *Dev Biol*, 163(2), 316–330.
- Dormoy, V., Béraud, C., Lindner, V., Thomas, L., Coquard, C., Barthelmebs, M., Massfelder, T. (2011). LIM-class homeobox gene Lim1, a novel oncogene in human renal cell carcinoma. *Oncogene*, 30(15), 1753–63.
- Dormoy, V., Danilin, S., Lindner, V., Thomas, L., Rothhut, S., Coquard, C., Massfelder, T. (2009). The sonic

hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Molecular Cancer*, 8, 123.

Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O., Gruss, P. (1990). Pax-2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development*, 109(4), 787–95.

Dressler, G. R., Douglass, E. C. (1992). Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(4), 1179–1183.

Dressler, G. R., Wilkinson, J. E., Rothenpieler, U. W., Patterson, L. T., Williams-Simons, L., Westphal, H. (1993). Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature*, 362(6415), 65–67.

Drews, C., Senkel, S., Ryffel, G. U. (2011). The nephrogenic potential of the transcription factors *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* and Pax-8 assessed in *Xenopus* animal caps. *BMC Developmental Biology*, 11(1), 5.

Dudley, A. T., Lyons, K. M., Robertson, E. J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes and Development*, 9(22), 2795–2807.

Dziarmaga, A., Eccles, M., Goodyer, P. (2006). Suppression of ureteric bud apoptosis rescues nephron endowment and adult renal function in Pax-2 mutant mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(6), 1568–75.

Ebert, L. M., Schaerli, P., Moser, B. (2005). Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. In *Molecular Immunology* (Vol. 42, pp. 799–809).

Eccles, S. A., Welch, D. R. (2007). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*, 369(9574), 1742–1757.

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7), 1417–1430.

Escudier, B., Bellmunt, J., Négrier, S., Bajetta, E., Melichar, B., Bracarda, S., Sneller, V. (2010). Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): Final analysis of overall survival. *Journal of Clinical Oncology*, 28(13), 2144–2150.

Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., TARGET Study Group. (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 356(2), 125–34.

Escudier, B. J., Porta, C., Bono, P., De Giorgi, U., Parikh, O., Hawkins, R. E., Cella, D. (2012a). Patient preference between pazopanib (Paz) and sunitinib (Sun): Results of a randomized double-blind, placebo-controlled, cross-over study in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC)--PISCES study, NCT 01064310. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 30(18_suppl), CRA4502.

- Escudier, B. J., Porta, C., Bono, P., De Giorgi, U., Parikh, O., Hawkins, R. E., Cella, D. (2012b). Patient preference between pazopanib (Paz) and sunitinib (Sun): Results of a randomized double-blind, placebo-controlled, cross-over study in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC)--PISCES study, NCT 01064310. *ASCO Meeting Abstracts*, 30(15_suppl), CRA4502-.
- Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Moore, N. (2016). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *The Lancet*, 370(9605), 2103–2111.
- Escudier, B., Sharma, P., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., Motzer, R. J. (2017). CheckMate 025 Randomized Phase 3 Study: Outcomes by Key Baseline Factors and Prior Therapy for Nivolumab Versus Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma. *European Urology*.
- Fang, H., DeClerck, Y. A. (2013). Targeting the tumor microenvironment: From understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Research*, 73(16), 4965-77.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374–1403.
- Ficarra, V., Martignoni, G., Lohse, C., Novara, G., Pea, M., Cavalleri, S., Artibani, W. (2006). External validation of the mayo clinic stage, size, grade and necrosis (SSIGN) score to predict cancer specific survival using a European series of conventional renal cell carcinoma. *Journal of Urology*, 175(4), 1235–1239.
- Finke, J., Ko, J., Rini, B., Rayman, P., Ireland, J., et Cohen, P. (2011). MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *International Immunopharmacology*, 11(7), 853–858.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., Gessler, M. (2004). The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes and Development*, 18(8), 901–911.
- Fonsato, V., Buttiglieri, S., Deregibus, M. C., Puntorieri, V., Bussolati, B., Camussi, G. (2006). Expression of Pax-2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 168(2), 706–13.
- Fossat, N., Ip, C. K., Jones, V. J., Studdert, J. B., Khoo, P.-L., Lewis, S. L., Tam, P. P. L. (2015). Context-specific function of the LIM homeobox 1 transcription factor in head formation of the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, 142(11), 2069–79.
- Foucher, I., Montesinos, M. L., Volovitch, M., Prochiantz, A., Trembleau, A. (2003). Joint regulation of the MAP1B promoter by HNF3beta/Foxa2 and Engrailed is the result of a highly conserved mechanism for

direct interaction of homeoproteins and Fox transcription factors. *Development*, 130(9), 1867–1876.

Frank, I., Blute, M. L., Chevillet, J. C., Lohse, C. M., Weaver, A. L., Zincke, H. (2002). An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *The Journal of Urology*, 168(6), 2395–400.

Freyd, G., Kim, S. K., Horvitz, H. R. (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*, 344(6269), 876–9.

Friedl, P., Wolf, K. (2008). Tube travel: The role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Research*, 68(18):7247-9.

Fuhrman, S. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 6:(655).

Fujii, T., Pichel, J. G., Taira, M., Toyama, R., Dawid, I. B., Westphal, H. (1994). Expression patterns of the murine LIM class homeobox gene *lim1* in the developing brain and excretory system. *Developmental Dynamics*, 199(1), 73–83.

Fyfe, G., Fisher, R. I., Rosenberg, S. A., Sznol, M., Parkinson, D. R., Louie, A. C. (1995). Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 13(3), 688–696.

Gassenmaier, M., Chen, D., Buchner, A., Henkel, L., Schiemann, M., Mack, B., Pohla, H. (2013). CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells*, 31(8), 1467–1476.

Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A. J., Salm, M. P., Varela, I., Swanton, C. (2014). Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature Genetics*, 46(3), 225–33.

Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 366(10), 883–92.

German, M. S., Wang, J., Chadwick, R. B., Rutter, W. J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: Building a functional insulin minienhancer complex. *Genes and Development*, 6(11), 2165–2176.

Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., Vande Woude, G. (2012). Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nature Reviews. Cancer*, 12(2), 89–103.

Giachino, C., Boulay, J. L., Ivanek, R., Alvarado, A., Tostado, C., Lugert, S., Taylor, V. (2015). A Tumor Suppressor Function for Notch Signaling in Forebrain Tumor Subtypes. *Cancer Cell*, 28(6), 730–742.

Gnarra, J. R., Dressler, G. R. (1995). Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition

- by antisense oligonucleotides. *Cancer Res*, 55(18), 4092–4098.
- Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E., Hsu, C. (2004). Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England Journal of Medicine*, 351(13), 1296–305.
- Godley, L. A., Kopp, J. B., Eckhaus, M., Paglino, J. J., Owens, J., Varmus, H. E. (1996). Wild-type p53 transgenic mice exhibit altered differentiation of the ureteric bud and possess small kidneys. *Genes and Development*, 10(7), 836–850.
- Godley, P., Kim, S. W. (2002). Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*, 14(3), 280–285.
- Gonzalez, H. C., Lamerato, L., Rogers, C. G., Gordon, S. C. (2015). Chronic hepatitis C infection as a risk factor for renal cell carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(6), 1820–4.
- Gore, M. E., Griffin, C. L., Hancock, B., Patel, P. M., Pyle, L., Aitchison, M., Mulders, P. F. (2010). Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): an open-label randomised trial. *The Lancet*, 375(9715), 641–648.
- Gossage, L., Eisen, T., Maher, E. R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer*, 15(1), 55–64.
- Goubran, H. A., Kotb, R. R., Stakiw, J., Emara, M. E., Burnouf, T. (2014). Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth and Metastasis*, 7, 9–18.
- Grabiner, B. C., Nardi, V., Birsoy, K., Possemato, R., Shen, K., Sinha, S., Sabatini, D. M. (2014). A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discovery*, 4(5), 554–563.
- Grange, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M. C., Camussi, G. (2011). Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Research*, 71(15), 5346–5356.
- Gravel, E., Thézé, B., Jacques, I., Anilkumar, P., Gombert, K., Ducongé, F., Doris, E. (2013). Cellular uptake and trafficking of polydiacetylene micelles. *Nanoscale*, 5(5), 1955–60.
- Grubb, R. L., Franks, M. E., Toro, J., Middleton, L., Choyke, L., Fowler, S., Linehan, W. M. (2007). Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer. *The Journal of Urology*, 177(6), 2074–9–80.
- Guan, X. (2015). Cancer metastases: Challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
- Guedez, L., Stetler-Stevenson, W. G., Wolff, L., Wang, J., Fukushima, P., Mansoor, A., Stetler-Stevenson, M. (1998). In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(11), 2002–10.

- Guertl, B., Senanayake, U., Nusshold, E., Leuschner, I., Mannweiler, S., Ebner, B., Hoefler, G. (2011). Lim1, an embryonal transcription factor, is absent in multicystic renal dysplasia, but reactivated in nephroblastomas. *Pathobiology*, 78(4), 210–219.
- Guo, J.-K., Hammes, A., Chaboissier, M.-C., Vidal, V., Xing, Y., Wong, F., Schedl, A. (2002). Early gonadal development: exploring Wt1 and Sox9 function. *Novartis Foundation Symposium*, 244, 23-31-42, 253–7.
- Gustafsson, A., Martuszevska, D., Johansson, M., Ekman, C., Hafizi, S., Ljungberg, B., Dahlbäck, B. (2009). Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clinical Cancer Research*, 15(14), 4742–4749.
- Hafizi, S., Dahlbäck, B. (2006). Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*.
- Hammers, H. J., Plimack, E. R., Sternberg, C., McDermott, D. F., Larkin, J. M. G., Ravaud, A., Motzer, R. (2015). CheckMate 214: A phase III, randomized, open-label study of nivolumab combined with ipilimumab versus sunitinib monotherapy in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(suppl), Abstr TPS4578.
- Han, J., Tian, R., Yong, B., Luo, C., Tan, P., Shen, J., Peng, T. (2013). Gas6/Axl mediates tumor cell apoptosis, migration and invasion and predicts the clinical outcome of osteosarcoma patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(3), 493–500.
- Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C., Lai, E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes and Development*, 10(12), 1467–1478.
- Hatori, M., Gill, S., Mure, L. S., Goulding, M., O’Leary, D. D. M., Panda, S. (2014). Lhx1 maintains synchrony among circadian oscillator neurons of the SCN. *eLife*, 3, e03357.
- Hazan, R. B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I., Suyama, K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Hellmich, H. L., Kos, L., Cho, E. S., Mahon, K. A., Zimmer, A. (1996). Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mechanisms of Development*, 54(1), 95–105.
- Hobert, O., Westphal, H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends in Genetics*, 16(2):75-83.
- Holland, P. W. H., Booth, H. A. F., Bruford, E. A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology*, 5, 47.
- Hollingsworth, J. M., Miller, D. C., Daignault, S., Hollenbeck, B. K. (2007). Five-year survival after surgical treatment for kidney cancer: A population-based competing risk analysis. *Cancer*, 109(9), 1763–1768.
- Hong, Q., Li, O., Zheng, W., Xiao, W.Z., Zhang, L., Wu, D., Cai, G.Y., He, J.C., Chen, X.M. (2017). LncRNA

HOTAIR regulates HIF-1 α /AXL signaling through inhibition of miR-217 in renal cell carcinoma. (*Cell Death Dis*, 8(5), e2772).

- Howard, K. A. (2009). Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), 710-20
- Hsieh-Li, H. M., Witte, D. P., Weinstein, M., Branford, W., Li, H., Small, K., Potter, S. S. (1995). Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development (Cambridge, England)*, 121(5), 1373-85.
- Hsieh, J. J., Manley, B. J., Khan, N., Gao, J. J., Carlo, M. I., Cheng, E. H. (2016). Overcome tumor heterogeneity-imposed therapeutic barriers through convergent genomic biomarker discovery: A braided cancer river model of kidney cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 64, 98-106
- Hsu, R. J., Ho, J. Y., Cha, T. L., Yu, D. S., Wu, C. L., Huang, W. P., Yu, C. P. (2012). WNT10A Plays an Oncogenic Role in Renal Cell Carcinoma by Activating WNT/ β -catenin Pathway. *PLoS ONE*, 7(10).
- Hu, Y. Y., Zheng, M. H., Zhang, R., Liang, Y. M., Han, H. (2012). Notch signaling pathway and cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol*, 727, 186-198.
- Huang, C. C., Orvis, G. D., Kwan, K. M., Behringer, R. R. (2014). Lhx1 is required in Mullerian duct epithelium for uterine development. *Developmental Biology*, 389(2), 124-136.
- Huang, Q. B., Ma, X., Li, H. Z., Ai, Q., Liu, S. W., Zhang, Y., Zhang, X. (2014). Endothelial Delta-like 4 (DLL4) promotes renal cell carcinoma hematogenous metastasis. *Oncotarget*, 5(10), 3066-75.
- Huang, W. C., Elkin, E. B., Levey, A. S., Jang, T. L., Russo, P. (2009). Partial Nephrectomy Versus Radical Nephrectomy in Patients With Small Renal Tumors-Is There a Difference in Mortality and Cardiovascular Outcomes? *Journal of Urology*, 181(1), 55-62.
- Huang, W. C., Levey, A. S., Serio, A. M., Snyder, M., Vickers, A. J., Raj, G. V., Russo, P. (2006). Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study. *The Lancet. Oncology*, 7(9), 735-40.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Motzer, R. J. (2008). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *Journal of Urology*. 179 (2), 497-498.
- Hueber, P. A., Iglesias, D., Chu, L. L., Eccles, M., Goodyer, P. (2008). In vivo validation of PAX-2 as a target for renal cancer therapy. *Cancer Letters*, 265(1), 148-155.
- Hui, C., Angers, S. (2011). Gli Proteins in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 513-537.
- Hukriede, N. A., Tsang, T. E., Habas, R., Khoo, P. L., Steiner, K., Weeks, D. L., Dawid, I. B. (2003). Conserved requirement of lim1 function for cell movements during gastrulation. *Developmental Cell*, 4(1), 83-94.

- Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., Reuter, V. E. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, 70, 106–119.
- Hunt, J. D., Van Der Hel, O. L., McMillan, G. P., Boffetta, P., Brennan, P. (2005). Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *International Journal of Cancer*, 114(1), 101–108.
- Hurst, D. R., Edmonds, M. D., Welch, D. R. (2009). Metastamir: The field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Research*, 69(19), 7495–8.
- Hutson, T. E., Davis, I. D., Machiels, J. H., Souza, P. L. De, Baker, K., Bordogna, W., Pandite, L. (2008). Biomarker analysis and final efficacy and safety results of a phase II renal cell carcinoma trial with pazopanib (GW786034), a multi-kinase angiogenesis inhibitor. *J Clin Oncol*, 26, 8–10.
- Hutson, T. E., Escudier, B., Esteban, E., Bjarnason, G. A., Lim, H. Y., Pittman, K. B., Motzer, R. J. (2014). Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(8), 760–7.
- Hutson, T. E., Lesovoy, V., Al-Shukri, S., Stus, V. P., Lipatov, O. N., Bair, A. H., Vogelzang, N. J. (2013). Axitinib versus sorafenib as first-line therapy in patients with metastatic renal-cell carcinoma: A randomised open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 14(13), 1287–1294.
- Huttlin, E. L., Bruckner, R. J., Paulo, J. A., Cannon, J. R., Ting, L., Baltier, K., Harper, J. W. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*, 545(7655), 505–509.
- Ip, C. K., Fossat, N., Jones, V., Lamonerie, T., Tam, P. P. L. (2014). Head formation: OTX2 regulates Dkk1 and Lhx1 activity in the anterior mesendoderm. *Development*, 141(20), 3859–3867.
- Isbarn, H., Karakiewicz, P. I. (2009). Predicting cancer-control outcomes in patients with renal cell carcinoma. *Current Opinion in Urology*, 19, 247–257.
- Israel, G. M., Bosniak, M. A. (2008). Pitfalls in renal mass evaluation and how to avoid them. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 28(5), 1325–1338.
- Janssens, N., Andries, L., Janicot, M., Perera, T., Bakker, A. (2004). Alteration of frizzled expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 25(4), 161–71.
- Janus, C. L., Mendelson, D. S. (1991). Comparison of MRI and CT for study of renal and perirenal masses. *Critical Reviews in Diagnostic Imaging*, 32(2), 69–118.
- Jayson, M., Sanders, H. (1998). Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*, 51(2), 203–205.

- Jensen, D. K., Villumsen, A., Skytte, A.-B., Madsen, M. G., Sommerlund, M., Bendstrup, E. (2017). Birt-Hogg-Dubé syndrome: a case report and a review of the literature. *European Clinical Respiratory Journal*, 4(1), 1292378.
- Jeong, D. E., Song, H. J., Lim, S., Lee, S. J., Lim, J. E., Nam, D.-H., Lee, H. W. (2015). Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis. *Oncotarget*, 6(32), 33046–33064.
- Jezierska, A., Matysiak, W., Motyl, T. (2006). ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 12(8), BR263-R273.
- Jilaveanu, L. B., Shuch, B., Zito, C. R., Parisi, F., Barr, M., Kluger, Y., Kluger, H. M. (2014). PD-L1 expression in clear cell renal cell carcinoma: An analysis of nephrectomy and sites of metastases. *Journal of Cancer*, 5(3), 166–172.
- Jin, H., Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer*, 90(3), 561–565.
- Johns Putra, L. G., Minor, T. X., Bolton, D. M., Appu, S., Dowling, C. R., Neerhut, G. J. (2009). Improved Assessment of Renal Lesions in Pregnancy With Magnetic Resonance Imaging. *Urology*, 74(3), 535–539.
- Johnson, J. P., Bar-Eli, M., Jansen, B., Markhof, E. (1997). Melanoma progression-associated glycoprotein MUC18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 73(5), 769–74.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 19–53.
- Jurata, L. W., Kenny, D. A., Gill, G. N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11693–8.
- Kabala, J. E., Gillatt, D. A., Persad, R. A., Penry, J. B., Gingell, J. C., Chadwick, D. (1991). Magnetic resonance imaging in the staging of renal cell carcinoma. *The British Journal of Radiology*, 64(764), 683–9.
- Kadmas, J. L., Beckerle, M. C. (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(11), 920–931.
- Kaelin Jr., W. G. (2004). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res*, 10(18 Pt 2), 6290S–5S.
- Kallakury, B. V., Karikhalli, S., Haholu, A., Sheehan, C. E., Azumi, N., Ross, J. S. (2001). Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(10), 3113–9.

- Kania, A., Johnson, R. L., Jessell, T. M. (2000). Coordinate Roles for LIM Homeobox Genes in Directing the Dorsoroventral Trajectory of Motor Axons in the Vertebrate Limb. *Cell*, 102(2), 161–173.
- Kanteti, R., Batra, S. K., Lennon, F. E., Salgia, R. (2015). FAK and Paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7(21), 31586–31601.
- Karakiewicz, P. I., Briganti, A., Chun, F. K. H., Trinh, Q. D., Perrotte, P., Ficarra, V., Patard, J. J. (2007). Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *Journal of Clinical Oncology*, 25(11), 1316–1322.
- Karakiewicz, P. I., Suardi, N., Capitanio, U., Jeldres, C., Ficarra, V., Cindolo, L., Patard, J. J. (2009). A Preoperative Prognostic Model for Patients Treated with Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma. *European Urology*, 55(2), 287–295.
- Karami, S., Bassig, B., Stewart, P. A., Lee, K.-M., Rothman, N., Moore, L. E., Lan, Q. (2013). Occupational trichloroethylene exposure and risk of lymphatic and haematopoietic cancers: a meta-analysis. *Occupational and Environmental Medicine*, 70(8), 591–9.
- Karavanov, A. A., Karavanova, I., Perantoni, A., Dawid, I. B. (1998). Expression pattern of the rat Lim-1 homeobox gene suggests a dual role during kidney development. *International Journal of Developmental Biology*, 42(1), 61–66.
- Karavanov, A. A., Saint-Jeannet, J. P., Karavanova, I., Taira, M., Dawid, I. B. (1996). The LIM homeodomain protein Lim-1 is widely expressed in neural, neural crest and mesoderm derivatives in vertebrate development. *International Journal of Developmental Biology*, 40(2), 453–461.
- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H., Edlund, T. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*, 344(6269), 879–82.
- Karnofsky, D. A., Burchenal, J. H. (1949). The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In *Evaluation of chemotherapeutic agents. Symposium held at New York Academy of Medicine*. (pp. 191–205).
- Kato, M., Kitayama, J., Kazama, S., Nagawa, H. (2003). Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Research: BCR*, 5(5), R144–50.
- Kattan, M. W., Reuter, V., Motzer, R. J., Katz, J., Russo, P. (2001). A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 166(1), 63–67.
- Kawakami, K., Hirata, H., Yamamura, S., Kikuno, N., Saini, S., Majid, S., Dahiya, R. (2009). Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer. *Cancer Research*, 69(22), 8603–8610.
- Kedrin, D., van Rheenen, J., Hernandez, L., Condeelis, J., Segall, J. E. (2007). Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(2–3), 143–152.

- Keegan, K. A., Schupp, C. W., Chamie, K., Hellenthal, N. J., Evans, C. P., Koppie, T. M. (2012). Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: Survival differences by subtype and stage. *Journal of Urology*, 188(2), 391–397.
- Kim, H. L., Belldegrun, A. S., Freitas, D. G., Bui, M. H. T., Han, K., Dorey, F. J., Figlin, R. A. (2003). Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *The Journal of Urology*, 170(5), 1742–6.
- Kim, H. L., Han, K.-R., Zisman, A., Figlin, R. A., Belldegrun, A. S. (2004). Cachexia-like symptoms predict a worse prognosis in localized t1 renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 171(5), 1810–3.
- Kim, J. J., Lee, S. B., Jang, J., Yi, S. Y., Kim, S. H., Han, S. A., Lou, Z. (2015). WSB1 promotes tumor metastasis by inducing pVHL degradation. *Genes and Development*, 29(21), 2244–2257.
- Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., Herzog, V. (2004). Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *European Journal of Cell Biology*, 83(11–12), 717–24.
- Kispert, A., Vainio, S., Shen, L., Rowitch, D. H., McMahon, A. P. (1996). Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development (Cambridge, England)*, 122(11), 3627–3637.
- Kobayashi, A., Kwan, K.-M., Carroll, T. J., McMahon, A. P., Mendelsohn, C. L., Behringer, R. R. (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development (Cambridge, England)*, 132(12), 2809–23.
- Kobayashi, A., Shawlot, W., Kania, A., Behringer, R. R. (2004). Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development (Cambridge, England)*, 131(3), 539–549.
- Koch, B. J., Ryan, J. F., Baxeavanis, A. D. (2012). The diversification of the lim superclass at the base of the metazoa increased subcellular complexity and promoted multicellular specialization. *PLoS ONE*, 7(3).
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Undén, A. B., Sandstedt, B., Zaphiropoulos, P. G. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nature Cell Biology*, 1(5), 312–319.
- Köhn, L., Svenson, U., Ljungberg, B., Roos, G. (2014). Specific Genomic Aberrations Predict Survival, But Low Mutation Rate in Cancer Hot Spots, in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 0(0), 1–9.
- Kominsky, S. L., Doucet, M., Brady, K., Weber, K. L. (2007). TGF-beta promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22(1), 37–44.
- Kominsky, S. L., Doucet, M., Thorpe, M., Weber, K. L. (2008). MMP-13 is over-expressed in renal cell carcinoma bone metastasis and is induced by TGF-beta1. *Clinical and Experimental Metastasis*, 25(8), 865–870.

- Korshunov, V. A. (2012). Axl-dependent signalling: a clinical update. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 122(8), 361–8.
- Koseki, C., Herzlinger, D., Al-Awqati, Q. (1992). Apoptosis in metanephric development. *Journal of Cell Biology*, 119(5), 1327–1333.
- Krabbe, L.-M., Bagrodia, A., Margulis, V., Wood, C. (2014). Surgical Management of Renal Cell Carcinoma. *Seminars in Interventional Radiology*, 31(1), 027–032.
- Krauss, S., Concordet, J. P., Ingham, P. W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*, 75(7), 1431–1444.
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., Rauscher, F. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74(4), 679–91.
- Krestin, G. P., Gross-Fengels, W., Marincek, B. (1992). [The importance of magnetic resonance tomography in the diagnosis and staging of renal cell carcinoma]. *Der Radiologe*, 32(3), 121–6.
- Kruck, S., Eyrich, C., Scharpf, M., Sievert, K. D., Fend, F., Stenzl, A., Bedke, J. (2013). Impact of an altered Wnt1/ β -catenin expression on clinicopathology and prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 10944–10957.
- Kruck, S., Eyrich, C., Scharpf, M., Sievert, K. D., Fend, F., Stenzl, A., Bedke, J. (2013). Impact of an Altered Wnt1/beta-Catenin Expression on Clinicopathology and Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*, 14(6), 10944–10957.
- Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78(2), 191–201.
- Kuroda, H., Inui, M., Sugimoto, K., Hayata, T., Asashima, M. (2002). Axial Protocadherin Is a Mediator of Prenotochord Cell Sorting in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 244(2), 267–277.
- Kwan, K. G., Matsumoto, E. D., Ablin, R. J., Gold, P. (2007). Radiofrequency ablation and cryoablation of renal tumours. *Current Oncology*, 14(1), 34–38.
- Lai, E., Clark, K. L., Burley, S. K., Darnell, J. E. (1993). Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or “winged helix” proteins: a family of transcription factors of diverse biologic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), 10421–10423.
- Lane, B. R., Abouassaly, R., Gao, T., Weight, C. J., Hernandez, A. V., Larson, B. T., Campbell, S. C. (2010). Active treatment of localized renal tumors may not impact overall survival in patients aged 75 years or older. *Cancer*, 116(13), 3119–3126.
- Lang, H., Béraud, C., Bethry, A., Danilin, S., Lindner, V., Coquard, C., Massfelder, T. (2016). Establishment of a large panel of patient-derived preclinical models of human renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(37), 59336–59359.

- Lang, H., Lindner, V., De Fromont, M., Molinié, V., Letourneux, H., Meyer, N., Jacqmin, D. (2005). Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: Assessment of 241 patients with > 15-year follow-up. *Cancer*, *103*(3), 625–629.
- Larkin, J. M., Eisen, T. (2006). Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, *60*(3), 216–226.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., *et al.*, (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene [see comments]. *Science*, *260*(5112), 1317–1320.
- Ledezma, R. A., Negron, E., Paner, G. P., Rjepaj, C., Lascano, D., Haseebuddin, M., Eggener, S. E. (2015). Clinically localized type 1 and 2 papillary renal cell carcinomas have similar survival outcomes following surgery. *World Journal of Urology*, 687–693.
- Ledig, S., Brucker, S., Barresi, G., Schomburg, J., Rall, K., Wieacker, P. (2012). Frame shift mutation of LHX1 is associated with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Human Reproduction*, *27*(9), 2872–2875.
- Lee, H. W., Choe, M. (2012). Expression of EZH2 in renal cell carcinoma as a novel prognostic marker. *Pathology International*, *62*(11), 735–741.
- Lee, S. H., Paek, A. R., Yoon, K., Kim, S. H., Lee, S. Y., You, H. J. (2015). Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor- β and contributes to cell motility in NSCLC cells. *BMB Reports*, *48*(2), 115–120.
- Leibovich, B. C., Blute, M. L., Cheville, J. C., Lohse, C. M., Frank, I., Kwon, E. D., Zincke, H. (2003). Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: A stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer*, *97*(7), 1663–1671.
- Lendvay, T. S., Marshall, F. F. (2003). The Tuberous Sclerosis Complex and its Highly Variable Manifestations. *The Journal of Urology*, *169*(5), 1635–1642.
- Levi, F., Ferlay, J., Galeone, C., Lucchini, F., Negri, E., Boyle, P., La Vecchia, C. (2008). The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU International*, *101*(8), 949–958.
- Li, D.-M., Feng, Y.-M. (2011). Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Research and Treatment*, *128*(1), 7–21.
- Li, G., Feng, G., Gentil-Perret, A., Genin, C., Tostain, J. (2008). Serum Carbonic Anhydrase 9 Level is Associated With Postoperative Recurrence of Conventional Renal Cell Cancer. *The Journal of Urology*, *180*(2), 510–514.
- Li, J.-K., Chen, C., Liu, J.-Y., Shi, J.-Z., Liu, S.-P., Liu, B., Wang, L.-H. (2017). Long noncoding RNA MRCCAT1 promotes metastasis of clear cell renal cell carcinoma via inhibiting NPR3 and activating p38-MAPK signaling. *Molecular Cancer*, *16*.

- Ligeza, J., Marona, P., Gach, N., Lipert, B., Miekus, K., Wilk, W., Jura, J. (2017). MCP1P1 contributes to clear cell renal cell carcinomas development. *Angiogenesis*, pp. 1–16.
- Lin, T.-C., Liu, Y.-P., Chan, Y.-C., Su, C.-Y., Lin, Y.-F., Hsu, S.-L., Hsiao, M. (2015). Ghrelin promotes renal cell carcinoma metastasis via Snail activation and is associated with poor prognosis. *The Journal of Pathology*, 237(1), 50–61.
- Ljungberg, B., Campbell, S., Choi, H., Cho, H., Jacqmin, D., Lee, J., Kiemeny, L. (2011). The epidemiology of renal cell carcinoma. *European Urology*, 60(4), 615–621.
- López-Lago, M. A., Posner, S., Thodima, V. J., Molina, A. M., Motzer, R. J., Chaganti, R. S. K. (2013). Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*, 32(14), 1752–60.
- Luker, K. E., Luker, G. D. (2006). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Letters*, 238(1), 30-41.
- Lum, L., Beachy, P. A. (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5678), 1755–9.
- Luo, J., Lubaroff, D. M., Hendrix, M. J. C. (1999). Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Research*, 59(15), 3552–3556.
- Luu, V. D., Boysen, G., Struckmann, K., Casagrande, S., Von Teichman, A., Wild, P. J., Moch, H. (2009). Loss of VHL and hypoxia provokes PAX-2 up-regulation in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 15(10), 3297–3304.
- Ly, J. P., Onay, T., Quaggin, S. E. (2011). Mouse models to study kidney development, function and disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(4), 382–390.
- Lyons, K. M., Hogan, B. L. M., Robertson, E. J. (1995). Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mechanisms of Development*, 50(1), 71–83.
- Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J., Salgia, R. (2003). c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22(4), 309-25.
- Macher-Goeppinger, S., Keith, M., Endris, V., Penzel, R., Tagscherer, K. E., Pahernik, S., Roth, W. (2016). MET expression and copy number status in clear-cell renal cell carcinoma: prognostic value and potential predictive marker. *Oncotarget*, 8(1), 1046–1057.
- MacKiewicz, N., Gravel, E., Garofalakis, A., Ogier, J., John, J., Dupont, D. M., Ducongé, F. (2011). Tumor-targeted polydiacetylene micelles for in vivo imaging and drug delivery. *Small*, 7(19), 2786–2792.
- Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G., Haber, D. A. (1995). The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes and Development*, 9(17), 2143–2156.

- Majid, S., Saini, S., Dahiya, R. (2012). Wnt signaling pathways in urological cancers: past decades and still growing. *Molecular Cancer*, 11(7), 1–13.
- Maruschke, M., Hakenberg, O. W., Koczan, D., Zimmermann, W., Stief, C. G., Buchner, a. (2013). Expression profiling of metastatic renal cell carcinoma using gene set enrichment analysis. *Int J Urol*, 46–51.
- Massfelder, T., Lang, H., Schordan, E., Lindner, V., Rothhut, S., Welsch, S., Helwig, J. J. (2004). Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res*, 64(1), 180–188.
- Mastick, G. S., Andrews, G. L. (2001). Pax6 regulates the identity of embryonic diencephalic neurons. *Mol Cell Neurosci*, 17(1), 190–207.
- Matsui, J., Funahashi, Y., Uenaka, T., Watanabe, T., Tsuruoka, A., Asada, M. (2008). Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clinical Cancer Research*, 14(17), 5459–5465.
- Matsumoto, K., Nakamura, T. (2001). Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney International*, 59(6), 2023–38.
- Maturen, K. E., Nghiem, H. V., Caoili, E. M., Higgins, E. G., Wolf, J. S., Wood, D. P. (2007). Renal mass core biopsy: accuracy and impact on clinical management. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 188(2), 563–70.
- McDermott, D. F., Regan, M. M., Clark, J. I., Flaherty, L. E., Weiss, G. R., Logan, T. F., Atkins, M. B. (2005). Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(1), 133–141.
- McDermott, D. F., Sosman, J. A., Sznol, M., Massard, C., Gordon, M. S., Hamid, O., Powles, T. (2016). Atezolizumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in metastatic renal cell carcinoma: Long-term safety, clinical activity, and immune correlates from a phase Ia study. *Journal of Clinical Oncology*, 34(8), 833–842.
- Méjean, A., Lebret, T. (2008). Prise en charge du cancer rénal métastatique Prise en charge of metastatic renal carcinoma. *Progrès En Urologie*, 18(5), S298–S308.
- Michaelson, M. D., Rini, B. I., Escudier, B. J., Clark, J., Redman, B., Tarazi, J. C., Motzer, R. J. (2012). Phase III AXIS trial of axitinib versus sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: Updated results among cytokine-treated patients. *ASCO Meeting Abstracts*, 30(15_suppl), 4546-4546.
- Michelsen, J. W., Sewell, A. K., Louis, H. A., Olsen, J. I., Davis, D. R., Winge, D. R., Beckerle, M. C. (1994). Mutational analysis of the metal sites in an LIM domain. *J Biol Chem*, 269(15), 11108–11113.
- Micke, P., Östman, A. (2004). Tumour-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? In *Lung Cancer* (Vol. 45).

- Mikami, S., Katsube, K.-I., Oya, M., Ishida, M., Kosaka, T., Mizuno, R., Okada, Y. (2011). Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Laboratory Investigation*, *91*(10), 1443–1458.
- Mitsui, Y., Shiina, H., Kato, T., Maekawa, S., Hashimoto, Y., Shiina, M., Tanaka, Y. (2017). Versican Promotes Tumor Progression, Metastasis and Predicts Poor Prognosis in Renal Carcinoma. *Molecular Cancer Research*, *15*(7), 884–895.
- Mitterberger, M., Pelzer, A., Colleselli, D., Bartsch, G., Strasser, H., Pallwein, L., Frauscher, F. (2007). Contrast-enhanced ultrasound for diagnosis of prostate cancer and kidney lesions. *European Journal of Radiology*, *64*(2), 231–238.
- Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., Ulbright, T. M. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*, *70*, 93–105.
- Moore, M. W., Klein, R. D., Fariñas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Rosenthal, A. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, *382*(6586):76-9.
- Morais, C., Gobe, G., Johnson, D. W., Healy, H. (2011). The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *43*(11), 1537–49.
- Mori, K., Yoshimoto, A., Takaya, K., Hosoda, K., Ariyasu, H., Yahata, K., Nakao, K. (2000). Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Letters*, *486*(3), 213–216.
- Motzer, R. J., Bacik, J., Murphy, B. A., Russo, P., Mazumdar, M. (2002). Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *20*(1), 289–96.
- Motzer, R. J., Escudier, B., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., Investigators, C. 025. (2015). Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. TL - 373. *The New England Journal of Medicine*, *373* VN-(19), 1803–1813.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Ravaud, A. (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, *372*(9637), 449–56.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Ravaud, A. (2010). Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: Final results and analysis of prognostic factors. *Cancer*, *116*(18), 4256–4265.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Tomczak, P., Hutson, T. E., Michaelson, M. D., Negrier, S., Rini, B. I. (2013). Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: Overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *14*(6), 552–562.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Cella, D., Reeves, J., Hawkins, R., Guo, J., Choueiri, T. K. (2013). Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, *369*(8), 722–731.

- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Glen, H., Michaelson, M. D., Molina, A., Eisen, T., Larkin, J. (2015). Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: A randomised, phase 2, open-label, multicentre trial. *The Lancet Oncology*, 16(15), 1473–1482.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Olsen, M. R., Hudes, G. R., Burke, J. M., Edenfield, W. J., Figlin, R. A. (2012). Randomized phase II trial of sunitinib on an intermittent versus continuous dosing schedule as first-line therapy for advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 30(12), 1371–1377.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Oudard, S., Figlin, R. A. (2009). Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(22), 3584–90.
- Motzer, R. J., Mazumdar, M., Bacik, J., Berg, W., Amsterdam, A., Ferrara, J. (1999). Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(8), 2530–40.
- Motzer, R. J., Michaelson, M. D., Redman, B. G., Hudes, G. R., Wilding, G., Figlin, R. A., Rini, B. I. (2006). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(1), 16–24.
- Motzer, R.J., Porta, C., Vogelzang, N.J., Sternberg, C.N., Szczylik, C., Zolnierak, J., Shi, M.M., Escudier, B. (2013). Phase 3 trial of dovitinib vs sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma after 1 prior VEGF pathway-targeted and 1 prior mTOR inhibitor therapy. *European Journal of Cancer*.
- Motzer, R. J., Rini, B. I., McDermott, D. F., Redman, B. G., Kuzel, T. M., Harrison, M. R., Hammers, H. J. (2015). Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 33(13), 1430–1437.
- Mueller-Lisse, U. G., Mueller-Lisse, U. L. (2010). Imaging of advanced renal cell carcinoma. *World Journal of Urology*, 28(3), 253–261.
- Mukhopadhyay, M., Teufel, A., Yamashita, T., Agulnick, A. D., Chen, L., Downs, K. M., Westphal, H. (2003). Functional ablation of the mouse *Ldb1* gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development*, 130(3), 495–505.
- Mumert, M., Dubuc, A., Wu, X., Northcott, P. A., Chin, S. S., Pedone, C. A., Fults, D. W. (2012). Functional genomics identifies drivers of medulloblastoma dissemination. *Cancer Research*, 72(19), 4944–4953.
- Nakano, T., Murata, T., Matsuo, I., Aizawa, S. (2000). OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 267(1), 64–70.
- Naora, H. (2014). Heterotypic Cellular Interactions in the Ovarian Tumor Microenvironment: Biological Significance and Therapeutic Implications. *Frontiers in Oncology*, 4, 18.
- Neuberg, P., Kichler, A. (2014). Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines. *Advances*

in *Genetics*, 88, 263–288.

- Neuberg, P., Perino, A., Morin-Picardat, E., Anton, N., Darwich, Z., Weltin, D., Wagner, A. (2015). Photopolymerized micelles of diacetylene amphiphile: Physical characterization and cell delivery properties. *Chemical Communications*, 51(58), 11595–11598.
- Nielsen, S. M., Rhodes, L., Blanco, I., Chung, W. K., Eng, C., Maher, E. R., Giles, R. H. (2016). Von Hippel-Lindau disease: Genetics and role of genetic counseling in a multiple neoplasia syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 34(18), 2172–2181.
- Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R., Wheelock, M. J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 631–44.
- Nishioka, N., Nagano, S., Nakayama, R., Kiyonari, H., Ijiri, T., Taniguchi, K., Sasaki, H. (2005). Ssdpl regulates head morphogenesis of mouse embryos by activating the Lim1-Ldb1 complex. *Development*, 132(11), 2535–2546.
- Novick, A. C. (1993). Renal-sparing surgery for renal cell carcinoma. *The Urologic Clinics of North America*, 20(2), 277–82.
- Nowotschin, S., Costello, I., Piliszek, A., Kwon, G. S., Mao, C. an, Klein, W. H., Hadjantonakis, A. K. (2013). The T-box transcription factor eomesodermin is essential for AVE induction in the mouse embryo. *Genes and Development*, 27(9), 997–1002.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795–801.
- O'Farrell, A.-M., Abrams, T. J., Yuen, H. A., Ngai, T. J., Louie, S. G., Yee, K. W. H., Cherrington, J. M. (2003). SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*, 101(9), 3597–605.
- Oatley, J. M., Brinster, R. L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 263–286.
- Ohba, K., Miyata, Y., Matsuo, T., Asai, A., Mitsunari, K., Shida, Y., Sakai, H. (2014). High expression of twist is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(6), 3158–3165.
- Okamoto, K., Kodama, K., Takase, K., Sugi, N. H., Yamamoto, Y., Iwata, M., Tsuruoka, A. (2013). Antitumor activities of the targeted multi-tyrosine kinase inhibitor lenvatinib (E7080) against RET gene fusion-driven tumor models. *Cancer Letters*, 340(1), 97–103.
- Oken, M. M., Creech, R. H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T. E., McFadden, E. T. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.*, 5(6), 649–55.
- Onuffer, J. J., Horuk, R. (2002). Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: Recent

- developments. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(10), 459–467.
- Ordóñez, N. G. (2012). Value of PAX-2 Immunostaining in Tumor Diagnosis. *Advances In Anatomic Pathology*, 19(6), 401–409.
- Orian-Rousseau, V. (2010). CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *European Journal of Cancer*, 46(7), 1271–1277.
- Oro, A. E., Higgins, K. M., Hu, Z., Bonifas, J. M., Epstein, E. H. J., Scott, M. P. (1997). Basal Cell Carcinomas in Mice Overexpressing Sonic Hedgehog. *Science*, 276(5313), 817–821.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Lonai, P. (1993). Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Developmental Biology*, 158(2), 475–86.
- Ougolkov, A. V., Bone, N. D., Fernandez-Zapico, M. E., Kay, N. E., Billadeau, D. D. (2007). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 110(2), 735–42.
- Ougolkov, A. V., Fernandez-Zapico, M. E., Bilim, V. N., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Billadeau, D. D. (2006). Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(17), 5074–81.
- Ougolkov, A. V., Fernandez-Zapico, M. E., Savoy, D. N., Urrutia, R. A., Billadeau, D. D. (2005). Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 65(6), 2076–81.
- Ozcan, A., de la Roza, G., Ro, J. Y., Shen, S. S., Truong, L. D. (2012). PAX-2 and PAX-8 expression in primary and metastatic renal tumors: a comprehensive comparison. *Arch Pathol Lab Med*, 136(12), 1541–1551.
- Paces-Fessy, M., Boucher, D., Petit, E., Paute-Briand, S., Blanchet-Tournier, M.-F. (2004). The negative regulator of Gli, Suppressor of fused (Sufu), interacts with SAP18, Galectin3 and other nuclear proteins. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 2), 353–62.
- Palmesino, E., Rousso, D. L., Kao, T. J., Klar, A., Laufer, E., Uemura, O., Kania, A. (2010). Foxp1 and Lhx1 coordinate motor neuron migration with axon trajectory choice by gating reelin signalling. *PLoS Biology*, 8(8), 41–42.
- Pan, J., Mestas, J., Burdick, M. D., Phillips, R. J., Thomas, G. V., Reckamp, K., Strieter, R. M. (2006). Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Molecular Cancer*, 5, 56.
- Patard, J.-J., Leray, E., Cindolo, L., Ficarra, V., Rodriguez, A., De La Taille, A., Lobel, B. (2004). Multi-institutional validation of a symptom based classification for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 172(3), 858–862.

- Patard, J. J., Kim, H. L., Lam, J. S., Dorey, F. J., Pantuck, A. J., Zisman, A., Belldegrun, A. S. (2004). Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. *J Clin Oncol*, 22(16),3316–3322.
- Patard, J. J., Leray, E., Rioux-Leclercq, N., Cindolo, L., Ficarra, V., Zisman, A., Pantuck, A. J. (2005). Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: A multicenter experience. *Journal of Clinical Oncology*, 23(12), 2763–2771.
- Patard, J. J., Rioux-Leclercq, N., Fergelot, P. (2006). Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *European Urology*, 49(4), 633–643.
- Patel, P. H., Chadalavada, R. S. V., Chaganti, R. S. K., Motzer, R. J. (2006). Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 12(24), 7215–7220.
- Patel, S. R., Ranghini, E., Dressler, G. R. (2014). Mechanisms of gene activation and repression by Pax proteins in the developing kidney. In *Pediatric Nephrology*, 29(4), 589–595.
- Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D. P., Garber, E. A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Williams, K. P. (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mechanisms of Development*, 106(1-2), 107–117.
- Pedersen, A., Skjong, C., Shawlot, W. (2005). Lim1 is required for nephric duct extension and ureteric bud morphogenesis. *Developmental Biology*, 288(2), 571–581.
- Perantoni, A., Dove, L. F., Karavanova, I., Prescott, D. M. (1995). Basic fibroblast growth factor can mediate the early inductive events in renal development. *Developmental Biology*, 92, 4696–4700.
- Peters, S., Adjei, A. A. (2012). MET: a promising anticancer therapeutic target. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(6), 314–326.
- Pietilä, I., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Kaisto, S., Tika, E., Van Eerde, A. M., Salo, A. M., Vainio, S. J. (2016). Wnt5a deficiency leads to anomalies in ureteric tree development, tubular epithelial cell organization and basement membrane integrity pointing to a role in kidney collecting duct patterning. *PLoS ONE*, 11(1).
- Pignot, G., Elie, C., Conquy, S., Vieillefond, A., Flam, T., Zerbib, M., Amsellem-Ouazana, D. (2007). Survival Analysis of 130 Patients with Papillary Renal Cell Carcinoma: Prognostic Utility of Type 1 and Type 2 Subclassification. *Urology*, 69(2), 230–235.
- Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Plachov, D. (1992). PAX-8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development (Cambridge, England)*, 116(3), 611–23.
- Profumo, V., Gandellini, P. (2013). MicroRNAs: cobblestones on the road to cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(4), 341–355.
- Prowse, A. H., Webster, A. R., Richards, F. M., Richard, S., Olschwang, S., Resche, F., Maher, E. R. (1997).

Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *American Journal of Human Genetics*, 60(4), 765–771.

Przybycin, C. G., Magi-Galluzzi, C., McKenney, J. K. (2013). Hereditary Syndromes With Associated Renal Neoplasia: A Practical Guide to Histologic Recognition in Renal Tumor Resection Specimens. *Advances in Anatomic Pathology*, 20(4), 245–263.

Qi, H., Ohh, M. (2003). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res*, 63(21), 7076–7080.

Rae, F. K., Stephenson, S. A., Nicol, D. L., Clements, J. A. (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *International Journal of Cancer*, 88(5), 726–732. h

Raj, G. V., Thompson, R. H., Leibovich, B. C., Blute, M. L., Russo, P., Kattan, M. W. (2008). Preoperative Nomogram Predicting 12-Year Probability of Metastatic Renal Cancer. *Journal of Urology*, 179(6), 2146–2151.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281–2308.

Rankin, E. B., Fuh, K. C., Castellini, L., Viswanathan, K., Finger, E. C., Diep, A. N., Giaccia, A. J. (2014). Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(37), 13373–13378.

Rankin, S. A., Kormish, J., Kofron, M., Jegga, A., Zorn, A. M. (2011). A gene regulatory network controlling *hhex* transcription in the anterior endoderm of the organizer. *Developmental Biology*, 351(2), 297–310.

Razorenova, O. V., Finger, E. C., Colavitti, R., Chernikova, S. B., Boiko, A. D., Chan, C. K. F., Giaccia, A. J. (2011). VHL loss in renal cell carcinoma leads to up-regulation of CUB domain-containing protein 1 to stimulate PKC $\{\delta\}$ -driven migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), 1931–1936.

Ribas, A. (2012). Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2517–2519.

Riethmacher, D., Brinkmann, V., Birchmeier, C. (1995). A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), 855–9.

Rini, B., Goddard, A., Knezevic, D., Maddala, T., Zhou, M., Aydin, H., Escudier, B. (2015). A 16-gene assay to predict recurrence after surgery in localised renal cell carcinoma: Development and validation studies. *The Lancet Oncology*, 16(6), 676–685.

Rini, B. I., Escudier, B., Tomczak, P., Kaprin, A., Szczylik, C., Hutson, T. E., Motzer, R. J. (2011). Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): A randomised phase 3

- trial. *The Lancet*, 378(9807), 1931–1939.
- Rivard, N. (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase: a key regulator in adherens junction formation and function. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 14, 510–522.
- Robbins, M., Judge, A., Maclachlan, I. (2009). siRNA and Innate Immunity. *Oligonucleotides*, 19(2), 89–101.
- Robson, C. J., Churchill, B. M., Anderson, W. (1969). The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 101, 297–301.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Dodd, J. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*, 76(4), 761–775.
- Rohrmann, S., Linseisen, J., Overvad, K., Würtz, A. M. L., Roswall, N., Tjønneland, A., Boeing, H. (2015). Meat and fish consumption and the risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *International Journal of Cancer*, 136(5), E423–E431.
- Roland, C. L., Harken, A. H., Sarr, M. G., Barnett, C. C. (2007). ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery*, 141(6), 705–707.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., Chang, A. E., Schwartzentruber, D. J., Seipp, C. A. (1993). Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(8), 622–632.
- Rothenpieler, U. W., Dressler, G. R. (1993). Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development (Cambridge, England)*, 119, 711–720.
- Ruan, G.-X., Kazlauskas, A. (2012). Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *The EMBO Journal*, 31(7), 1692–1703.
- Ryan, G., Steele-Perkins, V., Morris, J. F., Rauscher, F. J., Dressler, G. R. (1995). Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development (Cambridge, England)*, 121(3), 867–875.
- Richard, S., Benoît, G., Joly, D., Avril, M-F., *et al.*, Rein, pour le Réseau national des Prédispositions héréditaires au Cancer du Rein. (2006). Prédispositions Héréditaires Au Cancer Rénal. *Actualités Néphrologiques Necker*, 2006.
- Sabatino, M., Kim-Schulze, S., Panelli, M. C., Stroncek, D., Wang, E., Taback, B., Kaufman, H. L. (2009). Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol*, 27(16), 2645–2652.
- Saini, S., Majid, S., Dahiya, R. (2011). The complex roles of Wnt antagonists in RCC. *Nature Reviews Urology*, 8(12), 690–699.

- Sakamoto, S., Kyprianou, N. (2010). Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(2), 205–214.
- Sánchez-García, I., Osada, H., Forster, A., Rabbitts, T. H. (1993). The cysteine-rich LIM domains inhibit DNA binding by the associated homeodomain in Isl-1. *The EMBO Journal*, 12(11), 4243–50.
- Sariola, H. (2002). Nephron induction revisited: from caps to condensates. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 11(1), 17–21.
- Scales, S. J., de Sauvage, F. J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(6), 303–312.
- Schlaepfer, D. D., Jones, K. C., Hunter, T. (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. *Molecular and Cellular Biology*, 18(5), 2571–85.
- Schmeichel, K. L., Beckerle, M. C. (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, 79(2), 211–219.
- Schmid, P., Lorenz, A., Hameister, H., Montenarh, M. (1991). Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 113(3), 857–65. Retrieved from
- Schrader, A. J., Lechner, O., Templin, M., Dittmar, K. E. J., Machtens, S., Mengel, M., Lauber, J. (2002). CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *British Journal of Cancer*, 86(8), 1250–6.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*, 367(6461), 380–383.
- Shannon, B. A., Cohen, R. J., de Bruto, H., Davies, R. J. (2008). The Value of Preoperative Needle Core Biopsy for Diagnosing Benign Lesions Among Small, Incidentally Detected Renal Masses. *Journal of Urology*, 180(4), 1257–1261.
- Sharma, R., Sanchez-Ferras, O., Bouchard, M. (2015). Pax genes in renal development, disease and regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 44, 97–106
- Shawlot, W., Behringer, R. R. (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature*, 374(6521), 425–430.
- Shuch, B., Vourganti, S., Ricketts, C. J., Middleton, L., Peterson, J., Merino, M. J., Linehan, W. M. (2014). Defining Early-Onset Kidney Cancer: Implications for Germline and Somatic Mutation Testing and Clinical Management. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(5), 1–7.
- Shuman Moss, L. A., Jensen-Taubman, S., Stetler-Stevenson, W. G. (2012). Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *The American Journal of Pathology*, 181(6), 1895–9.

- Shvarts, O., Lam, J. S., Kim, H. L., Han, K., Figlin, R., Belldegrun, A. (2004). Eastern Cooperative Oncology Group performance status predicts bone metastasis in patients presenting with renal cell carcinoma: implication for preoperative bone scans. *The Journal of Urology*, 172(3), 867–70.
- Siesser, P. F., Maness, P. F. (2009). L1 cell adhesion molecules as regulators of tumor cell invasiveness. *Cell Adhesion & Migration*, 3(3), 275–7.
- Sim, S. H., Messenger, M. P., Gregory, W. M., Wind, T. C., Vasudev, N. S., Cartledge, J., Banks, R. E. (2012). Prognostic utility of pre-operative circulating osteopontin, carbonic anhydrase IX and CRP in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 107(7), 1131–7.
- Simon, J. A., Lange, C. A. (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 647(1-2), 21–9
- Sioud, M. (2014). Overcoming the challenges of siRNA Activation of innate immunity: Design better therapeutic siRNAs. In *RNA Interference: Challenges and Therapeutic Opportunities*, 1218, 301–319.
- Sjölund, J., Johansson, M., Manna, S., Norin, C., Pietras, A., Beckman, S., Axelson, H. (2008). Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(1), 217–28.
- Small, K. M., Potter, S. S. (1993). Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes and Development*, 7(12 A), 2318–2328.
- Sokhi, H. K., Mok, W. Y., Patel, U. (2015). Stage T3a renal cell carcinoma: Staging accuracy of CT for sinus fat, perinephric fat or renal vein invasion. *British Journal of Radiology*, 88(1045).
- Soki, F. N., Park, S. I., McCauley, L. K. (2012). The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis. *Future Oncology*, 8(7), 803–17.
- Song, D. Y., Song, S., Song, Y., Lee, J. E. (2012). Alcohol intake and renal cell cancer risk: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 106(11), 1881–90.
- Song, X., Liu, Z., Cappell, K., Gregory, C., Said, Q., Prestifilippo, J., Bissler, J. (2017). Natural history of patients with tuberous sclerosis complex-related renal angiomyolipoma. *Current Medical Research and Opinion*, 33(7), 1–13.
- Sonpavde, G., Hutson, T. E., Rini, B. I. (2008). Axitinib for renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs*, 17(5), 741–748.
- Sorbellini, M., Kattan, M. W., Snyder, M. E., Reuter, V., Motzer, R., Goetzl, M., Russo, P. (2005). A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 173(1), 48–51.
- Sourbier, C., Danilin, S., Lindner, V., Steger, J., Rothhut, S., Meyer, N., Massfelder, T. (2007). Targeting the nuclear factor-kappa B rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy.

Cancer Research, 67(24) 11668–11676.

Sourbier, C., Lindner, V., Lang, H., Agouni, A., Schordan, E., Danilin, S., Massfelder, T. (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: A new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Research*, 66(10), 5130–5142.

Sourbier, C., Massfelder, T. (2006). Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma. *Cancer Letters*, 240(2), 170–182.

Spano, D., Heck, C., De Antonellis, P., Christofori, G., Zollo, M. (2012). Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 22(3), 234–949.

Stadler, W. M., Huo, D., George, C., Yang, X., Ryan, C. W., Karrison, T., Vogelzang, N. J. (2003). Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer. *J Urol*, 170, 1141–1145.

Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., McMahon, A. P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*, 372, 679–683.

Stecca, B., Ruiz I Altaba, A. (2010). Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(2), 84–95.

Steffens, S., Janssen, M., Roos, F. C., Becker, F., Schumacher, S., Seidel, C., Schrader, A. J. (2012). Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma - A multicentre study. *European Journal of Cancer*, 48(15), 2347–2352.

Steffens, S., Schrader, A. J., Vetter, G., Eggers, H., Blasig, H., Becker, J., Serth, J. (2012). Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Letters*, 3(4), 787–790.

Steinbrecher, K. A., Wilson, W., Cogswell, P. C., Baldwin, A. S. (2005). Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), 8444–55.

Sternberg, C. N., Davis, I. D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., Hawkins, R. E. (2010). Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(6), 1061–8.

Stickel, J. S., Stickel, N., Hennenlotter, J., Klingel, K., Stenzl, A., Rammensee, H.-G., Stevanović, S. (2011). Quantification of HLA class I molecules on renal cell carcinoma using Edman degradation. *BMC Urology*, 11, 1.

Stickel, J. S., Weinzierl, A. O., Hillen, N., Drews, O., Schuler, M. M., Hennenlotter, J., Stevanović, S. (2009). HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(9), 1407–1417.

Struckmann, K., Mertz, K. D., Steu, S., Storz, M., Staller, P., Krek, W., Moch, H. (2008). pVHL co-ordinately

regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma. *Journal of Pathology*, 214(4), 464–471.

Stuart, E. T., Haffner, R., Oren, M., Gruss, P. (1995). Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *The EMBO Journal*, 14(22), 5638.

Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H., Taira, M. (2012). Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. *Development*, 139(9), 1651–1661.

Sufrin, G., Chasan, S., Golio, A., Murphy, G. P. (1989). Paraneoplastic and serologic syndromes of renal adenocarcinoma. *Seminars in Urology*, 7(3), 158–171.

Sun, M., Shariat, S. F., Cheng, C., Ficarra, V., Murai, M., Oudard, S., Karakiewicz, P. I. (2011). Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: A contemporary review. *European Urology*, 60(4), 644–61.

Suva, L. J., Winslow, G. A., Wettenhall, R. E., Hammonds, R. G., Moseley, J. M., Diefenbach-Jagger, H., Chen, E. Y. (1987). A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4817), 893–6.

Taira, M., Jamrich, M., Good, P. J., Dawid, I. B. (1992). The LIM domain-containing homeo box gene *Xlim-1* is expressed specifically in the organizer region of *Xenopus* gastrula embryos. *Genes and Development*, 6(3), 356–366.

Taira, M., Otani, H., Jamrich, M., Dawid, I. B. (1994). Expression of the LIM class homeobox gene *Xlim-1* in pronephros and CNS cell lineages of *Xenopus* embryos is affected by retinoic acid and exogastrulation. *Development (Cambridge, England)*, 120(6), 1525–1536.

Tam, P. P. L., Khoo, P. L., Wong, N., Tsang, T. E., Behringer, R. R. (2004). Regionalization of cell fates and cell movement in the endoderm of the mouse gastrula and the impact of loss of *Lhx1*(*Lim1*) function. *Developmental Biology*, 274(1), 171–187.

The Cancer Genome Atlas Research Network. (2016). Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 374(2), 135–45.

Tissir, F., Goffinet, A. M. (2003). Reelin and brain development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(6), 496–505.

Torres, M., Gómez-Pardo, E., Dressler, G. R., Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*, 121(12), 4057–4065.

Tsang, T. E., Shawlot, W., Kinder, S. J., Kobayashi, A., Kwan, K. M., Schughart, K., Tam, P. P. (2000). *Lim1* activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Developmental Biology*, 223(1), 77–90.

Tsivian, M., Moreira, D. M., Caso, J. R., Mouraviev, V., Polascik, T. J. (2011). Cigarette smoking is associated

with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(15), 2027–31.

- Tsui, K. H., Shvarts, O., Smith, R. B., Figlin, R. A., deKernion, J. B., Belldegrun, A. (2000). Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *The Journal of Urology*, 163(4), 1090–1095; quiz 1295.
- Ueno, K., Hirata, H., Majid, S., Tabatabai, Z., Hinoda, Y., Dahiya, R. (2011). IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 129, 2360–9.
- Valentini, R. P., Brookhiser, W. T., Park, J., Yang, T., Briggs, J., Dressler, G., Holzman, L. B. (1997). Post-translational processing and renal expression of mouse Indian hedgehog. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 8466–8473.
- Vaziri, S. A. J., Tavares, E. J., Golshayan, A. R., Rini, B. I., Aydin, H., Zhou, M., Ganapathi, R. (2012). Differing von hippel lindau genotype in paired primary and metastatic tumors in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 2, 51.
- Veltri, A., Garetto, I., Tosetti, I., Busso, M., Volpe, A., Pacchioni, D., Papotti, M. (2011). Diagnostic accuracy and clinical impact of imaging-guided needle biopsy of renal masses. Retrospective analysis on 150 cases. *European Radiology*, 21(2), 393–401.
- Venegas-FERRÍN, M., Sudou, N., Taira, M., Del Pino, E. M. (2010). Comparison of Lim1 expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *International Journal of Developmental Biology*, 54(1), 195–202.
- Vera-Badillo, F. E., Conde, E., Duran, I. (2012). Chromophobe renal cell carcinoma: A review of an uncommon entity. *International Journal of Urology*, 19(10), 894–900
- Verma, A., Warner, S. L., Vankayalapati, H., Bearss, D. J., Sharma, S. (2011). Targeting Axl and Mer kinases in cancer. *Mol Cancer Ther*, 10(10), 1763–1773.
- Volpe, A., Mattar, K., Finelli, A., Kachura, J. R., Evans, A. J., Geddie, W. R., Jewett, M. A. S. (2008). Contemporary results of percutaneous biopsy of 100 small renal masses: a single center experience. *The Journal of Urology*, 180(6), 2333–2337.
- Volpe, A., Novara, G., Antonelli, A., Bertini, R., Billia, M., Carmignani, G., Strada, E. (2012). Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): Oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU International*, 110(1), 76–83.
- Volpe, A., Panzarella, T., Rendon, R. A., Haider, M. A., Kondylis, F. I., Jewett, M. A. S. (2004). The Natural History of Incidentally Detected Small Renal Masses. *Cancer*, 100(4), 738–745.
- Wotschovsky, Z., Gummlich, L., Liep, J., Stephan, C., Kilic, E., Jung, K., Billaud, J.N., Meyer H-A. (2016). Integrated microRNA and mRNA Signature Associated with the Transition from the Locally Confined to the Metastasized Clear Cell Renal Cell Carcinoma Exemplified by miR-146-5p. *PLoS One*,

- Wai Wong, C., Dye, D. E., Coombe, D. R. (2012). The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 340296
- Wang, J., Sullenger, B. A., Rich, J. N. (2012). Notch signaling in cancer stem cells. *Adv Exp Med Biol*, 727, 174–185.
- Wang, J., You, H., Qi, J., Yang, C., Ren, Y., Cheng, H. (2017). Autocrine and paracrine STIP1 signaling promote osteolytic bone metastasis in renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(10), 17012–17026.
- Wang, P., Pereira, F. a, Beasley, D., Zheng, H. (2003). Presenilins are required for the formation of comma- and S-shaped bodies during nephrogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 130, 5019–5029.
- Wang, T., Shigdar, S., Shamaileh, H. Al, Gantier, M. P., Yin, W., Xiang, D., Duan, W. (2017). Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment. *Cancer Letters*, 387, 77–83.
- Wang, X., He, C., Hu, X. (2014). LIM homeobox transcription factors, a novel subfamily which plays an important role in cancer (Review). *Oncology Reports*, 31(5), 1975–1985.
- Watanabe, M., Rebbert, M. L., Andreazzoli, M., Takahashi, N., Toyama, R., Zimmerman, S., Dawid, I. B. (2002). Regulation of the Lim-1 gene is mediated through conserved FAST-1/FoxH1 sites in the first intron. *Developmental Dynamics*, 225(4), 448–456.
- Way, J. C., Chalfie, M. (1988). *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell*, 54(1), 5–16.
- Webb, D. S., Shimizu, Y., Van Seventer, G. A., Shaw, S., Gerrard, T. L. (1990). LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science*, 249(4974), 1295–1297.
- Wei, J. H., Haddad, A, Wu, K. J., Zhao, H. W., Kapur, P., Zhang, Z. L. Luo, J. H. (2015). A CpG-methylation-based assay to predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Commun*, 6, 8699.
- Weller, A., Sorokin, L., Illgen, E. M., Ekblom, P. (1991). Development and growth of mouse embryonic kidney in organ culture and modulation of development by soluble growth factor. *Developmental Biology*, 144(2), 248–261.
- Wells, A., Grahovac, J., Wheeler, S., Ma, B., Lauffenburger, D. (2013). Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(5), 283–9.
- Wen, J. L., Wen, X. F., Li, R. B., Jin, Y. C., Wang, X. L., Zhou, L., Chen, H. X. (2015). UBE3C promotes growth and metastasis of renal cell carcinoma via activating Wnt/ β -catenin pathway. *PLoS ONE*, 10(2).
- White, N., Khella, H., Grigull, J., Adzovic, S., Youssef, Y., Honey, R., Yousef, G. (2011). miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215. *British Journal of Cancer*,

- White, N. M. A., Newsted, D. W., Masui, O., Romaschin, A. D., Siu, K. W. M., Yousef, G. M. (2014). Identification and validation of dysregulated metabolic pathways in metastatic renal cell carcinoma. *Tumour Biology*, 35(3), 1833–46.
- Wild, W., Pogge von Strandmann, E., Nastos, A., Senkel, S., Lingott-Frieg, A., Bulman, M., Ryffel, G. U. (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1beta inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4695–700.
- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L. Y., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Trail, P. A. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*, 64(19), 7099–7109.
- Winyard, P. J. D., Risdon, R. A., Sams, V. R., Dressler, G. R., Woolf, A. S. (1996). The PAX-2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *Journal of Clinical Investigation*, 98(2), 451–459.
- Wolf, K., Friedl, P. (2009). Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clinical and Experimental Metastasis*, 26(4), 289–298.
- Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A., Whetton, A. D. (2014). The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews*, 40(4), 558–66.
- Woolf, A. S., Kolatsi-Joannou, M., Hardman, P., Andermarcher, E., Moorby, C., Fine, L. G., Gherardi, E. (1995). Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *The Journal of Cell Biology*, 128(1–2), 171–84.
- World Health Organization. (2004). *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours.*
- Wu, G., Bohn, S., Ryffel, G. U. (2004). The HNF1 β transcription factor has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax-8/lim1-induced kidney malformations. *European Journal of Biochemistry*, 271(18), 3715–3728.
- Wu, K., Xu, L., Zhang, L., Lin, Z., Hou, J. (2011). High Jagged1 expression predicts poor outcome in clear cell renal cell carcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 41(3), 411–416.
- Wuttig, D., Baier, B., Fuessel, S., Meinhardt, M., Herr, A., Hoefling, C., Wirth, M. P. (2009). Gene signatures of pulmonary metastases of renal cell carcinoma reflect the disease-free interval and the number of metastases per patient. *International Journal of Cancer*, 125(2), 474–482.
- Wwragg, J., Finnity, J. P., Anderson, J. A., Ferguson, H. J. M., Porfiri, E., Bhatt, R. I., Bicknell, R. (2016). MCAM and LAMA4 are highly enriched in tumor blood vessels of renal cell carcinoma and predict patient outcome. *Cancer Research*, 76(8), 2314–2326.

- Xiao, W., Gao, Z., Duan, Y., Yuan, W., Ke, Y. (2017). Notch signaling plays a crucial role in cancer stem-like cells maintaining stemness and mediating chemotaxis in renal cell carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1).
- Xiong, J., Liu, Y., Luo, S., Jiang, L., Zeng, Y., Chen, Z., Tang, W. (2017). High expression of the long non-coding RNA HEIRCC promotes Renal Cell Carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 8(4), 6555–6563.
- Xu, B., Abourbih, S., Sircar, K., Kassouf, W., Mansure, J. J., Aprikian, A., Brimo, F. (2013). Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with metastasis and adverse clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma: a comparative study and review of the literature. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(10), 1326–36.
- Xu, Q., Krause, M., Samoylenko, A., Vainio, S. (2016). Wnt signaling in renal cell carcinoma. *Cancers*, 8(6).
- Xu, Y., Xia, Q., Rao, Q., Shi, S., Shi, Q., Ma, H., Zhou, X. (2016). DCN deficiency promotes renal cell carcinoma growth and metastasis through downregulation of P21 and E-cadherin. *Tumor Biology*, 37(4), 5171–5183.
- Xu, Z., Meng, X., Cai, Y., Liang, H., Nagarajan, L., Brandt, S. J. (2007). Single-stranded DNA-binding proteins regulate the abundance of LIM domain and LIM domain-binding proteins. *Genes and Development*, 21(8), 942–955.
- Xue, C., Wyckoff, J., Liang, F., Sidani, M., Violini, S., Tsai, K. L., Segall, J. E. (2006). Epidermal growth factor receptor overexpression results in increased tumor cell motility in vivo coordinately with enhanced intravasation and metastasis. *Cancer Research*, 66(1), 192–197.
- Xue, H. Y., Liu, S., Wong, H. L. (2014). Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine (London, England)*, 9(2), 295–312.
- Yakes, F. M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Joly, A. H. (2011). Cabozantinib (XL184), a Novel MET and VEGFR2 Inhibitor, Simultaneously Suppresses Metastasis, Angiogenesis, and Tumor Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(12), 2298–2308.
- Yang, J. C., Haworth, L., Sherry, R. M., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Rosenberg, S. A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 349(5), 427–34.
- Yang, J. C., Hughes, M., Kammula, U., Royal, R., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Rosenberg, S. A. (2007). Ipilimumab (Anti-CTLA4 Antibody) Causes Regression of Metastatic Renal Cell Cancer Associated With Enteritis and Hypophysitis. *Journal of Immunotherapy*, 30(8), 825–830.
- Yang, J. C., Sherry, R. M., Steinberg, S. M., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Rosenberg, S. A. (2003). Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(16), 3127–32.
- Yang, L., Guell, M., Byrne, S., Yang, J. L., De Los Angeles, A., Mali, P., Church, G. (2013). Optimization of

- scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Research*, 41(19), 9049–9061.
- Yao, H. H. C., Whoriskey, W., Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes and Development*, 16(11), 1433–1440.
- Yildirim, L., Thanh, N. T. K., Loizidou, M., Seifalian, A. M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today*, 6(6), 585–607.
- Zbar, B., Tory, K., Merino, M., Schmidt, L., Glenn, G., Choyke, P., Linehan, W. M. (1994). Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J Urol*, 151(3), 561–566.
- Zeng, G.-F., Cai, S.-X., Wu, G.-J. (2011). Up-regulation of METCAM/MUC18 promotes motility, invasion, and tumorigenesis of human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 11(1), 113.
- Zhadanov, A. B., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Westphal, H. (1995). Genomic structure and chromosomal localization of the mouse LIM/homeobox gene Lhx3. *Genomics*, 27, 27–32.
- Zhang, S., Hong, Z., Chai, Y., Liu, Z., Du, Y., Li, Q., Liu, Q. (2017). CSN5 promotes renal cell carcinoma metastasis and EMT by inhibiting ZEB1 degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 488(1), 101–108.
- Zhao, Y., Kwan, K. M., Mailloux, C. M., Lee, W. K., Grinberg, A., Wurst, W., Westphal, H. (2007). LIM-homeodomain proteins Lhx1 and Lhx5, and their cofactor Ldb1, control Purkinje cell differentiation in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(32), 13182–13186.
- Zhou, L., Liu, X.-D., Sun, M., Zhang, X., German, P., Bai, S., Jonasch, E. (2016). Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 35(21), 2687–97.
- Zhou, N. B., Lu, F., Liu, C., Xu, K., Huang, J., Yu, D., Bi, L. (2016). IL-8 induces the epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells through the activation of AKT signaling. *Oncology Letters*, 12(3), 1915–1920.
- Zigeuner, R., Hutterer, G., Chromecki, T., Imamovic, A., Kampel-Kettner, K., Rehak, P., Pummer, K. (2010). External Validation of the Mayo Clinic Stage, Size, Grade, and Necrosis (SSIGN) Score for Clear-Cell Renal Cell Carcinoma in a Single European Centre Applying Routine Pathology. *European Urology*, 57(1), 102–111.
- Zisman, A., Pantuck, A. J., Wieder, J., Chao, D. H., Dorey, F., Said, J. W., Belldegrun, A. S. (2002). Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 20(23), 4559–4566.
- Zisman, A., Pantuck, A. J., Dorey, F., Said, J. W., Shvarts, O., Quintana, D., Belldegrun, A. S. (2001). Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *Journal of Clinical Oncology*, 19(6), 1649–1657.
- Zlotnik, A. (2006). Chemokines and cancer. *International Journal of Cancer*, 119 (9), 2026–2029.



Chapitre VII

ANNEXES



I. Mise en œuvre du modèle *in vivo*

Afin d'étudier l'implication de Lim1 dans le processus métastatique, il était nécessaire de développer un modèle original chez la souris *nude* permettant le développement de métastases visualisables par imagerie et l'inhibition conditionnelle de Lim1.

1. Visualisation des métastases

1.1. Sélection des clones transfectés par la luciférase

La sélection des clones s'est faite tout d'abord par la mesure de l'expression de la luciférase par bioluminescence (pré-sélection) suivi par une analyse des caractéristiques de croissance des clones pré-sélectionnés permettant de ne sélectionner au final que les clones dont la croissance n'est pas affectée par la transfection

1.1.1. Pré-sélection des clones par bioluminescence

Figure 19

Les clones de cellules 786-0 et Caki2 exprimant le meilleur signal luciférase ont été sélectionnés par bioluminescence sur plaques de culture après addition de la luciférine. L'analyse a permis de sélectionner 6 clones de cellules Caki2 (Caki2 Luc1 à 6) et 4 clones de cellules 786-0 (786-0 Luc1 à 4) exprimant un très fort signal luciférase.

1.1.2. Sélection des clones par les caractéristiques de croissance

La sélection des clones s'est faite sur 3 critères de croissance (i) la densité cellulaire pour l'établissement de courbes de croissance, (ii) la prolifération cellulaire et (iii) l'évaluation de l'apoptose tumorale.

1.1.2.1. Densité cellulaire

Figure 20

Des courbes de croissance par coloration au cristal violet ont été réalisées pour les 10 clones luciférase pré-sélectionnés. Les résultats montrent que la transfection des cellules 786-0 par le vecteur codant pour la luciférase ne modifie pas la densité cellulaire, les courbes de croissance obtenues pour les clones pré-sélectionnés étant superposables à celle de la lignée non transfectée. L'ensemble des clones pré-sélectionnés de cellules 786-0 conservent donc une croissance similaire. Nous avons poursuivi la caractérisation des clones avec les clones 2 et 3 choisis au hasard.

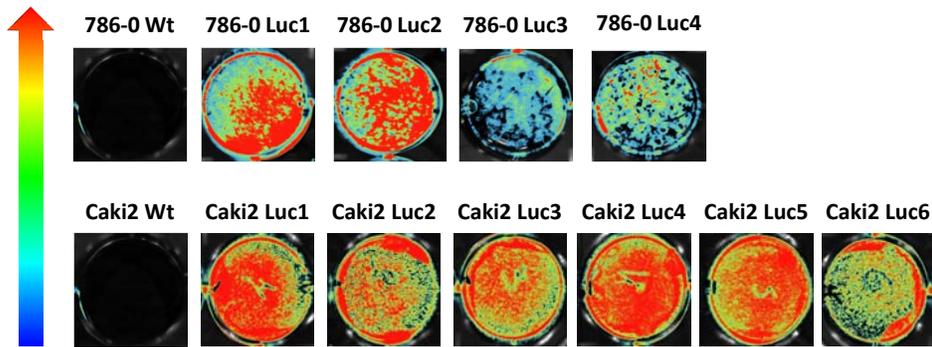


Figure 19: Imagerie par bioluminescence des clones Luciférase

Les cellules 786-0 (VHL-) et Caki2(VHL+) ont été transfectées avec un plasmide codant pour la luciférase, la sélection des cellules ayant intégré ce plasmide s'est faite à l'aide de l'hygromycine (200 µg/ml). 4 clones de cellules 786-0 (786-0 Luc1 à 4) et 6 clones de cellules Caki2 (Caki2 Luc1 à 6) exprimant un bon signal luciférase ont été sélectionnés.

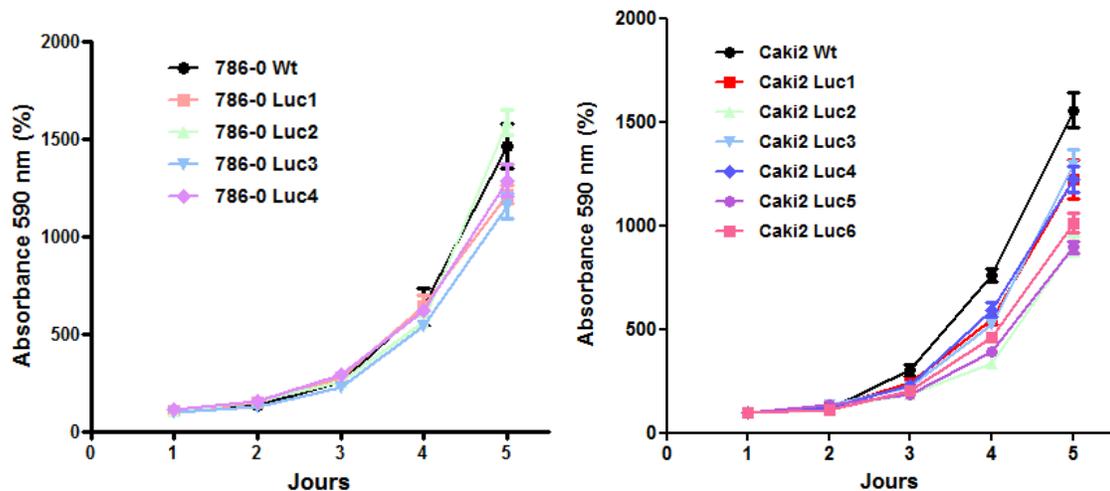


Figure 20: Courbes de croissance des clones Luciférase

Des courbes de croissance des clones 786-0 et Caki2 exprimant la luciférase ont été réalisées sur 5 jours à partir de la densité cellulaire évaluée par la technique de coloration au cristal violet. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'absorbance à 590 nm mesurée à J1 (100%) (n=4).

Concernant les cellules Caki2, des différences ont été observées dans les courbes de croissance en fonction des clones. Les clones Caki2 Luc1, 3 et 4 ne sont pas affectés par la transfection par le vecteur codant pour la luciférase alors que les clones Caki2 Luc2, 5 et 6 ont une croissance altérée. Nous avons décidé de poursuivre la caractérisation des clones Caki2 Luc1 et 3 qui ont une croissance similaire à la lignée de départ.

1.1.2.2. Prolifération cellulaire

Figure 21

La prolifération cellulaire des clones 786-0 Luc2 et 3 et Caki2 Luc1 et 3 a été analysée par mesure de l'incorporation de BrdU. Aucune différence significative n'a été observée dans la prolifération des clones 786-0 ou Caki2 par rapport aux cellules non transfectées, suggérant fortement que la transfection n'a pas affecté cette caractéristique de croissance.

1.1.2.3. Apoptose

Figure 22

L'analyse par FACS montre là encore que la transfection n'a pas affecté l'apoptose des cellules tumorales des clones 786-0 Luc2 et 3 et Caki2 Luc1 et 3. L'apoptose mesurée était de 2,4 % et 1,9 % dans les clones 786-0 Luc2 et 3, vs 2,2 % dans les cellules 786-0 non transfectées. Elle était de 1,7 % et 1,3 % dans les clones Caki2 Luc1 et 3, vs. 1,5% les cellules Caki2 non transfectées, respectivement.

Ces résultats nous ont conduits à utiliser les clones 786-0 Luc2 et 3 et les clones Caki2 Luc1 et 3 pour les doubles transfections.

2. Inhibition conditionnelle de Lim1

2.1. Le système shRNA

Nous avons initialement tenté de mettre en place un modèle métastatique original basé sur l'utilisation de 2 vecteurs d'expression chez la souris *nude* le premier comme établi avant exprimant la luciférase pour visualiser la tumeur primaire et les métastases par bioluminescence et le deuxième exprimant un shRNA ciblant Lim1 sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline permettant l'extinction du gène *Lhx1* de manière conditionnelle avec le traitement à la doxycycline.

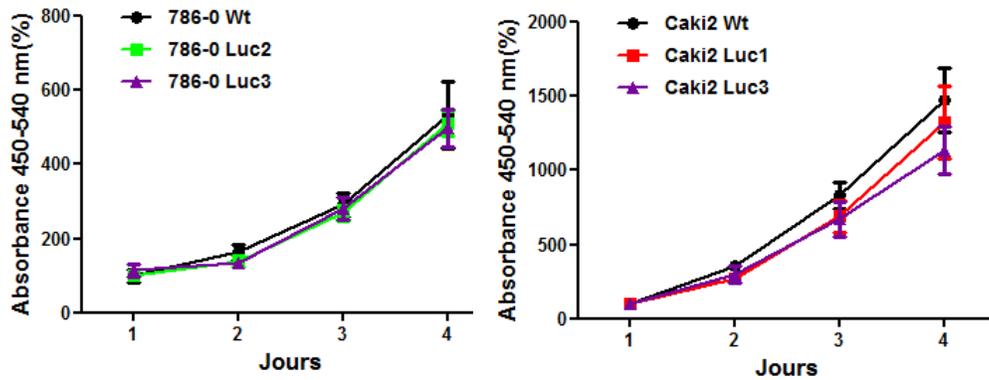


Figure 21: Courbes de prolifération des clones Luciférase

Des courbes de prolifération des clones 786-0 Luc2 et 3 et Caki2 Luc1 et 3 exprimant la luciférase ont été réalisées par le test d'incorporation du BrdU pendant 4 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'absorbance à 450-540nm mesurée à J1 (100%) (n=4).

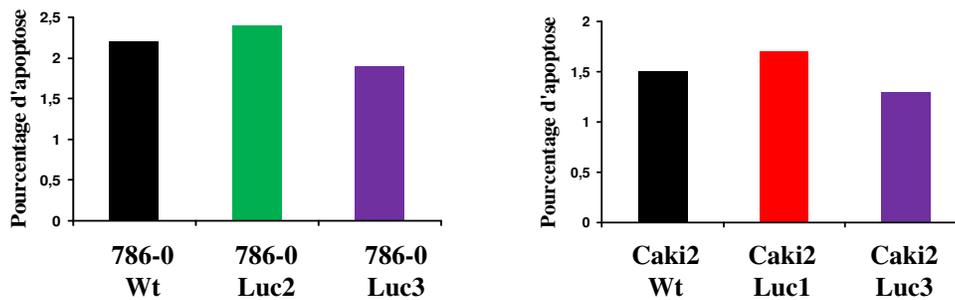


Figure 22: Pourcentage d'apoptose des clones Luciférase

Le pourcentage d'apoptose à 24h des clones 786-0 Luc2 et 3 et Caki2 Luc1 et 3 exprimant la luciférase a été évalué par cytométrie en flux (FACS). Le taux de cellules mortes par apoptose est exprimé en pourcentage par rapport au nombre de cellules totales (n=1).

2.1.1. *Le système shRNA inducible à la doxycycline*

2.1.1.1. Transfections stables

Il s'agissait ici de développer des clones stables de cellules 786-0 et Caki2 doublement transfectées (DT) à partir des clones sélectionnés ci-dessus. Les clones 786-0 Luc2 et 3 et Caki2 Luc1 et 3 ont été transfectés avec un plasmide exprimant un shRNA anti-Lim1 ou un shRNA contrôle contenant un promoteur inducible à la doxycycline, à savoir les vecteurs pSingle-tTS-shLhx et pSingle-tTS-shCtl respectivement, portant un gène de résistance à la néomycine. Après culture en présence d'hygromycine (200 µg/ml) et de néomycine (500 µg/ml), un pool cellulaire doublement transfecté a été obtenu à partir des 2 clones luciférase sélectionnés pour chaque lignée.

Pour sélectionner les clones DT qui serviront aux études d'invasion tumorale chez la souris *nude*, il est nécessaire de faire plusieurs vérifications. Dans un premier temps, la mesure de l'expression de la luciférase dans les clones doublement transfectés afin de s'assurer que la transfection par le deuxième vecteur n'a pas perturbé l'expression de la luciférase. Dans un deuxième temps, la mesure de l'expression de Lim1 dans ces clones afin de mesurer l'efficacité d'extinction de l'expression de Lim1 après traitement à la doxycycline, idéalement > 90% dans les clones. Enfin, dans un troisième temps, la mesure des caractéristiques de croissance des clones doublement transfectés comme a été fait pour les clones luciférase.

2.1.1.1.1. *Pré-sélection des clones doublement transfectés par bioluminescence*

Figure 23

A partir des pools de cellules 786-0 et Caki2 doublement transfectées, 21 clones de cellules 786-0 et 30 clones Caki2 ont été établis et leur expression de luciférase vérifiée par bioluminescence après addition de 150 µg/ml de luciférine dans le milieu de culture. Les résultats montrent que tous les clones 786-0 et Caki2 DT dérivés des clones 786-0 Luc2 ou 3 et des clones Caki2 Luc1 ou 3 respectivement ont conservé une expression de luciférase plus au moins comparable à celle des clones luciférase d'origine à partir desquels ils ont été obtenus.

2.1.1.1.2. *La sélection des clones doublement transfectés sensibles à la doxycycline*

Figure 24

Tous les clones établis 786-0, Caki2 DT ainsi que les pools cellulaires DT d'origine ont été cultivés en présence ou en absence de doxycycline à 1µg/ml pendant 48h selon les données de la bibliographie (et

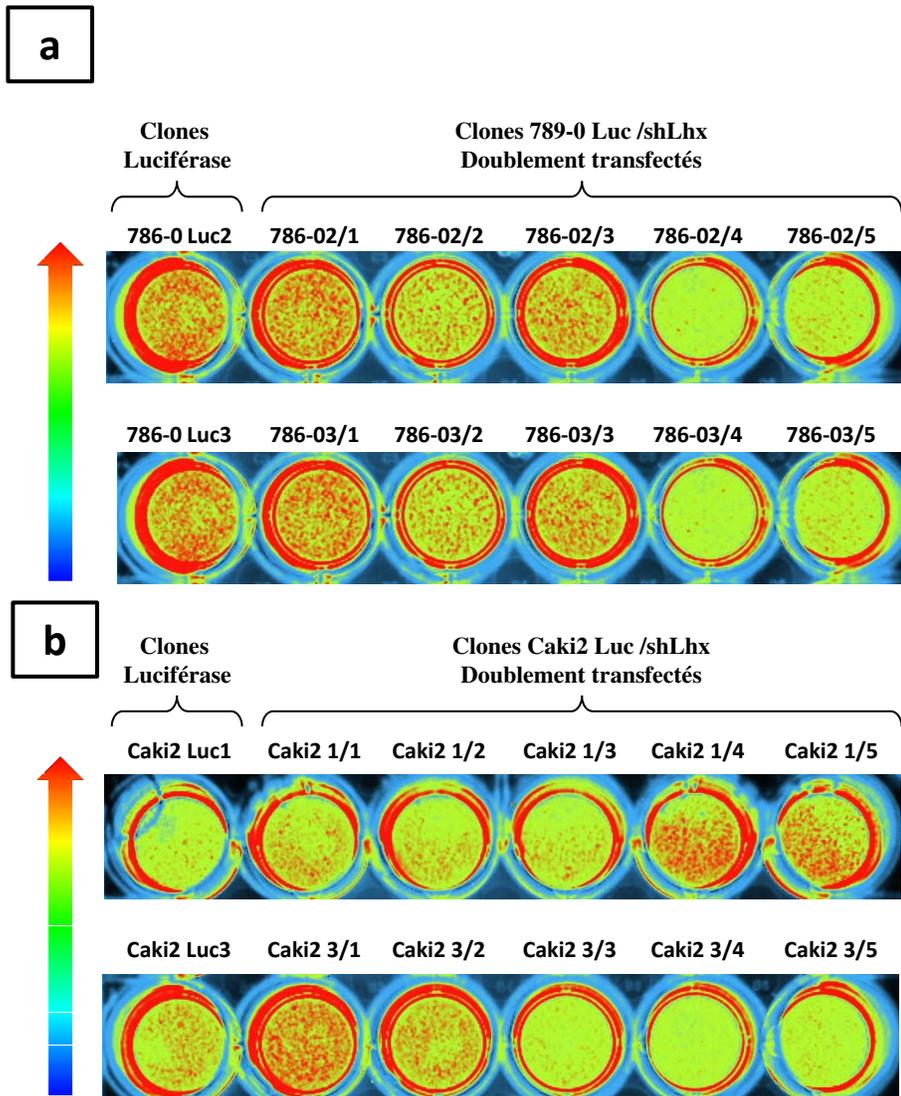


Figure 23: Bioluminescence des clones doublement transfectés

Les clones 786-0 Luc2, 786-0 Luc3 et Caki2 Luc1, Caki2 Luc3 exprimant la luciférase ont été transfectés avec un plasmide codant pour un shRNA anti-Lim1 (shLhx), la sélection des cellules ayant intégré le deuxième vecteur s’est faite avec la néomycine (500 µg/ml). Vingt et un clones 786-0 et 30 clones Caki2 doublement transfectés (DT) ont été établis (Luc/shLhx). Les résultats montrent que tous les clones (a) 786-0 et (b) Caki2 DT dérivés des clones 786-0 Luc2 ou 3 et des clones Caki2 Luc1 ou 3 respectivement ont conservé une expression de luciférase plus au moins comparable à celle des clones luciférase d’origine. Ici nous montrons 5 clones DT pour chaque clone luciférase.

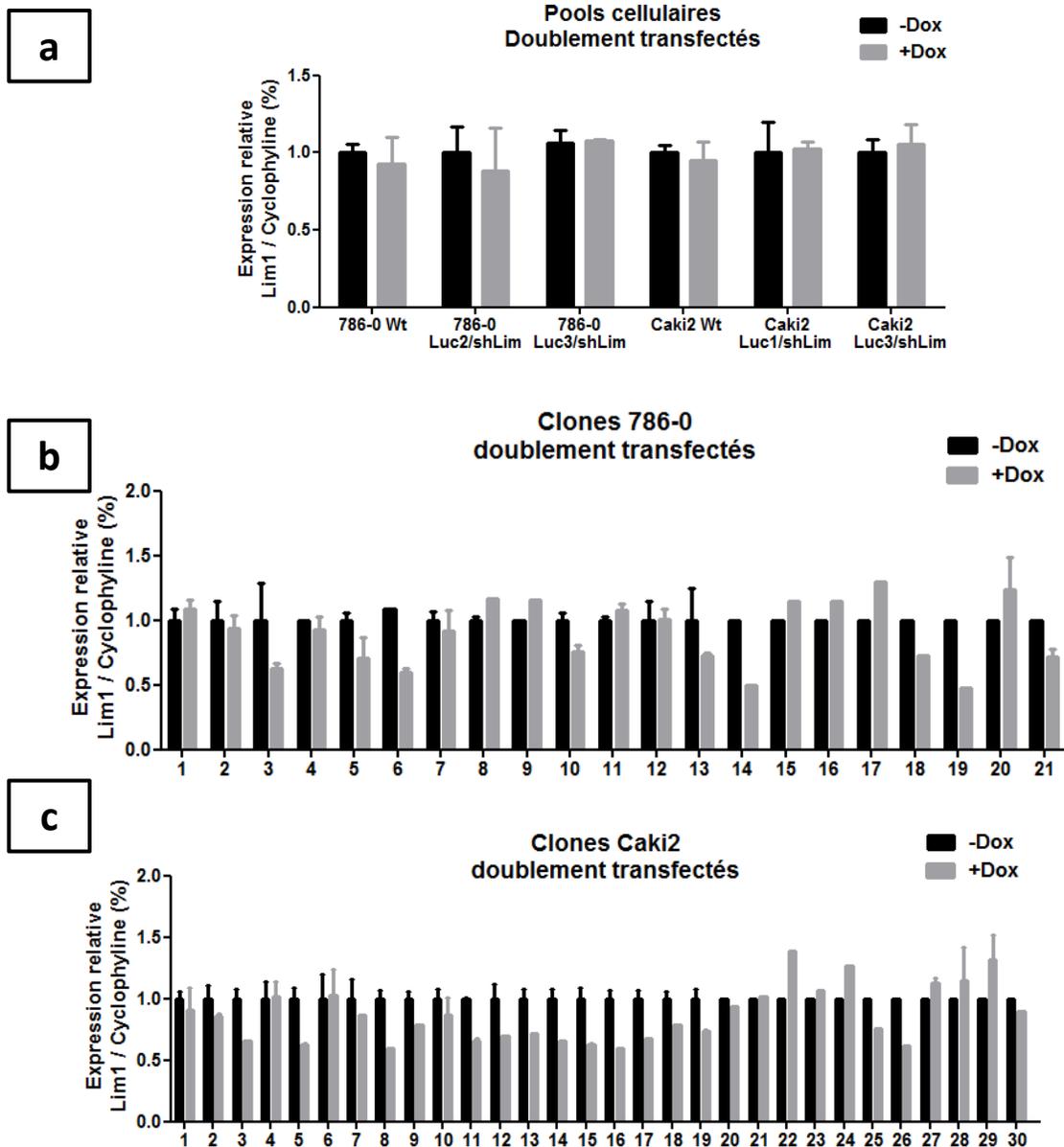


Figure 24: Screening des clones doublement transfectés sensibles à la doxycycline

L'expression relative de Lim1 par rapport à la cyclophiline a été étudiée à partir des pools cellulaires doublement transfectés (a) ; des clones 786-0 (b) et Caki2 (c) doublement transfectés traités ou non avec la doxycycline à 1 µg/ml pendant 48h (n=1-2). L'absence d'effet de la doxycycline sur l'expression de Lim1 a été également étudiée sur les cellules Wt non transfectées (a). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (100%).

le protocole du fournisseur) pour sélectionner ceux où l'expression de Lim1 est inhibée au moins à 90%. Comme contrôle, les lignées 786-0 et Caki2 non transfectées ont été également cultivées en présence et en absence de la doxycycline afin de vérifier l'absence d'effet du traitement sur l'expression de Lim1. L'expression de Lim1 a été analysée par RT-qPCR et a été normalisée en rapportant les taux d'ARNm à ceux du gène domestique cyclophiline.

Les résultats montrent l'absence d'effet de la doxycycline sur l'expression de Lim1 dans les cellules 786-0 et Caki2 Wt non transfectées comparativement aux cellules non traitées. Cependant, aucun effet d'induction de l'expression du shLhx avec la doxycycline dans les 4 pools cellulaires doublement transfectés à savoir 786-0 Luc2/shLhx, 786-0 Luc3/shLhx, Caki2 Luc1/shLhx et Caki2 Luc3/shLhx.

Concernant les clones doublement transfectés, comme il s'agit d'une étape de screening, la RT-qPCR a été réalisée uniquement en simple ou en duplicata. Les résultats montrent l'absence d'effet de la doxycycline sur l'induction de l'expression du shLhx dans plus de la moitié des clones doublement transfectés et cela pour les deux lignées cellulaires 786-0 et Caki2. 10 Clones sur 21 clones 786-0 DT et 15 Clones sur 30 clones DT ont montré une légère sensibilité au traitement doxycycline et une diminution de l'expression de Lim1 ne dépassant pas les 40%. La significativité de cette différence ne pouvant pas être évaluée à cause du nombre n d'échantillons. 40% de diminution est en outre insuffisante pour notre modèle *in vivo*, sachant que l'objectif au départ étant de 90% d'inhibition avec l'induction de doxycycline.

2.1.1.2. Transfections transitoires

2.1.1.2.1. Etablissement des conditions optimales pour l'induction du système shRNA

Figure 25

Il s'agit pour cette étape de définir les conditions optimales pour une induction de l'expression du système shRNA dans nos cellules, à savoir la concentration seuil de doxycycline et la durée de traitement. Pour cela, nous avons opté pour technique rapportrice visuelle plus rapide, il s'agit de l'imagerie par bioluminescence. Comme nous disposons déjà de clones luciférase exprimant un fort signal de bioluminescence, il suffit de transfecter les cellules en transitoire avec un shRNA ciblant la luciférase shLuc sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline. Afin de choisir la concentration optimale d'induction du système Tet-On, nous avons traité les cellules 4h après transfection avec différentes concentrations de 0 à 4 µg/ml, et nous avons observé les plaques par imagerie par bioluminescence. Nous avons choisi la transfection en transitoire pour une meilleur charge en vecteur et donc une meilleur efficacité d'induction. Les résultats par imagerie de

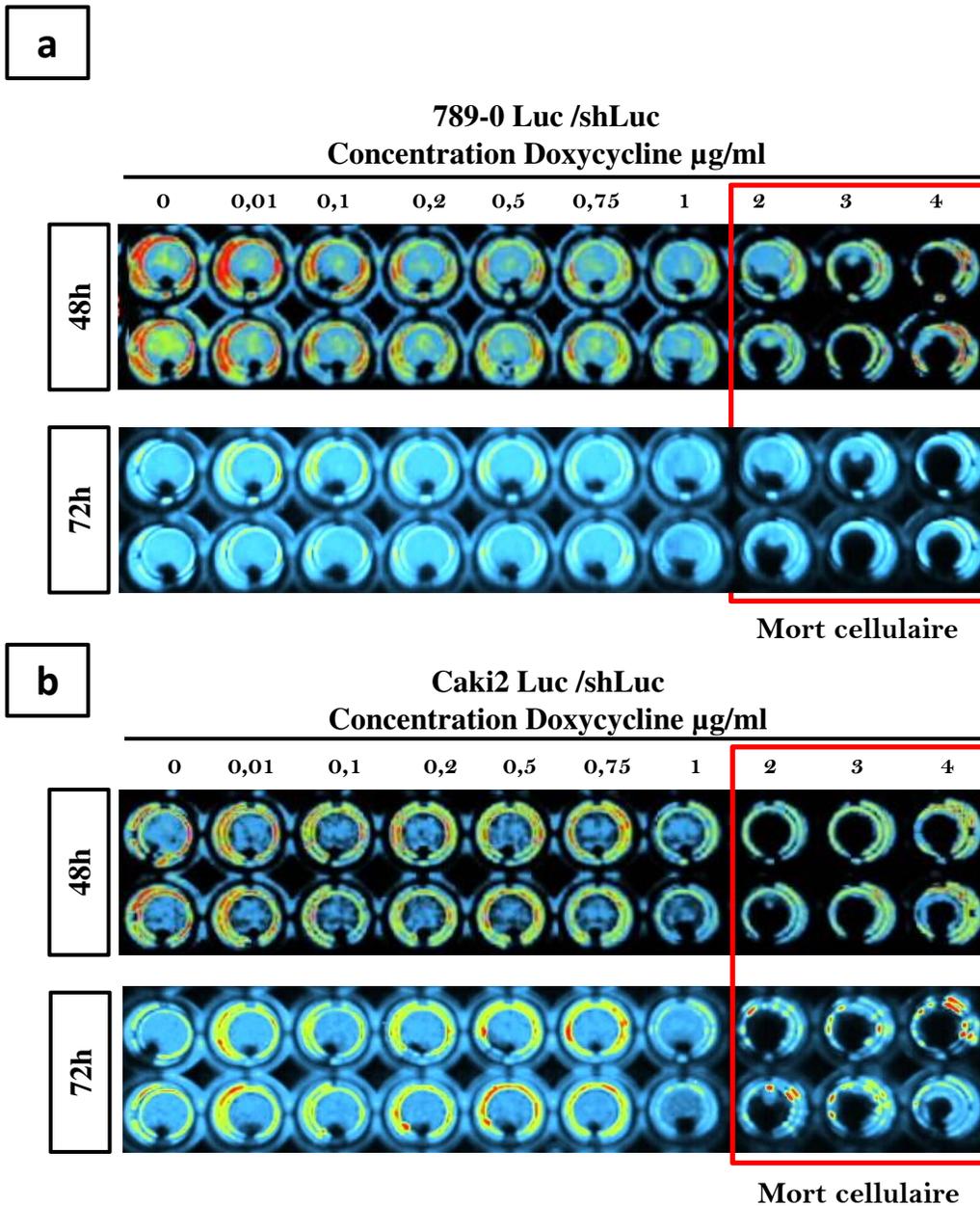


Figure 25: Screening des conditions optimales pour l'induction du système Tet-On

Imagerie par bioluminescence des cellules 786-0 (a) et Caki2 (b) exprimant la luciférase après transfection transitoire avec le vecteur shRNA ciblant la luciférase inducible et traitées avec différentes concentrations de doxycycline pendant 48h et 72h (n=2).

bioluminescence montrent l'absence de diminution du signal luciférase à 48h et 72h dans les cellules transfectées avec le shLuc inductible et cela avec toutes les concentrations de doxycyclines de 0.01µg/ml jusqu'à 1µg/ml comparativement aux cellules non traitées 0 µg/ml. L'absence d'effet de la doxycycline est observée pour les deux lignées cellulaires exprimant la luciférase à savoir 786-0 Luc et Caki2 Luc. Cependant une cytotoxicité liée à la doxycycline a été observée à partir de 2µg/ml pour les deux lignées. A partir de ces résultats nous concluons l'absence de diminution de l'expression de luciférase liée à une absence d'induction de l'expression de shLuc ou à une séquence shLuc non efficace sachant que la séquence shLuc a été désignée à partir des siRNAs qui induisent 98% d'inhibition de l'activité luciférase par transfection. Nous concluons également que 1 µg/ml est la concentration seuil à ne pas dépasser dans nos types cellulaires.

2.1.1.2.2. Vérification de l'efficacité du shLhx inductible en transfection transitoire

Figure 26

Dans les résultats précédents, malgré une cinquantaine de clones testés, aucun clone ou pool cellulaire n'a montré une inhibition satisfaisante avec le traitement doxycycline. Il est évident que le nombre de copies de vecteurs intégrés dans le génome cellulaire est variable ce qui peut expliquer la faible induction avec le traitement de doxycycline. Afin de vérifier qu'il s'agit d'un problème de transfection et non de séquence shRNA, nous avons décidé cette fois de transfecter les cellules 786-0 et Caki2 Wt (cette fois ci afin d'éliminer un possible effet de compétition entre promoteurs) en transitoire avec le vecteur shRNA inductible afin d'assurer une charge suffisante du vecteur dans les cellules. Quatre heures après transfection, les cellules ont été traitées avec la 1µg/ ml de doxycycline à 1µg/ml (concentration seuil) pendant 24h à 72h. Là encore, les analyses par RT-qPCR de l'expression de Lim1 ont montré l'absence d'effet d'induction de l'expression du shRNA ciblant Lim1 ou l'absence d'effet de la séquence shRNA sur l'expression de Lim1 dans les deux lignées cellulaires testées 786-0 et Caki2 à différents temps 24-72h.

2.1.1.2.3. Vérification de la séquence des différents shRNA par séquençage

Nous avons nous-mêmes conçu les vecteurs d'expression que nous avons amplifiés dans des bactéries compétentes après transformation. La probabilité de mutation du vecteur dans les bactéries lors de la transformation ou la multiplication est très faible. Afin d'éliminer un possible problème dans la séquence shRNA ciblant Lim1 et la séquence shRNA ciblant la luciférase ou même dans le promoteur par mutation, les vecteurs plasmidiques ont été séquencés par la boîte GATC grâce à une amorce spécifique au vecteur. Les résultats de séquençage ont montré une identité de 100% avec les séquences

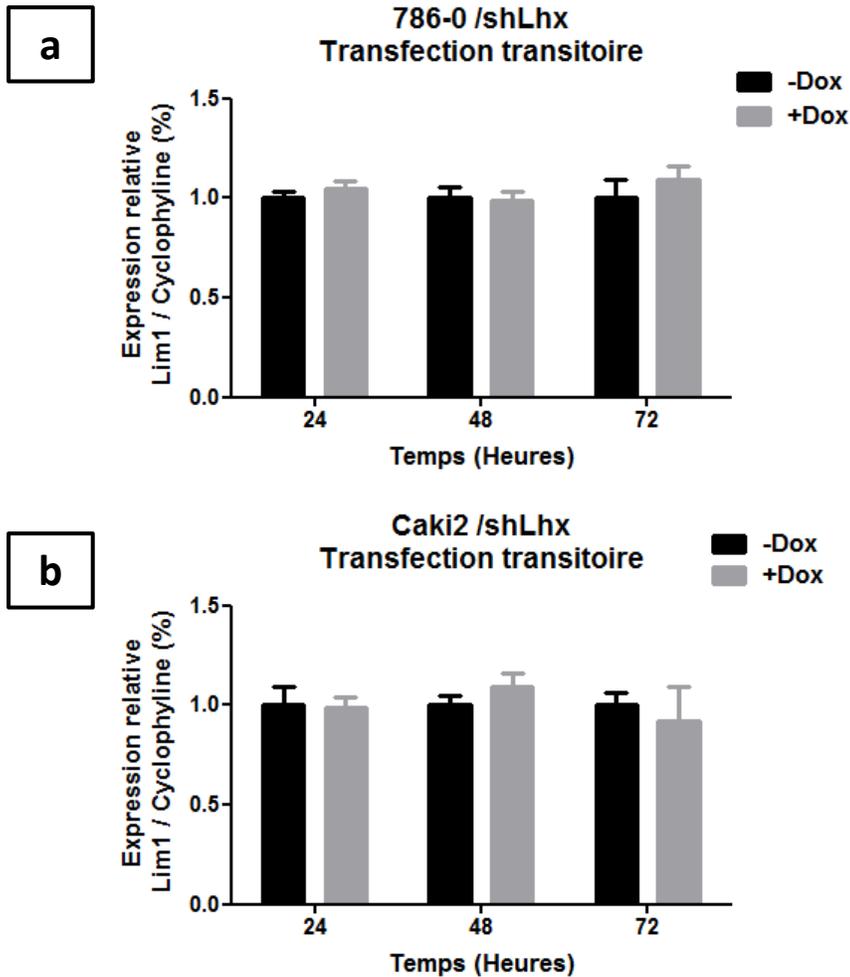


Figure 26: Traitement à la doxycycline après transfection transitoire avec le vecteur shRNA ciblant Lim1 inducible

L'expression relative de Lim1 par rapport à la cyclophiline a été étudiée dans les cellules 786-0 (a) et Caki2 (b) transfectées en transitoire avec le vecteur shRNA inducible ciblant Lim1 et traitées avec 1µg/ml de doxycycline de 24h à 72h (n=4). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (100%).

attendues et aucun problème au niveau des séquences shRNA correspondants ni au niveau du promoteur le système Tet-On.

2.1.2. Le système shRNA constitutif

Il est clair que l'efficacité du système shRNA dépend de plusieurs paramètres. Elle peut dépendre de la séquence à cibler du design de la boucle et du type cellulaire. Il est important de noter que les séquences siRNA et séquences shRNA ciblant la même séquence peuvent avoir des efficacités de *silencing* différentes. Il est donc nécessaire de tester plusieurs séquences shRNA ciblant Lim1 et choisir celle qui est capable d'induire une inhibition de l'expression de Lim1 >90%. Afin de s'affranchir des problèmes d'induction de l'expression du shRNA par la doxycycline, le screening a été fait sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

2.1.2.1. Le screening des séquences shRNA efficaces pour le *silencing* de Lim1

Figure 27

Nous avons choisi cinq vecteurs exprimant de façon constitutive 5 shRNA ciblant 5 régions distinctes de Lim1. Les séquences cibles sont principalement situées dans les exons 1, 2 et 4 qui codent respectivement pour les deux domaines LIM et l'homéodomaine. Les cellules 786-0 et Caki2 ont été transfectées avec les cinq vecteurs shRNA ciblant Lim1 de 24 à 72h. Comme contrôle négatif, nous avons utilisé le vecteur qui exprime un shRNA ciblant la GFP et donc aucune cible dans le génome humain. L'expression de Lim1 a été analysée par RT-qPCR et a été normalisée en rapportant les taux d'ARNm à ceux du gène domestique cyclophiline. Les résultats montrent aucune diminution significative de l'expression de Lim1 avec les cinq vecteurs exprimant le shRNA constitutif ciblant Lim1 comparativement au shGFP contrôle.

2.1.2.2. Etude de l'effet d'un shRNA ciblant la GFP validé par le fournisseur

Figure 28

Jusque-là, sept séquences shRNA ont été testées dans nos cellules mais aucune n'a montré une efficacité satisfaisante. Nous avons donc décidé de tester un contrôle positif de shRNA validé et testé par le fournisseur sur plusieurs lignées cellulaires. Il s'agit d'un shRNA ciblant la GFP de façon constitutive. Selon les instructions du fournisseur, nos cellules 786-0 et Caki2 ont été préalablement transfectées avec un vecteur exprimant la GFP. Après 24h, l'efficacité de transfection a été évaluée sous microscope à fluorescence. Les cellules ont été ensuite transfectées une deuxième fois avec le vecteur exprimant le shRNA ciblant la GFP en constitutif. L'efficacité du *silencing* de la GFP a été analysée 24h et 48h après la deuxième transfection avec le vecteur shRNA. Le pourcentage des

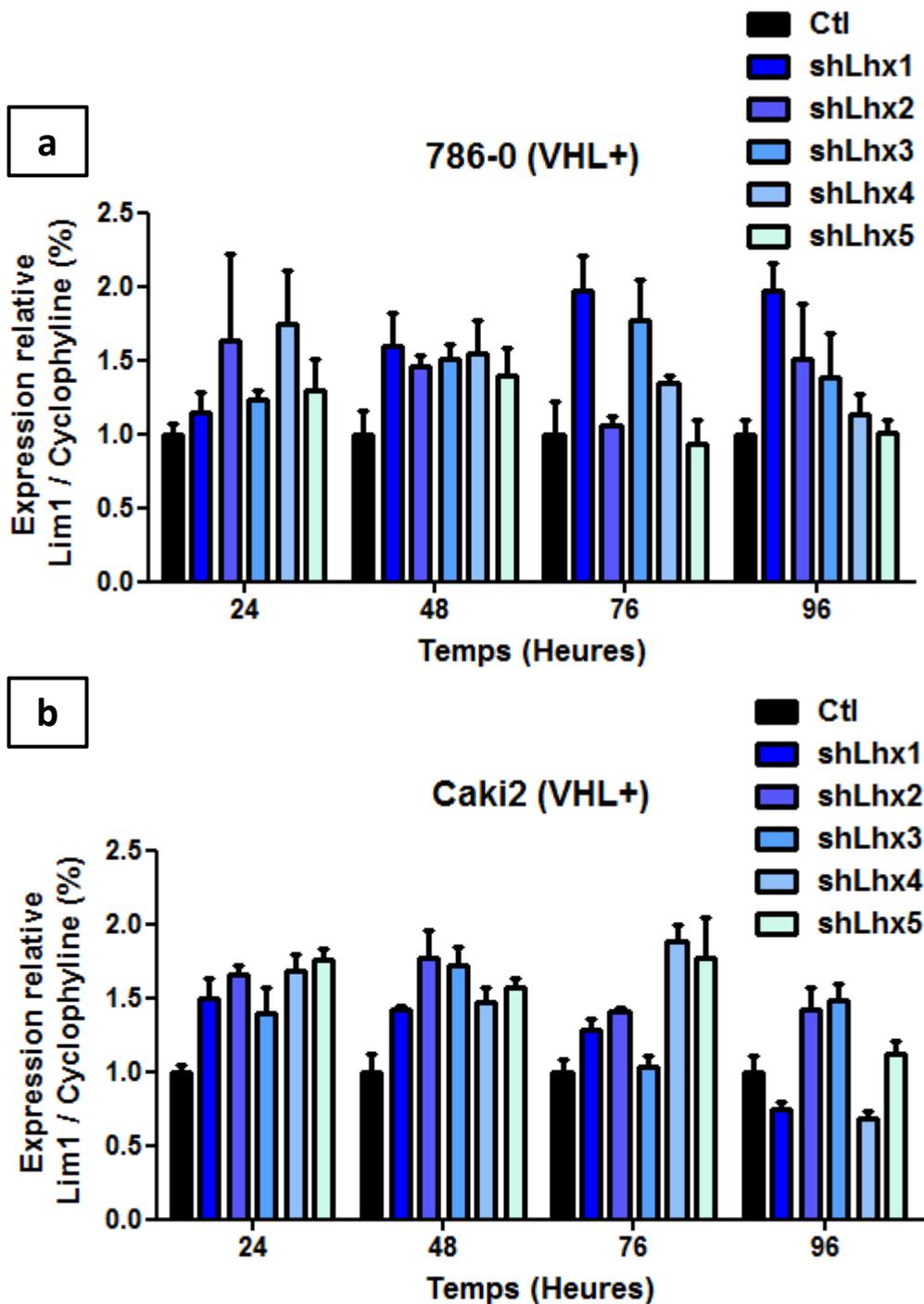


Figure 27: Etude de l'efficacité de 5 vecteurs shRNA ciblant Lim1 sous le contrôle d'un promoteur constitutif

L'expression relative de Lim1 par rapport à la cyclophiline a été étudiée à partir des cellules 786-0 (a) et Caki2 (b) transfectées en transitoire avec cinq vecteurs shRNA ciblant cinq régions distinctes de Lim1 (*shLhx1-5*) sous le contrôle d'un promoteur constitutif de 24h à 96h (n=4). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (100%).

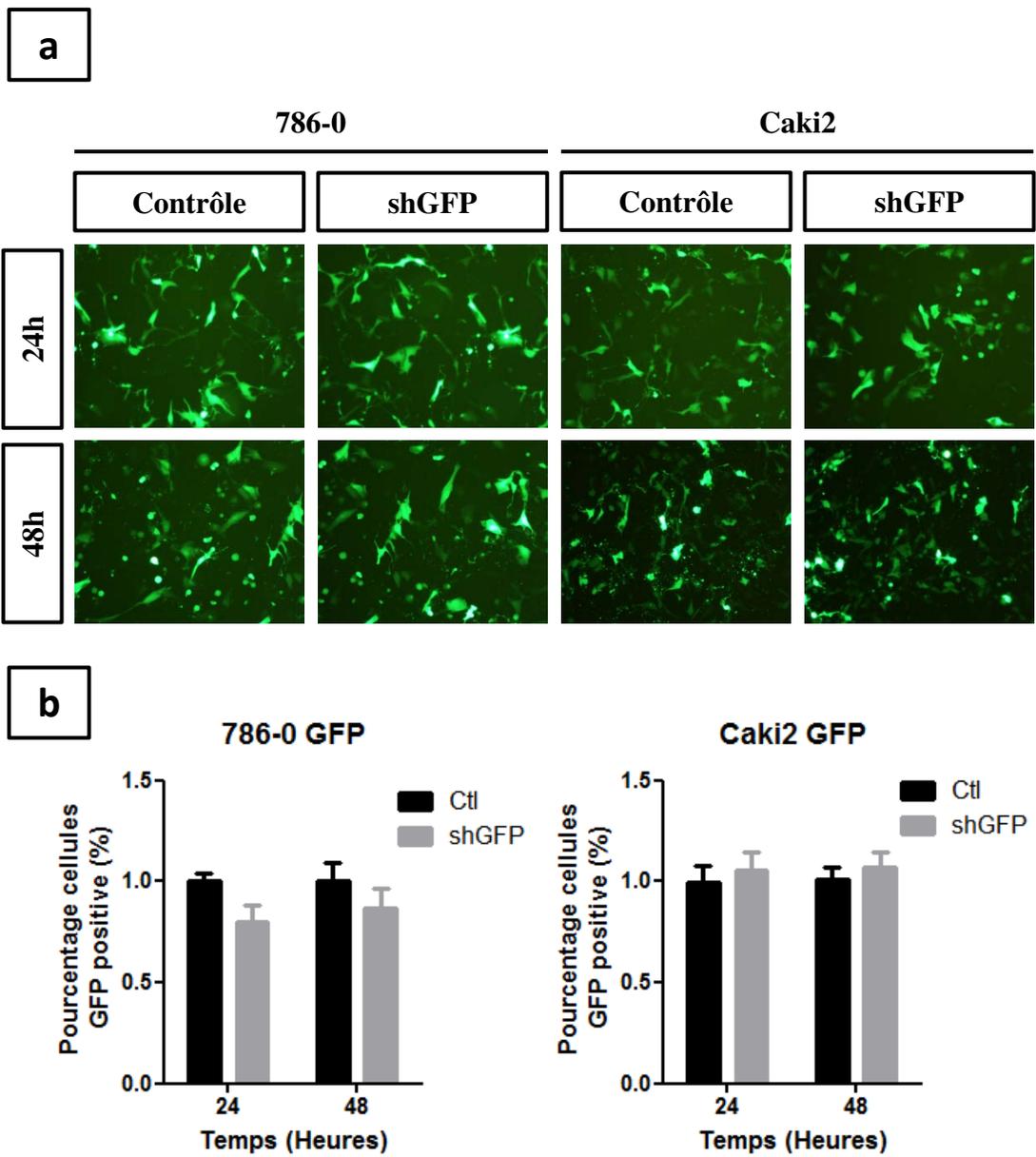


Figure 28: Analyse par microscopie à fluorescence de l'effet du vecteur shRNA ciblant la GFP sur des cellules exprimant la GFP

Des cellules 786-0 et Caki2 exprimant la GFP ont été transfectées avec un vecteur codant pour un shRNA ciblant la GFP (shGFP) de 24h à 48h. (a) Microscopie à fluorescence des cellules exprimant la GFP avec ou sans transfection avec le shGFP, (b) Quantification de la fluorescence à partir des cellules GFP positives transfectées ou non avec le shGFP. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fluorescence par rapport aux cellules contrôle (100%) (n=4).

cellules fluorescentes ainsi que l'intensité de la fluorescence ont été quantifiés par le logiciel Image J et les résultats sont exprimés en pourcentage de la fluorescence par rapport aux cellules ayant reçu uniquement le vecteur exprimant la GFP (100%). Là encore, les résultats ne montrent pas de diminution de l'expression de la GFP avec le shGFP dans les deux lignées cellulaires 786-0 et Caki2 à 24h et 48 de la deuxième transfection.

2.2. Système LoxP Cre-ER inductible / Edition Génomique ciblée CRISPR/Cas9

Après plusieurs tentatives de mise en œuvre du système à double expression dans les cellules à injecter chez les souris pour le modèle *in vivo*, nous avons opté pour un autre système inductible ; il s'agit du système LoxP/Cre-ER inductible au tamoxifène. Nous avons imaginé l'insertion de séquence LoxP en amont et en aval du gène *Lhx1* ce qui permet la délétion conditionnelle du gène grâce à une recombinase Cre-ER fusionné à un récepteur aux androgènes inductible au tamoxifène. Jusqu'à 2013, l'édition génomique ciblée a été une technologie très longue et très compliquée sans assurance de succès. Cependant, avec la découverte du système CRISPR/Cas 9 appelé encore, les ciseaux de l'ADN, sur la base des travaux de Charpentier et Doudna, il est devenu plus simple d'introduire n'importe quelle mutation de façon ciblée et précise, il suffit de diriger la nucléase Cas9 en lui précisant une séquence de moins de 20pb à cibler.

2.2.1. Sélection des séquences crRNA capables d'induire un clivage efficace de l'ADN double brin avec la Cas9

Figure 29

Nous avons conçu 4 vecteurs qui co-expriment le sgRNA et la nucléase Cas9 à partir de 4 séquences cibles, 2 en amont et 2 en aval du gène *Lhx1*. Là encore, il est important de vérifier que les séquences sgRNA choisies sont capables de se fixer sur l'ADN cible et de diriger la Cas9. Parfois, à cause du surenroulement de l'ADN, les séquences cibles ne sont pas forcément accessibles. Les 2 lignées 786-0 et Caki2 ont été transfectées avec les 4 vecteurs. Après amplification par PCR des régions ciblées en amont et en aval, les produits de PCR ont subi un cycle de dénaturation-hybridation, ce qui permet l'hybridation aléatoire et hétérogène des fragments de PCR et la présence donc des *mismatch*. L'ajout de l'enzyme de détection permet de reconnaître et de couper les *mismatch*, ce qui se traduit par la présence de plusieurs bandes après séparation sur gel.

Afin de valider cette expérience, un contrôle positif composé d'un mix de fragments de PCR avec plusieurs *mismatch* a été utilisé et les résultats montrent la présence de plusieurs bandes suite au clivage enzymatique des *mismatch* reconnus par l'enzyme de détection. Les produits de PCR en amont (387pb) issus des cellules 786-0 et Caki2 transfectées avec le sgRNA1 en présence de l'enzyme de détection montrent la présence de deux bandes une à 387 pb correspondant à la bande Wt et une

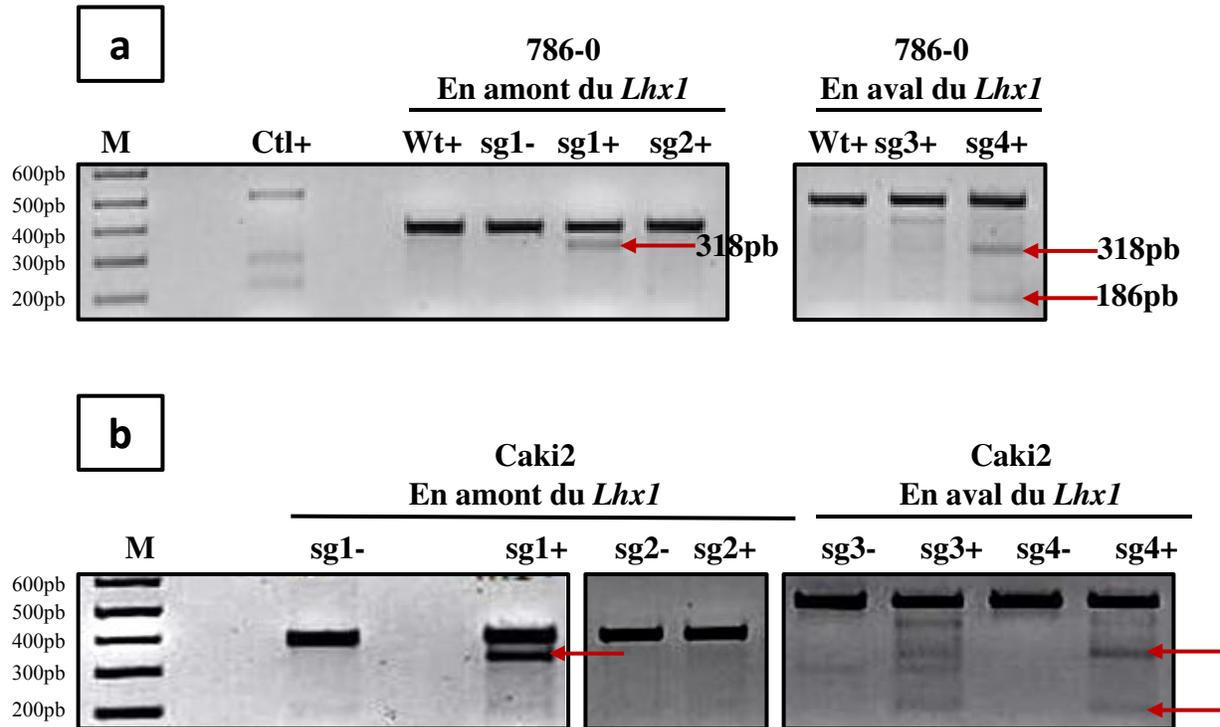


Figure 29: Sélection des sgRNAs capables d'induire un clivage efficace de l'ADN double brin

Les cellules 786-0 (a) et Caki2 (b) ont été transfectées avec les 4 vecteurs sgRNA. sg1-2 ciblant une région en amont du gène *Lhx1* et sg3-4 ciblant une région en aval du *Lhx1*. Les produits de PCR des régions en amont et aval du gène *Lhx1* ont subi un cycle de dénaturation-hybridation et la présence de *mismatch* est détectée et coupée après ajout (+) ou pas (-) d'une enzyme spécifique. Après traitement enzymatique les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Un contrôle positif contenant des *mismatch* a été utilisé (Ctl+) ainsi que les cellules 786-0 Wt en contrôle négatif. La présence de *mismatch* se traduit par la présence de plusieurs bandes après ajout de l'enzyme et est significative d'un clivage efficace de l'ADN double brin induit par la séquence de sgRNA correspondante.

deuxième vers 318pb qui correspond exactement au site de coupure de la Cas9 dans la séquence cible. La deuxième bande attendue à 69 pb n'étant pas visualisable. Les produits de PCR en amont issus des cellules transfectées avec le sgRNA2 ne présentent pas de *mismatch* donc pas de clivage efficace par la Cas9 avec cette séquence guide.

Les produits de PCR en aval (504pb) issus des cellules 786-0 et Caki2 transfectées avec le sgRNA3 et 4 en présence de l'enzyme de détection montrent la présence de plusieurs bandes, ce qui signifie que ces deux sgRNA sont capables de guider la Cas9 et d'induire un clivage efficace. Pour la sgRNA3, il y a présence de 4 bandes en plus de la bande Wt à 504 pb, ce qui signifie la présence de plusieurs *mismatch* et clivage en plus du site cible. Pour la séquence sgRNA3, il y a présence de 2 bandes en plus de la bande Wt à 504 pb qui correspond exactement au site de coupure attendue de la Cas9 dans la séquence cible à savoir 318 et 189pb. Nous pouvons noter que toutes les bandes observées sont spécifiques au clivage par l'enzyme de détection de *mismatch* par comparaison avec les mêmes produits de PCR auxquels nous n'avons pas ajouté d'enzyme. De plus, les produits de PCR en amont et aval du gène *Lhx1* issus des cellules 786-0 Wt non transfectées ne présentent pas de *mismatch* ou de clivages avec l'enzyme de détection. Notre choix s'est alors porté sur le vecteur sgRNA1/Cas 9 pour la région en amont du gène *Lhx1* et sur le vecteur sgRNA4/Cas9 pour la région en aval du gène *Lhx1*. Nous avons considéré que le sgRNA2 n'est pas capable d'induire un clivage efficace de l'ADN double brin et que le sgRNA3 était probablement moins spécifique vue la présence de plusieurs *mismatch*.

2.2.2. Vérification de l'insertion des séquences LoxP

2.2.2.1. Dans les clones et pools cellulaires

Après double transfection ou nucléofection des cellules 786-0 et Caki2 exprimant la luciférase avec le sgRNA1 et ssODN1 correspondant ou sgRNA4 et ssODN4 correspondant, les pools cellulaires ont été triés grâce à un rapporteur OFP présent dans le vecteur sgRNA/Cas9 afin de sélectionner uniquement les cellules ayant reçu le vecteur. Au total, 157 clones ont été établis pour les deux lignées. A savoir pour les 786-0 Luc (**Figure 30**) : 14 clones ciblés en amont avec la transfection et 41 clones avec la nucléofection, 15 clones ciblés en aval avec la transfection et 17 clones avec la nucléofection. Pour les Caki2 Luc (**Figure 31**) : 31 clones ciblés en amont avec la transfection et 11 clones avec la nucléofection, 17 clones ciblés en aval avec la transfection et 15 clones avec la nucléofection.

Pour tous les clones établis et les pools cellulaires d'origine, les régions en amont et en aval du gène *Lhx1* ont été amplifiées par PCR et digérés par EcoRI. La séparation par électrophorèse des produits de digestion n'ont malheureusement pas montré un clivage avec l'enzyme de restriction pour aucun des 157 clones testés (**Figures 30,31**) ni d'ailleurs les pools cellulaires d'origine (**Figure 32**), que ça soit avec la nucléofection ou la co-transfection classique. Tous les produits de PCR présentaient une

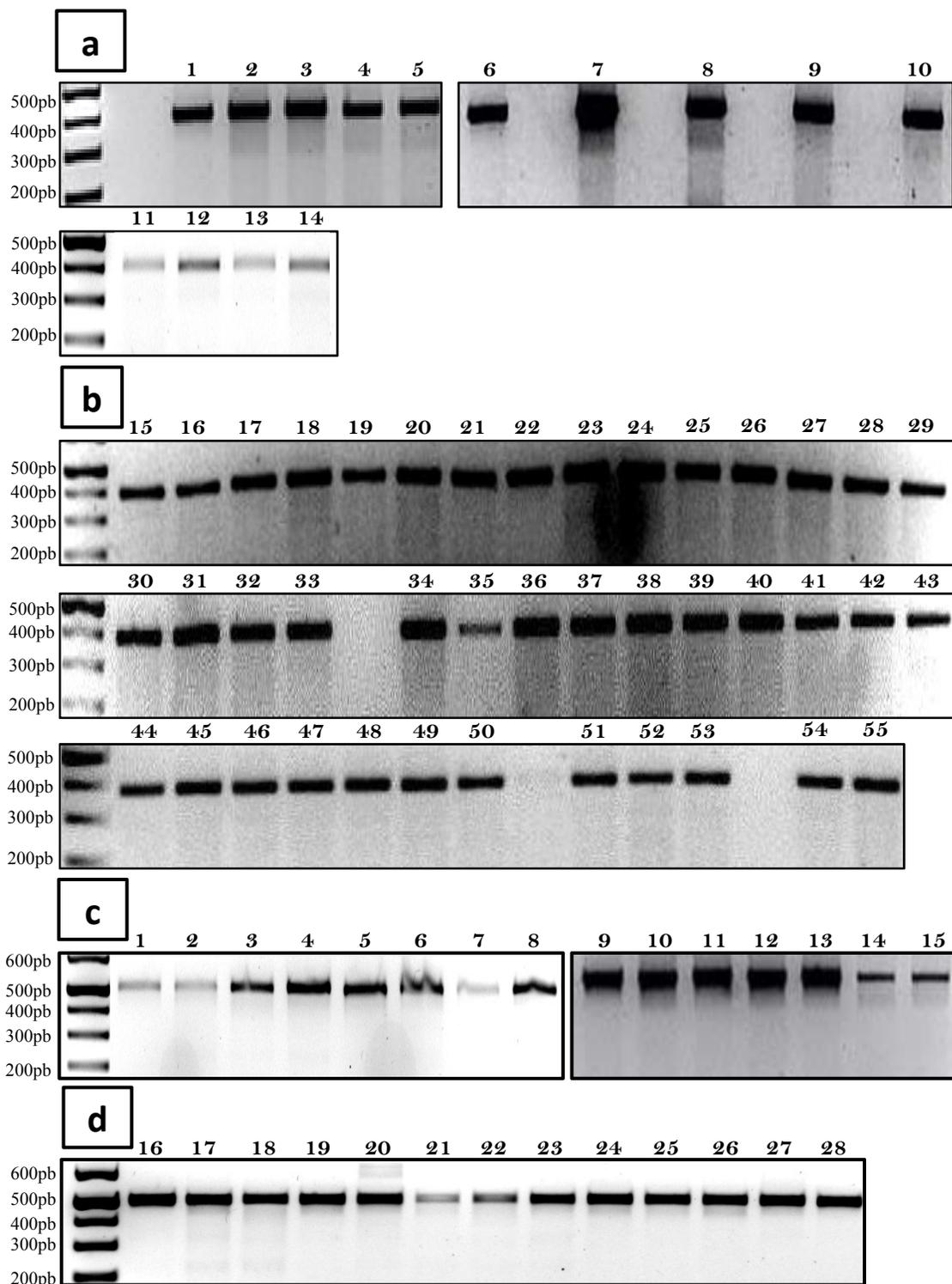


Figure 30: Vérification de l'insertion des séquences LoxP à partir des clones 786-0

Les cellules 786-0 Luc ont reçu par transfection ou nucléofection le vecteur sgRNA1 (amont de *Lhx1*) ou sgRNA4 (aval de *Lhx1*) et les ssODNs correspondants (ssODN1 ou ssODN4). Après établissement des clones les régions en amont et aval du gènes *Lhx1* ont été amplifiées par PCR. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gels d'agarose après digestion avec EcoRI. La taille du produit de PCR en amont du gène *Lhx1* Wt est de 387pb. La taille du produit de PCR en amont du gène *Lhx1* avec insertion de LoxP et digestion avec EcoRI donne naissance à deux fragments 353pb et 74pb. La taille du produit de PCR en aval du gène *Lhx1* Wt qui n'a pas subi d'insertion de LoxP est de 504pb. La taille du produit de PCR en aval du gène *Lhx1* avec insertion de LoxP et digestion avec EcoRI donne naissance à deux fragments 353pb et 191pb. (a) Les clones établis à partir du sgRNA1 et ssODN1 par transfection. (b) Les clones établis à partir du sgRNA1 et ssODN1 par nucléofection. (c) Les clones établis à partir du sgRNA4 et ssODN4 par transfection. (d) Les clones établis à partir du sgRNA4 et ssODN4 par nucléofection.

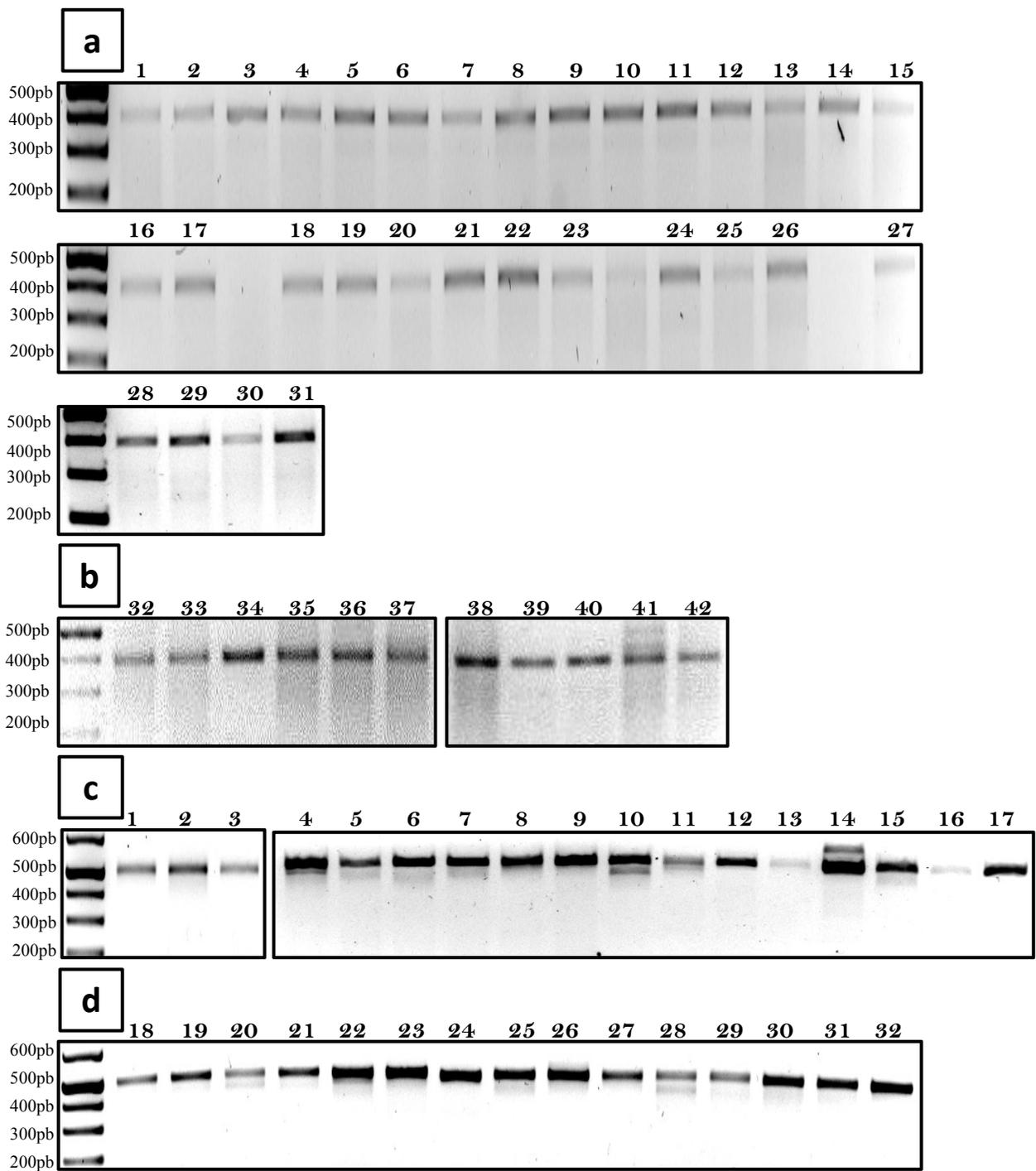
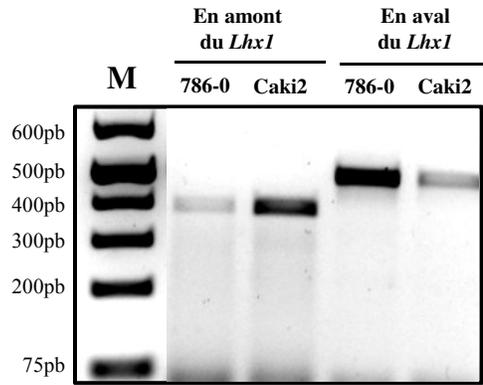


Figure 31: Vérification de l'insertion des séquences LoxP à partir des clones Caki2

Les cellules Caki2 Luc ont reçu par transfection ou nucléofection le vecteur sgRNA1 et le ssODN1 correspondant ou le vecteur sgRNA4 et le ssODN4 correspondant. Après établissement des clones les régions en amont et aval du gènes *Lhx1* ont été amplifiées par PCR. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose après digestion enzymatique avec EcoRI. La taille du produit de PCR en amont du gène *Lhx1* Wt est de 387pb. La taille du produit de PCR en amont du gène *Lhx1* avec insertion de LoxP et digestion avec EcoRI donne naissance à deux fragments 353pb et 74pb. La taille du produit de PCR en aval du gène *Lhx1* Wt qui n'a pas subi d'insertion de LoxP est de 504pb. La taille du produit de PCR en aval du gène *Lhx1* avec insertion de LoxP et digestion avec EcoRI donne naissance à deux fragments 353pb et 191pb. (a) Les clones établis à partir du sgRNA1 et ssODN1 par transfection. (b) Les clones établis à partir du sgRNA1 et ssODN1 par nucléofection. (c) Les clones établis à partir du sgRNA4 et ssODN4 par transfection. (d) Les clones établis à partir du sgRNA4 et ssODN4 par nucléofection.

a



b

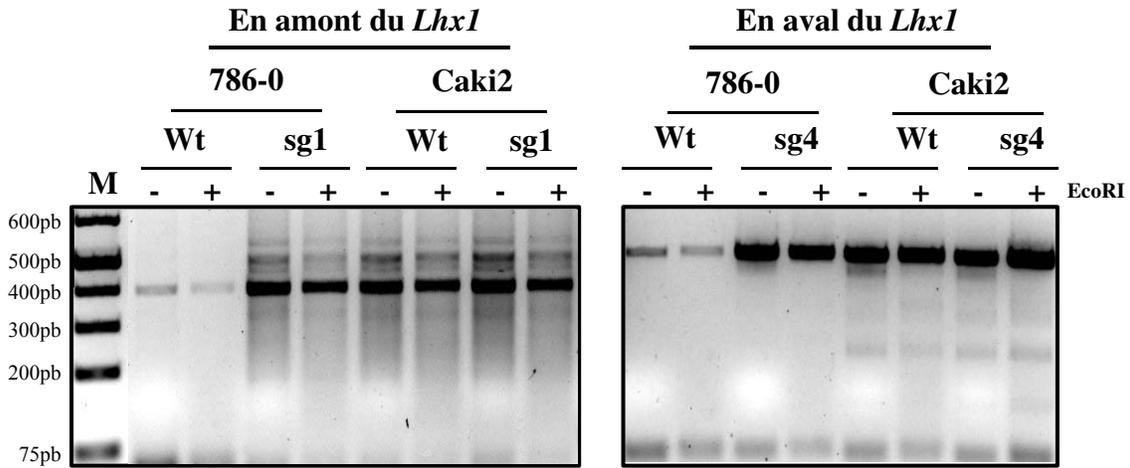


Figure 32: Vérification de l'insertion des séquences LoxP à partir des pools cellulaires

Les cellules 786-0 et Caki2 exprimant la luciférase ont reçu par transfection (a) ou nucléofection (b) le vecteur sgRNA1(ciblant une région en amont du *Lhx1*) et le ssODN1 correspondant ou le vecteur sgRNA4 (ciblant une région en aval du *Lhx1*) et le ssODN4 correspondant. les régions en amont et aval du gènes *Lhx1* ont été amplifiées par PCR. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose après digestion enzymatique (+) ou non (-) avec l'enzyme EcoRI. Les cellules 786-0 et Caki2 Wt ont été utilisées en contrôle négatif.

taille de bande de type Wt à savoir 387 en amont et 507pb en aval et donc pas d'insertion de séquence LoxP ni du site de restriction rapporteur EcoRI d'où l'absence de digestion enzymatique. Pour les clones Caki2 ciblés en aval, quatre clones présentaient des bandes non spécifiques, pas à la taille attendue à savoir 353pb/74pb pour la région en amont après digestion EcoRI et 353pb/192pb pour la région en aval après digestion EcoRI. Il s'agit des clones Caki2 ciblés en aval 4 /10 /14/ 28 (**Figure 31c-d**). Ces clones ont été séquencés et leur séquence présentait des erreurs au niveau du site de la coupure de la Cas9 mais pas la réparation attendue. Ceci signifie un clivage efficace de la Cas9 mais une absence de la réparation dirigée souhaitée.

2.2.2.2. Optimisations de la réparation dirigée

Figure 33

Il est vrai que le phénomène de réparation homologue dirigée est rare et le rendement est faible. Nous avons donc essayé d'optimiser la HDR en apportant plus de séquences ssODNs ou de différer l'apport de la matrice par rapport au vecteur. Nous avons alors réalisé une co-transfection des cellules 786-0 Wt avec différentes quantités de ssODNs de 10 à 50 nM. Nous avons également tenté des transfections successives, d'abord avec le vecteur sgRNA/Cas9 seul et quatre heures après, apporter les ssODNs correspondants avec là encore différentes quantités. Les résultats sur gels après électrophorèse des produits de PCR traités avec EcoRI ne montrent aucun clivage ou bandes à la taille attendues (353pb/74pb en amont et 353pb/ en aval). Nous retrouvons uniquement des bandes à la taille identiques des cellules non transfectées et cela en présence et en absence de l'enzyme.

2.2.2.3. Nombre de copies du gène *Lhx1* dans les lignées de CCC

Figure 34

Le nombre de copies (NC) du gène *Lhx1* présent dans les cellules cancéreuses 786-0 (VHL-), Caki2 (VHL+) a été déterminé par rapport à la lignée du rein normal HK-2 (2n). Le gène *Lhx1* a été amplifié à partir de l'ADN génomique des cellules 786-0 et Caki2 en présence d'une courbe de standardisation et le NC obtenu pour chaque lignée est comparé à celui de la lignée du rein normal HK-2 qui présente normalement 2 allèles du gène *Lhx1*. Les résultats montrent une duplication du NC de *Lhx1* dans les deux lignées testées, ce qui signifie la présence de 4 allèles *Lhx1* par lignée.

2.3. Le système antisens

Après l'échec de l'insertion des séquences LoxP et la longueur et l'incertitude de succès pour poursuivre cette approche, sachant qu'il existe 4 copies de gène *Lhx1* dans nos cellules et l'obtention d'une insertion homologue en amont et en aval risque d'être très longue sans assurance de succès.

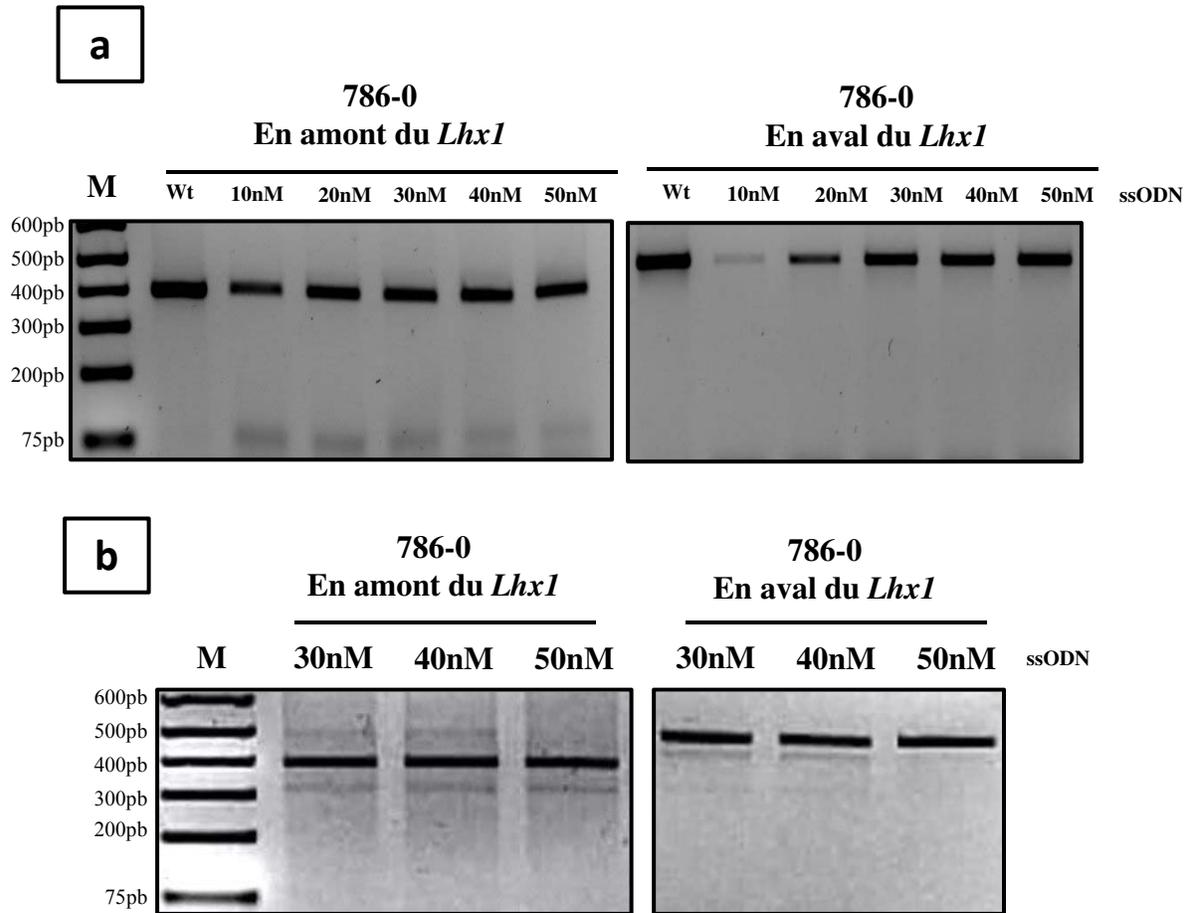


Figure 33: Optimisation de la transfection pour la réparation dirigée homologue

(a) Les cellules 786-0 ont été co-transfectées avec le vecteur sgRNA1 ou sgRNA4 et différentes concentrations (10-50nM) des ssODN1 ou ssODN4 correspondants. (b) les cellules 786-0 ont été d'abord transfectées avec le vecteur seul sgRNA1 ou 4. Quatre heures après la première transfection, les cellules ont reçu différentes concentrations du ssODN 30-50 nM. Les régions en amont et aval du gène *Lhx1* ont été amplifiées par PCR. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose après digestion enzymatique avec l'enzyme EcoRI. Les cellules 786-0 Wt non transfectées ont été utilisées en contrôle négatif.

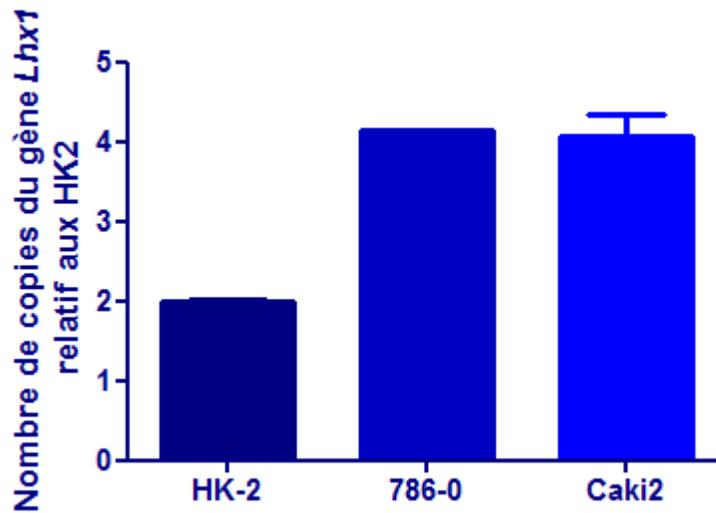


Figure 34: Nombre de copies du gène *Lhx1*

Le nombre de copies (NC) du gène *Lhx1* présent dans les cellules cancéreuses 786-0 (VHL-), Caki2 (VHL+) a été déterminé par rapport à la lignée du rein normal HK-2 (2n). Le gène *Lhx1* est amplifié à partir de l'ADN génomique des cellules 786-0 et Caki2 et le NC obtenu est comparé à celui de la lignée du rein normal HK-2 qui présente normalement 2 allèles du gène *Lhx1*.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules HK-2 (2n).

Nous avons décidé de poursuivre avec une autre approche d'inhibition conditionnelle. Il s'agit du système antisens sous le contrôle d'un promoteur inductible. Avant de passer à l'expression inductible de l'AS, nous avons dans un premier temps testé l'efficacité de l'extinction de l'expression de Lim1 avec l'antisens de ce dernier en constitutif sur les cellules 786-0. Les résultats de RT-qPCR montrent une augmentation du niveau des transcrits ARNm de Lim1 avec le vecteur AS de 3400X comparativement au vecteur vide à 48h (**Figure 35**). Il s'agit de transcrit de l'ARNm antisens de Lim1 et non pas de l'ARNm sens de Lim, cependant les amorces Lim1 reconnaissent également l'AS ce qui explique l'augmentation de la fraction de l'ARNm de Lim1. Cette fraction augmentée ne sera pas traduite en protéine mais vient s'insérer à l'ARNm de Lim1 ce qui empêche sa traduction. Les résultats de Western blot confirment le *silencing* et non la surexpression de Lim1 et montrent une inhibition quasiment totale de l'expression de Lim1 à 48h et 72h post-transfection comparativement au vecteur vide XL5 (**Figure 36**).

3. Développement de métastases

3.1. Validation du modèle invasif orthotopique

Figure 37

Des cellules 786-0 et Caki2 exprimant la luciférase ont été injectées en orthotopique, sous la capsule rénale de la souris *nude* et l'évolution tumorale en termes de croissance et d'invasion métastatique a été évaluée par bioluminescence. Les résultats d'imagerie montrent qu'au moment de l'implantation des cellules et après injection/administration ip de luciférine, le signal luciférase est localisé uniquement dans le rein implanté, ce qui signifie la spécificité du signal observé. Un mois après l'implantation des cellules (786-0 et Caki2), nous observons la présence de métastases détectables dans le cerveau, les poumons et le foie, correspondant aux sites métastatiques classiques du cancer du rein pour les deux lignées cellulaires testées. De plus, le signal luciférase est toujours détectable dans le rein implanté correspondant à la tumeur primaire. Ces résultats indiquent que le signal luciférase est stable dans le temps et qu'il est ainsi possible de suivre l'évolution tumorale et métastatique dans ce modèle et donc d'étudier le rôle de Lim1 dans les diverses étapes du processus métastatique.

3.2. Validation du modèle invasif iv

Figure 38

Suite aux problèmes rencontrés pour la mise en place d'une inhibition conditionnelle de Lim1 dans le modèle orthotopique, nous avons opté pour un autre modèle invasif par voie IV qui permet le développement de métastases pulmonaires dans un temps réduit 3 semaines, modèles décrit (Jeong *et*

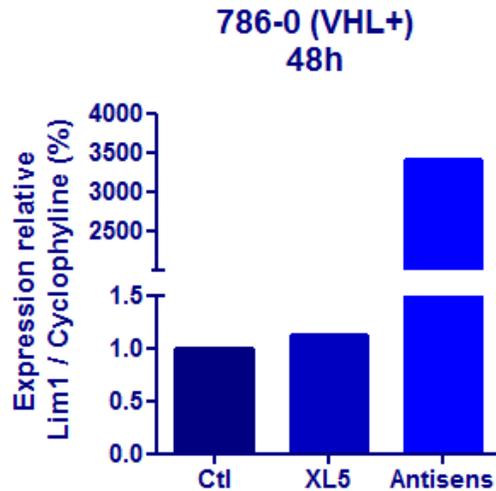


Figure 35: Vérification de l'efficacité de la transcription de l'antisens

Les cellules 786-0 ont été transfectées avec un vecteur exprimant l'antisens (AS) de Lim1 ou le vecteur vide (XL5) ou non transfectées (Ctl). L'expression de Lim1 a été analysée par RT-qPCR après 48h de transfection.

Les résultats de qRT-PCR montrent une augmentation du niveau des transcrits Lim1 avec le vecteur AS de plus de 3400 fois comparativement au vecteur vide et aux cellules non transfectées. Il s'agit en fait des transcrits de l'ARNm antisens de Lim1 et non pas de l'ARNm sens de Lim1 qui sont amplifiés avec les mêmes amorces.

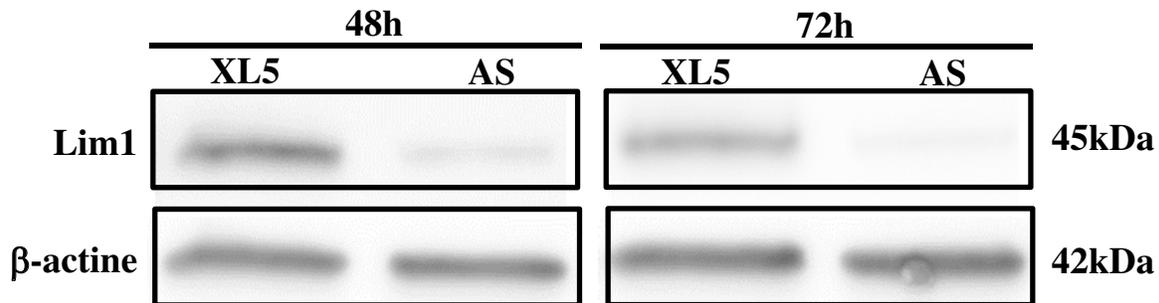


Figure 36: Analyse par Western blot de l'efficacité du vecteur antisens

Les cellules 786-0 ont été transfectées en transitoire avec un vecteur exprimant l'antisens de Lim1 (AS) ou le vecteur vide (XL5). L'expression de Lim1 a été analysée par Western blot après 48h et 72h de transfection. La β -Actine a été utilisée comme contrôle de charge pour le dépôt.

Injection orthotopique

786-0/Caki2 Luciférase

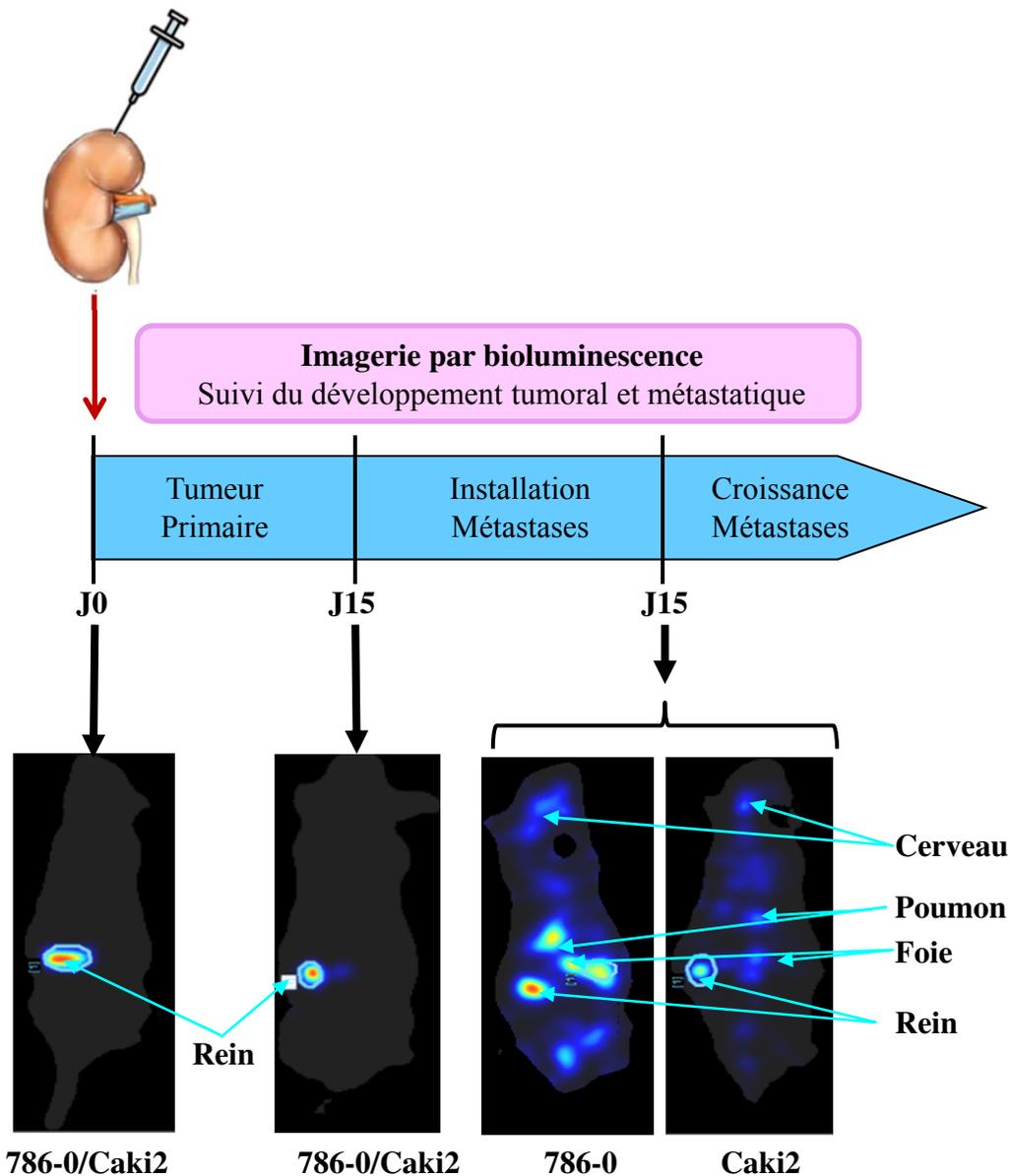


Figure 37: Validation du modèle métastatique orthotopique chez la souris *nude*
Imagerie par bioluminescence des souris *nude* xénotreffées avec des pools de 786-0/Caki2 exprimant la luciférase. 100 000 cellules sont injectées en orthotopique sous la capsule rénale des souris *nude*. Au moment de l'injection des cellules cancéreuses et 14 jours après l'injection, le signal bioluminescent est localisé au niveau du rein. Après un mois, des métastases sont détectées au niveau du cerveau, du poumon et du foie.

al., 2015). Etant donné qu'il n'existe pas d'inhibiteurs pharmaco, nous avons opté pour l'inhibition de Lim1 par RNA interférence dont l'efficacité est >98 % et qui est maintenue jusqu'à 120h.

1 million de des cellules (786-0 et Caki2) ont été injectées par voie IV dans la veine latérale de la queue de souris *nude*. Les souris ont été sacrifiées après 3 semaines et les poumons analysés en IHC. Les résultats montrent la présence de plusieurs nodules micrométastatiques, au total de 6 avec un diamètre autour de 200 μm quantifiables et cela pour les deux lignées testées. Ces résultats montrent la faisabilité du modèle métastatique iv chez la souris *nude* pour les deux lignées de CCC.

**Injection
intraveineuse des
cellules 786-0/Caki2**



Après 3 semaines



**Analyse IHC des
poumons**

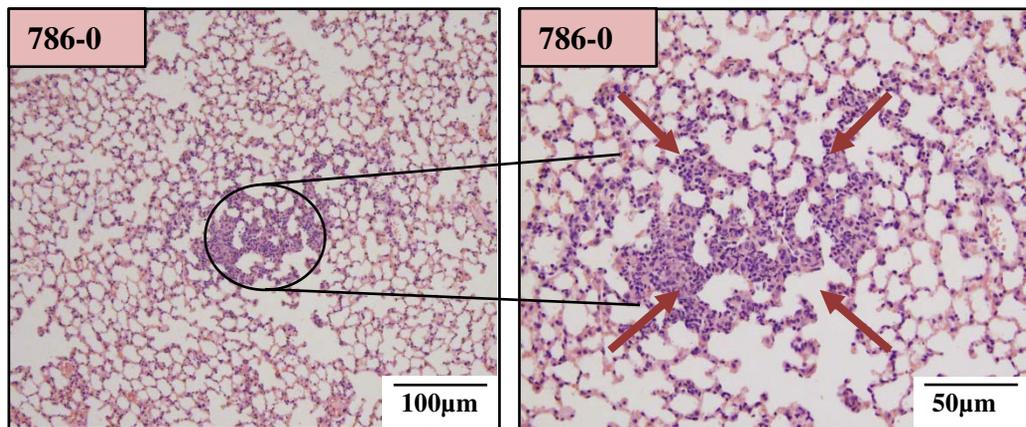


Figure 38: Validation du modèle métastatique iv chez la souris *nude*

Un million de cellules 786-0 ou Caki2 ont été inoculées dans la veine latérale de la queue de souris *nude* (n = 3). Les souris ont été euthanasiées 3 semaines après injection. Les poumons ont été récoltés et analysés histologiquement pour confirmer la présence de métastases pulmonaires. Les flèches indiquent un îlot de cellules néoplasiques à partir des cellules 786-0.

II. Discussion

Afin de répondre au troisième objectif de mon travail de thèse qui est la mise en évidence du potentiel invasif de Lim1 *in vivo*, il était nécessaire de développer un modèle d'étude *in vivo* original. Ce modèle devait permettre (1) le développement de métastases, (2) le suivi et la visualisation de ces métastases par imagerie et (3) l'inhibition conditionnelle de Lim1 en temps voulu.

Pour le premier point, nous avons opté pour le modèle invasif orthotopique par implantation de cellules cancéreuses sous la capsule rénale de la souris *nude* car ce type d'injection permet le développement de métastases

Pour la visualisation de métastases, les cellules sont préalablement transfectées avec un vecteur codant pour la luciférase, ce qui permet la visualisation et le suivi du développement tumoral et métastatique par imagerie par bioluminescence.

Pour l'inhibition conditionnelle de Lim1, nous avons tenté de mettre en place plusieurs systèmes conditionnels afin d'inhiber Lim1 en temps voulu et déterminer son rôle dans les différentes étapes du processus métastatique.

Afin d'augmenter la sensibilité de la détection des métastases par imagerie, il était nécessaire de sélectionner les clones qui expriment le plus fort signal de bioluminescence. De plus, la transfection stable des cellules implique que le vecteur s'intègre dans le génome cellulaire et est donc source de variabilité. Cette intégration est aléatoire peut altérer les propriétés de la cellule. Si un tel évènement se produit dans des gènes actifs, certaines propriétés cellulaires peuvent être altérées et se traduire par un ralentissement ou une accélération de la croissance cellulaire. Or, pour les expériences *in vivo*, les clones utilisés doivent être représentatifs des lignées cellulaires de CCC non transfectées, d'où la nécessité de vérifier que leur croissance n'était pas affectée par les transfections.

Après plusieurs séries de vérifications, nous avons réussi à établir des clones cellulaires stables exprimant un fort signal bioluminescent sans affecter les propriétés cellulaires de croissance par rapport aux lignées d'origine à savoir la prolifération et l'apoptose cellulaire.

Ensuite, il était nécessaire de vérifier la faisabilité et de calibrer le modèle invasif orthotopique en termes de croissance tumoral et de cinétique d'apparition des métastases ainsi que la stabilité du signal luciférase dans le temps *in vivo*.

Des expériences préliminaires du laboratoire ont permis de vérifier la faisabilité du modèle métastatique orthotopique par injection des cellules exprimant la luciférase sous la capsule rénale des souris *nude* immunodéficientes. Au moment de l'implantation des cellules et après injection chez l'animal de luciférine (ip, 150 mg/kg), le signal est localisé dans le rein implanté, ce qui signifie la spécificité du signal bioluminescent. L'injection de luciférine à divers temps montre, un mois après l'implantation des cellules, la présence de métastases détectables dans le cerveau, les poumons et le foie, qui sont, rappelons-le, les sites métastatiques classiques du cancer du rein. En outre, le signal luciférase est toujours détectable dans le rein implanté. Ces résultats montrent que le signal luciférase est stable dans le temps, du moins sur quelques semaines, et qu'il est ainsi possible de suivre l'évolution tumorale dans ce modèle et donc d'étudier l'impact de Lim1 dans ce processus.

Concernant l'inhibition conditionnelle de Lim1, nous avons initialement tenté d'éteindre l'expression de Lim1 à l'aide d'un vecteur codant pour un shRNA ciblant Lim1 sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline. Plusieurs tentatives et stratégies ont été menées. La séquence du shRNA était identique à celle du siRNA que nous avons utilisé dans nos études précédentes qui permettait 98% d'inhibition de l'expression de Lim1. Plusieurs clones stables et transitoires ont été développés mais le traitement à la doxycycline à 1µg/ml n'a pas permis d'aller au-delà de 40% d'inhibition d'expression de Lim1, sachant que notre objectif était de sélectionner les clones capables d'induire une inhibition idéalement >90% avec le traitement doxycycline. Le choix de la concentration de doxycycline était basé sur les données bibliographiques et les instructions du fournisseur Clontech. Nous avons pensé alors qu'il fallait optimiser les conditions d'induction du système Tet-On. Afin de définir les conditions optimales pour une induction optimale de l'expression du système shRNA dans nos cellules, à savoir la concentration seuil de doxycycline et la durée de traitement nous avons opté pour la stratégie reportrice visuelle qui est plus rapide, il s'agit de l'imagerie par bioluminescence. Nous avons transfecté les clones Luciférase par un shRNA anti-Luc inductible à la doxycycline (cloné dans le même vecteur que celui utilisé pour le shRNA anti-Lim1) et traité les cellules avec différentes concentrations de doxycycline de 0 à 4µg/ml. Mais à nouveau très peu ou pas d'inhibition du signal bioluminescent a été observée après traitement doxycycline à différentes concentrations. De plus, une toxicité a été observée à partir de 2µg/ml donc la concentration 1µg/ml était bien la concentration seuil à ne pas dépasser. Nous tenons à préciser que la séquence shLuc utilisée a été conçue à partir de la séquence siLuc qui induit une extinction quasi-totale de la luciférase avec la transfection comme énoncé dans l'étude translationnelle.

Le choix de transfection transitoire permet une meilleure évaluation de l'efficacité du vecteur, car tous les plasmides transfectés sont directement disponibles à la transcription. Contrairement à la transfection stable qui dépend du nombre de vecteurs intégrés dans le génome d'une cellule à autre d'où la nécessité d'établissement de clones.

Même si la probabilité de mutation du vecteur dans les bactéries lors de la transformation ou la multiplication est très faible, nous avons vérifié les vecteurs par séquençage qui n'a révélé aucune variation dans la séquence du promoteur U6 et dans les séquences des shRNA respectifs.

Il est clair que l'efficacité du système shRNA dépend de plusieurs critères tels que la séquence cible, la structure de la boucle (*hairpin*) et du type cellulaire. Même si les séquences cibles des shRNA sont identiques aux séquences cibles de siRNA, il a été décrit que l'efficacité du *silencing* peut être totalement différente. Il est donc nécessaire de tester plusieurs séquences shRNA ciblant Lim1. Et comme jusque-là nous ne savons pas si les inefficacités observées avec le système shRNA utilisé sont liées à la séquence de shRNA inefficace ou un à problème d'induction de l'expression du shRNA, nous avons décidé alors de faire le screening sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

Nous avons choisi des shRNA constitutifs anti-Lim1 dans 5 vecteurs différents et ciblant cinq régions distinctes de Lim1 et en contrôle positif nous avons utilisé un shRNA ciblant la GFP validé par le fournisseur dans des cellules 786-0 et Caki2 exprimant la GFP. Les séquences cibles sont principalement situées dans les l'exon 1, 2 et 4 qui codent respectivement pour les deux domaines LIM et à l'homéodomaine et qui sont les principales structures à cibler.

Là aussi peu d'efficacité des shRNA a été observée. Le système shRNA doit être relativement inefficace dans nos cellules, peut-être dû à un problème d'activité du promoteur U6 ou à une efficacité relative de la transfection des cellules par ces vecteurs. Nous avons pensé par la suite à l'infection virale, mais ces manipulations sont longues avec des risques de contamination et la possibilité de ne pas pouvoir les utiliser au laboratoire.

Nous avons alors tenté une autre approche celle du système CRISPR/Cas9, un nouvel outil permettant l'édition génomique ciblée. Il s'agissait d'introduire des séquences LoxP en amont et aval du gène *Lhx1*, afin d'inhiber de façon inductible l'expression du gène avec la recombinase Cre-ER activée par le tamoxifène. Le système CRISPR/Cas9 nécessite : (i) un sgRNA *single guided* qui sert de guide pour la nucléase Cas9 et qui est complémentaire avec la séquence cible de l'ADN et, (ii) la Cas9 une nucléase qui coupe l'ADN double brin et (iii) un oligonucléotide ssODN un donneur de la séquence LoxP pour de la réparation homologue dirigée HDR de la cassure double brin.

Nous avons choisi 2 sgRNA ciblant 2 séquences distinctes en amont du gène *Lhx1*, et 2 en aval, sur les lignées 786-0 et Caki2 parce que là encore, il est important de vérifier que les séquences sgRNA choisies sont capables de se fixer sur l'ADN cible et de diriger efficacement la Cas9. Parfois à cause du surenroulement de l'ADN et de la localisation dans certaines régions du génome, les séquences cibles peuvent ne pas être accessibles par le sgRNA et la Cas9. Les sgRNA 1 et 3 ont été éliminés

parce le sgRNA1 n'induit aucun clivage et le sgRNA3 induit plusieurs clivages non spécifiques donc risque de *off-target*.

Après le choix du sgRNA, nous avons réalisé des co-transfections du vecteur sgRNA-Cas9 (ciblant en amont ou aval du *Lhx1* séparément afin d'optimiser l'efficacité de transfection) et des ssODNs correspondant, donneur de la séquence LoxP suivie d'un site de restriction EcoRI servant de rapporteur pour la réparation.

Nous avons d'abord réalisé des co-transfections suivies de tri de cellules qui ont uniquement reçu le vecteur sgRNA-Cas9 (OFP rapporteur). Plusieurs clones **786-0 et Caki2 luciférase ciblés en amont et en aval** ont été établis et aucun d'entre eux n'a intégré la séquence LoxP. Ceci a été vérifié par digestion EcoRI des produits de PCR des régions d'intérêt.

Nous avons alors essayé d'optimiser la co-transfection vecteur-ssODNs en testant plusieurs concentrations de ssODNs (de 10 à 50nM), mais directement sur les pools cellulaires 786-0 et Caki2 et nous n'avons pas observé de réparation génomique. Nous avons aussi essayé de transférer le couple vecteur-ssODNs en 2 temps, c'est-à-dire d'abord le vecteur sgRNA-Cas9 puis les ssODNs donneurs 4h après, mais dans ce cas aussi nous n'avons pas observé la réparation homologue souhaitée sur aucun des clones.

Nous avons pensé que l'absence de réparation était due à un défaut d'introduction des ssODNs donneurs dans le noyau. Effectivement, ces derniers ne présentent aucun rapporteur permettant de montrer l'efficacité de leur introduction. Nous avons alors eu recours à la nucléofection suivie de tri cellulaire sur les lignées 786-0 et Caki2 et nous avons établi **plusieurs clones en amont et en aval**. A nouveau, aucun des clones n'avait intégré la séquence LoxP.

Il apparaît évident que cette approche est difficile et que plusieurs centaines de clones doivent être analysés. Il est décrit que la réparation homologue est un événement rare et le rendement est faible donc plusieurs centaines de clones doivent être screenées (Chu *et al.*, 2015). En effet, 3% de modification avec la réparation NHEJ et 1% avec la HDR utilisant des ssODNs comme matrice ont été obtenus et il est suggéré de screener plus de 300 clones pour avoir une modification (L. Yang *et al.*, 2013).

De plus, les cellules tumorales sont souvent hyperploïdes et présentent des aberrations génomiques. Le nombre de copies du gène *Lhx1* a été quantifié et les cellules cancéreuses utilisées présentent 4 allèles réduisant ainsi la possibilité de floxer *Lim1* dans les 4 allèles. Mais force est de constater que là aussi cette technologie ne nous a pas permis d'atteindre les objectifs fixés. Enfin, nous avons alors contacté

un laboratoire privé spécialisé dans l'édition génomique, mais le devis pour cette approche donnait un coût supérieur à 42000 euros, donc évidemment au-delà de notre budget.

La dernière approche tentée était l'antisens du gène *Lhx1* qui est la séquence inversée de l'ARNm du Lim1 qui après transcription se lie à l'ARNm par complémentarité, ce qui empêche sa traduction en protéine. Avant de tenter l'approche inductible nous avons d'abord vérifié l'efficacité de ce système à éteindre l'expression du Lim1 en constitutif. Pour cela, nous avons conçu, de façon constitutive, à partir du vecteur de surexpression du gène *Lhx1* son antisens par inversion de la séquence codante qui se trouve flanquée par deux sites de restriction EcoRI. Le séquençage a permis de vérifier la bonne orientation de la séquence de l'antisens. Ce vecteur a été transfecté dans les lignées et son efficacité à inhiber en constitutif l'expression de Lim1 a été validée par Western blot. Les résultats de PCR montrent une amplification de Lim1 qui est témoin de la bonne transcription de l'AS car les amorces reconnaissent l'ARNm du Lim1 et de l'AS. Nous avons pensé par la suite de cloner l'insert AS dans un vecteur d'expression inductible. Là encore il s'agit d'une longue série d'optimisations et de vérifications. Comme j'arrivais à la fin de ma thèse, nous ne sommes pas allés jusqu'au bout de cette approche qui semble pourtant être très efficace.

Nous avons finalement opté pour un autre modèle invasif qui permet le développement rapide de métastases pulmonaires après injection iv des cellules cancéreuses dans la veine de la queue chez les souris *nude*. Ce modèle a été validé et permet le développement effectivement de métastases pulmonaires quantifiables au bout de 3 semaines. Pour l'extinction de Lim1, nous avons opté par la stratégie d'RNA interférence en transitoire qui permet une extinction quasi-totale (98%) maintenue dans le temps jusqu'à 120h.

III. Résumé en Français

Le carcinome à cellules rénales claires métastatique (CCC) demeure résistant aux thérapies actuelles et ce malgré le développement des thérapies ciblées anti-angiogéniques et les nouvelles immunothérapies. Les travaux précédents du laboratoire ont montré des similitudes mécanistiques entre tumorigenèse et néphrogenèse. Parmi les cibles de la voie Sonic Hedgehog-Gli qui se trouve oncogénique dans le CCC, le facteur développemental Lim1 a été identifié comme un nouvel oncogène dans le CCC. Les études préliminaires suggèrent que Lim1 aurait un rôle dans l'invasion cellulaire. Afin d'établir son potentiel invasif nous avons (1) étudié *in vitro* sur les lignées de CCC humain A498 (VHL-) et Caki2, ACHN (VHL +) la migration et l'invasion cellulaires sur chambres de Boyden, la motilité cellulaire par *Wound healing assay*, la capacité cellulaire de former des colonies par le test de clonogénicité et l'expression d'un panel de cibles impliquées dans le processus métastatique par Western blot, (2) analysé l'expression de Lim1 dans 30 échantillons métastatiques de CCC par immunohistochimie (IHC) et / ou Western blot et (3) étudié l'impact de Lim1 sur le développement quantitatif et qualitatif des métastases sur un modèle murin invasif développé par injection iv de cellules cancéreuses chez la souris *nude*. Aucun inhibiteur de Lim1 n'est disponible; les études *in vitro* et *in vivo* ont donc été réalisées par la stratégie d'ARN interférence.

L'ARN interférence reste l'outil le plus efficace et le plus spécifique pour le *silencing* des gènes. Dans le but de développer un nouvel outil d'inhibition de Lim1 applicable en clinique, basée sur des siRNAs véhiculés par des systèmes nanométriques, une collaboration avec une équipe de chimistes a été réalisée qui nous a fourni une nouvelle génération de véhicules de siRNAs. Il s'agit de polymères diacétyléniques photo-polymérisables sous forme de nanofibres (PDA-Nfs). Nous avons d'abord vérifié leur efficacité à véhiculer les siRNAs *in vitro* sur la lignée 786-0 exprimant la luciférase. Ensuite nous les avons testés pour éteindre l'expression de Lim1 sur des cellules 786-0 Wt et des cellules surexprimant Lim1. Enfin nous avons étudié l'efficacité de ces PDA-Nfs à véhiculer les siRNAs *in vivo* dans un modèle de xénogreffe en sous-cutané de CCC humain.

L'extinction de Lim1 diminue la motilité, la migration, l'invasion cellulaire et la capacité des cellules à former des colonies dans toutes les lignées indépendamment du statut VHL ainsi que l'expression de plusieurs cibles impliquées dans ces processus. Les analyses IHC et Western blot ont montré l'expression constitutive de Lim1 dans tous les tissus métastatiques et que celle-ci est supérieure en comparaison avec les tumeurs primaires correspondantes. Dans le modèle invasif *in vivo* l'extinction de Lim1 a réduit significativement le nombre et la taille des foyers micro-métastatiques pulmonaires.

Concernant l'étude translationnelle, Les résultats ont montré l'efficacité de ces vecteurs à véhiculer les siRNAs et à éteindre l'expression de la luciférase et de l'oncogène Lim1 de plus de 90% *in vitro*. Dans le modèle *in vivo*, une injection unique en ip de complexes PDA-Nfs/siLhx a permis une inhibition significative de l'oncogène Lim1 mise en évidence par RT-qPCR et Western blot.

Ces travaux démontrent le rôle invasif de Lim1 dans la dissémination métastatique et identifient les PDA-Nfs comme un nouvel outil de délivrance de siRNAs très prometteur en clinique. L'avantage du ciblage de Lim1 avec cette approche nanométrique, est que ce facteur n'est pas exprimé à l'âge adulte.

Mots clefs : Carcinome à cellules rénales claires (CCC) - Lim1- Métastases - PDA-Nfs – siRNAs.

IV. Résumé en anglais

Clear cell renal cell carcinoma (CCC) remains resistant to current therapies, despite the development of anti-angiogenic and the new immunotherapeutic approaches. Previous work of the laboratory has shown mechanistic similarities between tumorigenesis and nephrogenesis. Among the targets of the Sonic Hedgehog-Gli pathway which is found oncogenic in CCC, the developmental factor Lim1 has been identified as a new oncogene in CCC. Preliminary studies suggest that Lim1 would have a role in cell invasion. In order to establish its invasive role we studied (1) *in vitro* on human CCC cell lines A498 (VHL-) and Caki2, ACHN (VHL +) cell migration and invasion in Boyden chambers, cell motility by wound healing assay, clonogenic capacity by colony formation assay and expression of many targets involved in the metastatic process by Western blot, (2) the expression of Lim1 in 30 metastatic samples of CCC by immunohistochemistry (IHC) and Western blot and (3) the impact of Lim1 on the quantitative and qualitative development of metastases on an invasive model developed by iv injection of cancer cells in *nude* mice. No Lim1 inhibitors are available; *in vitro* and *in vivo* studies have thus been performed by the RNA interference strategy.

RNA interference remains the most effective and specific tool for gene silencing. In order to develop a new clinically applicable inhibition tool for Lim1, based on siRNAs carried by nanoparticles, a collaboration with chemists who provide us with a new generation of siRNA vehicles. These are photo-polymerizable diacetylenic polymers in the form of nanofibers (PDA-Nfs). We first verified their efficacy to deliver siRNAs *in vitro* on the luciferase expressing cell line 786-0 Luc. Then we tested these vectors to inhibit the expression of Lim1 on the 786-0 Wt and over-expressing Lim1 cells. Finally, we investigated the efficacy of these PDA-Nfs to deliver siRNAs *in vivo* in a subcutaneous xenograft model of human CCC.

We showed that Lim1 extinction decreased cell migration, invasion, motility and clonogenic capacity in all cell lines regardless of the VHL status as well as the expression of several targets involved in these processes. The IHC and Western blot analyses showed constitutive expression of Lim1 in all metastatic tissues, and that this expression is higher in comparison to corresponding primary tumors. In the *in vivo* model, Lim1 extinction reduced significantly the number and size of pulmonary micro-metastatic foci.

Concerning the translational study, the results showed the efficacy of these vectors to deliver the siRNAs and to inhibit the expression of the luciferase and of the oncogene Lim1 by more than 90% *in vitro*. In the *in vivo* model, a single ip injection of PDA-Nfs/siLhx complexes allowed significant inhibition of the Lim1 expression demonstrated by RT-qPCR and Western blot.

These works demonstrate the invasive role of Lim1 in metastatic dissemination and identifies PDA-Nfs as a new promising siRNA delivery tool in clinical practice. The advantage of targeting Lim1 with this nano-carrier approach is that Lim1 is not expressed in adulthood.

Key Words: Clear cell renal cell carcinoma (CCC) - Lim1- Metastases - PDA-Nfs – siRNA.

V. Publications

- **The Lim1 oncogene as a new therapeutic target for metastatic human renal cell carcinoma.** Hamaidi I, Coquard C, Danilin S, Dormoy V, Béraud C, Rothhut S, Barthelmebs M, Lindner V, Lang H, Massfelder T. (*Oncogene*).
- **Polydiacetylenic Nanofibers as new siRNA vehicles for *in vitro* and *in vivo* delivery.** Neuberg P, Hamaidi I, Danilin S, Ripoll M, Nothisen M, Wagner A, Kichler A, Massfelder T, Remy J-S. (*Nanoscale*).
- **An FGFR3/MYC positive feedback loop provides new opportunities for targeted therapies in bladder cancers.** Mahe M, Dufour F, Neyret-Kahn H, Moreno-Vega A, Beraud C, Shi M, Hamaidi I, Sanchez-Quiles V, Krucker C, Dorland-Galliot M, Chapeaublanc E, Nicolle R, Lang H, Pouponnot C, Massfelder T, Radvanyi F, Bernard-Pierrot I. (*EMBO Mol Med*)

VI. Posters et Communications

Le 7ème Forum du Cancéropôle du Grand Est, 25-26 Novembre 2013, Strasbourg, France.

Session poster:

- [Hamaidi I](#), Coquard C, Danilin S, Dormoy V, Béraud C, Rothhut S, Barthelmebs M, Lindner V, Lang H, Massfelder T. Implication du facteur de transcription Lim1, un nouvel oncogene dans le cancer du rein humain avancé.

Seizième Journée Scientifique Régionale De La Ligue Contre Le Cancer, 16 Novembre 2015, Strasbourg, France. Communication:

- [Hamaidi I](#), Coquard C, Danilin S, Dormoy V, Béraud C, Rothhut S, Barthelmebs M, Lindner V, Lang H, Massfelder T. Implication du facteur de transcription Lim1, un nouvel oncogene dans le cancer du rein humain avancé.

Quatrième Journée Scientifique De La Fédération De Médecine Translationnelle De Strasbourg (FMTS), 28 Avril 2016, Strasbourg, France. Communication:

- [Hamaidi I](#), Coquard C, Danilin S, Dormoy V, Béraud C, Rothhut S, Barthelmebs M, Lindner V, Lang H, Massfelder T. Implication du facteur de transcription Lim1, un nouvel oncogene dans le cancer du rein humain avancé.

Annual congress of the European Association of Urology (EAU), 24-28 March 2017, London, UK. Moderated poster session:

- [Hamaidi I](#), Coquard C, Danilin S, Dormoy V, Béraud C, Rothhut S, Barthelmebs M, Lindner V, Lang H, Massfelder T. Targeting Lim1 oncogene has therapeutic potential in advanced human renal cell carcinoma.
- Danilin S, Amiable C, Coquard C, Kaminski P-A, Paoletti J, Rothhut S, [Hamaidi I](#), Lindner V, Lang H, Pochet S, Massfelder T. Oncogenic *versus* tumor suppressor potential of the new N-hydrolase DNPH1 in prostate and kidney cancers.

Annual meeting of the American Urological Association (AUA), 12-16 May 2017, Boston, MA, USA. Moderated poster session:

- [Hamaidi I](#), Coquard C, Danilin S, Dormoy V, Béraud C, Rothhut S, Barthelmebs M, Lindner V, Lang H, Massfelder T. Lim1 oncogene as a new therapeutic target in advanced human renal cell carcinoma.
- Danilin S, Amiable C, Coquard C, Kaminski P-A, Paoletti J, Rothhut S, [Hamaidi I](#), Lindner V, Lang H, Pochet S, Massfelder T. Role of the c-Myc target DNPH1, a new N-hydrolase, in kidney and prostate cancers.
- Pierard L, Bergerat S, Béraud C, Mouracade P, [Hamaidi I](#), Coquard C, Rothhut S, Lindner V, Lang H, Massfelder T. Involvement of angiogenin in sunitinib resistance in renal carcinoma.

