



HAL
open science

Implication des collagènes et de leur récepteur à domaine discoïdine DDR1 dans le développement des cancers du rein adultes et pédiatriques

Sandra Majo

► **To cite this version:**

Sandra Majo. Implication des collagènes et de leur récepteur à domaine discoïdine DDR1 dans le développement des cancers du rein adultes et pédiatriques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0356 . tel-03647124

HAL Id: tel-03647124

<https://theses.hal.science/tel-03647124v1>

Submitted on 20 Apr 2022

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

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

THÈSE PRESENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement le
13 décembre 2021

Par Sandra MAJO

Née le 13 octobre 1994 à Bordeaux

**Implication des collagènes et de leur récepteur à
domaine discoïdine DDR1 dans le développement des
cancers du rein adultes et pédiatriques**

Sous la direction de : **Patrick AUGUSTE**

Membres du Jury :

Mme Elisabeth GÉNOT, Directrice de recherche, Bordeaux

Mme Françoise RÉDINI, Directrice de recherche, Nantes

M. Ulrich VALCOURT, Professeur, Lyon

M. Serge ROCHE, Directeur de recherche, Montpellier

M. Patrick AUGUSTE, Maître de conférences, Bordeaux

Présidente du Jury

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

RESUME

Implication des collagènes et de leur récepteur à domaine discoïdine DDR1 dans le développement des cancers du rein adultes et pédiatriques

Chez l'adulte, les cancers du rein ou carcinomes rénaux (RCC) comptent parmi les 20 cancers les plus diagnostiqués. Chez les enfants, les cancers du rein (constitués à 90% par des tumeurs de Wilms (WT)) constituent la 3^{ème} tumeur solide diagnostiquée.

En l'absence de métastases le taux global de guérison est bon. Malgré cela, l'arsenal thérapeutique des RCC ou des WT est confronté à l'augmentation des résistances, à un manque d'efficacité ou provoque de lourds effets indésirables impactant la qualité de vie des patients (cancers secondaires, pathologies cardiaques etc.). L'absence de biomarqueurs dans ces cancers retarde et complique le diagnostic de ces tumeurs.

Le développement et la progression tumorale dépendent des interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement. Ce dernier est constitué d'un élément non cellulaire, la matrice extracellulaire (MEC) et d'éléments cellulaires (fibroblastes, cellules immunitaires, adipocytes etc.) détournés au profit de la tumeur et favorisant sa progression.

Mon projet de thèse s'est porté sur l'effet de la MEC et de ses récepteurs cellulaires sur le développement des cancers du rein adultes et pédiatriques.

Le 1^{ier} projet a consisté à évaluer l'impact de composants de la MEC (Collagène I, Fibronectine 1 et Matrigel) sur les caractéristiques phénotypiques de 3 lignées cellulaires de RCC (Renca, 786-O, Caki-2). Cette étude a permis de mettre en évidence que le collagène I est le principal modulateur du devenir des cellules de RCC favorisant la migration et l'invasion cellulaire, importantes pour la dissémination métastatique.

Par la suite, l'utilisation des lignées Renca et 786-O a permis d'étudier le rôle du récepteur aux collagènes, DDR1, dans le développement des RCC. Ces cellules ont été modifiées d'une part pour surexprimer le récepteur (DDR1) ou une forme dominante négative (DDR1DN) et d'autre part pour inactiver son expression (DDR1 KO). L'utilisation de techniques 2D et 3D (sphéroïdes) a révélé un rôle antitumoral de DDR1, inhibant le développement tumoral *in vitro* et *in vivo* lorsqu'il est surexprimé. Etonnamment, l'inactivation du récepteur n'a aucun effet *in vitro* mais induit une forte inhibition du développement tumoral *in vivo* suggérant des modifications d'interactions entre la tumeur et son microenvironnement.

Le 2^{ème} projet s'est intéressé au rôle de DDR1 dans le développement des WT. Une étude protéomique à partir des contingents prétéumoraux et tumoraux a mis en évidence une forte dérégulation de l'expression des collagènes dans les tumeurs ainsi que des modifications de la signalisation intracellulaire liée aux intégrines et aux autres récepteurs de la MEC. La lignée tumorale pédiatrique WT-CLS1 a été modifiée pour surexprimer différents niveaux de DDR1 (DDR1-1 et DDR1-2) ou pour inactiver son expression (DDR1 KO). L'utilisation de sphéroïdes révèle que la surexpression de DDR1 induit un effet antitumoral *in vitro* en réduisant la croissance/le développement et la migration des sphéroïdes en présence de collagène I. En revanche, l'inactivation du récepteur *in vitro* ne diminuera que la migration cellulaire suggérant la présence d'autres acteurs (comme les intégrines) pouvant contrôler ces mécanismes en l'absence de DDR1.

Ces résultats montrent que, dans les cellules tumorales des cancers du rein adultes et pédiatriques, la signalisation induite par le collagène I via son récepteur DDR1 doit être finement régulée afin de permettre un développement tumoral optimal.

Ces deux projets apportent une meilleure compréhension des mécanismes de progression tumorale dans les cancers du rein et permettent l'identification de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés : Carcinomes Rénaux, Tumeurs de Wilms, Matrice extracellulaire, DDR1, Collagène, Sphéroïdes.

SUMMARY

Involvement of collagens and their DDR1 discoidin domain receptor in the development of adult and pediatric kidney cancers

In adults, kidney cancer or renal cell carcinoma (RCC) is one of the 20 most diagnosed cancers. In children, Wilms' tumors (WT) represent 90% of kidney cancers and is the third solid tumors diagnosed.

In the absence of metastasis the overall cure rate is good. Despite this, the therapeutic arsenal of RCCs or WTs is faced with increased resistance, a lack of efficacy or causes serious undesirable effects impacting the quality of life of patients (secondary cancers, cardiac pathologies, etc.). The lack of biomarkers in these cancers delays and complicates the diagnosis of these tumors.

Tumor development and progression depend on interactions between cancer cells and their microenvironment. The latter consists of a non-cellular element, the extracellular matrix (ECM) and cellular elements (fibroblasts, immune cells, adipocytes, etc.) diverted for the benefit of the tumor and promoting its progression.

My thesis project focused on the effect of ECM and its cell receptors on the development of adult and pediatric kidney cancers.

The 1st project consisted of evaluating the impact of ECM components (Collagen I, Fibronectin 1 and Matrigel) on the phenotypic characteristics of 3 RCC cell lines (Renca, 786-O, Caki-2). This study demonstrates that collagen I is the main modulator of the fate of RCC cells, promoting cell migration and invasion, which are important for metastatic dissemination.

Subsequently, the use of the Renca and 786-O lines made it possible to study the role of the collagen receptor DDR1, in the development of RCCs. These cells were modified on one hand to overexpress the receptor (DDR1) or a dominant negative form (DDR1DN) and on the other hand to inactivate its expression (DDR1 KO). The use of 2D and 3D techniques (spheroids) has revealed an anti-tumor role of DDR1, inhibiting tumor development *in vitro* and *in vivo* when overexpressed. Surprisingly, the inactivation of the receptor has no effect *in vitro* but induces a strong inhibition of tumor development *in vivo* suggesting modifications of the interactions between the tumor and its micro-environment.

The 2nd project looked at the role of DDR1 in the development of WTs. A preliminary proteomic study using pretumor and tumor contingents revealed strong deregulation of collagen expression in tumors as well as changes in intracellular signaling linked to integrins and other ECM receptors. The pediatric tumor cell line WT-CLS1 has been modified to overexpress different levels of DDR1 (DDR1-1 and DDR1-2) or to inactivate its expression (DDR1 KO). The use of spheroids reveals that overexpression of DDR1 induces an antitumor effect *in vitro* by reducing the growth / development and migration of spheroids in the presence of collagen I. Inactivation of the receptor *in vitro* will only decrease migration suggesting the presence of other actors (such as integrins) that can control these mechanisms in the absence of DDR1.

These results show that in adult and pediatric kidney cancers tumor cell, signaling induced by collagen I via its DDR1 receptor must be finely regulated in order to allow optimal tumor development.

These two projects provide a better understanding of the mechanisms of tumor progression in kidney cancers and allow the identification of new biomarkers and new therapeutic strategies.

Keywords: Renal carcinomas, Wilms tumor, Extracellular matrix, DDR1, Collagen, Spheroids.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier ici toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail de thèse.

En premier lieu, je remercie les membres du jury pour leur participation. Merci au docteur Elisabeth GÉNOT d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, aux docteurs Françoise RÉDINI, Ulrich VALCOURT et Serge ROCHE d'avoir pris le temps de lire et examiner cet ouvrage. Merci également aux docteurs Christine VARON, Clotilde BILLOTTET, David SANTAMARIA et David CAPPELLEN pour le temps consacré et leurs précieux conseils lors de mon comité de mi-thèse.

J'aimerais vivement remercier surtout mon directeur de thèse Patrick AUGUSTE. Merci pour ta confiance, ta disponibilité, tes précieux conseils et ton oreille attentive à mes nombreuses questions qui m'ont permis d'effectuer cette thèse dans d'excellentes conditions. Je n'oublie pas tes relectures et corrections qui ont fortement contribué à l'améliorer.

Merci également à la Région Nouvelle Aquitaine et à la fondation Groupama pour le soutien financier qui a permis la réalisation de cette thèse. Un grand merci aux associations Eva pour la vie, Aidons Marina et Aïda ainsi qu'à toutes les autres pour leurs encouragements et le soutien financier si importants pour le bon déroulement des différents projets de notre équipe.

Je remercie Alain TAIEB et François MOREAU-GAUDRY pour leur accueil bienveillant au sein de l'unité U1035. Je tiens plus particulièrement à remercier les membres passés et présents de l'équipe MiRCaDe : tout d'abord Christophe GROSSET pour l'accueil, le soutien, les conseils et les discussions scientifiques enrichissantes et Aksam MERCHED pour ses remarques pertinentes. Un grand merci à Véronique TRÉZÉGUET-BUSQUET pour ses conseils, sa bonne humeur et ses encouragements tout au long de ces années de doctorat ainsi qu'à Philippe VESCHAMBRE pour son aide.

Merci aussi aux doctorants et post doctorants qui ont partagé avec moi une partie ou la totalité de cette thèse : Nicola, Malak, Farah, Hala, Fatma, Marina, Guillaume et Alexia, avec lesquels j'ai été ravie de partager ces moments de vie, autour d'un verre, d'un repas, les discussions enflammées, scientifiques ou pas, les fous rires et les soirées, mais merci surtout pour votre aide et votre soutien dans les moments de doute, je vous souhaite le meilleur pour la suite. Merci aussi à Anthony COOKE et à Sandrine HAMON pour votre réactivité et votre bonne humeur à toute épreuve. Je n'oublie pas aussi les stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer : Chloë, Vanessa, Aurélie, Thomas, Laurine, Eva, à qui j'espère avoir pu transmettre un peu de mes connaissances.

Je remercie également les membres des autres équipes de l'unité U1035 pour leurs remarques et les discussions enrichissantes sur l'avancement de mon projet sans oublier les moments partagés hors laboratoire lors des journées de cohésion.

J'adresse aussi mes remerciements aux personnels des différentes plateformes : Merci à Valérie PROUZET-MAULEON (CRISP'edit) pour son aide et ses conseils sur l'élaboration et le criblage des lignées CRISPR, à Laetitia ANDRIQUE (VoxCell) pour ses multiples tentatives d'encapsulations des lignées Renca. Un grand merci aussi à Anne Aurélie RAYMOND et Sylvaine DI TOMMASO (Oncoprot) pour leur aide lors de la microdissection et l'analyse protéomique. Merci également à Nathalie DUGOT-SENANT pour son aide et ses précieux conseils lors des expériences d'immunohistochimie et à Atika ZOUINE pour son aide dans l'acquisition et l'analyse des données de cytométrie.

Je remercie les membres de l'INSERM U1053 pour leur accueil chaleureux, le soutien et les discussions échangées au cours de ces 3 années de thèse.

Un grand merci aux Docteurs Anne RULLIER, Anne NOTZ-CARRERE, Aurore COULOMB et Stéphane DUCASSOU pour le temps passé dans la collecte des échantillons de tumeurs pédiatriques, merci pour votre expertise pathologique et vos avis précieux quant à la microdissection des différentes régions d'intérêts.

Je remercie également les membres de l'équipe INSERM U1029. Merci à Andreas BIKFALVI de m'avoir accueillie et autorisée à utiliser certains des équipements de votre laboratoire. Merci à Joris GUYON pour l'élaboration de macros qui m'ont fait gagner un temps précieux en analyse, à Andrea EMANUELLI pour son aide concernant les inclusions des organes et les coupes au microtome, à Wilfried SOULEYREAU pour le temps passé dans l'injection des cellules et la collecte des organes lors de l'expérimentation animale. Un grand merci à l'animalerie de Talence, et plus particulièrement à Marie-Alix DERIEPPE et Julie MARTINEAU pour le temps qu'elles m'ont consacré pendant nos expériences sur les souris.

Merci à l'ensemble des professeurs qui m'ont accompagnée lors des différents TP donnés dans le cadre de ma mission d'enseignement et qui ont partagé avec moi leur savoir-faire et leur expérience.

Un grand merci enfin, et d'une façon plus personnelle, à ma famille et mes amis sans lesquels ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir. Merci pour votre patience, votre soutien, votre disponibilité... Merci tout simplement d'avoir toujours été là pour moi !

SOMMAIRE

TABLES DES ILLUSTRATIONS	1
PRINCIPALES ABRÉVIATIONS	4
INTRODUCTION	7
I. LE REIN.....	7
A) Anatomie chez l'homme	7
1. Localisation.....	7
2. Structure.....	8
a) Externe (Macroscopique)	8
b) Interne (Microscopique).....	9
3. Vascularisation et innervation.....	11
B) Fonctions	12
1. Elimination des déchets par la production d'urine	12
2. Maintien de l'homéostasie.....	12
3. Fonctions endocrines	13
a) Production d'érythropoïétine.....	13
b) Production de vitamine D.....	13
c) Production de rénine.....	13
d) Autres	13
C) Organogenèse	14
1. Mise en place des ébauches rénales	14
a) Pronéphros	14
b) Mésonéphros.....	14
c) Métanéphros	15
2. Devenir du métanéphros.....	16
a) Interaction entre le bourgeon urétéral et le blastème métanéphrique	16
b) Migration rénale et évolution fonctionnelle	17
3. Facteurs impliqués dans le développement rénal	17
a) Facteurs impliqués dans la mise en place des ébauches rénales.....	18
b) Facteurs impliqués dans l'interaction entre le bourgeon urétéral et le mésenchyme métanéphrique.....	22
II. LES CANCERS DU REIN	35
A) Chez l'enfant.....	36
1. Epidémiologie.....	36

2.	Classification anatomopathologique.....	36
a)	Tumeurs bénignes	36
b)	Tumeurs malignes	37
➤	Tumeur de Wilms (WT)	37
➤	Tumeur rhabdoïde.....	39
➤	Cas de carcinomes rénaux (RCC) chez les enfants / Cas de WT chez les adultes.....	39
3.	Stade tumoral.....	40
a)	Classification SIOP	40
b)	Classification COG.....	42
4.	Diagnostic	43
a)	Symptômes et signes cliniques.....	43
b)	Examen clinique.....	43
c)	Survie au diagnostic.....	43
5.	Causes et facteurs de risques	44
a)	Facteurs de risques environnementaux	44
b)	Facteurs de risques génétiques	44
c)	Causes génétiques.....	45
6.	Facteurs pronostiques et biomarqueurs	47
7.	Traitements	48
8.	Modèles d'étude	50
B)	Chez l'adulte	52
1.	Epidémiologie.....	52
2.	Classification anatomopathologique.....	52
a)	Tumeurs bénignes	52
➤	Angiomyolipomes.....	52
➤	Oncocytomes.....	53
b)	Cas particulier : Lésions kystiques	54
c)	Tumeurs malignes	54
➤	Le carcinome rénal à cellules claires (ccRCC)	54
➤	Le carcinome rénal tubulo-papillaire (pRCC).....	55
➤	Le carcinome rénal à cellules chromophobes (chRCC).....	56
➤	Autres carcinomes.....	57
3.	Stade tumoral.....	57
a)	La classification TNM.....	57
b)	Autres classifications des cancers du rein	60
➤	Le grade nucléaire de Fuhrman.....	60

➤ Le système de notation ISUP	61
4. Diagnostic	61
a) Symptômes et signes cliniques.....	61
b) Examen clinique.....	61
c) Survie au diagnostic.....	62
5. Causes et facteurs de risques	62
a) Facteurs de risques environnementaux	62
b) Facteurs de risques génétiques	63
➤ Origine héréditaire	63
➤ Origine sporadique	63
6. Facteurs pronostiques et biomarqueurs	64
7. Traitements	65
III- RECEPTEURS A DOMAINE DISCOÏDINE ET CANCERS : MECANISMES DE PROGRESSION ET D'INVASION TUMORALE.....	67
A) Microenvironnement tumoral.....	67
1. Composants cellulaires du microenvironnement	67
2. La matrice extracellulaire	68
a) Structure et fonction	68
b) Composition	69
➤ Substance fondamentale : protéoglycanes.....	70
➤ Les protéines fibreuses.....	70
• Les fibres élastiques	70
• Les glycoprotéines d'adhésion cellulaire : Laminine et Fibronectine.....	70
• Les collagènes.....	71
c) Récepteurs aux collagènes	74
➤ Les intégrines.....	74
➤ Récepteurs à domaine discoïdine (DDR)	75
• Structure	75
• Activation.....	76
• Signalisation.....	78
• Fonctions	79
B) DDR1 et développement tumoral	80
1. DDR1 et Hallmark du cancer	80
2. Implication de DDR1 dans le développement tumoral	81
a) Formation et croissance de la tumeur primaire.....	81
b) Mécanismes d'invasion locale.....	83

➤ Remodelage et dégradation de la matrice extracellulaire	83
➤ Production d'une nouvelle matrice.....	85
➤ Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)	87
➤ Migration et invasion.....	88
c) Invasion distante : formation des métastases	90
3. Stratégie thérapeutique : inhibition de DDR1.....	92
OBJECTIFS	94
MATERIELS ET METHODES	96
A) Matériels.....	96
1. Cellules	96
a) Renca	96
b) 786-O	96
c) Caki-2	96
d) WT-CLS1.....	96
2. Patients.....	97
3. Anticorps	97
4. Amorces.....	98
B) Méthodes	99
1. Culture cellulaire	99
a) Culture	99
b) Génération des différentes lignées cellulaires	99
➤ Lignées surexprimant DDR1	99
➤ Lignées inactivées pour l'expression de DDR1 (DDR1 KO)	100
c) Stimulation des cellules par différentes MEC.....	100
2. Analyses phénotypiques (<i>in vitro</i>)	101
a) Expression et localisation protéiques.....	101
➤ Western blot.....	101
➤ Immunofluorescence (IF)	102
b) Expression génétique	102
➤ RT-qPCR	102
c) Adhésion.....	102
d) Prolifération.....	103
➤ Technique 2D et 3D de prolifération	103
➤ Test de sensibilité aux drogues	103
e) Cycle cellulaire.....	103
➤ Marquage à l'iodure de propidium	103

➤	Marquage à l'EDU.....	104
➤	Etude des protéines impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire	104
f)	Migration et invasion.....	105
➤	A partir de cellules.....	105
•	Migration / invasion	105
➤	A partir de sphéroïdes	105
•	Génération des sphéroïdes	105
•	Migration	105
•	Invasion.....	106
g)	Activités des gélatinases MMP2 et MMP9 (Zymographie)	106
3.	Analyses <i>in vivo</i> de la croissance tumorale	106
a)	Implantation cellulaire	106
b)	Préparation des organes et coupes au microtome	107
c)	Immunohistochimie.....	107
4.	Analyses protéomiques des tumeurs de Wilms	108
5.	Analyse <i>in silico</i> de la survie des patients à 5 ans	108
6.	Tests statistiques	108
	RESULTATS.....	109
	PROJET 1 - PARTIE I : IMPACT DE LA MEC DANS LA MODULATION PHENOTYPIQUE DES CELLULES DE RCC.....	109
	PROJET 1 - PARTIE II : ROLE DE DDR1 DANS LE DEVELOPPEMENT DES RCC	111
A)	Impact de l'expression de DDR1 sur la survie des patients.....	111
B)	Expression de DDR1 dans les RCC	112
C)	Hypothèse et modèle d'étude.....	113
D)	Niveau d'expression et localisation de DDR1 dans les différentes lignées cellulaires	113
1.	Expression de DDR1.....	113
a)	Analyse par western blot.....	113
b)	Analyse par RT-qPCR	115
2.	Localisation de DDR1.....	116
E)	Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la prolifération cellulaire.....	118
F)	Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur le cycle cellulaire	120
1.	Etude du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium	120
2.	Etude du cycle cellulaire par marquage à l'EDU.....	122
3.	Etude des protéines impliquées dans le passage des points de contrôle du cycle cellulaire	123
G)	Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la migration cellulaire	126

1.	Migration à partir de sphéroïdes.....	126
2.	Expression des facteurs de transcription de l'EMT	129
H)	Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur l'invasion cellulaire	131
1.	Invasion à partir de sphéroïdes	132
2.	Expressions et activités de MMP2 et MMP9.....	133
I)	Impact <i>in vivo</i> de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur le développement des ccRCC	139
1.	Développement tumoral	139
2.	Analyses histologiques	141
	PROJET 2 : ROLE DE DDR1 DANS LE DEVELOPPEMENT DES TUMEURS DE WILMS	143
A)	Analyse protéomique	143
1.	Nombre de protéines détectées	144
2.	Analyse comparative entre les RNH et les différents contingents tumoraux	144
3.	Analyse comparative entre les RNQ et les différents contingents tumoraux.....	146
B)	Hypothèse et modèle d'étude.....	148
C)	Niveau d'expression de DDR1 dans les cellules WT-CLS1	148
D)	Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la prolifération cellulaire.....	149
E)	Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la migration cellulaire	150
F)	Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur le développement des sphéroïdes...	152
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	154
	CONCLUSION GENERALE	166
	VALORISATION SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL DE THESE	167
	REFERENCES	168
	ANNEXES.....	185

TABLES DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Le système urinaire humain.</i>	7
<i>Figure 2 : Structure externe du rein.</i>	8
<i>Figure 3 : Structure interne du rein.</i>	9
<i>Figure 4 : Unité fonctionnelle du rein : Le néphron.</i>	10
<i>Figure 5 : Représentation des différents types de néphrons : cortical et juxtamédullaire.</i>	11
<i>Figure 6 : Développement du rein.</i>	15
<i>Figure 7 : Développement du rein (suite).</i>	17
<i>Figure 8 : Formation du mésoderme intermédiaire.</i>	19
<i>Figure 9 : Formation du pronéphros et du mésonéphros.</i>	20
<i>Figure 10 : Formation du métanéphros.</i>	22
<i>Figure 11 : Formation et induction du bourgeon urétéral.</i>	24
<i>Figure 12 : Représentation schématique des branchements urétéraux.</i>	26
<i>Figure 13 : Représentation schématique du processus MET lors du développement rénal.</i>	29
<i>Figure 14 : Structuration du néphron.</i>	32
<i>Figure 15 : Classification OMS 2016 des tumeurs rénales.</i>	35
<i>Figure 16 : Néphrome mésoblastique congénital.</i>	36
<i>Figure 17 : Tumeur de Wilms.</i>	38
<i>Figure 18 : Tumeur rhabdoïde.</i>	39
<i>Figure 19 : Schématisation d'un sphéroïde.</i>	51
<i>Figure 20 : Angiomyolipomes.</i>	53
<i>Figure 21 : Oncocytomes.</i>	53
<i>Figure 22 : Carcinome rénal à cellules claires.</i>	55
<i>Figure 23 : Carcinome rénal tubulo-papillaire.</i>	56
<i>Figure 24 : Carcinome rénal à cellules chromophobes.</i>	56
<i>Figure 25 : La matrice extracellulaire.</i>	69
<i>Figure 26 : Structures des différents collagènes.</i>	71
<i>Figure 27 : Biosynthèse et organisation des différents types de collagènes.</i>	72
<i>Figure 28 : Principaux récepteurs aux collagènes.</i>	74
<i>Figure 29 : Représentation schématique des DDR.</i>	76
<i>Figure 30 : Représentation schématique de l'activation des récepteurs DDR.</i>	77
<i>Figure 31 : Représentation schématique de l'activation non canonique des DDR.</i>	78
<i>Figure 32 : Signalisations intracellulaires induites par les DDR.</i>	79
<i>Figure 33 : Implication des DDR dans les différentes hallmarks du cancer.</i>	81
<i>Figure 34 : Représentation schématique du microenvironnement de la tumeur primaire.</i>	83
<i>Figure 35 : Dégradation et remodelage de la MEC.</i>	85
<i>Figure 36 : Représentation schématique des 3 signatures de collagènes associés aux tumeurs (TACS).</i>	86
<i>Figure 37 : Représentation des différentes phases de l'EMT.</i>	87
<i>Figure 38 : Représentation schématique des modes de migration individuels (amiboïde / mésenchymateux) et collectifs.</i>	89
<i>Figure 39 : Processus de dissémination métastatique.</i>	91
<i>Figure 40 : Représentation schématique du core et de la zone de migration d'un sphéroïde.</i>	106
<i>Figure 41 : Analyse in silico des corrélations entre l'expression de DDR1 et la survie des patients atteints de RCC.</i>	111
<i>Figure 42 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de DDR1 dans les tissus de patients atteints de RCC.</i>	112
<i>Figure 43 : Vérification du niveau d'expression de DDR1 ou DDR1DN par western blot dans les différentes lignées cellulaires de RCC.</i>	114
<i>Figure 44 : Vérification de l'inactivation de l'expression de DDR1 par western blot dans les différentes lignées cellulaires de RCC.</i>	115
<i>Figure 45 : Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression de DDR1 ou de DDR1DN dans les différentes lignées cellulaires de RCC.</i>	116
<i>Figure 46 : Localisation de DDR1 dans les cellules de RCC.</i>	117

Figure 47 : Impact de l'expression de DDR1 sur la prolifération in vitro des cellules Renca.	118
Figure 48 : Impact de l'expression de DDR1 sur la prolifération in vitro des cellules 786-O.	119
Figure 49 : Impact de l'expression de DDR1 sur le cycle cellulaire des cellules Renca.	120
Figure 50 : Impact de l'expression de DDR1 sur le cycle cellulaire des cellules 786-O.	121
Figure 51 : Impact de l'expression de DDR1 sur l'entrée en phase S des cellules Renca.	122
Figure 52 : Impact de l'expression de DDR1 sur l'entrée en phase S des cellules 786-O.	123
Figure 53 : Représentation schématique du cycle cellulaire et des protéines impliquées dans sa régulation.	124
Figure 54 : Impact de DDR1 sur l'expression des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire par les cellules 786-O.	125
Figure 55 : Génération des sphéroïdes à partir de cellules de RCC.	126
Figure 56 : Impact de l'expression de DDR1 sur la migration cellulaire in vitro des sphéroïdes formés à partir de cellules 786-O.	127
Figure 57 : Impact de l'inactivation de DDR1 sur la migration cellulaire in vitro des sphéroïdes formés à partir de cellules 786-O.	128
Figure 58 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT.	129
Figure 59 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT.	130
Figure 60 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT.	130
Figure 61 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT.	131
Figure 62 : Impact de l'expression de DDR1 sur l'invasion cellulaire in vitro à partir de sphéroïdes issus de cellules 786-O.	132
Figure 63 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules Renca.	133
Figure 64 : Impact de la déplétion de DDR1 sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules Renca.	134
Figure 65 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules Renca.	135
Figure 66 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules Renca.	135
Figure 67 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules 786-O.	136
Figure 68 : Impact de la déplétion de DDR1 sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules 786-O.	136
Figure 69 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules 786-O.	137
Figure 70 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules 786-O.	138
Figure 71 : Impact de l'expression de DDR1 sur le développement tumoral in vivo.	140
Figure 72 : Coloration Hématoxyline et éosine des coupes de reins et de tumeurs issues des différentes cellules Renca.	141
Figure 73 : Images représentatives des différentes régions d'intérêts analysées dans l'étude protéomique préliminaire.	143
Figure 74 : Récapitulatif de l'analyse comparative entre les RNH et les différents contingents tumoraux.	145
Figure 75 : Récapitulatif de l'analyse comparative entre les RNQ et les différents contingents tumoraux.	147
Figure 76 : Vérification du niveau d'expression de DDR1 par western blot dans la lignée cellulaire de WT.	149
Figure 77 : Impact de l'expression DDR1 sur la prolifération in vitro des cellules WT-CLS1.	150
Figure 78 : Impact de l'expression de DDR1 sur la migration cellulaire in vitro à partir de sphéroïdes WT-CLS1.	151
Figure 79 : Impact de DDR1 sur le développement des sphéroïdes WT-CLS1 in vitro.	152
Figure 80 : Graphiques Kaplan-Meier de l'association entre l'expression des collagènes et la survie des patients atteints de WT.	155
Figure 81 : Marquages des différentes coupes de tumeurs à l'aide d'un anticorps anti CD11c.	160

Figure 82 : Graphiques Kaplan-Meier de l'association entre l'expression de DDR2 et la survie des patients atteints de ccRCC (gauche) et WT (droite). 163

Tableau 1 : Facteurs importants lors de la néphrogénèse.	33
Tableau 2 : Rôles des principaux effecteurs des voies de signalisation lors du développement rénal.	34
Tableau 3 : Classification SIOP des tumeurs rénales pédiatriques SIOP UMBRELLA 2016.	41
Tableau 4 : Stratification des risques des différents sous-types histologiques.	42
Tableau 5 : Taux de survie à 4 ans des WT en fonction des stades établis par la classification COG.	44
Tableau 6 : Principaux syndromes de prédisposition aux WT.	45
Tableau 7 : Traitement post-opératoire.	49
Tableau 8 : Classification TNM 2017 des cancers du rein.	58
Tableau 9 : Assignation des stades cliniques des cancers rénaux en fonction de la classification TNM.	59
Tableau 10 : Distribution des stades cliniques en fonction de la classification 2010 dans les ccRCC, pRCC et chRCC.	59
Tableau 11 : Grade nucléaire de Fuhrman.	60
Tableau 12 : Système de classification ISUP des cancers du rein.	61
Tableau 13 : Taux de survie à 5 ans post-chirurgie en fonction des stades établis d'après la classification TNM 2010.	62
Tableau 14 : Principaux syndromes héréditaires.	63
Tableau 15 : Tableau récapitulatif de quelques inhibiteurs non spécifiques et spécifiques des DDR.	93
Tableau 16 : Récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés dans ce travail.	97
Tableau 17 : Récapitulatif des amorces utilisées lors de ce travail.	98
Tableau 18 : Résumé des analyses des activités des MMP2 et MMP9 retrouvées dans le surnageant cellulaire et des expressions des ARNm MMP2 et 9 dans les cellules Renca et 786-O.	138
Tableau 19 : Nombre de protéines détectées lors de l'analyse par spectrométrie de masse pour chaque patient.	144

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

A

AJCC : American Joint Committee on Cancer

B

Balb/c : Bagg and Albino

BMP : Bone Morphogenetic Proteins

BSA : Bovine Serum Albumin

C

CAF : Cancer Associated Fibroblast (Fibroblastes associés au cancer)

CAKUT : Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract

ccRCC : clear cell Renal Cell Carcinoma (Carcinomes rénaux à cellules claires)

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

chRCC : chromophobe Renal Cell Carcinoma (Carcinome rénal à cellules chromophobes)

CM : Cap Mesenchyme (Coiffe métanéphrogène)

COG : Children Oncology Group

Col : Collagène

CSB : Comma Shape Body (Corps en forme de virgule)

CTL : Contrôle

D

DAPI : 4,6 Diamidino-2-Phénylindol

DDR : Discoïdine Domain Receptor (Récepteur à domaine discoïdine)

DDR1DN : Discoidin Domain Receptor 1 Dominant Negative

DT : Distal tubule (Tubule distal)

E

EDU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition

F

FACIT : Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices

FGF : Fibroblast Growth Factor

FN : Fibronectine

G

GAG : Glycosaminoglycanes

GBM : Glomerular Basement Membrane (Membrane basale glomérulaire)

GDNF : Glial-cell line-Derived Neurotrophic Factor

H

HES : Hématoxyline – Eosine - Safran

HIF : Hypoxia Inducible Factor

I

IF : ImmunoFluorescence

IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISUP : Société Internationale d'Urologie

K

KO : Knock - Out

L

LH : Loop of Henle (Anse de Henlé)

LOH : Loss Of Heterozygosity

LOX : Lysyl oxydases

M

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MET : Mesenchymal to Epithelial Transition

MM : Mésochyme (blastème) Métanéphrique

MMP : Matrix MetalloProtéinase

MOI : Multiplicity Of Infection

N

Notch 1 / 2 : Neurogenic locus notch homolog protein 1 / 2

NPC : Nephron Progenitor Cells (Cellules progénitrices du néphron)

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFA : ParaFormaldéhyde

pRCC : papillary Renal Cell Carcinoma (Carcinome rénal tubulo-papillaire)

PT : Proximal Tubule (Tubule proximal)

PTA : Peri Tubular Aggregate (Agrégats cellulaires péri-tubulaires)

R

RCC : Renal Cell Carcinoma (Carcinomes rénaux)

Ret : Receptor tyrosine-protein kinase

RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay

RNH : Restes Néphrogéniques Hyperplasiques

RNQ : Restes Néphrogéniques Quiescents

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

RV : Renal Vesicle (Vésicule rénale)

S

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SHH : Sonic HedgeHog

SIOP : Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique

SPC : Stromal Progenitor Cells (Cellules progénitrices stromales)

SSB : S Shape Body (Corps en forme de S)

SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TAM : Tumor Associated Macrophages (Macrophages associés au cancer)

TACS : Tumor Associated Collagen Signatures

TE : Tumeur Epithéliale

TB : Tumeur Blastémateuse

TBS / TBST : Tris-Buffered Saline / Tris-Buffered Saline Tween

TGF : Transforming Growth Factor

TGS : Tris-Glycine-SDS

TNM : Tumor, Node, Metastasis

TS : Tumeur Stromale

Tyr : Tyrosine

U

UB : Ureteral Bud (Bourgeon Urétéral)

UICC : Union for International Cancer Control

UPC : Ureteral Progenitor Cells (Cellules progénitrices urétérales)

V

VHL : Von Hippel Lindau

W

WB : Western Blot

Wnt : Wingless-type MMTV Integration site family

WT : Wilms Tumor (Tumeur de Wilms)

INTRODUCTION

I. LE REIN

Les reins font partie de l'appareil urinaire composé également de deux uretères, de la vessie et de l'urètre (**Figure 1**). L'appareil urinaire fait partie du système excréteur et permet l'élimination des déchets de l'organisme, produits par le catabolisme cellulaire, sous forme liquide par l'urine. De ce fait, ce système urinaire permet le maintien de l'homéostasie et garantit l'épuration du sang dans l'organisme [1].

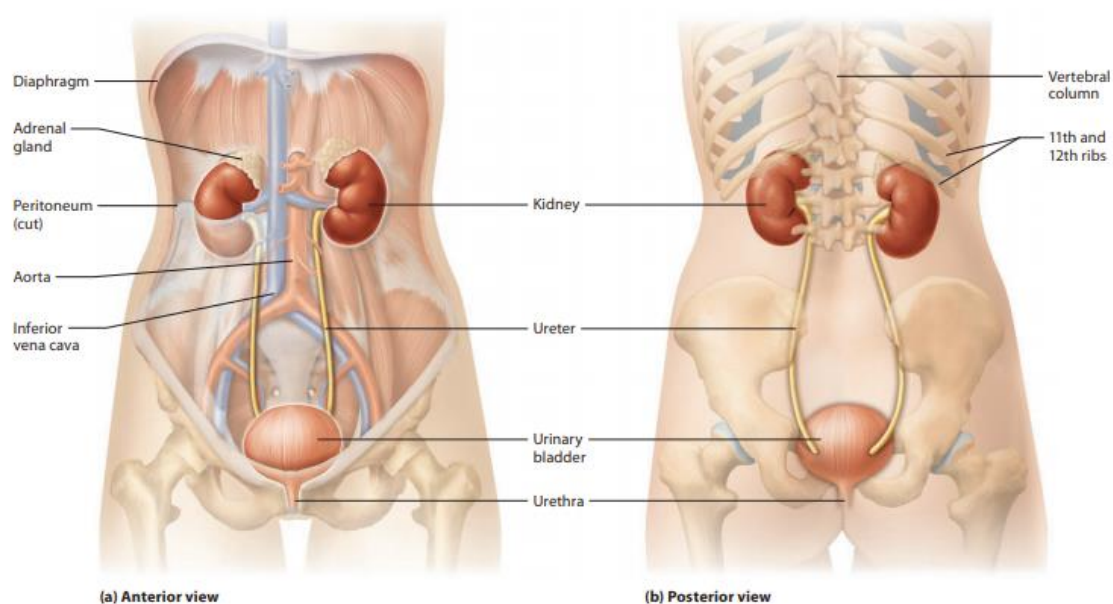


Figure 1 : Le système urinaire humain. Ce système est composé de deux reins (filtrant les différents fluides), de deux uretères (amenant l'urine des reins à la vessie), de la vessie (collectant l'urine) et de l'urètre (acheminant l'urine vers l'extérieur) [1].

A) Anatomie chez l'homme

1. Localisation

Les reins sont des organes rétropéritonéaux en forme de haricot qui se situent derrière la paroi abdominale. Leur position diffère légèrement, le rein gauche prenant place de la vertèbre T12 à L3 et le rein droit se situant un peu en dessous en raison de la présence du foie. Leur partie supérieure est partiellement protégée par les 11^{ème} et 12^{ème} paires de côtes et surmontée par la glande surrénale. A l'âge adulte, ils mesurent environ 11 cm de long, 6 cm de large et 3 cm d'épaisseur et pèsent environ 150 grammes (**Figure 1**) [1].

2. Structure

a) Externe (Macroscopique)

Les reins sont entourés et protégés par différentes couches de tissus conjonctifs décrites en suivant de la plus superficielle à la plus profonde [1] (**Figure 2**) :

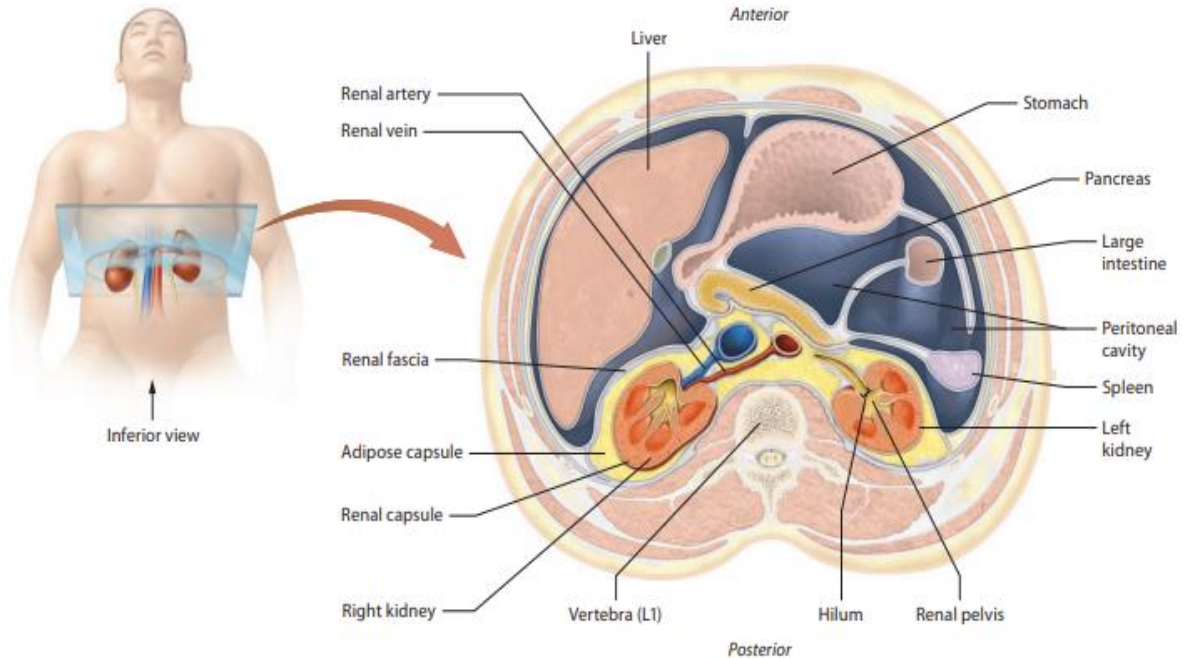


Figure 2 : Structure externe du rein. Ce schéma représente une vue inférieure de la position des différentes couches de tissus recouvrant les reins par rapport aux autres organes [1].

- Renal fascia : Cette couche permet d'ancrer les reins au péritoine.
- La capsule adipeuse : La plus épaisse des couches, composée de tissus adipeux, permet de maintenir les reins en place et de les protéger de chocs physiques.
- La capsule rénale : Très fine, recouvre les reins et les protège contre les traumatismes physiques et les infections.

b) Interne (Microscopique)

Une coupe longitudinale du rein a permis de mettre en évidence 3 régions particulières (**Figure 3**) :

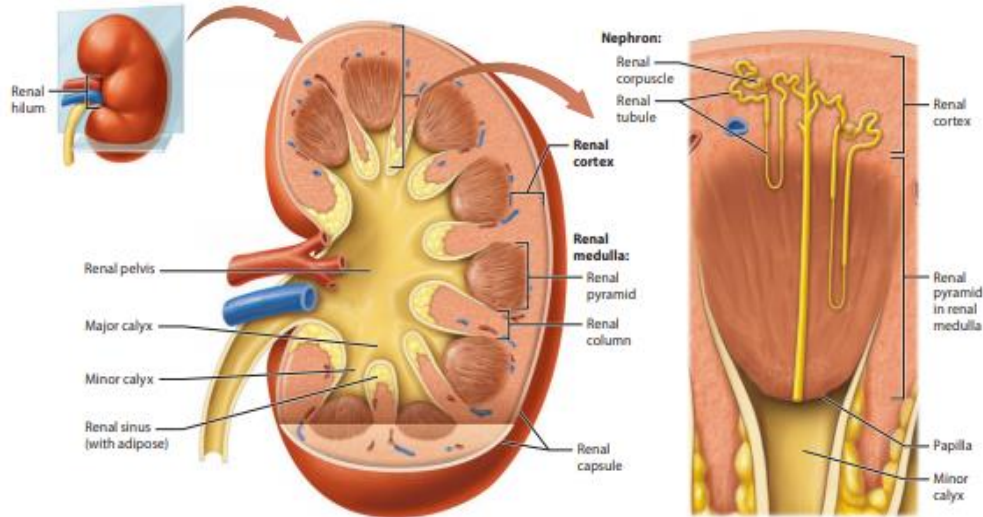


Figure 3 : Structure interne du rein. Cette représentation schématisique du rein permet de visualiser les positions des différentes régions rénales ainsi que l'agencement du néphron au sein de ces structures [1].

- Le cortex rénal : Cette région, très vascularisée, contient 90 à 95% des vaisseaux sanguins du rein qui sont à l'origine de son aspect brun-rougeâtre. Elle est composée d'extensions, appelées colonnes rénales (ou colonnes de Bertin) situées entre les pyramides rénales (ou pyramides de Malpighi).
- La médullaire : Dans cette région, se trouve les pyramides de Malpighi qui sont formées par des faisceaux tubulaires possédant un aspect strié et plus foncé car moins vascularisée que le cortex rénal.
- Le pelvis rénal (ou bassinnet du rein) : Cette poche membraneuse constitue la cavité de collecte de l'urine à partir des calices. L'extrémité de chaque pyramide de Malpighi aboutit à un calice mineur et la réunion de 3 à 4 calices mineurs forme un calice majeur drainant l'urine jusqu'au pelvis rénal (constituant la cavité excrétrice centrale du sinus rénal) puis l'urètre.

Le cortex et la zone médullaire comportent les structures fonctionnelles du rein appelées néphrons (**Figure 3**). Chez l'humain, le nombre de néphrons est très variable pouvant aller de 250 000 à 1,8 millions de néphrons. Une corrélation inverse entre le nombre de

néphrons et le risque d'apparition d'hypertension et de maladies rénales (insuffisance rénale) a été démontrée [2].

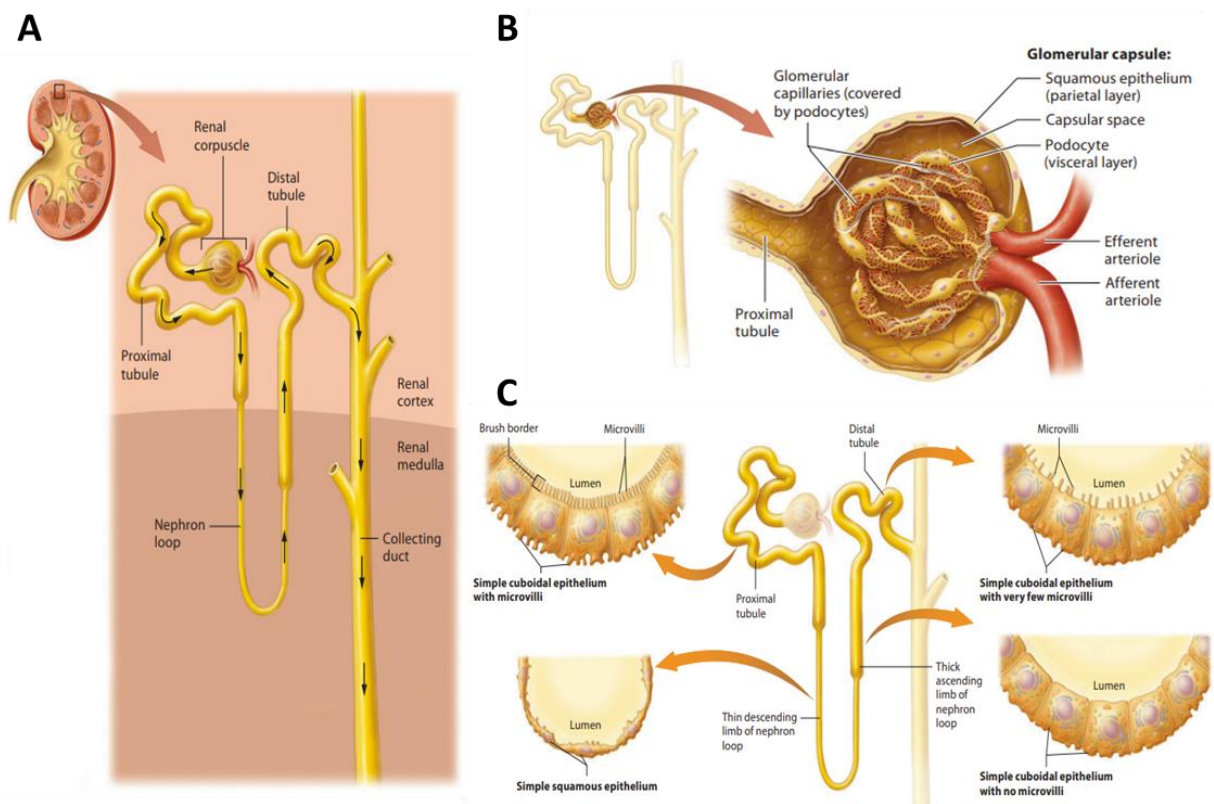


Figure 4 : Unité fonctionnelle du rein : Le néphron. *A/ Représentation de la structure globale du néphron constitué de tubules rénaux ainsi que de corpuscules rénaux. B/ Structure détaillée du corpuscule rénal formé par un réseau capillaire de glomérules entouré par la capsule glomérulaire. C/ Structure détaillée des différents tubules rénaux. Adaptée de [1].*

Les néphrons sont composés de deux différentes structures (**Figure 4**) :

- Les corpuscules rénaux composés d'un réseau capillaire nommé glomérule et d'une capsule glomérulaire (de Bowman), ayant pour fonction la filtration du sang, se situent dans le cortex rénal. La capsule de Bowman est constituée d'une double couche de tissu épithélial, la couche interne étant formée par des cellules épithéliales particulières, les podocytes, enroulées autour du réseau capillaire (**Figure 4B**).
- Les tubules rénaux modifient les filtrats et sont composés de différentes parties se situant dans le cortex rénal et la médulla. La première est le tube proximal, composé de cellules épithéliales cubiques avec microvillosités et le segment le plus long du tube rénal. Puis la boucle de Henlé, seul segment qui se trouve dans la médulla, est constituée d'une partie descendante formée d'un épithélium simple squameux et d'une partie ascendante majoritairement composée d'un épithélium simple cuboïde.

Pour finir, le tube distal, à l'image du tube proximal, est aussi composé d'un épithélium simple cuboïde possédant quelques microvillosités (**Figure 4C**).

Il existe deux types de néphrons. Les corticaux, représentant 80% des néphrons, se situent dans le cortex rénal et sont constitués d'une petite boucle de Henlé. Les néphrons juxtamédullaires se trouvent à la limite entre le cortex rénal et la médulla. Constitués d'une grande boucle de Henlé enveloppée par des capillaires péritubulaires dans le cortex et par un réseau de capillaires médullaires appelé vasa recta, ces néphrons font partie du système contrôlant le volume et la concentration de l'urine. Le système collecteur, constitué du canal collecteur cortical et du système de collecte médullaire, fait suite aux néphrons et modifie davantage les filtrats [1] (**Figure 5**).

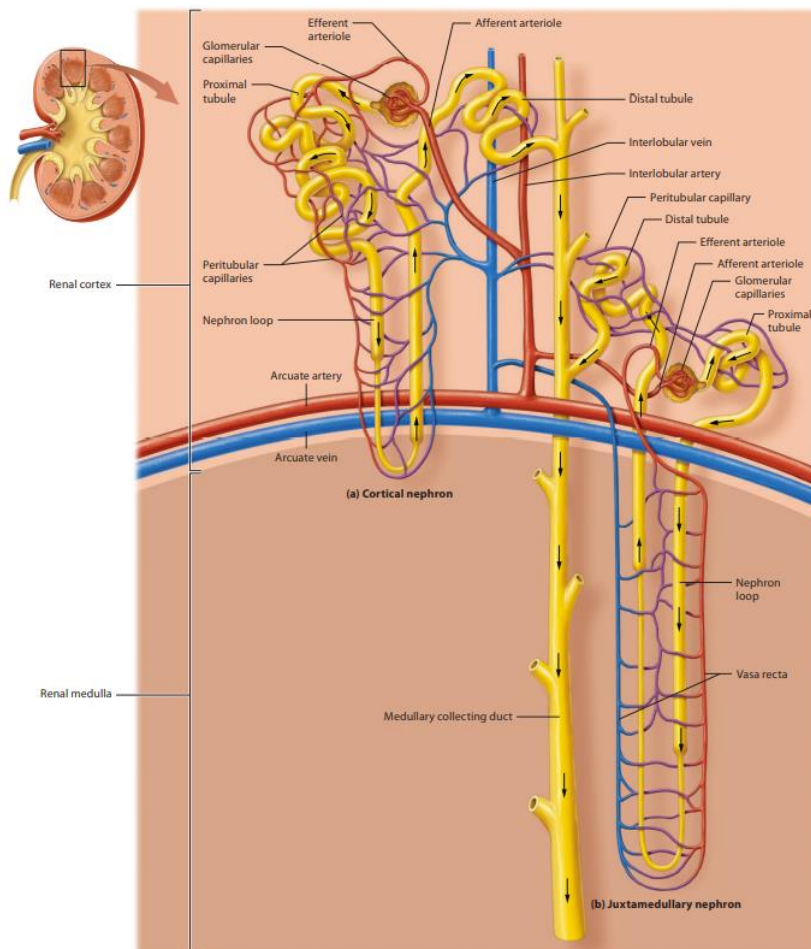


Figure 5 : Représentation des différents types de néphrons : cortical et juxtamédullaire.

La position ainsi que la vascularisation de ces 2 structures sont indiquées dans cette figure [1].

3. Vascularisation et innervation

Au niveau de la région médiane concave du rein se situe une ouverture appelée hile qui permet aux nerfs, aux vaisseaux et à l'urètre d'entrer et sortir du rein (**Figure 3**). Cette ouverture aboutit sur le sinus rénal, cavité centrale du rein permettant d'accueillir les

structures drainantes de l'urine. Les reins sont des organes extrêmement vascularisés dont le débit sanguin représente 20 à 25% du débit cardiaque total (**Figure 5**). Enfin, les artères rénales sont entourées par les nerfs du système sympathique [1].

B) Fonctions

Les reins sont des organes vitaux exerçant différentes fonctions clés dans l'organisme :

1. Élimination des déchets par la production d'urine

Un des rôles essentiels des reins consiste en la purification de l'organisme par élimination des déchets via l'urine. Un adulte élimine en moyenne 1 à 2 litres d'urine par jour. L'eau représente approximativement 95% du volume total d'urine et les électrolytes 5%. Ces derniers sont des solutés inorganiques (comme les ions potassium, ammoniacque etc.) et organiques (tels que l'urée, la créatinine, les acides gras etc.) qui dérivent du métabolisme et de substances exogènes à l'image des médicaments. Ce processus, assuré par les néphrons et le tube collecteur, se déroule en 3 grandes étapes : en premier, la filtration glomérulaire a lieu lorsque le plasma sanguin passe à travers la membrane des glomérules. La filtration sélective du liquide se base sur la taille et s'effectue à différents niveaux. Un premier niveau de filtration a lieu au niveau du réseau capillaire, les cellules endothéliales étant séparées de 70 à 100 nm. Le deuxième s'effectue au niveau de la lame basale, les fibres de collagènes chargées négativement formant un maillage de 8nm. Le dernier niveau de filtration est constitué par les fentes de filtration de 6 à 7nm situées entre les podocytes. Le filtrat final est constitué d'eau, de solutés, de petites protéines et d'acides aminés, les différents niveaux de filtration ayant permis d'empêcher l'évacuation de cellules ou de plaquettes. La quantité de filtrats formée par minute dans les corpuscules rénaux est en moyenne de 125 mL/min et correspond au débit de filtration glomérulaire. En deuxième, la réabsorption tubulaire se fait essentiellement dans le tube contourné proximal. En effet, chaque jour les reins produisent 180 litres de filtrats parmi lesquels 1% va être éliminé sous forme d'urine et 99% réabsorbés par le corps. Enfin, la sécrétion tubulaire va permettre d'éliminer les déchets supplémentaires [1].

2. Maintien de l'homéostasie

Le bon fonctionnement de l'organisme requiert une régulation constante de la composition du sang. Les reins assurent le maintien de l'osmolarité en contrôlant l'élimination

de l'eau et des solutés notamment les ions sodium mais aussi le potassium, le calcium et le chlorure. Par ailleurs, les reins régulent la balance acide-base en contrôlant les quantités d'ions hydrogène et bicarbonate. Ces mécanismes permettent entre autres de réguler le pH et le volume sanguin [1].

3. Fonctions endocrines

Enfin, les reins produisent des substances exerçant des effets endocrines ou une régulation paracrine sur le métabolisme, le transport et/ou la croissance des cellules. Parmi les fonctions endocrines du rein, 3 sont plus particulièrement connues [3]:

a) Production d'érythropoïétine

En réponse à l'hypoxie, les reins sécrètent de l'érythropoïétine qui stimule la production de globules rouges.

b) Production de vitamine D

Les reins sont aussi responsables de l'activation de la vitamine D à partir de son précurseur hépatique $25(\text{OH})\text{D}_3$. Ce précurseur va être hydroxylé en forme active $1\text{-}\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ par l'enzyme 1-alpha hydroxylase produite dans le tube proximal du rein. Par la suite, la vitamine D joue un rôle important dans divers processus comme l'homéostasie calcique, la sécrétion d'insuline ou la régulation de la pression sanguine.

c) Production de rénine

La pression sanguine est aussi régulée par le système rénine-angiotensine. Lorsqu'une baisse de pression artérielle ou veineuse est détectée, la rénine est sécrétée par les reins. Une fois libérée dans le sang circulant, elle clive l'angiotensinogène contenue dans le plasma en angiotensine I, convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion. L'angiotensine II va entre autres augmenter la vasoconstriction, la production d'hormones antidiurétiques et la sécrétion d'aldostérone.

d) Autres

D'autres fonctions endocrines moins connues sont exercées par le rein notamment un rôle dans le métabolisme d'un certain nombre de molécules (telles que l'insuline, la prostaglandine, l'hormone parathyroïdienne etc.), dans la gluconéogenèse et la génération de thrombopoïétine.

C) Organogenèse

Lors du développement, la mise en place de l'appareil urinaire humain débute dès la 3^{ème} semaine et se développe à partir du mésoderme intermédiaire (ou néphrotome), situé entre les somites et les feuilletts cœlomiques, aboutissant par la suite aux reins et uretères. Le reste de l'appareil urinaire (vessie et urètre) dérive du sinus urogénital et ne sera pas détaillé ici [4].

1. Mise en place des ébauches rénales

Le rein se développe en suivant une séquence temporelle cranio-caudale de 3 ébauches rénales, décrites par la suite : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Ces 3 ébauches se mettent en place à partir du cordon néphrogène qui dérive du mésoderme intermédiaire (**Figure 6**) [4].

a) Pronéphros

Le pronéphros se met en place à l'extrémité crâniale du cordon néphrogène au cours de la 3^{ème} - 4^{ème} semaine de développement et régresse à partir de la 5^{ème} semaine. La segmentation du cordon, à l'origine plein, donne naissance à des amas indépendants : les néphrotomes. Ces derniers vont former des tubules pronéphrotiques qui, en se réunissant aux extrémités, vont aboutir à l'ébauche du canal collecteur pronéphrotique.

Cette structure, primitive et éphémère, ne sera jamais fonctionnelle chez l'humain mais est nécessaire au bon développement du rein. L'absence de pronéphros aboutit à une agénésie rénale c'est-à-dire un développement insuffisant du rein (**Figure 6**) [4].

b) Mésonéphros

Le mésonéphros se différencie au cours de la 4^{ème} semaine de développement, à la suite du pronéphros, et régresse dès la 8^{ème} semaine. Durant la régression du pronéphros, le canal mésonéphrotique (cordon cellulaire mésenchymateux) se développe au versant dorsal du cordon néphrogène. A la suite de sa dissociation avec le cordon néphrogène, il évolue vers l'extrémité caudale où il fusionnera avec la paroi du cloaque donnant naissance au canal de Wolff. Lors de sa progression, le canal mésenchymateux va subir une transition épithéliale avec mise en place d'une lumière centrale, la partie caudale demeurant mésenchymateuse.

Le mésonéphros est un rein transitoire et nécessaire au bon développement rénal aboutissant à la formation d'unités fonctionnelles, à l'image du néphron, appelées unités

excrétrices mésonéphrotiques. Ces dernières sont formées à partir des tubules mésonéphrotiques dérivant du cordon néphrogène après formation du canal mésonéphrotique. Au cours du développement, la production d'urine s'étend de la 6^{ème} à la 10^{ème} semaine quand ces unités, devenues inactives, régresseront (**Figure 6**) [4].

c) Métanéphros

Le métanéphros, constituant le rein définitif, se développe dans la région sacrée, caudale du cordon néphrogène qui ne se segmente pas. Il est composé d'une partie excrétrice, le blastème (ou mésenchyme) métanéphrique (MM), correspondant à la partie caudale du cordon néphrogène et d'une partie collectrice, le bourgeon urétéral (UB), diverticule épithélial qui dérive de la partie caudale du canal de Wolff (**Figure 6**) [4].

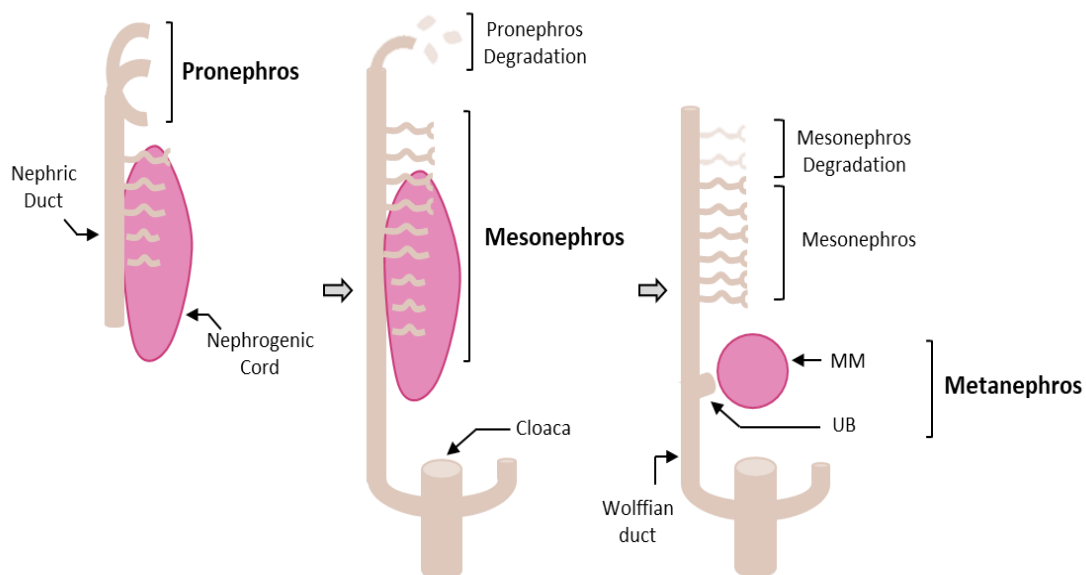


Figure 6 : Développement du rein. Représentation schématique de la formation des 3 ébauches rénales : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. MM : mésenchyme (blastème) métanéphrique, UB : bourgeon urétéral.

2. Devenir du métanéphros

a) Interaction entre le bourgeon urétéral et le blastème métanéphrique

Le développement du rein met en jeu une série d'interactions et de signaux inducteurs ou répresseurs, réciproques et séquentiels, entre un épithélium (le bourgeon urétéral), à l'origine du système excréteur, et un mésenchyme (le blastème métanéphrique), à l'origine du système sécréteur (**Figure 7**).

L'extrémité libre du bourgeon urétéral va progresser en direction céphalique et pénétrer le blastème métanéphrique. Au contact et sous l'effet inducteur du blastème, le bourgeon va se dilater et la zone élargie deviendra par la suite le bassinnet du rein. Au cours de sa progression dans le blastème, le bourgeon urétéral va effectuer une série de 15 générations de divisions dichotomiques à l'origine de l'établissement du système collecteur. Ces divisions aboutiront à la formation de 1 à 3 millions de tubes collecteurs à la périphérie du blastème. Puis, au contact et sous l'effet inducteur du bourgeon urétéral, les cellules du blastème métanéphrique vont recouvrir les tubes collecteurs, et se condenser en agrégats cellulaires périrénaux (PTA) aux extrémités du bourgeon formant les coiffes métanéphrogènes (CM). Ces cellules vont par la suite subir une transformation épithéliale appelée transition mésenchymo-épithéliale (MET) aboutissant à la formation des vésicules rénales (RV). Ces dernières vont s'allonger et former des tubules contournés en forme de virgule (CSB) puis en forme de S (SSB), décomposés en 3 parties, qui donneront naissance aux différentes parties du néphron. La partie supérieure (distale) est à l'origine du tube distal, la partie médiale donnera naissance au tube proximal et la partie inférieure (proximale) formera la capsule rénale. Enfin, lors du développement de la capsule rénale, la partie proximale de la vésicule est richement vascularisée et au contact d'une artériole forme la capsule de Bowman des glomérules. En parallèle, le métanéphros devient fonctionnel lorsque la partie supérieure de la vésicule fusionne avec le tube collecteur distal adjacent (**Figure 7**) [4].

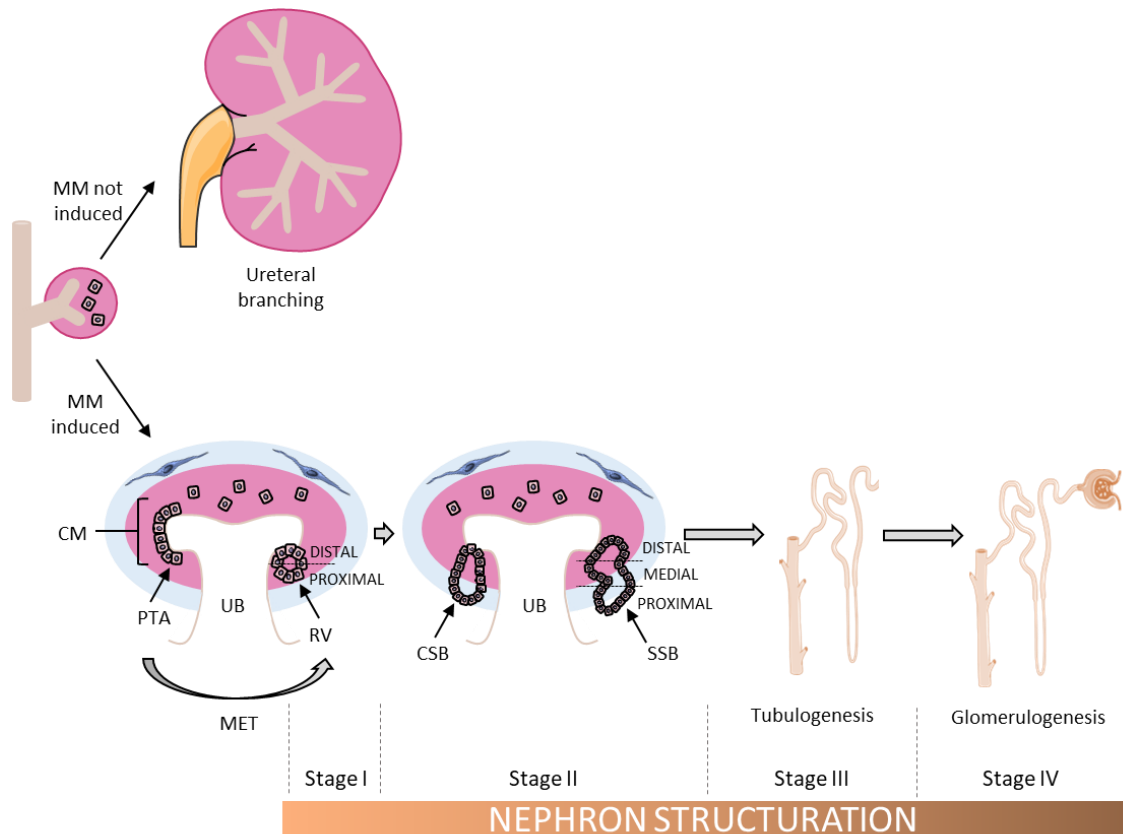


Figure 7 : Développement du rein (suite). Représentation schématique de l'interaction entre le blastème (mésenchyme) métanéphrique (MM) et le bourgeon urétéral (UB) aboutissant à la mise en place d'un néphron fonctionnel. CM : coiffe métanéphrogène, PTA : agrégats péri-tubulaires, RV : vésicule rénale, CSB et SSB : corps en forme de virgule et en forme de S, MET : transition mésenchymateuse épithéliale.

b) Migration rénale et évolution fonctionnelle

Comme dit précédemment, le métanéphros est formé dans la partie sacrée du cordon néphrogène au niveau de la première vertèbre sacrée (S1). Afin de rejoindre leur localisation définitive, les reins ne subissent pas de migration active. L'ascension des reins est due essentiellement à une différence de croissance entre les régions lombaires et sacrées. A la naissance, les reins présentent un aspect polylobé en raison de l'évolution du bourgeon urétéral dans le blastème métanéphrique. Cet aspect sera par la suite perdu en raison de l'augmentation de taille des néphrons de nombre inchangé [4].

3. Facteurs impliqués dans le développement rénal

Le développement rénal est un processus complexe qui fait intervenir un certain nombre d'acteurs et de processus, non seulement de manière séquentielle mais aussi simultanée. Durant ces dernières années, des manipulations génétiques sur des modèles animaux notamment souris, poissons zèbres, embryons de poulet ont permis de mettre en évidence certains facteurs, mécanismes et voies de signalisation déterminants pour le

développement du rein contribuant ainsi à une meilleure compréhension de l'organogénèse rénale.

a) Facteurs impliqués dans la mise en place des ébauches rénales

La structuration du mésoderme de l'embryon débute par le déplacement des cellules le long de la ligne primitive vers leurs positions finales. Elles seront exposées tout le long à un grand nombre de signaux en provenance de tissus qui vont influencer et déterminer leur différenciation en mésodermes : paraxial, intermédiaire ou latéral. Le mésoderme intermédiaire est à l'origine de la formation de tous les tissus du rein. Même si les mécanismes régissant sa formation restent à ce jour encore mal connus, des éléments concernant la régulation de sa localisation et de sa différenciation ont été élucidés (**Figure 8**). La formation, l'extension et la localisation du mésoderme intermédiaire sont tout d'abord régies par une modulation dose dépendante de la signalisation BMP. En effet, il a été montré que de hauts niveaux de signaux BMP favorisaient le développement du mésoderme latéral alors qu'à l'inverse, des niveaux intermédiaires de signalisation induisaient la formation du mésoderme intermédiaire [5]. Ce dernier est caractérisé par l'expression d'au moins 3 facteurs de transcription qui apparaissent peu après la gastrulation : le plus précoce Odd Skipped-related 1 (Osr1, anciennement Odd1), Pax2 et Lim1 (Lhx1). Les niveaux d'expression des deux facteurs de transcription Foxc1 et c2 ont été montrés comme étant décisifs dans l'engagement des cellules vers une structure paraxiale ou intermédiaire [6]. Ainsi, lorsque Foxc1 et c2 sont exprimés, ils inhibent la transcription des marqueurs du mésoderme intermédiaire, favorisant l'expression de marqueurs des somites comme Paraxis. La signalisation BMP exerce une régulation négative sur ces 2 facteurs empêchant l'inhibition des marqueurs du mésoderme intermédiaire.

Par la suite, il a été mis en évidence qu'un autre ligand, appartenant à la superfamille TGF- β , Nodal, était impliqué dans la structuration du mésoderme intermédiaire et nécessaire à l'expression des marqueurs de ce dernier. Nodal exercerait ses effets sur la structuration en modulant la signalisation BMP induisant la phosphorylation des Smad1/5/8 [7].

Enfin, la délimitation du mésoderme intermédiaire est aussi effectuée grâce aux effecteurs de la voie de signalisation Wnt non canonique. En effet, Wnt5a contrôle via Ror2 la morphogénèse et l'extension des tissus, et en particulier du mésoderme intermédiaire. La

dérégulation de cette voie non canonique aboutit à des structures plus courtes et élargies et la délétion de Wnt5a entraîne la formation de rein duplex [8].

Les marqueurs du mésoderme ont, eux aussi, étaient identifiés comme participant à sa structuration. Les gènes de la famille Odd codent pour 2 facteurs de transcription en doigt de zinc, Osr1 et 2. Dans la formation du rein, Osr1 est un régulateur essentiel [9] interagissant avec différents acteurs et hiérarchiquement donnant lieu à une panoplie de cellules progénitrices. Osr2, quant à lui, n'est pas impliqué, sa délétion n'ayant aucun impact sur les reins, il est un acteur majeur de la régulation et du développement du palais [10]. Très récemment, une balance entre l'expression de Osr1 et le facteur de transcription Hand2, tous deux exprimés dans le mésoderme postérieur, a été mise en évidence. Cet équilibre délimite une frontière entre le mésoderme intermédiaire et latéral dans laquelle Osr1, en opposition avec Hand2, favorise la différenciation du mésoderme intermédiaire et inhibe l'émergence des progéniteurs des vaisseaux latéraux [11].

Enfin, les gènes Pax ont été identifiés par homologie avec des gènes capables de définir des limites entre des compartiments tissulaires, chez la drosophile, et sont connus pour recruter des complexes épigénétiques de l'ADN pouvant réguler, négativement ou positivement, l'expression des gènes cibles. Pax2 se lie à une protéine adaptatrice PTIP et entraîne l'expression de marques épigénétiques activatrices, comme H3K4me1. Pax2 définit une limite entre le mésoderme paraxial et intermédiaire et régule des gènes par des mécanismes dépendants mais aussi indépendants de PTIP [12].

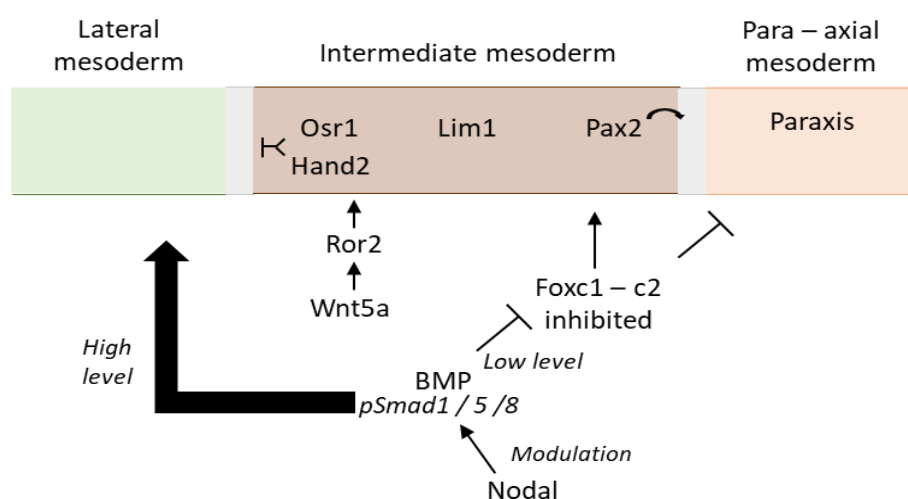


Figure 8 : Formation du mésoderme intermédiaire. Représentation schématique des différents acteurs (voies de signalisation et facteurs de transcription) impliqués dans la formation et la délimitation du mésoderme intermédiaire.

Par la suite, un réseau transcriptionnel central, constitué des facteurs de transcription Pax2/8, Gata3 et Lim1, régule l'expression d'effecteurs nécessaires à la morphogénèse du pronéphros et du mésonéphros (**Figure 9**). Une relation hiérarchique a pu être établie entre ces facteurs, Pax2/8 agissant en amont et induisant l'expression de Gata3 et Lim1 nécessaires fonctionnellement l'un à l'autre [13]. Ces facteurs exercent, tous, différentes fonctions essentielles dans le développement du pronéphros et mésonéphros. Pax2 et Pax8 sont requis pour l'induction de la lignée néphrique. En raison de leurs fonctions biochimiques équivalentes, une redondance de fonctions est observée dans le développement rénal. Des expériences de perte de fonction simultanée des facteurs de transcription ont montré que les doubles mutants ne présentent pas de développement du pro et mésonéphros [14]. Il est intéressant de noter que Pax2 et Osr1 présentent des profils d'expressions complémentaires dans le mésonéphros, Pax2 étant visualisé dans l'épithélium du canal néphrique et les tubules tandis que Osr1 est exprimé dans le mésenchyme adjacent aux tubules.

Gata3 est nécessaire dans la morphogénèse, le guidage et la prolifération des cellules du canal néphrique [15]. Lim1 est essentiel pour l'élongation et l'intégrité du canal néphrique [16]. Ce réseau transcriptionnel régule l'expression d'effecteurs comme Ret, Evi1, Id4 ou Plac8 qui participeront aux événements de morphogénèse et à la différenciation cellulaire [13]. D'autres facteurs ont été reconnus comme nécessaires à la formation du pronéphros comme Iroquois, Kohtalo, Trapzzo, Xtrap [17] et à la formation des tubes mésonéphrotiques [18], les plus proches du pronéphros sont induits par l'expression de Wnt9b et les tubes les plus rostraux par WT1 et Six1.

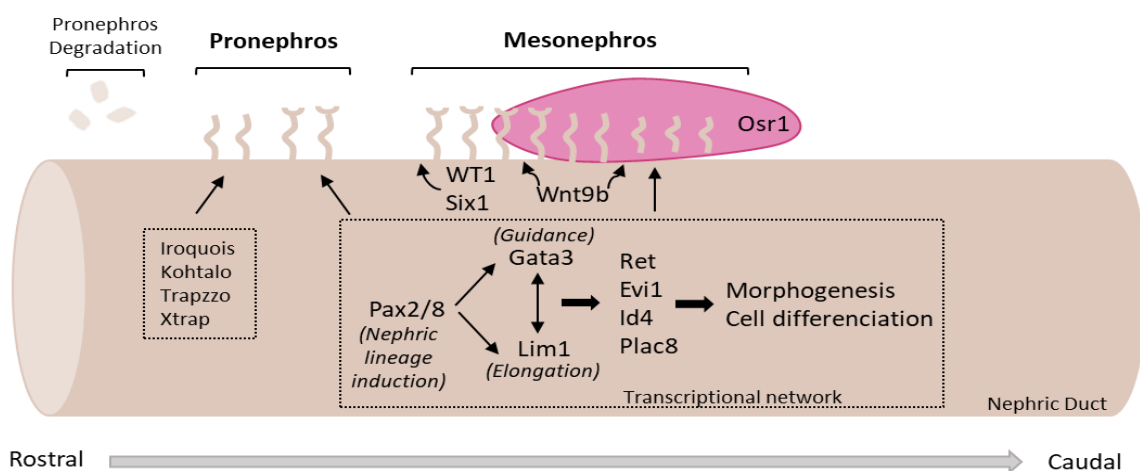


Figure 9 : Formation du pronéphros et du mésonéphros. Représentation schématique de la formation des 2 ébauches rénales marquée plus particulièrement par la mise en place d'un réseau transcriptionnel de gènes.

Dans le métanéphros, le blastème métanéphrique se caractérise par la présence de divers marqueurs, notamment Osr1, Eya1, Nr2f2, Six1, Six2, Pax2, WT1, les paralogues Hox11 (Hoxa11, Hoxc11, Hoxd11), Sall1, Lim1 et GDNF (**Figure 10**). De nombreuses études ont permis de mettre en évidence une hiérarchie et des interactions entre ces différents facteurs. En premier, Osr1 est un des facteurs les plus précoces nécessaire à la formation du blastème métanéphrique et des structures antérieures ainsi que pour l'expression des marqueurs comme Eya1, WT1, Six1, Pax2, Sall1 [19]. En plus d'induire l'expression de certains marqueurs, Osr1 est capable d'interagir avec, afin de réguler certains mécanismes. Ainsi, Osr1 interagit avec WT1 pour réguler la spécification et le développement du blastème métanéphrique [20]. Osr1 est aussi capable d'interagir avec Six2 afin de maintenir le pool de cellules progénitrices du néphron [21].

Un autre marqueur Nr2f2 (COUP-TFII), agissant indépendamment de Osr1, est essentiel à la formation du blastème métanéphrique, mais pas des structures antérieures comme le mésonéphros, et régule l'expression de Eya1 et WT1 en interagissant avec Sp1 et l'expression de Six2 et GDNF [22].

Eya 1, à l'image de Nr2f2 est uniquement nécessaire à la spécification du blastème, et est épistatique à Osr1. De plus, un complexe formé entre Eya1, Six1 et Pax2 régule l'expression de GDNF [23].

Des études ont montré que Six1 était nécessaire pour l'induction du blastème métanéphrique et requis pour l'expression de Six2, Pax2 et Sall1 [24].

Les protéines paralogues Hox11 interagissent et forment un complexe avec Eya1 et Pax2 pour réguler l'activation et l'expression de Six2 et GDNF [25].

Enfin, la voie de signalisation Fibroblast Growth Factor (FGF) a été identifiée comme impliquée dans la formation du blastème métanéphrique et du bourgeon urétéral, plus particulièrement les récepteurs FGFR1-2 dont la délétion induit une mort embryonnaire avant que les reins commencent à se former [26]. FGFR1 est exprimé dans le mésenchyme et l'épithélium métanéphrique alors que FGFR2 est exprimé dans le bourgeon urétéral, dans le blastème métanéphrique adjacent du bourgeon urétéral et l'épithélium du néphron. Afin de pouvoir comprendre le rôle de ces récepteurs dans la formation rénale, des mutations conditionnelles des récepteurs ont été effectuées dans le blastème métanéphrique ou dans le bourgeon urétéral et ont révélé leurs rôles critiques dans la formation de ces structures. Ces 2 récepteurs, coexprimés dans le blastème métanéphrique, sont nécessaires à sa bonne

formation et survie et possèdent une redondance de fonction, la délétion d'un unique récepteur n'entraînant aucune malformation alors que la délétion des 2 provoque une aplasie rénale. Dans ces doubles mutants, le bourgeon urétéral est formé mais n'envahit pas le blastème et ne se ramifie pas. L'impact de la signalisation a pu être décortiqué sur les différents marqueurs du blastème, montrant que les récepteurs fonctionnent en aval des marqueurs *Eya1* et *Six1* et en amont de *Six2*, *Sall1* et *Pax2* [27].

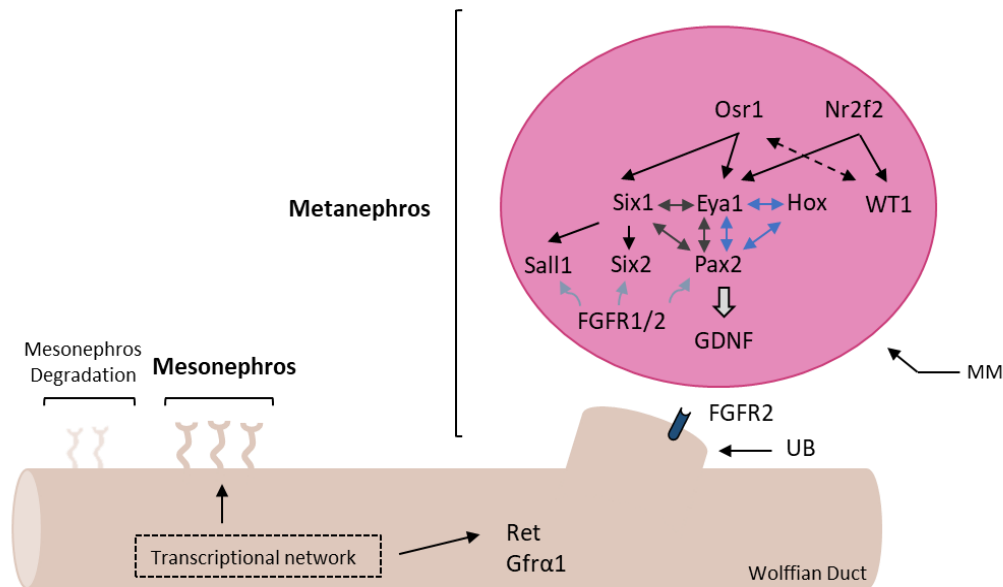


Figure 10 : Formation du métanéphros. Représentation schématique de la formation du métanéphros marquée par une interaction hiérarchique initiée par *Osr1* et *Nr2f2* induisant l'expression de *GDNF*. MM : blastème (mésenchyme) métanéphrique, UB : bourgeon urétéral.

b) Facteurs impliqués dans l'interaction entre le bourgeon urétéral et le mésenchyme métanéphrique

L'organogenèse rénale requiert une balance entre auto-renouvellement et différenciation des cellules progénitrices dans le but de générer un nombre important et suffisant de néphrons. Les différentes cellules progénitrices génèrent plus de 30 types cellulaires dans le rein. Elles consistent en 3 grands types, dérivés de cellules progénitrices multipotentes, pouvant être facilement identifiables par l'expression d'un marqueur spécifique. Ainsi, les cellules progénitrices du bourgeon urétéral (UPC) sont caractérisées par l'expression de *Ret*, les cellules progénitrices du néphron (NPC) par l'expression de *Six2* et les cellules progénitrices stromales (SPC) par l'expression de *Foxd1*. Elles donnent respectivement naissance aux canaux collecteurs et à l'uretère, au néphron et à une grande majorité des cellules dans les compartiments interstitiels. Une analyse récente par cellule unique a permis de décortiquer plus en profondeur les mécanismes et les interactions entre ligands et

récepteurs permettant la maintenance ou la différenciation des différentes lignées progénitrices. En tout 16 différents clusters ont été identifiés, 9 concernant différentes populations du néphron, 4 concernant le stroma et 1 cluster concernant respectivement l'épithélium urétéral, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales. Cette étude a aussi permis d'apporter de nouvelles informations concernant non seulement les interactions mais aussi les marqueurs retrouvés dans chaque population du rein en développement [28]. Après la formation du blastème métanéphrique et du bourgeon urétéral, des interactions réciproques entre ces 2 structures vont aboutir à la formation du rein (**Figure 11 - 12**).

La signalisation GDNF/Ret est un élément clé de l'induction et du branchement du bourgeon urétéral. Avant l'induction du bourgeon, le récepteur Ret et le corécepteur Gfr α 1 sont exprimés le long du canal de Wolff (**Figure 10**) [29] tandis que GDNF est situé dans le blastème métanéphrique. Lorsque le bourgeon urétéral apparaît et envahit le mésenchyme environnant, l'expression de Ret diminue dans le canal de Wolff et est limitée au niveau des extrémités du bourgeon, tandis que l'expression de GDNF est restreinte en périphérie du mésenchyme entourant les extrémités du bourgeon [30]. Le développement normal d'un unique bourgeon, correctement localisé, dépend de la régulation convenable de l'expression de GDNF. Il existe des régulateurs positifs, notamment le réseau de gènes précédemment évoqué, assurant son expression dans le blastème métanéphrique, mais aussi un membre de la famille TGF- β , GDF-11. A contrario, il existe aussi des régulateurs négatifs de l'expression de GDNF. Ainsi Slit2 et son récepteur Robo2 assurent la formation correcte du bourgeon et empêchent l'apparition de bourgeons surnuméraires [31] comme Foxc1 et Foxc2 [32]. De plus, BMP4 exprimé dans le mésenchyme entourant la tige urétérique est crucial dans la détermination du site d'induction en limitant la signalisation GDNF/Ret [33]. Wnt11 exprimé d'abord dans le conduit néphrique, et par la suite aux extrémités du bourgeon urétéral, joue un rôle au niveau de la croissance du bourgeon urétéral en coopérant avec la signalisation GDNF/Ret et en maintenant l'expression de GDNF. Sa délétion entraîne un défaut de branchement du bourgeon et aboutit à la formation d'une hypoplasie rénale c'est-à-dire un arrêt ou un développement insuffisant du rein [34]. Enfin, Sprouty1 n'agit pas directement sur l'expression de GDNF mais module la sensibilité du canal de Wolff aux signaux de la voie GDNF/Ret, limitant la formation de bourgeons supplémentaires [35]. Par ailleurs, l'expression de Ret dans le canal néphrique est régulée et maintenue via la voie de la β -caténine et

l'expression de Gata3, prévenant ainsi la différenciation prématurée des cellules [36] (**Figure 11**).

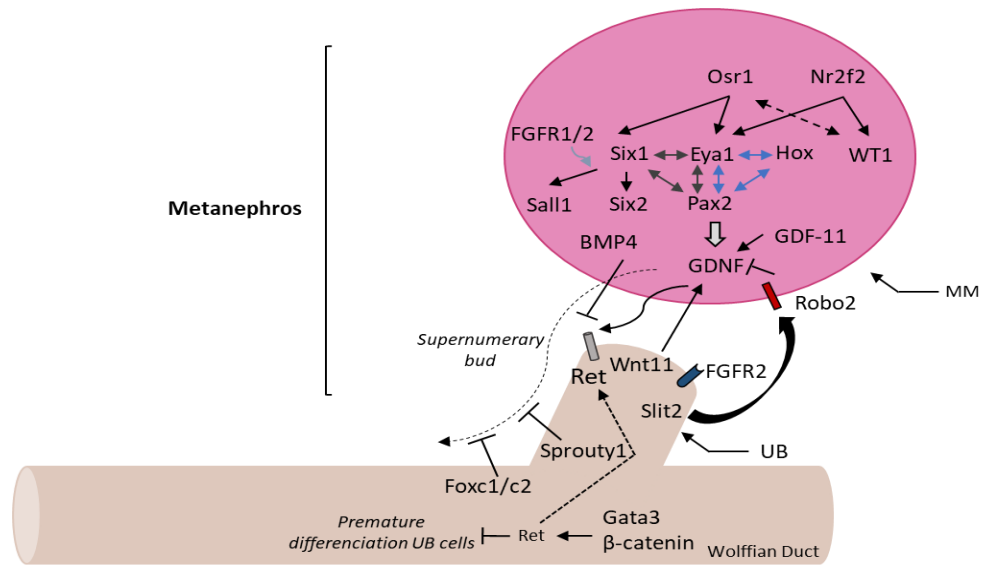


Figure 11 : Formation et induction du bourgeon urétéral. Représentation schématique de la formation du bourgeon contrôlée principalement par la signalisation Ret / GDNF et nécessitant une régulation stricte de ces composants par divers facteurs assurant le déroulement correct du mécanisme d'induction. MM : blastème (mésenchyme) métanéphrique, UB : bourgeon urétéral.

L'interaction entre GDNF et les récepteurs Ret et Gfra1 aboutissent à des phénomènes de prolifération via la voie PI3K/ERK et de migration responsables de l'invasion du bourgeon dans le mésenchyme [17]. La ramification du bourgeon s'effectue grâce à des cycles de division des cellules progénitrices du bourgeon situées aux extrémités qui peuvent donner naissance à d'autres cellules progénitrices ou à des cellules ayant perdu la capacité d'auto-renouvellement et se situant dans le tronc du bourgeon. La localisation des cellules aux extrémités ou dans le tronc pourrait être régulée par l'expression de Ret et du facteur de transcription Etv4. En effet, des cellules conservant des niveaux élevés de Ret migreraient préférentiellement vers la pointe. Ceci serait dû au recrutement et à l'expression par Ret/Etv4, d'effecteurs du mouvement cellulaire comme le récepteur à chimiokines CXCR4 ou de chimio attractant donc GDNF pourrait faire partie [37].

En plus de l'implication de la signalisation GDNF/Ret dans le branchement, d'autres effecteurs de grandes voies de signalisation sont impliqués, entre autres FGF, TGF- β /BMP, Wnt et SHH (**Figure 12**).

Concernant la voie FGF dans le bourgeon urétéral, contrairement au blastème, uniquement FGFR2 est crucial pour la morphogénèse et le branchement des bourgeons urétéraux ainsi que pour la structuration du mésenchyme rénal [38]. Mis à part les récepteurs, les ligands de la

voie FGF, notamment FGF1, 2, 7 et 10, stimulent la croissance du bourgeon urétéral et peuvent être divisés en 2 groupes selon la morphogénèse induite. D'un côté FGF1 et 10 stimulent la croissance et induisent une prolifération plus concentrée au niveau des extrémités, ce qui aboutit à la formation de longues structures tubulaires avec des ampoules claires (correspondant aux extrémités du bourgeon urétéral coiffées par les cellules du mésoderme). De l'autre côté, FGF2 et 7 induisent une prolifération dans l'ensemble du bourgeon conduisant à une ramification moins ordonnée où il est difficile de différencier les tubules des ampoules [39].

En plus de son implication dans la détermination du site d'induction du bourgeon, BMP4 joue un rôle dans le bourgeonnement urétéral avec son antagoniste Gremlin. Un bourgeonnement et une ramification corrects sont observés lorsque les niveaux des Smad1/5/8 phosphorylés sont maintenus bas dans le mésenchyme. Gremlin, lui aussi exprimé dans le mésenchyme est en charge de maintenir des niveaux faibles des Smad, son absence conduisant à une apoptose des types cellulaires et à un échec du bourgeonnement [40]. Plusieurs études ont mis en évidence un rôle des ligands et récepteurs TGF- β dans la régulation de la croissance et le branchement du bourgeon urétéral, mais le mécanisme d'action n'est pas élucidé. L'ajout de TGF- β 1 *in vitro* dans des reins murins aboutit à un retard de ramifications et à un allongement plus rapide du bourgeon, et dans des reins embryonnaires de rats, il entraîne des anomalies au niveau des extrémités du bourgeon et un compactage du réseau de branches [41]. Cependant, la délétion *in vivo* de TGF- β 1 ou β 3 ne montre aucune malformation rénale. En ce qui concerne TGF- β 2, la délétion entraîne la réduction du nombre d'extrémités de branches urétérales *ex vivo* [42].

Mis à part Wnt11, d'autres molécules de la voie Wnt sont impliquées dans le bourgeonnement. C'est le cas notamment de la β -caténine dont la délétion conditionnelle cause un défaut de branchement menant à une aplasie rénale (dysfonctionnement des cellules / tissus provoquant l'arrêt du développement ou une hypoplasie du rein) (**Figure 11**) [43]. Le rôle de la voie canonique Wnt dans le bourgeonnement urétéral a d'autant plus été mis en évidence par l'utilisation de Dickkopf-1, inhibiteur de la voie Wnt et plus spécifiquement des corécepteurs LRP5 et 6, capable par son action de perturber la croissance du bourgeon [44].

Enfin, le contrôle de la formation du répresseur Gli3 (forme raccourcie) est essentiel dans le développement rénal et notamment dans la prolifération et le bourgeonnement urétéral.

Ainsi en l'absence de SHH, une augmentation de la forme répressive Gli3 au détriment de l'expression des formes activatrices Gli1, 2 et 3 (pleine longueur) ainsi que des gènes cibles de la voie (Pax2, Sall1, n-myc, cyclinD1 etc.) est observée. L'expression du répresseur Gli3 induit une dysplasie rénale et une perturbation du branchement urétéral qui est réduit de 40%. L'inactivation du répresseur Gli3 chez des souris déficientes pour l'expression de SHH restaure un phénotype normal avec expression des gènes cibles précédemment cités. Gli3 serait capable de contrôler l'expression de Gli1/2 et des différents gènes cibles en se liant sur leurs régions consensus [45]. De plus, des composants de la matrice extracellulaire (MEC) contrôlent la morphogenèse du branchement rénal mais aussi d'autres organes. En effet, lorsque le bourgeon croît, il est sujet à des remodelages intensifs de la MEC qui l'entoure et qui transmet les signaux aux cellules via des récepteurs dont les intégrines. Dans le rein, les intégrines $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$ ainsi qu'un de leurs ligands, la laminine 5, sont requis dans le branchement normal du bourgeon [46]. La destruction de la matrice aux abords des extrémités du bourgeon est régulée par une balance entre l'expression de métalloprotéinases matricielles (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP) facilitant l'élongation [47] (**Figure 12**).

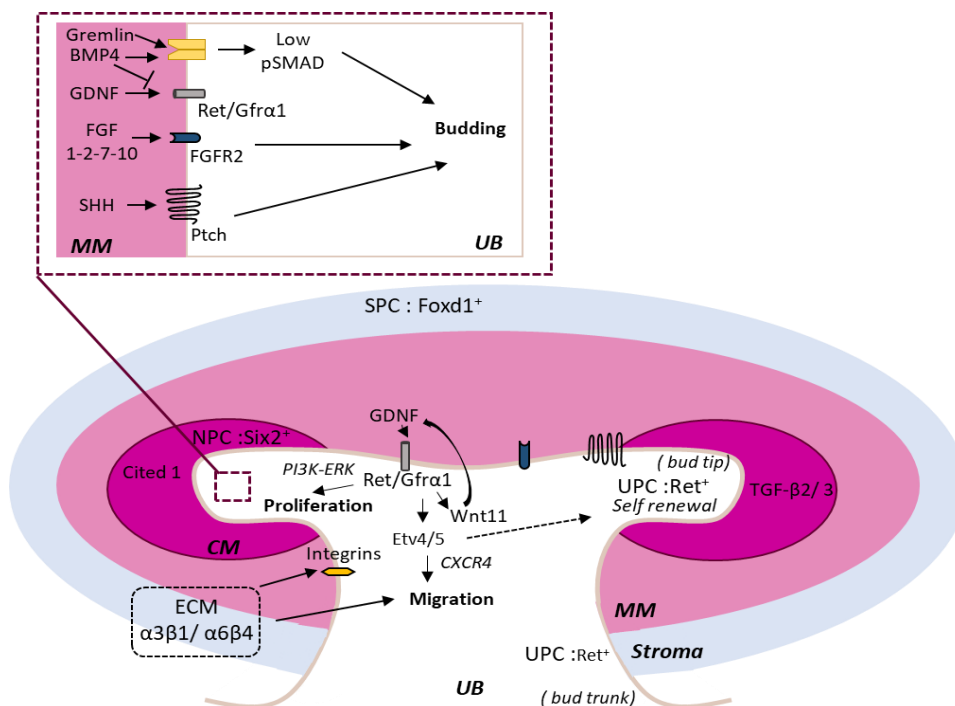


Figure 12 : Représentation schématique des branchements urétéraux. Initiés par la signalisation GDNF/Ret, le bon déroulement de ce mécanisme nécessite la coopération d'autres voies de signalisation comme FGF ou BMP. MM : blastème (mésenchyme) métanéphrique, UB : bourgeon urétéral, CM : coiffe métanéphrogène, ECM : matrice extracellulaire, NPC : cellules progénitrices du néphron, UPC : cellules progénitrices urétérales, SPC : cellules progénitrices stromales.

En parallèle des branchements, le bourgeon urétéral va induire une partie des cellules de la coiffe métanéphrogène à se condenser en agrégats périrénaux puis à subir une

transformation épithéliale sous l'influence de diverses signalisations notamment Wnt, FGF et BMP (**Figure 13**).

La formation d'un nombre suffisant de néphrons nécessite un équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules progénitrices. Tout comme les cellules du bourgeon urétéral, les cellules progénitrices du néphron situées dans la coiffe métanéphrogène, ont pu être séparées globalement en 2 grandes catégories, selon l'expression d'un marqueur Cited1. Ainsi, la première catégorie regroupe les cellules non induites, exprimant Six2 et Cited1, qui s'autorenouvellent, maintenant le pool progéniteur, et la deuxième, les cellules induites par le bourgeon dans le processus de différenciation en néphrons qui perdent l'expression de Cited1 et conservent uniquement l'expression de Six2 [48]. Cited1, membre fondateur d'une famille de cofacteurs transcriptionnels non liés à l'ADN, et incluant aussi entre autres Cited2, sont exprimés dans le rein en développement, notamment au niveau du mésenchyme. Ces 2 cofacteurs ne sont pas requis pour la néphrogénèse, leurs délétions n'entraînant pas de malformations rénales mais s'avèrent utiles dans la délimitation des compartiments rénaux, notamment de la coiffe métanéphrogène [49]. Dans la coiffe, comme dans le bourgeon, des niveaux de prolifération différents ont été observés entre les différentes cellules. Les cellules en périphérie, autoreouvelées, prolifèrent plus doucement que les cellules moins périphériques entrant en différenciation. Au fur et à mesure du développement, une diminution du taux de prolifération est observée dans les populations du bourgeon et de la coiffe entraînant un épuisement progressif des cellules jusqu'à la fin de la néphrogénèse [50]. Certaines études ont mis en évidence des facteurs et des mécanismes capables de maintenir le pool progéniteur mais aussi de prévenir la différenciation prématurée des cellules de la coiffe, en modulant leurs réponses aux signaux inducteurs en provenance du bourgeon. WT1 maintient l'expression d'effecteurs des voies BMP et FGF pour réguler l'équilibre entre renouvellement et différenciation cellulaire du pool progéniteur. De plus, il active la transcription de Gas1 afin de contrôler la prolifération des cellules progénitrices en régulant la signalisation PI3K-AKT de la voie FGF [51]. En effet, les voies FGF et BMP interagissent pour réguler le devenir des cellules progénitrices de la coiffe et du néphron. FGF9 et FGF20 agissent chez la souris de façon redondante et sont nécessaires avec BMP7 à la prolifération et la survie des cellules progénitrices de la coiffe mésenchymateuse afin d'éviter une différenciation prématurée. Un rôle similaire a été mis en évidence pour FGF20 chez l'humain [52]. La régulation du niveau de

signalisation BMP va être déterminante dans le nombre de néphrons formés en fin de néphrogénèse. Ainsi, un inhibiteur des BMP Dullard, appartenant à la famille des phosphatases sérine/thréonine, est exprimé non seulement pendant la formation du rein embryonnaire dans le blastème et le bourgeon mais aussi dans le rein adulte. Cet inhibiteur est capable de moduler le signal en favorisant la dégradation du récepteur de type II par le protéasome. En absence de cet inhibiteur, une suractivation de la voie BMP conduit à une réduction du nombre de néphrons par augmentation de l'apoptose [53].

Récemment, une étude a montré que VHL (avec HIF) régule la différenciation des cellules progénitrices du néphron en induisant un switch métabolique nécessaire à la formation des reins [54].

La capacité des cellules progénitrices du néphron à répondre aux signaux inducteurs dépend des niveaux de Six2. D'une part, Eya1 interagit avec Six2 afin d'inhiber la dégradation de Myc et assure la progression normale du cycle cellulaire pendant l'auto-renouvellement et l'expansion des progéniteurs du néphron [55]. D'autre part, Six2, en se liant au complexe régulateur Lef/Tcf, agit comme un répresseur de la différenciation, favorisant le maintien de l'auto-renouvellement des cellules en assurant qu'à chaque cycle d'induction seulement une partie des cellules entre en différenciation. Au contraire, lorsque la β -caténine se lie sur le complexe régulateur Lef/Tcf elle favorise l'induction de la néphrogénèse [56].

BMP7 exprimé dans le blastème métanéphrique et le bourgeon urétéral joue un rôle clé dans l'induction de la différenciation en préparant les cellules à recevoir les signaux inducteurs en opérant une transition des cellules Six2⁺ Cited1⁺ à des cellules Six2⁺ Cited1⁻. BMP7 induirait la différenciation via la voie canonique Smad, le niveau étant plus élevé dans les cellules différenciées et le maintien du pool progéniteur via la voie non canonique MAPK [48].

Enfin, la voie Notch permet aussi de réguler cette balance en induisant, via la réduction de l'expression de Six2, la différenciation des cellules alors qu'une inactivation de Notch1 ou Notch2 maintient l'état d'auto-renouvellement [57]. Les agrégats périrénaux formés, précurseurs des vésicules rénales, sont caractérisés par l'expression de divers marqueurs comme FGF8, Wnt4, Pax8 et Lim1 [58]. Puis, la transition mésenchymateuse épithéliale est induite par l'expression de Wnt9b (nécessaire à la formation des agrégats périrénaux) à l'extrémité du bourgeon [59] et de Wnt4 dans le mésenchyme aboutissant à l'apparition des vésicules rénales [60] (**Figure 13**).

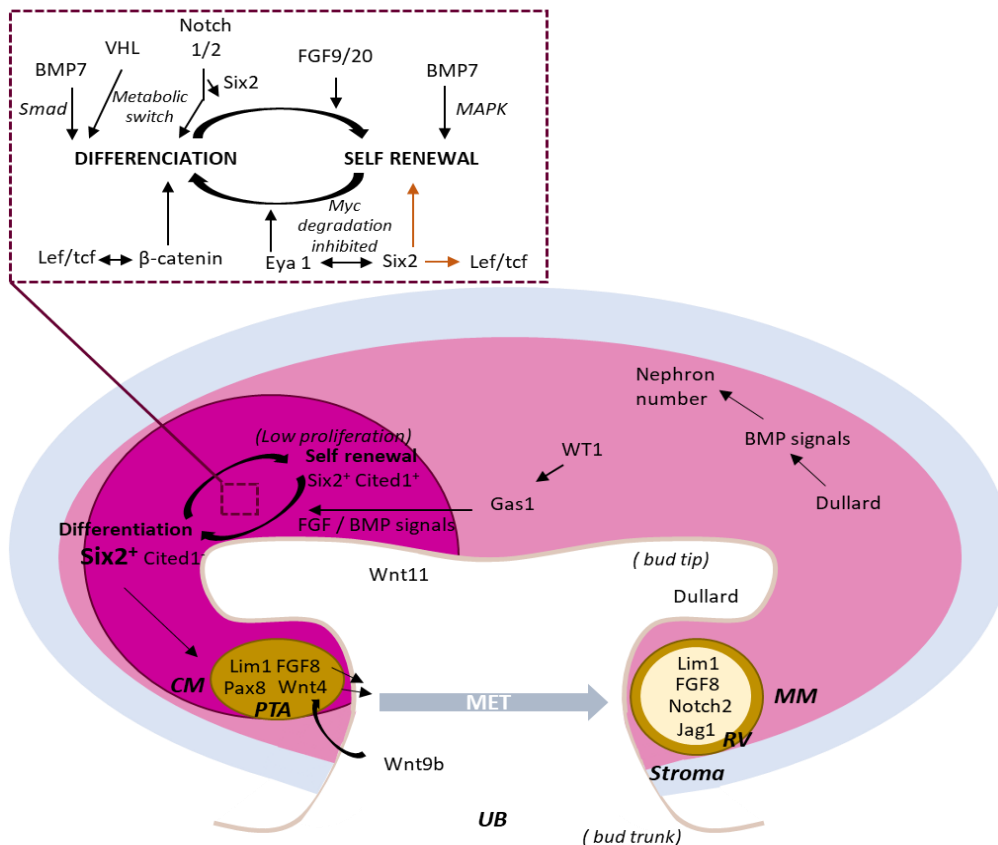


Figure 13 : Représentation schématique du processus MET lors du développement rénal. Initié par l'expression de Wnt9b et Wnt4 principalement, ce mécanisme transforme les agrégats péritubulaires (PTA) mésenchymateux formés par la condensation des cellules du blastème en vésicules rénales (RV) épithéliales. MM : blastème (mésenchyme) métanéphrique, UB : bourgeon urétéral, CM : coiffe métanéphrogène, MET : transition mésenchymateuse épithéliale.

Au cours de la formation de la vésicule, on observe une diminution d'expression de Six2 et Cited2 et une augmentation entre autres de l'expression de Lim1 et FGF8 [61] mais aussi des molécules de la voie Notch comme Notch2 ou Jag1 (**Figure 13**) [62].

La signalisation Notch est cruciale pour la néphrogénèse (**Figure 14**). Afin d'étudier l'influence de cette voie dans le développement rénal, des manipulations génétiques ont dû être effectuées notamment sur les récepteurs, les mutations homozygotes des gènes *Jagged1*, *Dll1*, *Notch1* et *Notch2* chez des souris aboutissant à des anomalies létales avant le développement du rein métanéphrique [63]. Ainsi, une mutation sur un allèle hypomorphe du récepteur Notch2, *Notch2^{del1}* a eu pour conséquence un décès rapide des souris après la naissance, mettant en lumière un défaut de fonctionnement du néphron, notamment de la différenciation du glomérule et de la conversion des vésicules rénales en corps en forme de S, les autres processus du développement (croissance et branchement du bourgeon, formation des vésicules rénales) s'étant déroulés normalement [64].

Le développement et la maturation du néphron peuvent être divisés en 4 grands stades, le premier étant la formation et la polarisation de la vésicule rénale [65]. Cette vésicule peut être séparée en une région proximale, caractérisée par l'expression de 2 marqueurs principalement, WT1 et Tmem100, et une région distale caractérisée par l'expression d'un plus grand nombre de facteurs, notamment Brn1 (Pou3f3), Dll1, Lim1, BMP2, Jag1, DKK1 et Wnt4. Une différence de prolifération a été aussi observée entre les régions proximales et distales, cette dernière proliférant plus vite. Cette différence de prolifération est certainement due à un mécanisme crucial dans le développement et le fonctionnement du rein, à savoir la fusion de cette région distale avec le tube collecteur adjacent du bourgeon urétéral. Lors de cette fusion, les cellules distales de la vésicule, entraînées par une augmentation de prolifération, empiètent sur la pointe de l'uretère du bourgeon urétéral, et les marqueurs BMP2 et Lim1 seraient impliqués et exprimés dans la région où la fusion a lieu. Ceci résulte en un changement de morphologie de la vésicule rénale qui s'élargit à sa partie proximale et donne naissance au corps en forme de virgule [66]. Par la suite, la différenciation des cellules du corps en forme de virgule aboutit à la formation de la structure appelée corps en forme de S, composée de 3 segments (distal, médial et proximal), exprimant différents marqueurs moléculaires nécessaires à la formation de tous les composants du néphron et qui constitue le stade II de formation du néphron. Dans ces corps, les marqueurs proximaux de la vésicule rénale continuent d'être restreints au segment proximal alors que les marqueurs distaux sont répartis entre les segments médians et distaux. Enfin, la prolifération et migration des cellules des segments médians et distaux formeront les tubules rénaux connectés au bourgeon urétéral et au canal collecteur (stade III) et la partie proximale donnera naissance au glomérule visible dans des néphrons en cours et fin de maturation (stade IV) [65].

Certains marqueurs et mécanismes commencent à être mis en évidence dans la formation des différentes régions tubulaires et du glomérule. Une interaction entre les voies Wnt, BMP et Notch est nécessaire pour la bonne structuration de l'axe distal-proximal des néphrons. Ainsi, un gradient d'activité de la β -caténine est observé le long de l'axe distal-proximal du néphron et est modulé par les signalisations PTEN/PI3K/AKT et Notch. Des niveaux élevés de β -caténine sont retrouvés et caractéristiques des parties distales du néphron. Cependant, le développement des parties proximales n'est rendu possible que par l'inhibition de la β -caténine par la signalisation BMP permettant l'expression de Notch, caractéristique des parties médiales et proximales du néphron, et qui, à son tour y inhibe

l'expression de la β -caténine [67]. Cependant, une étude plus récente suggère que Notch serait nécessaire à la formation de l'ensemble des segments du néphron et ne serait pas restreint et plus impliqué dans les parties médiales et proximales du néphron [68].

D'autres facteurs sont impliqués dans la segmentation du néphron, c'est le cas du facteur de transcription Bnr1 qui est essentiel à la formation du tube contourné distal (DT), de l'anse de Henlé (LH) et de la macula densa [69]. Lgr5 marque une population de cellules souches consacrées notamment à la formation du tube contourné distal et de la branche ascendante de l'anse de Henlé [70]. Des analyses d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence entre autres la présence du marqueur Aqp1 dans le tubule proximal (PT) et l'anse de Henlé, et du marqueur Umod dans le tubule distal et l'anse de Henlé [65].

HNF1 β est aussi un régulateur clé de la segmentation tubulaire du néphron. L'interaction entre HNF1 β et Pax2/8 permet l'expression de composants de la voie Notch ainsi que des facteurs de transcription Iroquois Irx1, 2 et 3 présents dans la partie médiane des corps en S, nécessaires à l'élaboration de diverses parties du néphron, notamment des segments tubulaires [71]. La régulation temporelle des effecteurs de la voie Notch, Hes1 et 5 exprimés strictement dans la partie médiane des corps en S pour Hes5 et dans la partie médiane avec un élargissement de l'expression vers les segments distaux et proximaux pour Hes1, est importante lors de la structuration du néphron [72].

Enfin la formation du glomérule passe par la différenciation d'un type cellulaire spécialisé, les podocytes. La formation de ce type cellulaire met en jeu un certain nombre de facteurs de transcription (WT1, Foxc2, Hey1, tcf21, Lmx1b et Mafb) constituant un réseau qui régule, de manière spatio-temporelle, l'expression des divers composants pour que les podocytes se développent dans le glomérule. Parmi ces facteurs, WT1 est considéré comme le régulateur clé du développement des podocytes et dont la délétion donne les effets les plus sévères. Une certaine hiérarchie a pu être mise en évidence dans ce réseau qui présente un niveau élevé de redondance. Ainsi l'expression de WT1, Hey1 activé par la voie Notch et Foxc2 entraînent l'activation de Tcf21, Lmx1b et Mafb. Ce dernier est capable de réguler négativement ses activateurs WT1 et foxc2. L'ensemble de ces facteurs mène à l'expression des marqueurs de différenciation proximal des podocytes, entre autres Nphs1 (nephrin), Nphs2 (podocin), Kirrel (nephrin) et Ptpu [73]. Par la suite, la formation du glomérule se poursuit avec le recrutement des cellules endothéliales par les podocytes qui sécrètent du VEGF [74]. A leur tour, les cellules endothéliales vont sécréter du PDGF pour recruter les

cellules mésangiales dans le glomérule [75]. Enfin, la membrane basale glomérulaire (GBM), qui sépare les podocytes des cellules endothéliales, joue un rôle crucial dans la sélectivité des molécules qui traversent la barrière de filtration glomérulaire. Durant le développement elle subit des modifications et est composée notamment de collagène IV A3, A4, A5, de laminine et de nidogène (**Figure 14**) [76].

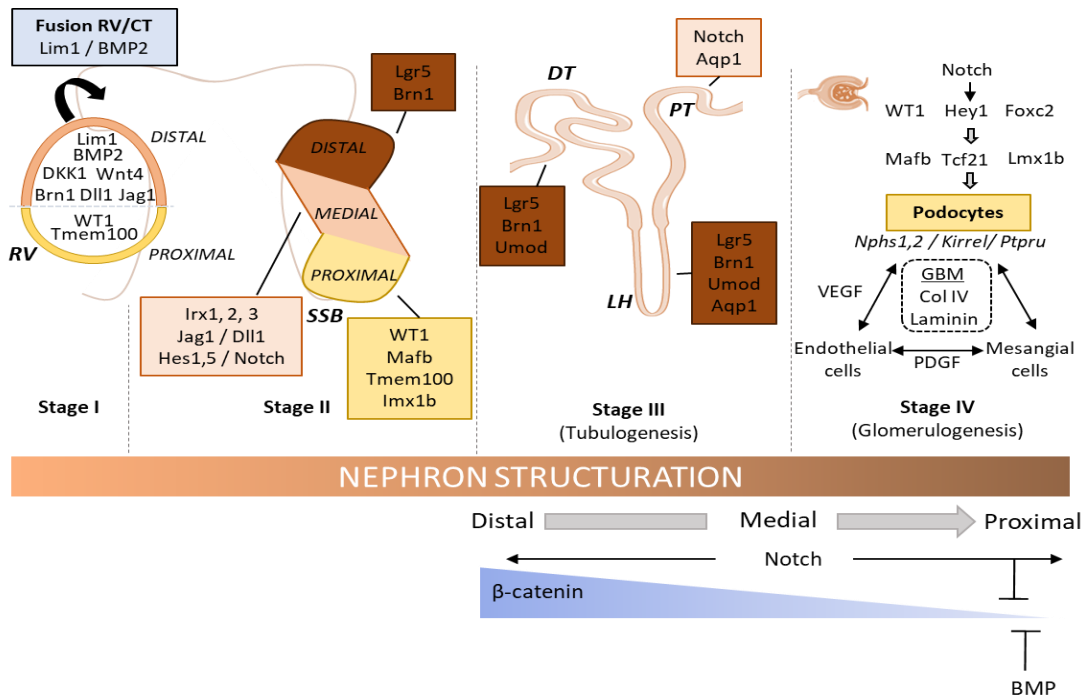


Figure 14 : Structuration du néphron. Représentation schématique des différents stades de la néphrogénèse ainsi que des facteurs et voies de signalisation impliqués dans chacun d'entre eux. RV : vésicule rénale, SSB : corps en forme de S, DT : tubule distal, LH : anse de Henlé, PT : tubule proximal, GBM : membrane basale glomérulaire.

En conclusion, la néphrogénèse est un processus complexe qui s'achève à la 36^{ème} semaine chez l'humain et durant lequel se déroule divers mécanismes clés faisant intervenir et interagir un grand nombre de facteurs.

Tous ces marqueurs, essentiels à de multiples étapes du développement, sont exprimés dans plusieurs localisations et peuvent jouer différents rôles. L'étude de leurs délétions a révélé de nombreux phénotypes. Les localisations, fonctions et phénotypes sont compilés dans le **tableau 1**.

Gènes	Localisations	Rôles	Phénotypes après délétions
Osr1	MI, MM	Formation MM	Agénésie
Foxc1 /c2	MI, CSB	Délimitation mésoderme Formation des podocytes	Développement incorrect du MI Pas de podocytes
Pax2	MI, MM	Morphogenèse pronéphros/mésonephros	Dégénération MM
Pax8	MI	Morphogenèse pronéphros/mésonephros	Pas de défaut rénal
Lim1	MI, PTA, RV, CSB	Formation canal néphrique	Hypoplasie / hydronéphrose
Gata3	MI	Formation canal néphrique	Plusieurs canaux néphriques
Eya1	MM	Formation MM, expression de GDNF	Agénésie
Six1	MM non induit	Expression de GDNF Développement rénal précoce	Pas d'invasion UB = Agénésie
Six2	MM, CM	Maintien des progéniteurs du néphron, expression de GDNF	Différenciation prématurée
Sall1	MM	Expression de GDNF	Pas de croissance UB = Agénésie
Nr2f2	IM, MM non induit	Expression de GDNF	Pas de formation MM
Hox paralog	MM non induit	Expression de GDNF Développement rénal précoce	Pas de différenciation du MM
GDNF	MM	Bourgeoisement urétéral	Pas de branchement
Ret	UB	Bourgeoisement urétéral	Pas de branchement
WT1	MM, podocytes	Expression de GDNF, Formation des podocytes	Pas de podocytes
Brn1	RV, CSB	Tubulogenèse	Insuffisance rénale
Lgr5	RV, CSB	Tubulogenèse	?

Tableau 1 : Facteurs importants lors de la néphrogénèse. Tableau récapitulatif de la localisation, fonction et phénotype après délétion des facteurs importants dans le développement rénal. MI : mésoderme intermédiaire, MM : blastème (mésenchyme) métanéphrique, CSB, SSB : corps en forme de virgule et de S, UB : bourgeon urétéral, RV : vésicule rénale, PTA : agrégats cellulaires périrubulaires.

Par ailleurs, 5 voies de signalisation jouent un rôle clé dans divers processus du développement rénal. Le rôle et les phénotypes entraînés par la délétion de ces effecteurs clés sont compilés dans le **tableau 2**.

Effecteurs	Rôles	Phénotypes après délétions
Voie de signalisation TGF-β / BMP		
TGFβ 1-2-3	Bourgeonnement et ramification urétéraux Néphrogénèse (TGF β 2)	TGF β 2 ^{-/-} : réduction du nombre de néphrons
TGFβR3	Stimulation néphrogénèse	Réduction du nombre de néphrons
BMP4	Bourgeonnement et ramification urétéraux	CAKUT (hypoplasie)
BMP7	Auto-renouvellement / différenciation cellules progénitrices du néphron	Agénésie
Voie de signalisation Wnt		
Wnt4	MET	Pas de RV et de néphrons
Wnt5a	Morphogenèse tissulaire	CAKUT, rein duplex
Wnt9b	MET	Pas de RV et de néphrons
Wnt11	Bourgeonnement urétéral	Pas de branchements, hypoplasie
Voie de signalisation Notch		
Notch1	Structuration du néphron	Défaut de fonctionnement du néphron
Notch2		
JAG1		Syndrome d'Alagille
Dll1		Anomalie létale avant formation du rein
Voie de signalisation FGF		
FGFR1/2	Formation du blastème métanéphrique Formation bourgeon urétéral (Fgfr2)	Fgfr1/2 ^{-/-} : aplasie rénale
FGF8/FGFRL1	Gastrulation (FGF8), MET	Dysgénésie bilatérale
FGF 1,2,7,10	Bourgeonnement et ramification urétéraux	FGF7 ^{-/-} : diminution des branchements
FGF 9, 20	Prolifération / survie des cellules progénitrices	Différenciation prématurée
Voie de signalisation SHH		
SHH	Expression des gènes de structuration, régulateur du cycle cellulaire	Dysplasie rénale, perturbation branchement
Gli3 (court)		Phénotype normal

Tableau 2 : Rôles des principaux effecteurs des voies de signalisation lors du développement rénal.

Le rein est un organe vital et son dysfonctionnement, autant dans les mécanismes de développement que dans ses fonctions, conduit à l'apparition de diverses maladies comme l'insuffisance rénale ou les cancers du rein.

II. LES CANCERS DU REIN

La 4^{ème} édition de la classification OMS, parue en 2016, catalogue les tumeurs rénales en plusieurs sous-types, en fonction des caractéristiques cytoplasmiques et architecturales, de la localisation anatomique et de la corrélation avec des altérations moléculaires, des syndromes de prédisposition ou des antécédents d'insuffisance rénale (**Figure 15**). Ces dernières années, l'amélioration des connaissances et des données cliniques et pathologiques sur ces tumeurs a permis l'émergence et la classification de nouvelles entités comme le carcinome papillaire à cellules claires ou le carcinome tubulocystique [77].

Renal cell tumours		Mesenchymal tumours occurring mainly in adults	
Clear cell renal cell carcinoma	8310/3	Leiomyosarcoma	8890/3
Multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential	8316/1*	Angiosarcoma	9120/3
Papillary renal cell carcinoma	8260/3	Rhabdomyosarcoma	8900/3
Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma-associated renal cell carcinoma	8311/3*	Osteosarcoma	9180/3
Chromophobe renal cell carcinoma	8317/3	Synovial sarcoma	9040/3
Collecting duct carcinoma	8319/3	Ewing sarcoma	9364/3
Renal medullary carcinoma	8510/3*	Angiomyolipoma	8860/0
MiT family translocation renal cell carcinomas	8311/3*	Epithelioid angiomyolipoma	8860/1*
Succinate dehydrogenase-deficient renal carcinoma	8311/3	Leiomyoma	8890/0
Mucinous tubular and spindle cell carcinoma	8480/3*	Haemangioma	9120/0
Tubulocystic renal cell carcinoma	8316/3*	Lymphangioma	9170/0
Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma	8316/3	Haemangioblastoma	9161/1
Clear cell papillary renal cell carcinoma	8323/1	Juxtaglomerular cell tumour	8361/0
Renal cell carcinoma, unclassified	8312/3	Renomedullary interstitial cell tumour	8966/0
Papillary adenoma	8260/0	Schwannoma	9560/0
Oncocytoma	8290/0	Solitary fibrous tumour	8815/1
Metanephric tumours		Mixed epithelial and stromal tumour family	
Metanephric adenoma	8325/0	Cystic nephroma	8959/0
Metanephric adenofibroma	9013/0	Mixed epithelial and stromal tumour	8959/0
Metanephric stromal tumour	8935/1	Neuroendocrine tumours	
Nephroblastic and cystic tumours occurring mainly in children		Well-differentiated neuroendocrine tumour	8240/3
Nephrogenic rests		Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Nephroblastoma	8960/3	Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3
Cystic partially differentiated nephroblastoma	8959/1	Phaeochromocytoma	8700/0
Paediatric cystic nephroma	8959/0	Miscellaneous tumours	
Mesenchymal tumours		Renal haematopoietic neoplasms	
Mesenchymal tumours occurring mainly in children		Germ cell tumours	
Clear cell sarcoma	8964/3	Metastatic tumours	
Rhabdoid tumour	8963/3	The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions.	
Congenital mesoblastic nephroma	8960/1	*New code approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O.	
Ossifying renal tumour of infancy	8967/0		

Figure 15 : Classification OMS 2016 des tumeurs rénales. Les indications /0 caractérisent les tumeurs bénignes, /1 non spécifiées, /2 carcinomes in situ et néoplasme intraépithélial de grade III et /3 tumeurs malignes.

Comme mentionné dans la classification, il existe un grand nombre de tumeurs pouvant être bénignes ou malignes, chez les adultes et les enfants. Les principales vont être décrites en suivant.

A) Chez l'enfant

1. Epidémiologie

Les cancers pédiatriques sont des pathologies rares qui représentent 1% de l'ensemble des cancers et touchent les enfants et les adolescents de moins de 18 ans. Les tumeurs rénales pédiatriques représentent environ 6% des cas de cancers de l'enfant, tous sexes confondus. Le néphroblastome ou tumeur de Wilms (WT) constitue la tumeur urogénitale la plus fréquente de l'enfant de moins de 15 ans et la 3^{ème} tumeur solide (après le neuroblastome et les tumeurs du tissu mou).

Chaque année, en France, environ une centaine de cas sont diagnostiqués, représentant 1 cas toutes les 10 000 naissances. Cette tumeur touche principalement les enfants, entre 1 et 5 ans, avec un pic de fréquence aux alentours des 3 ans.

2. Classification anatomopathologique

a) Tumeurs bénignes

Chez l'enfant, les tumeurs bénignes sont très rares. Cependant, avant l'âge de 3 mois, le néphrome mésoblastique congénital ou tumeur de Bolande est la tumeur rénale solide la plus fréquente (**Figure 16**).

Cette tumeur est circonscrite, ferme et de couleur jaune-ocre (**Figure 16A**). En microscopie, elle est représentée dans sa forme classique par la présence de faisceaux croisés de cellules fusiformes possédant des caractéristiques de myofibroblastes, fibroblastes ou cellules musculaires lisses. On peut visualiser, dans certains cas, des tubules et glomérules piégés entre les faisceaux (**Figure 16B**) [78].

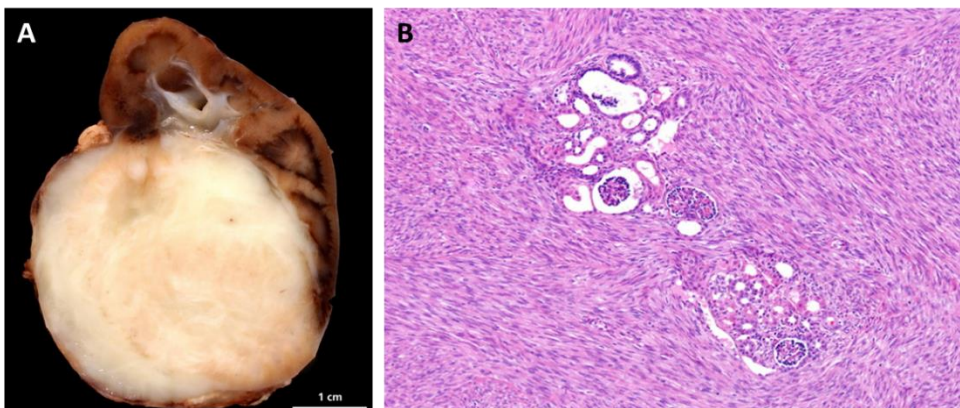


Figure 16 : Néphrome mésoblastique congénital. A/ Aspect macroscopique d'un néphrome mésoblastique congénital. B/ Coupe histologique de la même tumeur. Illustration de Webpathology.com.

Il existe d'autres tumeurs bénignes comme des néphromes cystiques ou des angiomyolipomes qui sont rares et qui ne seront pas détaillées ici.

b) Tumeurs malignes

La majorité des tumeurs chez l'enfant sont malignes. Les tumeurs les plus fréquentes sont les WT qui représentent 90% de l'ensemble des tumeurs rénales pédiatriques. Parmi les autres pathologies malignes, on retrouve, entre autres, dans de rares cas, des tumeurs rhabdoïdes (3%), des sarcomes à cellules claires (3%) ou des carcinomes rénaux.

➤ Tumeur de Wilms (WT)

La tumeur de Wilms est une tumeur embryonnaire qui se développe à partir d'un petit pool de cellules du métanéphros qui ne se différencient pas lors de la néphrogénèse. Ces cellules vont alors subsister dans le rein et donner naissance à des restes néphrogéniques, considérés comme des lésions pré-cancéreuses qui peuvent spontanément disparaître, rester quiescentes ou se transformer en WT. Il existe 2 types de restes néphrogéniques : ceux dits quiescents possédant un aspect de petits tubes immatures et basophiles et ceux dits hyperplasiques lorsqu'ils prolifèrent et constituent une masse visible.

Macroscopiquement, la tumeur de Wilms est volumineuse (8 à 10 cm, due à un développement rapide), de couleur gris pâle ou ocre, solide, ferme et bien délimitée. Des zones de nécroses et d'hémorragies peuvent être visibles dans certains cas, surtout après la chimiothérapie et la radiothérapie. Il arrive que ces tumeurs soient plus fragiles et puissent se rompre dans le rétropéritoine ou la cavité péritonéale (**Figure 17A**) [79].

D'un point de vue microscopique, ces tumeurs sont très polymorphes et présentent 3 composants : épithélial, stromal et blastémateux, faisant référence aux différents constituants présents lors du métanéphros en développement. La forme histologique classique de ces tumeurs dites mixtes est triphasique et associe les 3 composants précédemment cités, dans des proportions variables (**Figure 17B**). Cependant, il est possible d'observer, dans certains cas, une prédominance d'un ou deux composants entraînant des formes monophasiques ou biphasiques (**Figure 17C-E**). Ainsi, la composante épithéliale des WT est constituée de tubules modérément différenciés ou plus matures ainsi que de structures glomérulaires. Les cellules sont cylindriques et possèdent des noyaux allongés et hyperchromatiques, un cytoplasme peu abondant et des nucléoles peu visibles (**Figure 17C**). La composante stromale est constituée habituellement de cellules fusiformes de type fibroblastique pouvant être agencées en

faisceaux, courts ou longs, ou possédant une architecture storiforme. Elle peut contenir dans certains cas des éléments hétérologues comme du cartilage, du tissu adipeux ou du muscle lisse ou squelettique. Il est possible de retrouver du stroma entre les composants épithéliaux ou blastémateux (**Figure 17D**). La composante blastémateuse possède une cellularité élevée avec des petites cellules rondes ou ovales indifférenciées. Ces cellules possèdent des noyaux hyperchromatiques, un cytoplasme rare et une activité mitotique rapide. Les cellules peuvent être agencées selon différents motifs : nodulaire, diffus, en serpentins ou trabéculaires (**Figure 17E**) [80]. Il est possible de retrouver dans chaque composant des WT une caractéristique particulière nommée anaplasie pouvant être locale ou diffuse. L'anaplasie est diagnostiquée lorsque les 3 critères suivants sont réunis : présence de figures mitotiques atypiques tripolaires et/ou multipolaires, augmentation de la taille nucléaire à plus de 3 fois la normale et un hyperchromatisme nucléaire (**Figure 17F**) [81]. La composante blastémateuse est celle qui possède le moins bon pronostic.

D'un point de vue immunohistochimique, il est actuellement très difficile de différencier, de manière fiable, les restes néphrogéniques des WT. Les WT strictement épithéliaux sont marqués positivement dans 80 à 90% des cas par WT1 et négativement pour CK7. Les WT blastémateux sont marqués positivement par CD56 et WT1. Enfin, les WT stromales ont un signal plus inégal pour WT1 et une coloration faible pour le répresseur BCL6 [80]. La génétique des WT est moins utilisée pour le diagnostic mais peut être utile pour discriminer d'autres pathologies et sera développée ultérieurement.

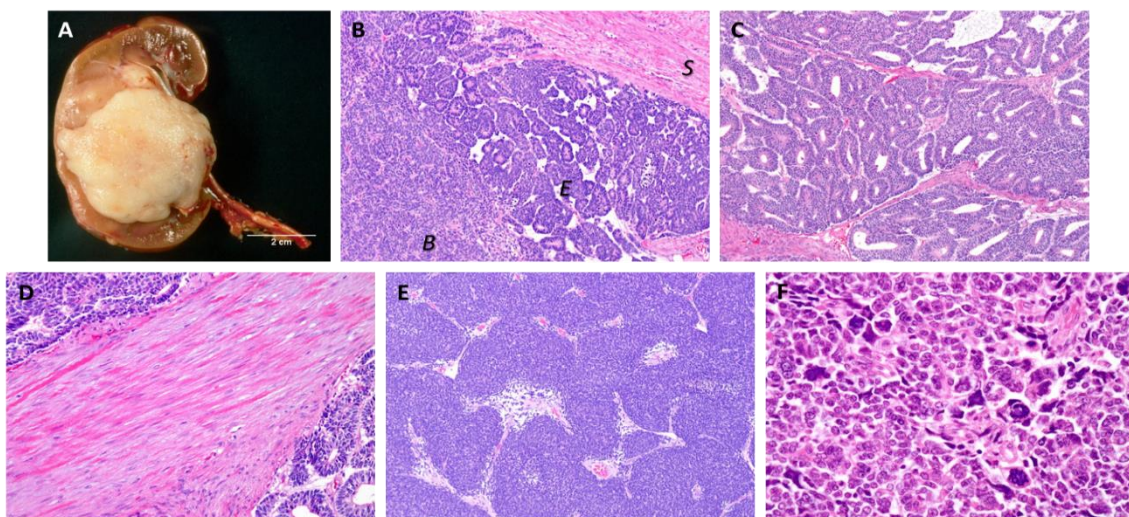


Figure 17 : Tumeur de Wilms. *A/ Aspect macroscopique d'une WT. B/ Coupe histologique d'une WT de type mixte : les 3 composants sont présents dans des proportions similaires. C/ Coupe histologique d'une WT de type épithélial : prédominance du composant épithélial. D/ Coupe histologique d'une WT de type stromal : prédominance du composant stromal. E/ Coupe histologique d'une WT de type blastémateux : prédominance du composant blastémateux. F/ Coupe histologique d'une WT anaplasique. Illustration de Webpathology.com.*

➤ Tumeur rhabdoïde

La tumeur rhabdoïde fait partie des tumeurs extrêmement agressives et est, d'un point de vue macroscopique, bien délimitée et souvent non encapsulée, molle et de couleur pâle (**Figure 18A**). Brièvement, sur le plan histologique elle se compose de cellules malignes de haut grade non jointives, de forme ronde à ovale et agencées en feuillets diffus. Elles possèdent de gros noyaux vésiculeux et des nucléoles proéminents (**Figure 18B**). Ces tumeurs possèdent un pronostic extrêmement défavorable [79].

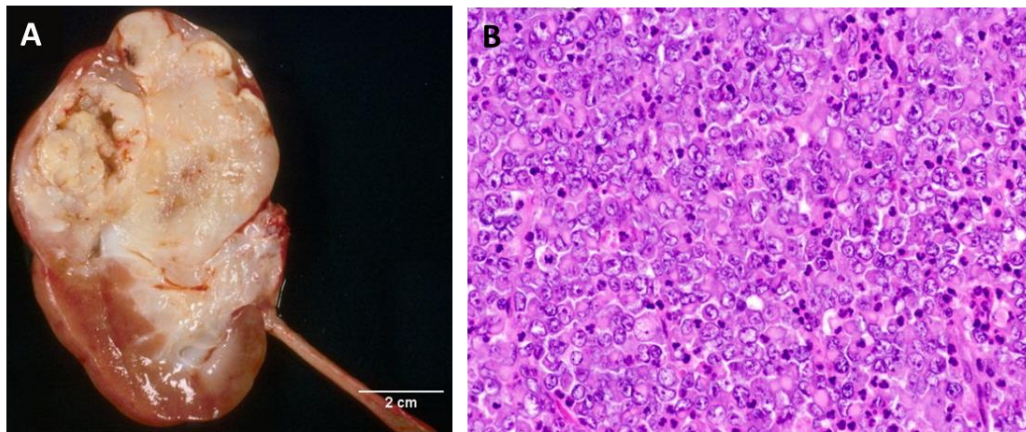


Figure 18 : Tumeur rhabdoïde. A/ Aspect macroscopique d'une tumeur rhabdoïde B/ Coupe histologique d'une tumeur rhabdoïde. Illustration de Webpathology.com.

➤ Cas de carcinomes rénaux (RCC) chez les enfants / Cas de WT chez les adultes

Bien que les WT soient rencontrées très majoritairement chez les enfants et les RCC chez les adultes, de rares cas ont été recensés impliquant des WT chez les adultes et des RCC chez les enfants. La maladie est habituellement à un stade plus avancé dû au diagnostic un peu plus tardif.

Chez les enfants, les RCC peuvent être divisés en différentes histologies comprenant, entre autres, le RCC de type papillaire, de type chromophile ou à cellules claires, le carcinome médullaire rénal et le RCC avec translocation du gène TFE-3. Le traitement de choix chez ces carcinomes reste la chirurgie [82].

Chez les adultes, les WT sont à un stade plus localisé et possèdent un pronostic plus mauvais. Dans ces cas-là, il a été démontré que les traitements pédiatriques des WT pouvaient être ajustés et administrés aux adultes afin d'améliorer la survie [83].

3. Stade tumoral

Durant ces dernières années, la compréhension et l'amélioration des traitements sur les tumeurs pédiatriques ont été rendues possibles par les recherches et études cliniques menées par la Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP) et le Children's Oncology Group (COG). L'analyse des résultats des études menées par la SIOP et le COG ainsi que diverses discussions ont mené à l'élaboration en 2016 du protocole SIOP UMBRELLA. Ce projet a pour but de collecter un maximum d'informations multidimensionnelles sur les tumeurs rénales pédiatriques concernant le diagnostic, les biobanques et les recommandations thérapeutiques [84]. La SIOP et le COG ont tous deux établi des protocoles regroupant les classifications des sous-types histologiques et les recommandations de traitements appliqués en Europe pour la première et aux Etats-Unis pour le deuxième. Dans cette partie, le protocole SIOP sera développé plus en détail.

a) Classification SIOP

Dans le protocole de la SIOP, avant la néphrectomie et la classification des différentes tumeurs, une chimiothérapie standard néoadjuvante (cf plus bas) est administrée au patient même en l'absence de métastases. Les différents stades de la classification sont décrits dans le **tableau 3** et sont pris en compte dans l'élaboration de la stratégie thérapeutique post-opératoire [81]. Cette classification est basée sur la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie (et sa résection chirurgicale) ainsi que la présence d'invasions ganglionnaires et métastatiques.

Stades	Descriptions
Stade I	Tumeur limitée au rein, ou entourée d'une pseudo capsule fibreuse si les contours normaux du rein sont dépassés, et est complètement réséquée. Possibilité de gonflement dans le système pelvien et de plonger dans l'urètre sans infiltrer leur paroi. Implication possible des vaisseaux intrarénaux et non implication des vaisseaux et des tissus mous du sinus rénal. La présence d'une tumeur nécrotique dans la graisse périrénale ou le sinus rénal ne dépasse pas le stade II.
Stade II	Tumeur étendue au-delà du rein, ou pénétrant la graisse périrénale à travers la capsule ou la pseudo capsule, mais est complètement réséquée. Invasion tumorale dans les tissus mous, les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques du sinus rénal ou du tissu périrénal mais résection complète. Invasion tumorale dans la veine cave et les organes adjacents (à part la glande surrénale) mais résection complète.
Stade III	Excision incomplète de la tumeur qui persiste macroscopiquement ou microscopiquement en post-opératoire. Atteinte des ganglions lymphatiques abdominaux par une tumeur viable ou non. Rupture tumorale préopératoire ou intraopératoire si confirmée par l'examen macroscopique. Présence de thrombus tumoraux (viables ou non) au niveau des marges de résection du rein, de l'urètre et de la veine cave. Présence d'implants tumoraux (viables ou non) dans l'abdomen. Pénétration de la tumeur (viable ou non) à travers la surface péritonéale.
Stade IV	Métastases hémato-gènes (poumons, foie, cerveau, os) ou ganglionnaires en dehors de la région abdomino-pelvienne.
Stade V	Tumeurs bilatérales au diagnostic. Les 2 tumeurs seront classifiées séparément selon les précédents stades (I, II, III).

Tableau 3 : Classification SIOP des tumeurs rénales pédiatriques SIOP UMBRELLA 2016. Adapté de [81].

La distribution des cas est variable en fonction des études, la plus grande majorité des patients se situant dans les stades localisés I à III. Le stade IV concerne 17% des patients et 5 à 8% des patients présentent une tumeur bilatérale au diagnostic [84].

Sur la base de l'effet de la chimiothérapie pré-opératoire sur les tumeurs, ces dernières sont classées en différentes catégories de risques (bas, intermédiaire et élevé) en fonction du degré de nécrose et de la proportion des différents composants tumoraux. Cette classification sera prise en compte dans les traitements post-opératoire attribués aux patients. L'attribution des sous-types histologiques selon le risque encouru est récapitulée dans le **tableau 4** [81].

Risques	Sous-types histologiques après traitement
Bas risque	WT complètement nécrotique Néphroblastome mésoblastique Néphroblastome cystique différencié
Risque intermédiaire	WT de type mixte WT de type épithélial WT de type stromal WT de type régressif WT avec anaplasie focale
Haut risque	WT de type blastémateux WT avec anaplasie diffuse Tumeur rhabdoïde Sarcome à cellules claires du rein

Tableau 4 : Stratification des risques des différents sous-types histologiques. Adapté de [81].

Dans certains cas, notamment chez des enfants de moins de 6 mois, le protocole SIOP recommande une chirurgie directe prenant en compte le risque d'erreur de diagnostic et permettant d'éviter un lourd traitement de chimiothérapie. Une stratification des risques des sous-types histologiques non traités par chimiothérapie néoadjuvante existe et ne sera pas détaillée ici. Des améliorations de cette stratification sont nécessaires car environ 40% des cas de rechutes surviennent chez des patients dont la tumeur n'a initialement pas été classée de haut risque [81], [84].

b) Classification COG

Contrairement à la SIOP, le COG n'administre pas de traitements néoadjuvants, retire en 1^{ère} intention les tumeurs par chirurgie et les classe selon 5 stades qui ne sont pas véritablement différents de ceux de la SIOP. Ce protocole permet une classification plus précise avec davantage de données histologiques et moléculaires nécessaires pour le traitement post-opératoire. Cependant, dans certaines situations, ce protocole recommande un traitement néoadjuvant par exemple en cas de thrombus ou si la tumeur est bilatérale. Dans ce protocole, sur la base des données histologiques récoltées, les tumeurs sont classées en 2 groupes : les tumeurs d'histologies favorables (ne présentant pas d'anaplasie) et les tumeurs d'histologies défavorables (présentant une anaplasie focale ou diffuse) [85].

4. Diagnostic

a) Symptômes et signes cliniques

Le plus souvent, dans 80% des cas, une masse abdominale asymptomatique est découverte de manière fortuite par les parents, lors de l'habillage ou du bain, ou par les médecins, de manière systématique lors d'un examen d'un enfant en bonne santé. Face au développement rapide de la tumeur, l'augmentation du volume abdominal passe souvent inaperçue et le diagnostic s'effectue lorsqu'une importante masse abdominale est détectée. Cette masse est volumineuse, indolore, ferme et lisse à l'examen. Dans des cas plus rares, des symptômes annonciateurs peuvent être associés au développement tumoral : hématurie, vomissements, anorexie ou douleurs abdominales dues à une compression digestive, ou encore une hypertension artérielle traduite par une augmentation du taux de rénine plasmatique.

b) Examen clinique

L'examen clinique d'une tumeur pédiatrique démarre par une échographie abdominale. Cet examen non invasif permet de visualiser la tumeur, d'éventuels signes de rupture ou une extension locorégionale ainsi que la relation avec les organes voisins. Le rein controlatéral est toujours examiné afin de s'assurer de son bon fonctionnement et de l'absence de tumeur bilatérale. Ensuite, une tomodensitométrie abdominale est réalisée afin de préciser les données précédemment collectées, et cela permet de visualiser l'ensemble de l'abdomen. Cet examen caractérise les liens entre la tumeur et les organes voisins mais aussi les extensions potentielles vers les voies excrétrices, des atteintes ganglionnaires ou des vaisseaux. En cas de masse volumineuse, une IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) complémentaire permet de déterminer l'origine rénale de la tumeur et de visualiser ses interactions avec les vaisseaux. La recherche de métastases, principalement pulmonaires (85%), se fait par une radio du thorax. Enfin, dans de très rares cas et en présence de douleurs osseuses, une scintigraphie osseuse peut être réalisée afin de rechercher des métastases osseuses très rares (0,8%).

c) Survie au diagnostic

La société américaine du cancer a communiqué les résultats d'études nationales sur les WT d'enfants traités au cours de ces décennies aux Etats-Unis (**Tableau 5**).

Stade tumoral	Histologies favorables	Histologies défavorables	
		Anaplasie focale	Anaplasie diffuse
Stade I	95 - 100 %	85 - 90 %	75 - 80 %
Stade II	95 - 100 %	80 - 85 %	80 - 85 %
Stade III	95 - 100 %	75 - 90 %	50 - 70 %
Stade IV	85 - 90 %	70 - 75 %	30 - 45 %
Stade V	95 - 100 %	95 - 100 %	65 - 70%

Tableau 5 : Taux de survie à 4 ans des WT en fonction des stades établis par la classification COG (American cancer society).

L'analyse de ces taux de survie permet de constater un taux global de survie de 90 % à 4 ans quel que soit le stade dans le cas de tumeurs présentant une histologie favorable. Les taux de survies restent globalement bons malgré une diminution quel que soit le stade dans les sous-types présentant une anaplasie focale. Enfin les sous-types possédant une anaplasie diffuse notamment de stade III et IV voient leur taux de survie chuter grandement, traduisant un plus mauvais pronostic.

5. Causes et facteurs de risques

La grande majorité des cas de WT sont sporadiques (plus de 90% des cas), les formes familiales étant très rares (environ 1%).

a) Facteurs de risques environnementaux

De nombreuses études ont été menées afin de déceler de potentielles associations entre des facteurs environnementaux (exposition à l'alcool ou au tabac, poids et âge gestationnel de l'enfant etc.) et le risque de développement d'une WT. De nombreux facteurs testés n'ont montré aucune association avec le développement d'une WT. Cependant, des facteurs comme l'hypertension maternelle durant la grossesse, une naissance prématurée ou un poids élevé à la naissance augmentent le risque de développer une WT. Des études ultérieures sont nécessaires pour clarifier et confirmer ces risques [86].

b) Facteurs de risques génétiques

Au cours de ces dernières années, de multiples études ont été réalisées permettant une meilleure compréhension des facteurs génétiques impliqués dans le développement des WT. Dans 10 à 15% des cas le développement de ces tumeurs est accompagné d'un syndrome de prédisposition. Il existe une dizaine de syndromes répertoriés associés à une augmentation

du risque de développement des WT et impliquant des gènes retrouvés dans les formes familiales ou sporadiques (**Tableau 6**) [87].

Syndromes	Gènes impliqués	Risques	Phénotypes
WAGR	WT1	50 %	Aniridie, anomalies génito-urinaires, retard mental.
Denys-Drash	WT1	75 %	Sclérose mésangiale diffuse, organes génitaux ambigus.
Anémie de Fanconi	BRCA2, PALB2	20-40 %	Malformation du squelette, petite taille, microcéphalie, insuffisance médullaire.
Perlman	DIS3L2	65 %	Retard de développement, organomégalie.
Beckwith-Wiedemann	Méthylation centre d'empreinte 11p15.5	24 %	Organomégalie, hémihypertrophie, hypoglycémie néonatale, grand poids à la naissance.
Aneuploïdie en mosaïque	BUB1B / TRIP13	85 %	Retard de développement, déficit de croissance, microcéphalie, anomalie oculaire.

Tableau 6 : Principaux syndromes de prédisposition aux WT. Ce tableau récapitule les principaux syndromes de prédisposition au développement des WT. Pour chaque syndrome, le ou les gènes impliqués, le risque de développement de la tumeur et les phénotypes engendrés sont indiqués. Adapté de [87].

c) Causes génétiques

En plus des syndromes de prédisposition, de grandes études de génomiques et de transcriptomiques ont permis de décortiquer d'autres altérations génétiques dans les WT comprenant des effecteurs de voies de signalisation (Wnt) ou des gains (1q) et/ou pertes (1p et 16q) chromosomiques. Ainsi, le gène *WT1* a été retrouvé muté dans 10-20% des tumeurs, *CTNNB1*, codant pour la β -caténine, dans 15% des tumeurs et *WTX*, impliqué dans la dégradation de la β -caténine, dans 15 à 20% des tumeurs. Une étude du COG a permis d'établir des profils d'expression génétique permettant de séparer les WT en 5, les groupes S1 à S4 étant d'histologies favorables et le groupe S5 d'histologie plus défavorable. Les résultats ont permis d'établir un modèle de développement en fonction des différents groupes nécessitant au minimum 2 mutations différentes dans la mise en place des WT. Concernant le groupe S2, *WT1* est muté et inactivé dans les cellules du mésoderme intermédiaire induisant la formation des restes néphrogéniques. Par la suite, l'activation de la voie Wnt provoquera le développement tumoral. Les mutations concernant *WT1* sont plus tardives dans le groupe S3 et apparaissent dans les cellules du blastème métanéphrique

induisant aussi la formation des restes néphrogéniques. L'augmentation d'IGF2 combinée à la diminution d'activation de la voie Wnt conduira au développement tumoral des tumeurs du groupe S3. L'augmentation d'IGF2, combinée à d'autres mutations non identifiées, est responsable de la formation des tumeurs du groupe S5 [88]. Par ailleurs, d'autres gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans la pathogenèse des WT. C'est le cas des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine (*SMARCA4*, *ARIDIA*) dans 5% des WT, des régulateurs de facteurs de transcription *SIX1/2* ou des gènes de la voie de formation des miARN (*DROSHA*, *DICER* etc.) dans 18% des cas. Des mutations sur le gène *TP53* (70% des cas) ou le proto-oncogène *MYCN* (13% des cas) sont surtout associées avec des tumeurs anaplasiques [89].

Cependant, dans 2/3 des cas de WT ces mutations communes sont absentes mais des anomalies au niveau du locus IGF2/H19 ont été trouvées suggérant l'implication d'épimutations. En effet, chez l'homme de nombreux gènes sont imprimés et exprimés de manière monoallélique. IGF2 et H19 sont imprimés et exprimés de façon opposée, H19 (suppresseur de tumeur) est exprimé à partir de l'allèle maternel et IGF2 (facteur de croissance embryonnaire) à partir de l'allèle paternel. Tous 2 exprimés dans la région 11p15, ils formeraient un domaine imprimé. Dans certains cas de WT, des altérations de méthylation de l'ADN sur ces gènes ont été retrouvées entraînant une perte d'expression de H19 et une expression bi-allélique d'IGF2 par exemple [90].

Des études ont été menées sur les restes néphrogéniques retrouvés dans 40% des WT unilatérales et 100% des WT bilatérales juxtaposés aux tumeurs afin de comprendre les mécanismes et les gènes responsables de la transformation des restes en tumeurs. Souvent difficiles à analyser dus au manque d'échantillons, une analyse comparative du méthylome a pu mettre en évidence des facteurs responsables de cette transformation. Les analyses montrent que la rétention des restes néphrogéniques dans le rein, initiant la tumorigenèse, met en cause un gain de PRC2 associé à une méthylation au niveau des loci requis pour la différenciation néphrogénique correcte. De plus, cette étude met en évidence l'existence de 2 groupes de WT et leurs restes néphrogéniques associés en fonction de leur méthylome : le groupe 1 ayant un méthylome distinct et le groupe 2 un similaire. En effet, 22 344 positions variables de méthylation ont été identifiées entre le groupe 1 de WT et leurs restes néphrogéniques alors qu'aucune différence n'a été retrouvée dans le groupe 2 suggérant un épigénome très varié dans le groupe 1. Dans ce premier groupe, 460 régions ont été

identifiées comme hypo-méthylées (enrichies dans les processus de développement du néphron impliquant des gènes comme *GDNF* ou *IRX2*) et 165 hyper-méthylées (enrichies en gènes jouant un rôle dans la régulation de la transcription ou l'adhésion cellulaire) en comparaison des restes néphrogéniques [91].

6. Facteurs pronostiques et biomarqueurs

L'identification de facteurs pronostiques et de biomarqueurs fait partie des objectifs du protocole UMBRELLA de la SIOP. Ces derniers permettraient de faciliter le diagnostic et le choix du traitement thérapeutique.

Dans le cas des WT, l'âge des enfants, le stade, la taille et la latéralité de la tumeur, ainsi que le recours à la chirurgie ont été confirmés en tant que facteurs pronostiques indépendants. En effet, l'avancement de la maladie et de la grosseur tumorale sont associés à de plus mauvais pronostics. Jusqu'à présent, il n'existait pas de nomogrammes robustes pour estimer le pronostic dans le cas des enfants atteints de WT. L'âge plus avancé au moment du diagnostic est associé à un pronostic défavorable et un risque élevé de récurrence. Les facteurs précédemment cités ont été inclus dans une étude afin de produire un nomogramme. Ce dernier a fourni une prédiction précise de la survie malgré quelques limitations dans sa création, notamment la non-inclusion de la chimiothérapie et de la radiothérapie et l'abstraction des sous-types détaillés, classant les tumeurs en fonction d'une histologie favorable ou défavorable [92].

Concernant les biomarqueurs, l'histologie et plus particulièrement l'anaplasie est considérée comme un biomarqueur associé avec le pronostic et avec un taux plus élevé de récurrences, métastases et décès. Une glycoprotéine de surface des lymphocytes T, B7-H1, est associée avec un risque élevé de récurrence chez les patients présentant une histologie favorable ou défavorable. B7-H1 provoque l'apoptose des lymphocytes T, affaiblissant la réponse immunitaire. De nombreuses études ont été menées dans l'identification de potentiels biomarqueurs génétiques. Des mutations sur p53 sont associées à une augmentation de la récurrence et une diminution de la survie [93]. De même, la dérégulation de *MYCN* est associée à un plus mauvais pronostic, comprenant une histologie anaplasique et une diminution de la survie [94]. Pour finir, des altérations chromosomiques retrouvées dans le développement des tumeurs ont montré leurs potentiels pronostics. Ainsi, les patients possédant une LOH (Loss of heterozygosity) 16q et 1p ont un plus mauvais pronostic, associé à des taux plus élevés de

récidive ou de décès [95]. De même, le gain 1q est associé à un pronostic défavorable dans les WT [93].

Un grand nombre d'études sont en cours pour évaluer d'autres biomarqueurs potentiels comme les acides nucléiques circulants détectables dans le sang et l'urine ou les miARN présents dans le sang et les tissus tumoraux (d'après la SIOP).

7. Traitements

Les tumeurs de Wilms sont traitées de manière multidisciplinaire combinant la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie. L'amélioration du protocole thérapeutique au cours de ces dernières années a permis de passer de 30% à 90% de survie. Malgré des différences protocolaires, les mêmes molécules sont utilisées dans la SIOP et le COG mais seule la stratégie thérapeutique de la SIOP sera détaillée ici.

Comme évoqué précédemment, dans le protocole de la SIOP les patients reçoivent pendant 4 à 6 semaines un traitement de chimiothérapie préopératoire après le diagnostic. Contrairement aux RCC, les WT sont très chimiosensibles et répondent à la chimiothérapie conventionnelle. L'objectif de ce traitement est de réduire le stade ainsi que le volume tumoral afin de faciliter l'exérèse et de réduire l'intensité et la longueur du traitement post-opératoire. Elle est composée dans 2/3 des cas par des injections d'actinomycine D (A) et de vincristine (V). Afin de réduire la toxicité cardiaque, la doxorubicine (D) est administrée en complément uniquement dans des cas métastatiques où son efficacité est prouvée avec une durée ne dépassant pas les 12 semaines [84].

Par la suite, l'exérèse de la tumeur primaire, et d'éventuelles métastases par chirurgie, fait partie du traitement standard de cure des enfants atteints de WT. La néphrectomie totale reste la première recommandation dans les cas où l'exérèse complète est possible due au développement rapide de la tumeur. Cependant, dans certains cas, une néphrectomie partielle est possible (tumeur bilatérale, rein unique etc.). La technique appelée nephron-sparing surgery consiste à retirer la tumeur avec ou sans marge de tissus sains autour. Elle est acceptée sous certaines conditions, citées dans le protocole UMBRELLA, par exemple, la suspicion d'une activité rénale résiduelle ou dans le cas de petites tumeurs. Une classification est disponible dans le protocole UMBRELLA [84].

Enfin, la durée et la composition du traitement post-opératoire se fait en fonction du stade et du risque attribués à la tumeur. Ceci peut comprendre de la chimiothérapie seule,

avec les médicaments préalablement cités ou d'autres, (étoposide, carboplatine, cyclophosphamide + doxorubicine (ECCD)) combinés ou non avec l'ajout de radiothérapie dans les cas plus avancés. Les WT sont très radiosensibles mais l'utilisation de la radiothérapie est limitée au maximum à cause des séquelles importantes. La stratégie thérapeutique post-opératoire est résumée dans le **tableau 7** [84]:

Risque	Volume	Traitement		
		Stade I	Stade II	Stade III
Bas	Toutes	Rien	A + V (27 semaines)	A + V (27 semaines)
Intermédiaire	Tous types < 500 mL ou type stromal, épithélial ≥ 500mL	A + V (4 semaines)	A + V (27 semaines)	A + V (27 semaines) + radiothérapie
	Type non stromal, non épithélial ≥ 500 mL	A + V (4 semaines)	A + V + D (27 semaines)	A + V + D (27 semaines) + radiothérapie
Haut	Toutes (types blastémateux + anaplasie)	A + V + D (27 semaines)	ECCD (34 semaines) + radiothérapie (anaplasie)	ECCD (34 semaines) + radiothérapie

Tableau 7 : Traitement post-opératoire. La durée et la composition du traitement varient en fonction du stade et du risque. Adapté de [84]. A : actinomycine D, V : vincristine, D : doxorubicine, ECCD : étoposide, carboplatine, cyclophosphamide + doxorubicine.

Le protocole UMBRELLA de la SIOP recommande dans les stades IV l'administration d'actinomycine D, vincristine + une dose cumulative de 150 ou 250mg/m² de doxorubicine ou la combinaison ECCD. Les patients de stade V reçoivent les traitements en fonction du stade I, II, III attribué lors de la classification [84].

Malgré l'efficacité de ces traitements et les hauts taux de survie, il est nécessaire de minimiser les effets indésirables à long terme dus à l'utilisation de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Ces effets comprennent des rechutes ou le développement de cancers secondaires (rénaux ou autres), des pathologies cardiaques ou pulmonaires, des problèmes de fertilité ou la mort [96]. Les récurrences concernent 15% des WT de bas risque (d'histologie favorable) et 30 à 50% des WT de haut risque (anaplasique) et ont lieu assez tôt dans les 2 ans du diagnostic. Elles se situent souvent dans les poumons (60%) ou dans l'abdomen (30%) et font chuter le taux de survie de 90% à 60% dans les WT d'histologie favorable, le taux de survie étant encore plus bas pour les sous-types anaplasiques [97]. Les patients présentant des récurrences sont classés en 3 groupes AA, BB et CC, en fonction du sous-type histologique initial

et du traitement reçu en première intention. En fonction du groupe attribué, différentes recommandations de traitements sont données, par exemple l'utilisation entre autres de la camptothécine pour le groupe CC (regroupant des patients possédant des tumeurs initiales anaplasiques diffuses) [84].

Actuellement, les recherches se tournent vers des thérapies plus ciblées afin de réduire les effets indésirables induits par les traitements actuels. Une piste sérieusement envisagée concerne le ciblage thérapeutique des cellules souches cancéreuses des WT [98].

8. Modèles d'étude

L'étude des WT est très difficile par manque de cellules, à disposition des chercheurs, capables de récapituler l'ensemble des composants tumoraux. Actuellement, une lignée nommée WT-CLS1 est commercialisée. Ces cellules sont issues d'une tumeur rhabdoïde d'un patient ayant eu une WT et sont pour l'instant utilisées comme lignée de WT. De plus, la plupart des lignées établies par des chercheurs sont surtout anaplasiques, établies souvent par des xénogreffes difficiles à mettre en place et très coûteuses. De nos jours, avec l'augmentation des connaissances et l'émergence de nouvelles technologies, de nouvelles pistes sont envisagées et mises en application pour l'analyse de ces tumeurs. Récemment, des tumeurs blastémateuses ont pu être étudiées *in vitro* à l'aide d'une technique 3D, nommée sphéroïde [99]. La même équipe a été en mesure de générer des cultures 3D représentatives des contingents, épithélial et stromal [99].

Les sphéroïdes, contrairement aux techniques 2D, permettent de reproduire plus fidèlement les interactions cellules-cellules et matrice-cellules retrouvées au sein d'une tumeur. Ces sphéroïdes pouvant être formés d'un ou plusieurs types cellulaires, sont souvent de forme sphérique et présentent 3 zones distinctes selon différents gradients d'oxygène et de nutriments. La plus externe est composée de cellules possédant des caractéristiques prolifératives et migratoires. La zone médiane est une zone de quiescence et la zone interne est composée de cellules nécrotiques hypoxiques (**Figure 19**) [100].

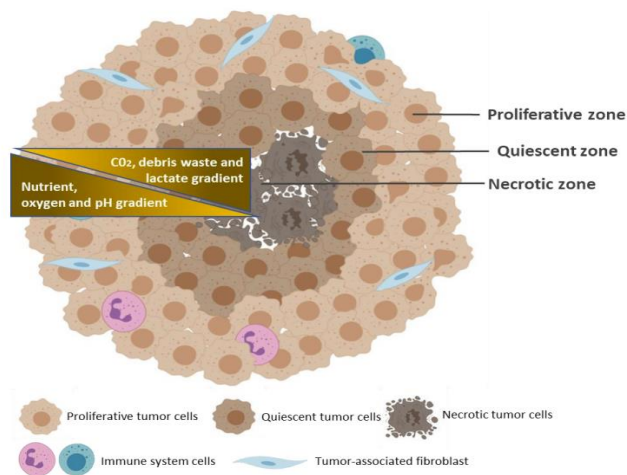


Figure 19 : Schématisation d'un sphéroïde.

Visualisation des 3 zones composant le sphéroïde : zone proliférative, zone de quiescence et zone nécrotique. Les différents gradients retrouvés sont également présentés [100].

Actuellement, différentes méthodes sont disponibles pour générer les sphéroïdes, entre autres l'auto-génération ou l'encapsulation. Ces sphéroïdes sont utilisés notamment dans la recherche de traitements ou l'analyse de l'invasion et de la migration dans différents cancers y compris les RCC. En effet, les sphéroïdes ont été utilisés dans des lignées cellulaires métastatiques de RCC pour évaluer la sensibilité médicamenteuse [101].

Une autre technique 3D, nommée organoïde, commence à être utilisée dans la recherche de plusieurs cancers. Ce sont des amas complexes de cellules spécifiques à un organe et formés à partir de l'auto-assemblage de cellules souches ou progénitrices introduites dans un environnement extracellulaire adéquat pour leur développement. Ces organoïdes sont utiles à différents niveaux : récemment l'élaboration d'une biobanque d'organoïdes de tumeurs rénales pédiatriques a permis de mieux caractériser l'hétérogénéité de ces dernières et de fournir des modèles utiles pour la recherche fondamentale ou la caractérisation de médicaments [102]. De même, dans le cas des RCC, ces organoïdes permettent l'analyse de ces modèles face à de nouvelles stratégies thérapeutiques [103]. Très récemment, un modèle d'organoïde humain de WT a été mis en place à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) permettant de préserver l'hétérogénéité tumorale et de pouvoir récapituler plus précisément la progression tumorale et les réponses aux drogues [104].

B) Chez l'adulte

Bien que touchant le même organe, les cancers du rein de l'adulte sont différents des cancers pédiatriques dans leur histologie, leur mode de développement et nécessitent d'autres traitements pour éradiquer ou du moins contrôler le plus possible la maladie.

1. Epidémiologie

Les cancers du rein représentent en 2020, 2,2% des cancers dans le monde (431 288 nouveaux cas) le classant parmi les 20 cancers les plus diagnostiqués. On dénombre 179 368 décès dans le monde, la même année [105].

En 2020, en France, environ 15 000 nouveaux cas, tous sexes confondus, ont été recensés positionnant le cancer du rein au 7^{ème} rang des cancers les plus diagnostiqués. La même année, environ 5 000 décès ont été constatés (d'après Global Cancer Observatory). Il s'agit du troisième cancer urologique après les cancers de la prostate et de la vessie.

2. Classification anatomopathologique

a) Tumeurs bénignes

La majorité des tumeurs rénales adultes sont malignes. Néanmoins, les tumeurs bénignes sont assez fréquentes dans le cas de petites masses où elles représentent 20 à 30% des cas. Parmi les principales tumeurs bénignes, on retrouve les angiomyolipomes et les oncocytomes [106].

➤ Angiomyolipomes

L'angiomyolipome est une tumeur mésenchymateuse microscopiquement composée de tissus adipeux, de vaisseaux sanguins et de fibres musculaires lisses (**Figure 20B**). La grosseur est déterminée selon la quantité des différents composants.

D'un point de vue macroscopique, ces tumeurs ont un aspect plein et peuvent présenter des amas graisseux et des zones hémorragiques ressemblant respectivement à un lipome ou à un carcinome à cellules rénales (RCC) [106] (**Figure 20A**).

En immunohistochimie, ces tumeurs sont positives pour l'HMB45, l'actine des muscles lisses et la vimentine [107]. Généralement bénignes, un sous-type peut être plus agressif : l'angiomyolipome épithélioïde.

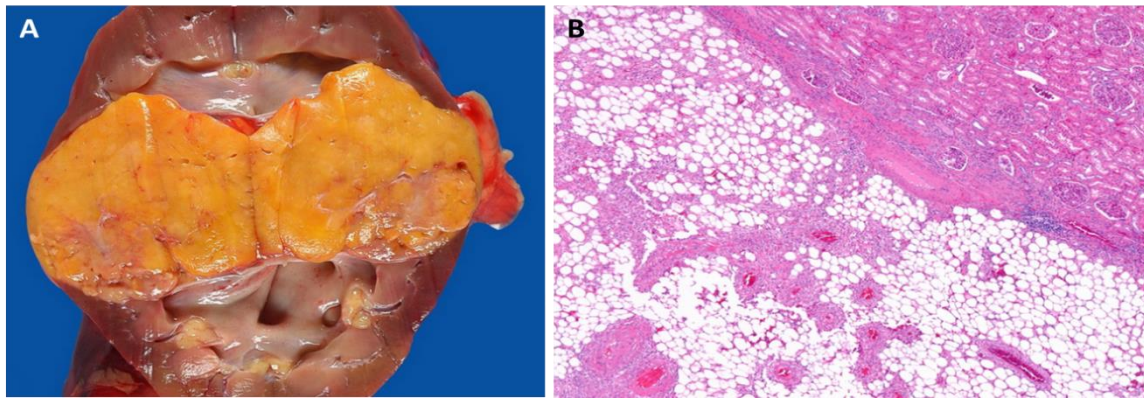


Figure 20 : Angiomyolipomes. *A/ Aspect macroscopique d'un angiomyolipome. B/ Coupe histologique d'un angiomyolipome : les différents constituants (tissus adipeux, vaisseaux sanguins et fibres musculaires lisses) sont visibles en bas et le rein normal se situe en haut à droite. Illustrations du site Webpathology.com.*

➤ Oncocytomes

L'oncocytome est une tumeur dérivant de cellules intercalées des tubes collecteurs qui représente 5% de l'ensemble des tumeurs rénales.

Macroscopiquement, ces tumeurs sont circonscrites, plus ou moins encapsulées, de couleur brun acajou, pouvant présenter une cicatrice fibreuse centrale (**Figure 21A**).

En microscopie, ces tumeurs sont constituées de nids de cellules oncocytaires séparés par du stroma lâche. Les oncocytes sont de grandes cellules possédant un cytoplasme granulaire, fortement éosinophile et des noyaux ronds réguliers (**Figure 21B**) [106].

Ces tumeurs sont marquées positivement par CD117 en immunohistochimie [107].

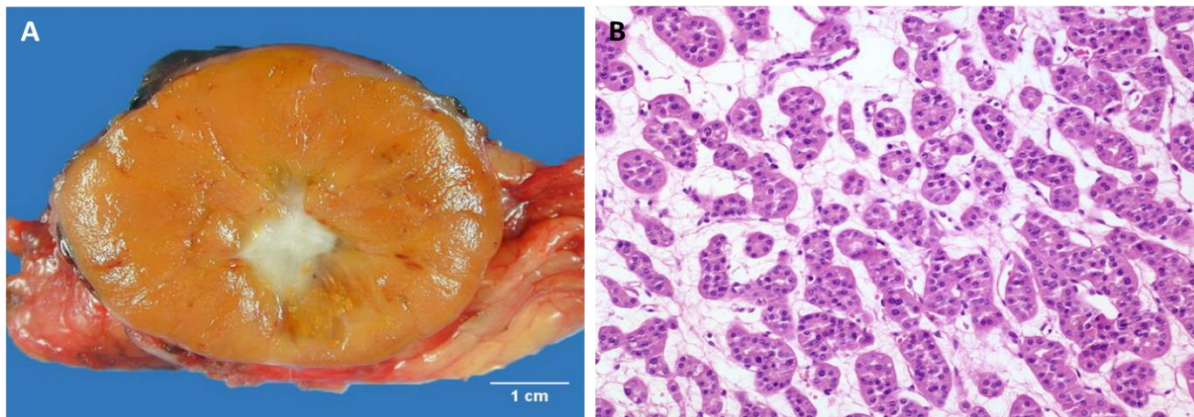


Figure 21 : Oncocytomes. *A/ Aspect macroscopique d'un oncocytome : sur cette image, l'oncocytome possède une cicatrice fibreuse centrale. B/ Coupe histologique d'un oncocytome : des amas cellulaires solides de tailles variables sont séparés par un stroma lâche. Illustrations du site Webpathology.com.*

b) Cas particulier : Lésions kystiques

Dans certains cas, les tumeurs rénales, qu'elles soient bénignes ou malignes, peuvent se présenter sous la forme de kystes (5 à 7% des lésions rénales). Ce sont des grosseurs en général remplies d'un liquide clair, entourées d'une membrane fine qui forment des bosses à la surface du rein ou des néphrons. Environ 50% de la population de plus de 50 ans présente un kyste rénal. Ces derniers sont répertoriés en différents stades (I, II, IIF, III et IV) en fonction de la classification de Bosniak. Brièvement, les stades I et II caractérisent les kystes bénins, le stade IIF représente les kystes à surveiller et les stades III et IV correspondent aux kystes à haut risque de malignité [108].

c) Tumeurs malignes

Différentes catégories de tumeurs malignes ont été définies par la classification OMS de 2016, les plus communes étant les RCC représentant 90% des tumeurs rénales. Les RCC constituent un groupe de tumeurs hétérogènes provenant de la transformation des cellules des tubules du rein. Ainsi, une douzaine de sous-types de RCC ont été caractérisés sur la base d'observations histologiques, les 3 principaux étant le RCC à cellules claires (ccRCC), le RCC tubulo-papillaire (pRCC) et le RCC à cellules chromophobes (chRCC). L'identification du sous-type de RCC est déterminante quant au choix du traitement à administrer.

➤ Le carcinome rénal à cellules claires (ccRCC)

Ce carcinome est le plus fréquent et représente 65-70% de tous les RCC. Il se développe à partir des cellules des tubules proximaux. Macroscopiquement, ces tumeurs sont d'aspect jaunâtre avec des signes de nécrose et d'hémorragie (**Figure 22A**).

D'un point de vue microscopique, les cellules éosinophiles présentent un cytoplasme clair en raison d'une accumulation de glycogène, de phospholipides et de lipides comme le cholestérol (**Figure 22B**) [109].

Les ccRCC apparaissent généralement positifs aux marqueurs immunohistochimiques CAIX et CD10 et négatifs à AMACR et CK7 [107].

Génétiquement, ces tumeurs sont surtout caractérisées par des altérations sur le chromosome 3. Ce carcinome est le plus agressif des 3 sous-types précédemment cités et celui possédant le plus mauvais pronostic.

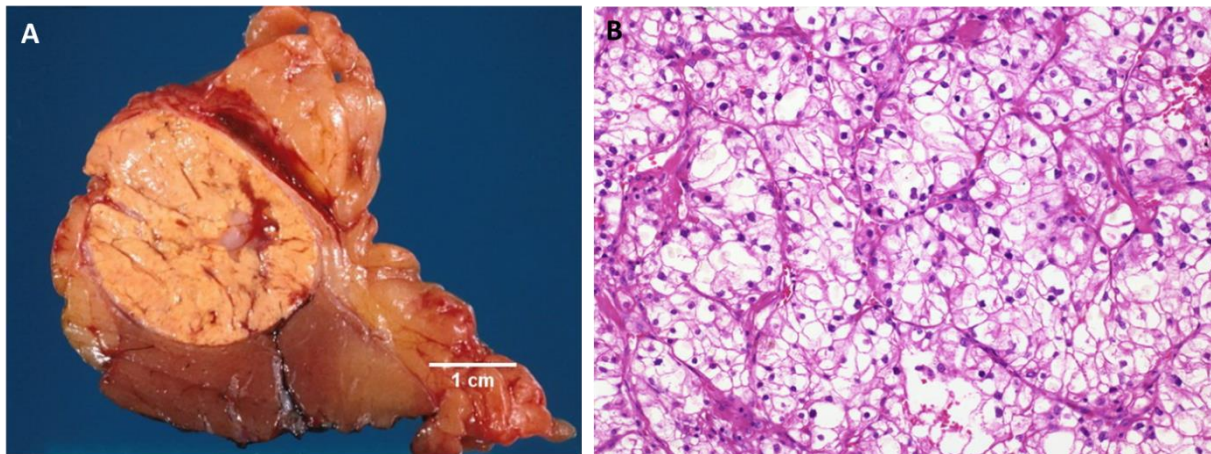


Figure 22 : Carcinome rénal à cellules claires. A/ Aspect macroscopique d'un ccRCC : couleur jaunâtre caractéristique de ces tumeurs. B/ Coupe histologique d'un ccRCC : présence de nombreux cytoplasmes clairs dus à l'accumulation de diverses substances. Illustrations du site Webpathology.com.

➤ Le carcinome rénal tubulo-papillaire (pRCC)

Ce carcinome est le deuxième type de RCC le plus fréquent, représentant 15-20% de tous les RCC. Il est issu des cellules des tubules contournés distaux.

D'un point de vue macroscopique, ces tumeurs sont circonscrites, d'aspect friable et présentant des signes de nécrose et d'hémorragie (**Figure 23A**). Ces tumeurs formant de petites extensions nommées papilles (pouvant contenir ou non des macrophages mousseux) ont été classées en 2 types selon leurs différences microscopiques.

Dans les pRCC de type I, les papilles sont tapissées d'une couche de cellules tumorales présentant des petits noyaux hyperchromatiques sans nucléoles prédominants et un cytoplasme de couleur claire rare (**Figure 23B**).

Dans les pRCC de type II, les cellules sont plus grosses avec des noyaux larges pseudostratifiés, des nucléoles proéminents et un cytoplasme éosinophile plus abondant (**Figure 23C**). Par ailleurs, il existe un autre sous-type de pRCC avec une histologie mixte.

D'un point de vue immunohistochimique, les pRCC sont positifs pour CD10, CK7 (plus important pour le type I) et AMACR et négatif pour CAIX. Les pRCC sont généralement de meilleurs pronostics que les ccRCC et le pRCC de type I est associé à un meilleur pronostic que les pRCC de type II.

Génétiquement, ces tumeurs sont caractérisées par des altérations sur les chromosomes 7, 17 et Y [109].

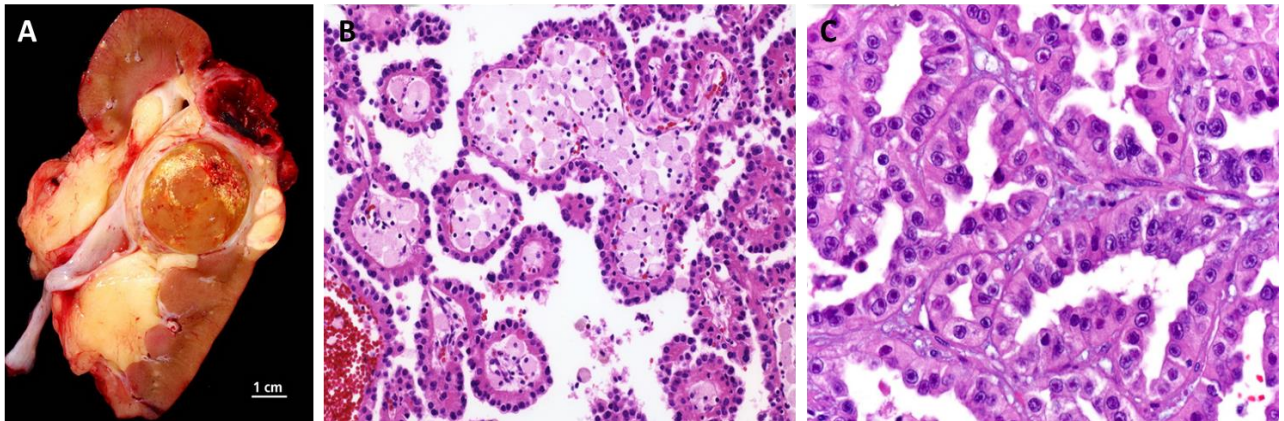


Figure 23 : Carcinome rénal tubulo-papillaire. A/ Aspect macroscopique des pRCC : tumeur bien circonscrite. Coupes histologiques d'un pRCC de type I (B) et de type II (C) : les papilles sont visibles dans les 2 sous-types. Illustrations du site Webpathology.com.

➤ Le carcinome rénal à cellules chromophobes (chRCC)

Ce carcinome, issu des cellules intercalaires du tube collecteur, constitue 5 à 7% des RCC et présente un pronostic favorable.

D'un point de vue macroscopique, la tumeur est bien circonscrite et compacte de couleur beige clair à brun acajou. Dans certain cas, ces tumeurs peuvent posséder une cicatrice fibreuse semblable à l'oncocytome (**Figure 24A**).

Microscopiquement, ces tumeurs sont caractérisées par la présence de cellules possédant un pléomorphisme nucléaire avec des halos périnucléaires et un cytoplasme pâle ou éosinophile (**Figure 24B**).

D'un point de vue immunohistochimique, les chRCC sont généralement marquées positivement pour CK7 et KIT et négativement pour CAIX et CD10.

Génétiquement, ces tumeurs possèdent des altérations sur les chromosomes 1, 2, 6, 10, 13 et 17 [109].

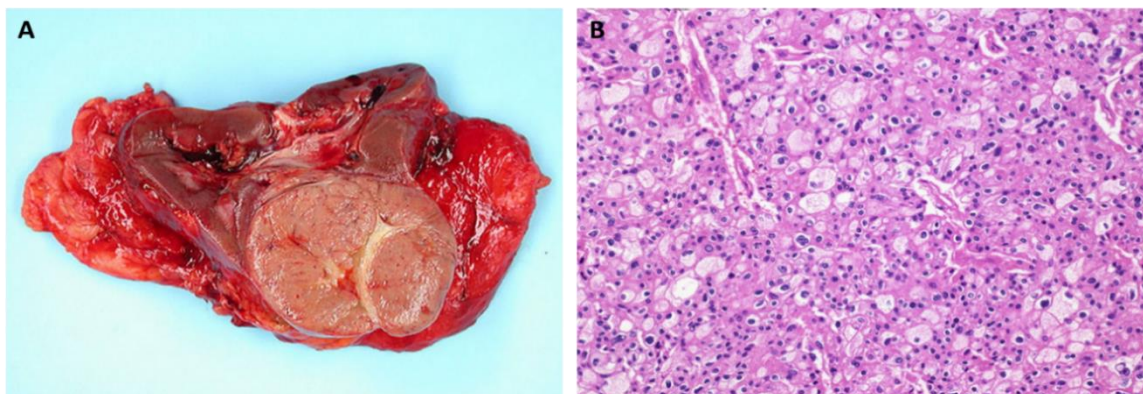


Figure 24 : Carcinome rénal à cellules chromophobes. A/ Aspect macroscopique d'un chRCC : sur cette image, la tumeur circonscrite et compacte possède une cicatrice fibreuse. B/ Coupe histologique d'un chRCC : visualisation des cytoplasmes pâles à éosinophiles des cellules. Illustrations du site Webpathology.com.

➤ Autres carcinomes

Les autres sous-types de carcinomes, comme le carcinome du tube collecteur ou le carcinome médullaire rénal, sont très rares, représentant moins de 1% des cas de RCC et ne seront pas décrits ici.

3. Stade tumoral

La définition d'un stade de cancer est une étape cruciale nécessitant des examens et tests diagnostiques afin de définir précisément la nature et l'évolution de la maladie. L'identification du stade de développement du cancer est un facteur décisif dans le choix thérapeutique mais permet aussi, à visée pronostique, d'évaluer l'évolution et les chances de survie du patient et, à visée prospective, d'améliorer les traitements futurs en répertoriant les réponses cliniques.

a) La classification TNM

La classification TNM est un code standard international, communément utilisé dans les tumeurs rénales et permettant aux médecins d'identifier le stade clinique de la maladie. Ce système se base sur 3 caractéristiques cancéreuses : la taille de la tumeur primaire (T), l'invasion régionale des ganglions lymphatiques situés à proximité de la tumeur primaire (N) et la présence de métastases (M). Au cours de ces dernières années, de petites modifications ont été apportées entre la classification TNM de 2010 et de 2017 par le comité mixte américain sur le cancer (AJCC) et l'union internationale de lutte contre le cancer (UICC) notamment sur la définition du grade T3a [110]. La classification est détaillée dans le **tableau 8** ci-dessous.

Tumeur primaire (T)
<p>TX : Tumeur primaire non déterminée. T0 : Absence de tumeur primaire.</p> <p>T1 : Tumeur limitée au rein inférieure ou égale à 7cm de dimension : T1a : Tumeur inférieure ou égale à 4cm de dimension. T1b : Tumeur supérieure à 4cm mais inférieure ou égale à 7cm de dimension.</p> <p>T2 : Tumeur limitée au rein et supérieure à 7 cm de dimension : T2a : Tumeur supérieure à 7cm mais inférieure ou égale à 10 cm de dimension. T2b : Tumeur supérieure à 10 cm de dimension.</p> <p>T3 : Tumeur envahissant les tissus périphériques ou les veines principales sans atteinte de la glande surrénale homolatérale ou du fascia de Gérota (ou rénal fascia). T3a : Tumeur envahissant la veine rénale ou ses branches segmentaires, la graisse périrénale ou le sinus rénal et le système pelvical sans dépasser le fascia de Gérota. T3b : Tumeur envahissant macroscopiquement la veine cave sous-diaphragmatique. T3c : Tumeur envahissant macroscopiquement la veine cave sus-diaphragmatique ou la paroi de la veine cave.</p> <p>T4 : Tumeur envahissant au-delà du fascia de Gérota ou la glande surrénale homolatérale.</p>
Ganglions lymphatiques régionaux (N)
<p>NX : Ganglions lymphatiques régionaux non évalués. N0 : Absence de métastases ganglionnaires régionales. N1 : Présence de métastases ganglionnaires régionales.</p>
Métastases à distance (M)
<p>M0 : Absence de métastases à distance. M1 : Présence de métastases à distance.</p>

Tableau 8 : Classification TNM 2017 des cancers du rein. Les tumeurs sont classées en fonction de la taille des tumeurs primaires (T) et de la présence ou absence d'invasion dans les ganglions lymphatiques (N) et de métastases (M) [111].

A partir de cette classification TNM et des différentes caractéristiques précédemment citées un stade clinique est désigné. Ces stades allant de I (précoce) à IV (avancé) représentent l'état d'avancement de la maladie et sont décrits dans le **tableau 9** ci-dessous [111].

Stades	Descriptions
Stade I (T1, N0, M0)	La tumeur fait 7cm de diamètre ou moins et reste localisée au rein (T1). Le cancer n'a pas envahi les ganglions lymphatiques voisins (N0) ni d'autres organes distants (M0).
Stade II (T2, N0, M0)	La tumeur a une taille supérieure à 7cm de diamètre et reste localisée au rein (T2). Le cancer ne s'est pas étendu aux ganglions lymphatiques voisins (N0) ni à d'autres organes distants (M0).
Stade III (T3, N0, M0) (T1-3, N1, M0)	Plusieurs situations sont possibles : T3, N0, M0 : La tumeur a envahi une veine (rénale ou cave) ou un tissu proche du rein sans atteindre la glande surrénale et le fascia de Gérota (T3). Les ganglions lymphatiques voisins et les organes distants ne sont pas envahis (N0 et M0). T1-2-3, N1, M0 : Indépendamment de la taille de la tumeur primaire (T1 à T3), si la tumeur envahit un ganglion lymphatique voisin (N1) mais n'atteint pas d'autres organes (M0) le stade III est désigné.
Stade IV (T4, N1, M0) (T, N, M1)	Ce stade, appelé stade métastatique, regroupe différentes situations : Si la tumeur a envahi au-delà du fascia de Gérota (T4) ou atteint plusieurs ganglions lymphatiques (N1), le stade IV est désigné. De plus, si des métastases distantes sont détectées (M1), le cancer est classé de stade IV indépendamment de la taille de la tumeur primaire ou de l'atteinte des ganglions lymphatiques.

Tableau 9 : Assignment des stades cliniques des cancers rénaux en fonction de la classification TNM.

Le registre de la clinique Mayo a permis une visualisation de la distribution des stades cliniques en fonction de la classification TNM 2010 dans les 3 sous-types principaux de RCC (**Tableau 10**).

	ccRCC	pRCC	chRCC
Stade I	51 %	74 %	52 %
Stade II	12 %	13 %	32 %
Stade III	22 %	10 %	12 %
Stade IV	14 %	4 %	4 %

Tableau 10 : Distribution des stades cliniques en fonction de la classification 2010 dans les ccRCC, pRCC et chRCC. Données de 4380 patients dont 3521 présentant un ccRCC, 627 un pRCC et 232 un chRCC faisant partie du registre de la clinique entre 1970 et 2009 [112].

Dans chaque carcinome, plus de la moitié des patients se trouvent dans un stade clinique précoce. Ce registre permet de confirmer le caractère agressif et le moins bon

pronostic attribués aux ccRCC pour lesquels 36% des patients ont un stade plus avancé (III-IV) contre 14-16% pour les 2 autres sous-types.

b) Autres classifications des cancers du rein

D'autres techniques existent pour classer et établir un pronostic dans les cancers du rein.

➤ Le grade nucléaire de Fuhrman

Parmi un grand nombre de classifications, le système Fuhrman est universellement accepté et utilisé pour classer les différentes tumeurs rénales. Ce système est basé sur l'évaluation subjective de la taille et de la forme des noyaux, sur le pléomorphisme nucléaire et la prééminence des nucléoles (**Tableau 11**).

Grades	Descriptions
Grade 1	Noyaux ronds et réguliers d'environ 10 µm avec des nucléoles indiscernables ou absents.
Grade 2	Noyaux ronds présentant de petites irrégularités d'environ 15 µm avec des nucléoles visibles au grossissement x400.
Grade 3	Noyaux irréguliers, d'environ 20 µm avec des nucléoles larges et proéminents, visibles au grossissement x100.
Grade 4	Noyaux bizarres souvent multilobés de plus de 20 µm avec des nucléoles larges et proéminents et une chromatine irrégulière.

Tableau 11 : Grade nucléaire de Fuhrman [113].

Ce système constitue, à l'heure actuelle, une référence dans la classification des tumeurs rénales et possède une forte valeur pronostique, indépendante du stade clinique. Cependant, au fur et à mesure du temps et de l'augmentation des connaissances, de nombreuses limitations sont apparues. Certaines études ont mis en cause la validité de ce système notamment dans le cas des pRCC où seule la proéminence nucléolaire était significativement corrélée avec le résultat du patient tandis que pour les chRCC aucun paramètre n'était significativement associé avec le résultat. De plus, des systèmes reposant uniquement sur la proéminence nucléolaire ont montré une corrélation plus forte avec les résultats des patients pour le ccRCC et le pRCC, comparés à ceux établis à partir du grade de Fuhrman [114], [115].

➤ Le système de notation ISUP

Un nouveau système de classification a été proposé par la société internationale d'urologie (ISUP) en 2012. Ce système est basé sur les caractéristiques nucléolaires et est résumé dans le **tableau 12** [115].

Grades	Descriptions
Grade 1	Nucléoles basophiles, imperceptibles ou absents au grossissement x400.
Grade 2	Nucléoles éosinophiles et visibles au grossissement x400 mais visibles et non proéminents au grossissement x100.
Grade 3	Nucléoles éosinophiles et visibles au grossissement x100.
Grade 4	Très fort pléomorphisme nucléaire, présence de cellules géantes multinucléées et / ou différenciation sarcomatoïde et /ou rhabdoïde.

Tableau 12 : Système de classification ISUP des cancers du rein [115].

Lors de la conférence ISUP, un consensus a été établi sur le fait que ce système devait être appliqué au ccRCC et au pRCC. En ce qui concerne le chRCC, un nombre supérieur de données est nécessaire pour déterminer l'utilisation de ce système. Par ailleurs, une classification propre au chRCC a été élaborée et ne sera pas détaillée ici [116].

4. Diagnostic

a) Symptômes et signes cliniques

Assez souvent, il n'y a aucun symptôme si bien que la majorité des cas sont découverts de façon fortuite, au cours d'un examen effectué pour une autre pathologie (rénale ou non). Quelquefois, il est possible de ressentir des symptômes comme une hématurie ou des douleurs lombaires, localisées dans un flanc pouvant être les symptômes initiaux mais qui ne sont pas spécifiques au cancer du rein. Plus rarement, le patient peut ressentir des symptômes plus généraux tels que, une perte de poids, de la fatigue, une hypertension artérielle ou des symptômes gastro-intestinaux ou respiratoires.

b) Examen clinique

L'examen clinique du cancer du rein se base sur des techniques d'imageries qui ont permis d'augmenter le nombre de cas découverts. L'échographie va permettre de déterminer la nature solide ou liquide de la tumeur rénale. L'imagerie scanner ou tomodensitométrie est l'examen de référence pour établir le bilan d'extension (locorégionale et intravasculaire) de la maladie. Enfin, l'IRM permet d'analyser la structure des tissus. Cette dernière constitue un examen complémentaire en cas de thrombus de la veine cave ou de tumeur du rein de moins

de 4 cm. Lors de l'examen clinique le rein controlatéral est aussi étudié car, dans 1 à 3% des cas, le cancer du rein peut être bilatéral.

c) Survie au diagnostic

Le registre de la clinique Mayo a permis une visualisation de la survie à 5 ans des patients en fonction des différents stades de la classification TNM 2010 (**Tableau 13**) [112].

Stades	Survie à 5 ans
Stade T1a	98 %
Stade T1b	89 %
Stade T2a	75 %
Stade T2b	69 %
Stade T3a	53 %
Stade T3b	31 %
Stade T3c	36 %
Stade T4	10 %

Tableau 13 : Taux de survie à 5 ans post-chirurgie en fonction des stades établis d'après la classification TNM 2010 [112].

L'évaluation des taux de survie à 5 ans permet de se rendre compte que lorsqu'un cancer est diagnostiqué à un stade précoce, limité au rein (stades I-II), les chances de survie des patients sont bonnes allant de 69% à 98%. Cependant, lorsque le cancer est diagnostiqué à un stade plus avancé avec envahissement des tissus périphériques (stade III) ou présence de métastases (stade IV) les chances de survie chutent aux alentours de 30% pour le stade III et de 10% pour le stade IV.

5. Causes et facteurs de risques

Il existe des facteurs de risques environnementaux et génétiques dans le développement des RCC.

a) Facteurs de risques environnementaux

L'un des facteurs environnementaux le plus important est l'insuffisance rénale chronique qui multiplie par 7 le risque de développer une tumeur. Le tabac, l'obésité et l'hypertension artérielle sont aussi des facteurs qui augmentent le risque de développement du cancer.

b) Facteurs de risques génétiques

Parmi les RCC, la grande majorité est d'origine sporadique mais il est aussi possible qu'ils soient héréditaires.

➤ Origine héréditaire

Environ 5% des RCC sont d'origine héréditaire. Ces prédispositions héréditaires se caractérisent par l'existence d'une dizaine de syndromes présentant des altérations sur des gènes clés dans le développement des RCC héréditaires et sporadiques. Les principaux sont listés dans le **tableau 14** ci-dessous [117].

Syndromes	Gènes impliqués	Risques	Types de tumeurs
Von-Hippel-Lindau (VHL)	VHL	25-45%	Surtout ccRCC
Translocation constitutionnelle du chromosome 3	?	30-70%	ccRCC
Birt-Hogg-Dubé	FLCN	25-34%	chRCC, oncocytomes, ccRCC, pRCC
Carcinome papillaire héréditaire	MET	100%	pRCC de type I
Cowden	PTEN	10-35%	chRCC, pRCC, ccRCC

Tableau 14 : Principaux syndromes héréditaires. Ce tableau récapitule les principaux syndromes impliqués dans le développement des cancers du rein héréditaires. Pour chacun le gène impliqué, le risque de développement du cancer et le sous-type histologique sont indiqués. Adapté de [117].

➤ Origine sporadique

Comme dit précédemment, le ccRCC se caractérise par des altérations et plus précisément la perte du chromosome 3 dans 91% des cas. Ce chromosome contient 7 gènes suppresseurs de tumeurs parmi lesquels figure *VHL*, muté dans la grande majorité des cas de ccRCC (70-90%). Il joue un rôle critique dans la pathogénicité de ce sous-type histologique. Dans des conditions physiologiques, *VHL* cible les facteurs d'induction hypoxique - 1 et -2 (HIF) et provoque leur dégradation. Dans des conditions hypoxiques ou dans le cas d'une altération du gène *VHL*, l'expression de HIF-1 et -2 est stabilisée et peut conduire à l'activation de molécules effectrices jouant des rôles clés dans l'angiogenèse (VEGF), le métabolisme ou les processus d'invasion et de métastases. De plus, HIF-1 et -2 ont des rôles opposés dans la prolifération lors de la progression tumorale, HIF-1 étant exprimé dans les lésions précoces et HIF-2 dans les plus tardives. Par ailleurs, le développement d'un ccRCC est le résultat d'une association spécifique de diverses altérations génétiques et non de l'unique mutation de *VHL*.

ou des HIF [118]. Des analyses de séquençage sur des ADN et ARN purifiés ont permis d'identifier d'autres gènes impliqués dans le développement comme *PBRM1*, *BAP1* et *SETD2* localisés sur le chromosome 3 mais aussi, entre autres, *ARID1A* et *SMARCA4*. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence l'importance des voies VHL/HIF, de remodelage de la chromatine et PI3K/AKT/mTOR dans le développement de ces carcinomes [119].

Brièvement, différentes mutations sont impliquées dans le développement des sous-types pRCC qui sont biologiquement et cliniquement différents. Le type I est majoritairement caractérisé par une altération de *MET* retrouvée dans 81% des cas. Le type II est quant à lui caractérisé par la perte de *CDKN2A* dans 25% des cas mais aussi par des altérations sur des gènes de modification de la chromatine (*PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*) [120].

Enfin, les chRCC sont caractérisés entre autres par des réarrangements génomiques faisant intervenir la région du promoteur *TERT* [121].

6. Facteurs pronostiques et biomarqueurs

L'intérêt de la médecine quant à l'identification de facteurs pronostiques et biomarqueurs est grandissant car ces derniers permettent de prévoir l'évolution et l'efficacité des traitements ainsi que de poser un diagnostic plus rapide de la maladie et indiquer des pistes de traitements. A l'heure actuelle, au moment du diagnostic la maladie est à un stade métastatique dans 30% des cas [122].

Le pronostic des patients atteints de cancer du rein est évalué et modulé en fonction de différents facteurs : le sous-type histologique, le stade associé à la classification TNM, le grade nucléaire, l'invasion lympho-vasculaire et les composants nécrotiques et sarcomatoïdes. Plus le stade et le grade sont élevés, plus le pronostic est mauvais. De même la présence d'une différenciation sarcomatoïde, définie dans le grade 4 de la nouvelle classification nucléaire proposée par l'ISUP, est associée à un mauvais pronostic [123].

Par ailleurs, une association a pu être établie entre le pronostic et des composants du microenvironnement tumoral. Par exemple, un niveau élevé de lymphocytes T CD8 est associé à un mauvais pronostic dans les RCC mais aussi dans les cancers de la prostate. De même, les patients possédant un taux élevé de lymphocytes T régulateurs ont un plus mauvais pronostic. L'expression de CD39 et CD73 est aussi associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de RCC [124], [125].

Plusieurs algorithmes et nomogrammes pronostiques ont été développés par différents groupes pour établir des programmes de surveillance post-opératoire adaptés aux risques de progression de la maladie mais aussi pour conseiller les patients et déterminer le besoin de traitements adjuvants. Ces modèles sont basés sur la combinaison de caractéristiques pathologiques préalablement citées (sous-type histologique, classification TNM, taille et grade de la tumeur, présence de nécrose) afin de prédire, entre autres, l'échec du traitement, les récurrences ou la survie chez des patients atteints de RCC [126], [127].

Concernant les biomarqueurs, plusieurs pistes sont envisagées mais aucune n'est validée en clinique dans la grande majorité des RCC. Cependant, des biomarqueurs immunohistochimiques sont disponibles pour distinguer deux formes héréditaires : le carcinome rénal associé à la léiomyomatose héréditaire associé à une perte d'expression de la fumarate hydratase et le carcinome rénal déficient en succinate déshydrogénase caractérisé par la perte d'expression de la succinate déshydrogénase B [117]. Des études utilisant l'analyse transcriptomique permettent de caractériser différentes signatures moléculaires pouvant être utiles en tant que biomarqueurs prédictifs de l'efficacité thérapeutique. En effet, un essai français, nommé BIONIKK, constitue la première étude clinique prospective sur la personnalisation du traitement en utilisant les caractéristiques moléculaires de patients atteints de tumeurs ccRCC métastatiques. Cette étude en cours pourrait identifier des biomarqueurs optimaux pouvant être utiles dans l'adaptation des traitements de première intention des tumeurs ccRCC métastatiques [128].

7. Traitements

La stratégie thérapeutique des RCC a considérablement évolué au cours des dernières décennies.

Le traitement de référence pour les cancers localisés est la chirurgie. De nos jours, et dans les cas où cela est possible, une néphrectomie partielle est préférée afin de conserver au maximum la fonction rénale. Les cancers du rein sont un modèle de choix pour l'évaluation de thérapies émergentes telles que la thérapie ciblée et l'immunothérapie. En effet, ces cancers sont très peu sensibles aux thérapies dites conventionnelles : la chimiothérapie et la radiothérapie.

Du fait de ce constat, l'immunothérapie classique était l'un des premiers traitements administrés dans des cas de RCC métastatiques. En effet, les patients recevaient des doses

élevées d'interleukine-2 et des réponses durables étaient observées dans 5 à 10% des cas. Du fait de la toxicité de ce traitement, des doses plus basses d'une autre cytokine, l'interféron- α (IFN α) étaient administrées n'entraînant que peu de bénéfices [129]. Au milieu des années 2000, le traitement des cancers du rein a évolué avec l'apparition des thérapies ciblées contre un facteur de croissance angiogénique : le VEGF. En effet, les ccRCC sont richement vascularisés en grande partie due à la surexpression du VEGF à la suite de la dérégulation du gène *VHL*. Ainsi la mise sur le marché d'inhibiteurs de tyrosine kinase dirigés contre le récepteur du VEGF comme, entre autres, le Sunitinib (SutentTM), le Pazopanib (VotrientTM) et le Cabozantinib ou d'anticorps bloquant le VEGF comme le Bevacizumab (AvastinTM) a révolutionné la prise en charge et constitué un des traitements standards des RCC avancés. Dans le même temps, des inhibiteurs de mTOR comme le Temsirolimus (ToriselTM) ou l'Everolimus (AfinitorTM) impliqués, entre autres, dans l'inhibition de synthèse du VEGF ont été développés et étaient administrés lorsque les traitements anti-angiogéniques précédemment cités ne montraient pas d'efficacité.

Ces traitements ont amélioré la prise en charge de patients mais ont une efficacité modeste. En effet, une étude clinique a montré que le Sorafenib (NexavarTM) avait permis de prolonger la survie des patients mais était associé à une augmentation d'effets indésirables en comparaison avec le groupe Placebo [130]. La montée des résistances ou non réponses vis-à-vis de ces traitements, associés à une efficacité modeste, a conduit au développement de nouvelles thérapies.

Plus récemment, l'immunothérapie ciblée a vu le jour avec des inhibiteurs dirigés contre les points de contrôle du cycle immunitaire : PD1, PDL1 et CTLA4 dans un premier temps. Le Nivolumab (OptivoTM) est un anticorps monoclonal dirigé contre PD-1 et empêche l'interaction du récepteur PD-1 et de ses ligands PD-L1 et L2. Ces ligands sont surexprimés et font obstacle à la réponse immunitaire antitumorale [131].

Compte tenu de l'efficacité des différents traitements seuls et de l'émergence de mécanismes de résistance, de plus en plus de thérapies combinatoires ont vu le jour. Ces thérapies ont pour objectif d'améliorer la réponse et obtenir des effets à long terme en ciblant idéalement plusieurs voies ou plusieurs étapes de la même voie. Ainsi, des inhibiteurs antiangiogéniques comme le Bévacicumab sont utilisés en combinaison avec l'immunothérapie classique (IFN α). De plus, ces dernières années, des combinaisons thérapeutiques impliquant plusieurs inhibiteurs de points de contrôle (Nivolumab +

Ipilimumab) ou un inhibiteur de point de contrôle et un inhibiteur de VEGF (Pembrolizumab + Axitinib) ont montré une très bonne efficacité et font partie des traitements de première ligne. Actuellement, de nombreuses combinaisons thérapeutiques font l'objet de recherches [124].

La société européenne d'oncologie médicale (ESMO) fournit des indications sur la stratégie thérapeutique de première, deuxième et troisième ligne dans les ccRCC et les différents traitements dans le cas des autres RCC. Actuellement, la majorité des traitements sont développés et approuvés au regard du ccRCC qui est le sous-type le plus fréquent [111].

III- RECEPTEURS A DOMAINE DISCOÏDINE ET CANCERS : MECANISMES DE PROGRESSION ET D'INVASION TUMORALE

Les tumeurs ne se composent pas exclusivement de cellules cancéreuses mais aussi d'un microenvironnement tumoral associé dans lequel elles évoluent. Ce dernier est très hétérogène et composé d'éléments cellulaires comme les fibroblastes ou les cellules immunitaires et d'un élément non cellulaire : la matrice extracellulaire (MEC). Ce microenvironnement n'est pas inerte et influence le développement tumoral et la progression de la maladie via les interactions entre ses composants et les cellules cancéreuses.

A) Microenvironnement tumoral

1. Composants cellulaires du microenvironnement

La composante cellulaire du microenvironnement est constituée de diverses cellules incluses dans la MEC. On retrouve ainsi principalement des fibroblastes produisant des éléments de la MEC notamment le collagène mais aussi des cellules endothéliales vasculaires, des cellules du système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes etc.) et des adipocytes. En condition normale, le microenvironnement joue un rôle de suppresseur de tumeurs via les cellules des réponses immunitaires innées (macrophages, neutrophiles) et adaptatives (lymphocytes T et B). Ces dernières vont migrer jusqu'aux cellules anormales et les détruire. En condition pathologique, la structure et la composition du microenvironnement diffèrent afin de favoriser le développement tumoral. En effet, lors du développement il n'y a plus de délimitation entre le compartiment épithélial et conjonctif et les cellules du stroma sont contrôlées par la tumeur pour répondre à ses besoins. Ce microenvironnement tumoral sera sujet à de nombreuses variations au cours des différentes étapes du développement

tumoral, s'adaptant entre les phases précoces de croissance et d'invasion locale et les phases plus tardives d'invasion métastatique [132].

2. La matrice extracellulaire

a) Structure et fonction

La MEC est un réseau complexe et spécialisé de macromolécules (de nature protéiques et glucidiques) en 3 dimensions faisant le lien entre différentes cellules et donnant lieu à l'élaboration de tissus [133].

En se basant sur les caractéristiques structurales et biochimiques, la MEC peut être divisée en 2 parties (**Figure 25**) :

- La membrane basale : Cette MEC particulière, sur laquelle reposent les cellules épithéliales, est retrouvée à l'interface entre un épithélium et le tissu conjonctif. Elle est constituée majoritairement de réseaux de collagène IV et de laminine. Ces 2 derniers composants interagissent via des molécules de pontage comme le perlecan et le nidogène. La fonction principale de cette membrane est d'établir une barrière physique entre les cellules épithéliales et le stroma tout en permettant les échanges gazeux et le passage d'effecteurs de voies de signalisation [133].
- La matrice interstitielle : Cette matrice, sous-jacente et étroitement connectée à la membrane basale, est retrouvée dans les espaces intercellulaires du tissu conjonctif. Produite par les cellules mésenchymateuses, elle est composée de différents collagènes (I et III majoritairement), de fibronectine et de protéoglycanes. Les cellules résidentes possèdent des récepteurs de la MEC, principalement les intégrines mais aussi d'autres récepteurs comme le CD44 ou les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) [133].

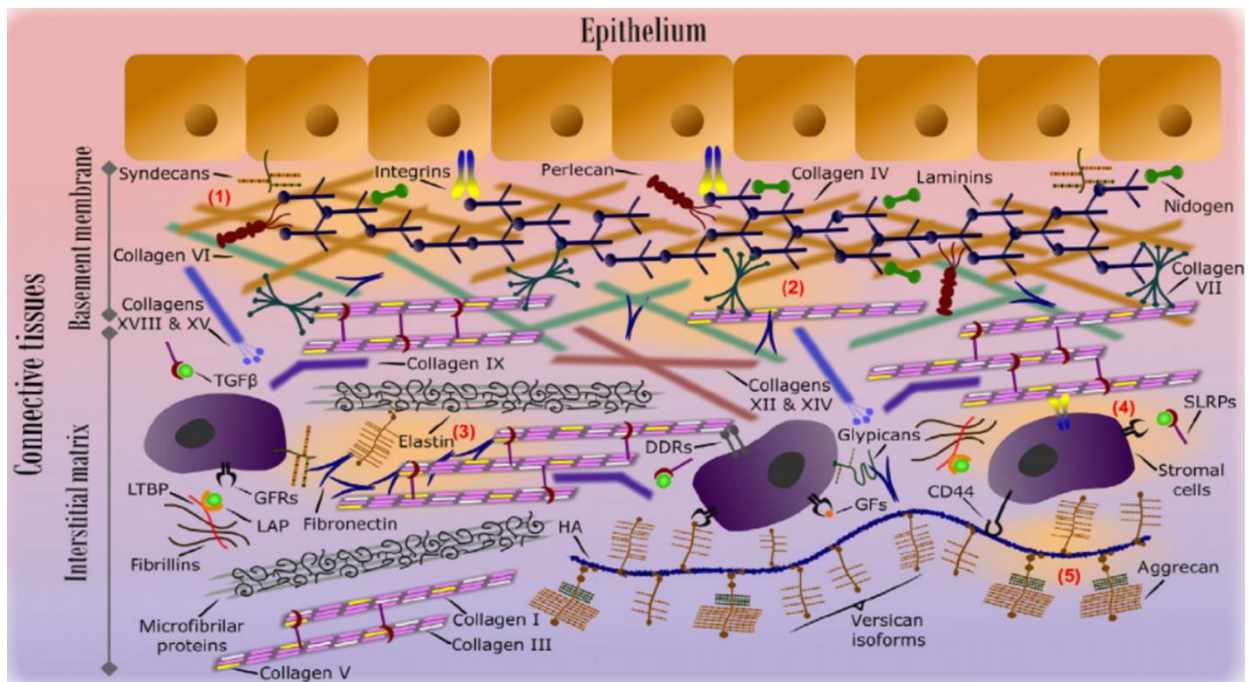


Figure 25 : La matrice extracellulaire. La MEC est constituée d'une membrane basale (1) composée majoritairement de réseaux de collagène IV et de laminine, reliés à une matrice interstitielle via des fibres de collagène (2). La matrice interstitielle (3) est composée principalement de collagènes I/III et de fibronectine et contient des cellules comportant différents récepteurs de la MEC (4). La rigidité de la matrice est assurée en partie par les protéoglycanes et les molécules d'élastine (5) [133].

Pendant longtemps, la MEC était considérée comme un réseau inerte de soutien et de structure cellulaire. Le maintien de la MEC permet de garantir l'intégrité mécanique et structurelle tissulaire essentielles à leurs fonctionnements. Cependant, par l'intermédiaire de signaux mécaniques et chimiques propres ou via l'interaction avec ses différents récepteurs, la MEC est aussi capable de réguler la fonction et le comportement des cellules et influencer sur des mécanismes cellulaires comme la prolifération, la différenciation ou la migration. La MEC est une structure très dynamique et en perpétuel remodelage autant dans des processus physiologiques (cicatrisation) que pathologiques comme la fibrose ou le cancer [133].

b) Composition

Les composants de la MEC peuvent être divisés en deux groupes, dont l'abondance relative est responsable de la rigidité de la MEC :

- Le premier groupe est constitué de molécules principalement saccharidiques, notamment les protéoglycanes formant la substance fondamentale (amorphe et de consistance semi-fluide, composée d'ions, d'eau et de constituants non fibrillaires).
- Le deuxième regroupe les protéines fibreuses (entre autres collagène, fibronectine, laminine, élastine etc.) responsables de la structure de la MEC.

Dans le cadre de ce travail, la fibronectine et le collagène seront développés plus en détail.

➤ Substance fondamentale : protéoglycanes

Les protéoglycanes sont constitués de l'association d'une protéine à laquelle s'attache des glycosaminoglycanes (GAG). Il existe 6 différents types de GAG comme l'héparane sulfate, l'hyaluronane (acide hyaluronique) ou la chondroïtine. Au sein de la MEC, les protéoglycanes sont très diversifiés et exercent leurs fonctions entre autres via des interactions avec les différents constituants de la MEC : récepteurs, facteurs de croissance, enzymes etc. [133].

➤ Les protéines fibreuses

- *Les fibres élastiques*

Ces fibres sont retrouvées particulièrement dans des tissus soumis à un étirement continu (poumons, peau etc.). Les monomères de tropoélastine, sous-unités de l'élastine constituées de domaines contenant de la lysine et de domaines hydrophobes, s'autoassemblent et sont modifiées par les enzymes lysyl oxydases (LOX) afin de former des fibres élastiques matures. Ces fibres d'élastine forment un réseau avec, entre autres, des microfibrilles de fibrilline ou de fibuline [133].

- *Les glycoprotéines d'adhésion cellulaire : Laminine et Fibronectine*

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques composées de l'association de 3 chaînes polypeptidiques : α , β , γ . Malgré une multitude d'associations possibles, à ce jour, seules 16 combinaisons ont été identifiées. Comme précédemment évoqué, les laminines s'assemblent pour former un réseau qui interagit avec le réseau de collagène IV dans la membrane basale. Elles peuvent aussi interagir avec les cellules épithéliales via les intégrines ou les protéoglycanes pour réguler la migration ou la différenciation cellulaire [133].

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine dimérique formée par l'association entre 2 sous-unités identiques reliées par des ponts disulfures et exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus. Chaque sous-unité est composée de 3 modules de répétitions : type I, type II et type III qui contiennent des sites de liaison pour des composants et récepteurs de la MEC comme le collagène ou les intégrines. Bien que la FN ne soit codée que par un seul gène, il existe chez l'humain diverses isoformes dues à l'épissage alternatif de l'ARNm. La FN semble jouer un rôle à différents niveaux lors de la progression tumorale notamment en favorisant la prolifération, l'angiogenèse et l'invasion [134]. Dans le stroma des RCC, la FN1 ou son variant EDA-FN sont largement distribués [135]. Très récemment, il a été montré que la FN favorisait la croissance

et la migration de 2 lignées cellulaires de RCC, en formant potentiellement un réseau interactif avec Src et TGF- β 1/Smad [136]. De plus, la FN1 a été identifiée à de mauvais pronostics dans les ccRCC, associée à un taux de mortalité plus élevé [137].

- *Les collagènes*

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères représentant 30 % de la masse protéique. La famille des collagènes est constituée de 28 membres (de I à XXVIII) possédant une caractéristique commune, à savoir la présence d'une triple hélice. Cette dernière, formée par l'association de 3 chaînes polypeptidiques α , peut représenter de 10% (collagène XII) à 90% de leur structure, comme c'est le cas pour le collagène I. Il existe, en plus, une diversité due à la présence de plusieurs isoformes moléculaires pour le même type de collagène (par exemple le collagène IV) ou d'isoformes hybrides constituées de chaînes appartenant à deux collagènes différents (**Figure 26**).



Figure 26 : Structures des différents collagènes.

Représentation de quelques structures de collagènes. Ces derniers sont caractérisés par la présence d'une triple hélice et se différencient par l'ajout d'autres domaines.

Certains collagènes (indiqués en rouge) possèdent des isoformes de chaînes contribuant à la diversité moléculaire de ces derniers. Adaptée de [138].

Les collagènes sont tout d'abord synthétisés sous la forme de procollagènes transformés en tropocollagènes sous l'action de peptidases. L'association des molécules de tropocollagènes va aboutir à la formation de polymères de collagène. En fonction de la

structure formée par les polymères, les collagènes peuvent être divisés en plusieurs sous-familles de collagènes fibrillaires et non fibrillaires. Par exemple, les collagènes fibrillaires (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII), assemblés sous forme de fibres sont les plus abondants dans les tissus. Parmi les collagènes non fibrillaires, on retrouve la sous-famille des FACIT (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices) constituée par exemple des collagènes IX, XII et XIV. Les FACIT ne forment pas de fibrilles mais sont associés à la surface des collagènes fibrillaires. D'autres collagènes (IV, VIII et X) forment des feuilletts et s'organisent en réseaux que l'on retrouve au niveau des membranes basales des épithéliums [138], [139] (**Figure 27**).

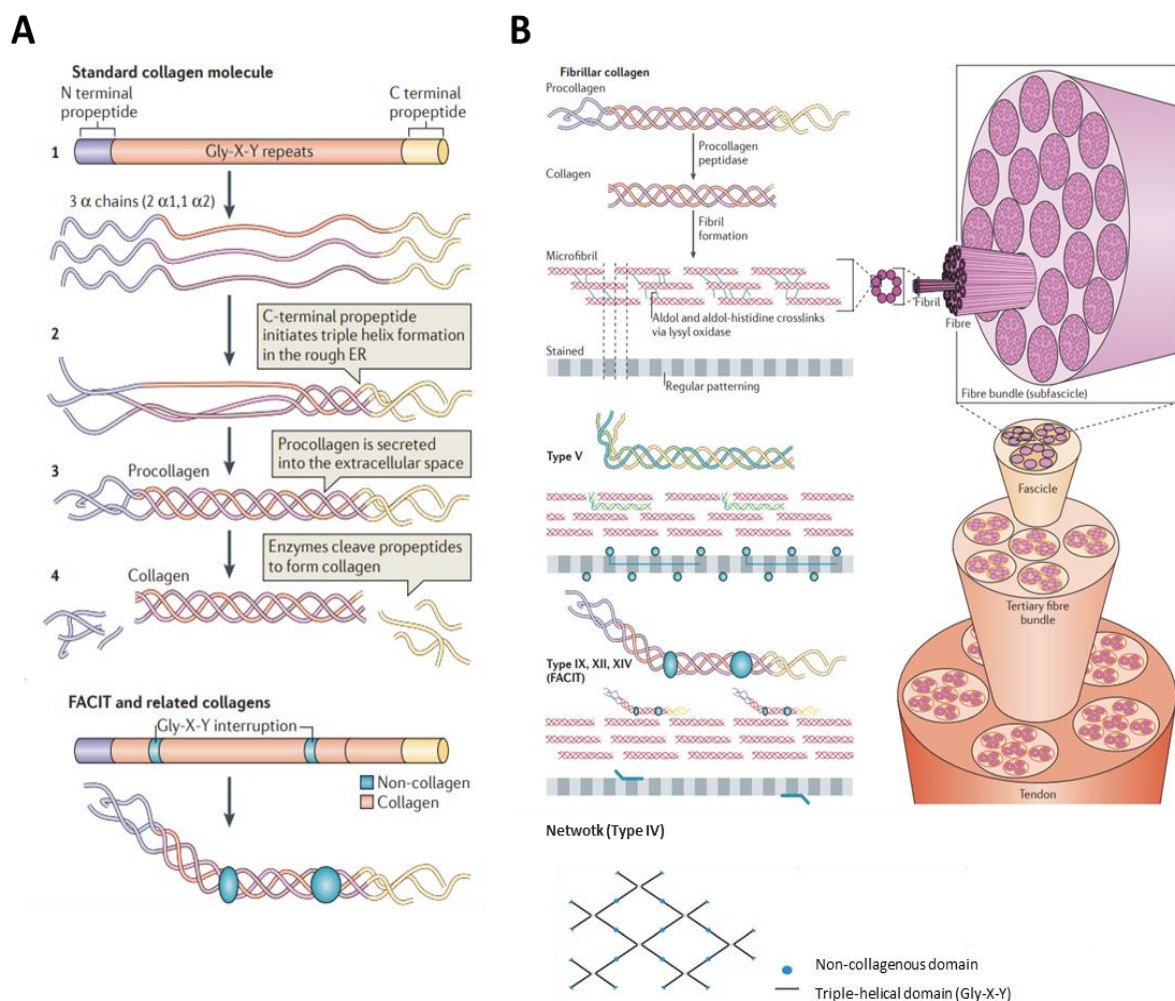


Figure 27 : Biosynthèse et organisation des différents types de collagènes. A/ Représentation du processus de biosynthèse de collagènes standards (fibrillaires par exemple) ou de FACIT et collagènes associés. **B/** Représentation de l'organisation des différentes familles de collagènes après la biosynthèse. Adaptée de [138] et [139].

Durant de nombreuses années, il était considéré que le rôle du collagène se limitait à fournir un support structural aux cellules. Mais au cours de la dernière décennie, de plus en plus d'études prouvent que ce dernier joue des rôles supplémentaires et notamment dans la

progression tumorale. L'expression des collagènes est dérégulée à la hausse lors du développement des cancers comme entre autres le collagène I dans le cancer du sein ou le médulloblastome [140], [141]. De plus, plusieurs études ont montré qu'une expression élevée de collagène était associée à un plus mauvais pronostic (augmentation de la prolifération, invasion, métastases, récurrence ou réduction de la survie) dans de nombreux cancers comme le cancer du poumon ou de la prostate. Cependant, il est possible que le collagène puisse avoir des rôles antitumoraux en limitant l'activation des cellules tumorales et en constituant un obstacle à la croissance tumorale [142].

D'autres formes de collagènes peuvent agir sur les cellules environnantes. En effet, les peptides formés à partir de la dégradation des collagènes (notamment I et IV) mais aussi d'autres éléments de la MEC sont divisés en matrikines naturelles ou matricryptines et peuvent aussi contribuer à diverses réponses sur les cellules voisines. C'est le cas, par exemple, du peptide actif du collagène I, Proline-glycine-proline qui possède un rôle chimio attractif envers les neutrophiles ou le peptide actif du collagène IV, la Pentastin-1, qui possède des effets antiangiogéniques dans les tissus du sein et du poumon [143]. De manière similaire l'endostatine, un peptide actif du collagène XVIII produit par l'hémangioendothéliome, inhibe aussi l'angiogenèse et la croissance tumorale [144].

Dans les cancers, le collagène peut exercer ses effets de 2 manières différentes. La première manière passe par l'organisation spatiale et structurelle du collagène pouvant limiter le développement tumoral, ou au contraire, le favoriser en créant une voie migratoire pour les cellules tumorales (voir plus bas – production d'une nouvelle matrice). La deuxième manière pour le collagène de réguler le comportement cellulaire est via la liaison sur des récepteurs extracellulaires provoquant diverses signalisations intracellulaires, contrôlant des processus biologiques comme la prolifération ou la migration cellulaire.

c) Récepteurs aux collagènes

Différents récepteurs sont capables de lier le collagène (**Figure 28**). On les retrouve dans les plaquettes (GPVI), dans les cellules immunitaires (LAIR-1), les ostéoclastes (OSCAR), ou les fibroblastes, lymphocytes ou cellules de mélanomes (GPR56). Dans le cadre de ce travail, seules les intégrines, et plus particulièrement les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) retrouvés, entre autres, dans les cellules épithéliales et dans les cancers du rein, seront développés [145].

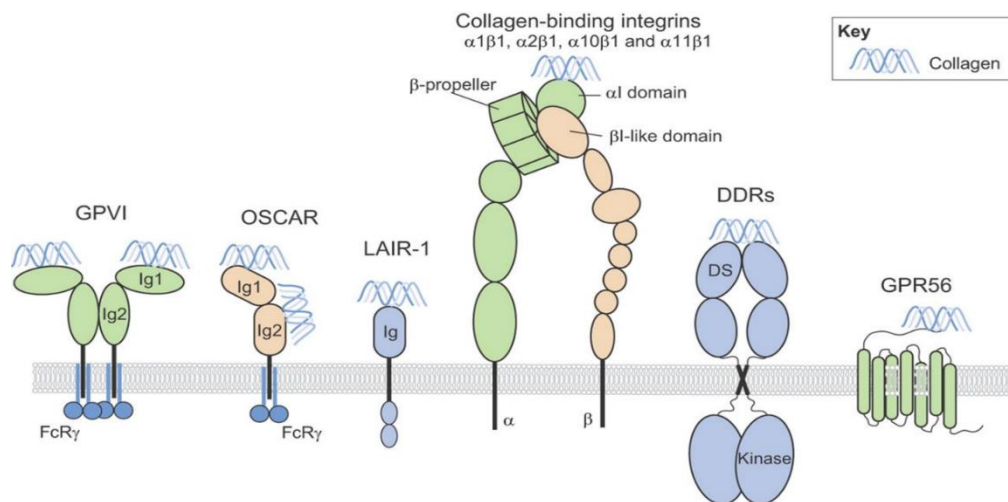


Figure 28 : Principaux récepteurs aux collagènes. Ces récepteurs aux collagènes sont différents du fait de leurs structures, leurs localisations, leurs affinités pour le collagène et leurs fonctions au sein de divers processus [145].

➤ Les intégrines

Les intégrines représentent les principaux récepteurs aux collagènes présents dans les cellules cancéreuses. Ces récepteurs sont des hétérodimères constitués de 2 sous-unités, α et β , associées de façon non covalente (**Figure 28**). La famille des intégrines est constituée de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β pouvant s'associer en 24 hétérodimères différents. Comme évoqué précédemment, les intégrines peuvent lier le collagène ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$, et $\alpha11\beta1$) mais aussi d'autres composants de la MEC comme la laminine (comme $\alpha3\beta1$ ou $\alpha6\beta4$) ou la fibronectine ($\alpha4\beta1$ ou $\alpha5\beta1$ par exemple) [146]. Lors du développement tumoral, selon les intégrines exprimées, des effets sont observés sur différents mécanismes clés comme la prolifération, l'invasion et la survie cellulaire. La signalisation intracellulaire des intégrines est médiée par l'activation des protéines SFK (Src Family Kinase), FAK (Focal Adhesion Kinase) et PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) [147].

➤ Récepteurs à domaine discoïdine (DDR)

Les DDR constituent une famille de récepteurs membranaires à domaine tyrosine kinase, comportant deux membres DDR1 et DDR2. Découverts par clonage par homologie de séquence, les DDR sont considérés comme récepteurs orphelins jusqu'en 1997 lorsque des études montrèrent que différents types de collagènes constituaient les ligands fonctionnels de ces récepteurs [148].

- *Structure*

D'un point de vue structural, les récepteurs sont constitués de 3 grands domaines : un domaine extracellulaire, un transmembranaire (TD) et un intracellulaire (**Figure 29**).

La partie extracellulaire comprend :

- Un domaine discoïdine similaire au domaine lectine discoïdine I de l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Ce domaine est le site de fixation des ligands comprenant les collagènes mais aussi plus récemment la periostine dans le cas de DDR1.
- Un domaine semblable au domaine discoïdine.
- Un domaine extracellulaire juxta-membranaire (EJXM).

La partie intracellulaire comprend :

- Un domaine intracellulaire juxta-membranaire (IJXM).
- Un domaine tyrosine kinase (TKD) qui possède le domaine catalytique de la kinase responsable de la signalisation intracellulaire.

DDR1 et DDR2 sont codés par des gènes uniques situés respectivement sur le chromosome 6 (6p21.33) et 1 (1q23.3). A ce jour, il n'y a pas d'isoformes connues pour DDR2 contrairement à DDR1 qui en possède 5 (a, b, c, d et e) formées par épissage alternatif. Les isoformes a à c sont des isoformes dont l'activité tyrosine kinase est active alors que les isoformes d et e, déficiente (d) ou mutée (e) sur le domaine kinase possèdent une activité tyrosine kinase inactive et sont peu étudiées. La différence entre les isoformes a, b, c est la présence d'une séquence de 37 acides aminés au sein du domaine IJXM dans DDR1b et c par rapport à l'isoforme a. Cette insertion de 37 acides aminés contient des résidus tyrosines supplémentaires en particulier Tyr513 jouant un rôle critique dans la signalisation de DDR1. Enfin DDR1c se différencie de DDR1b par la présence de 6 acides aminés supplémentaires dans le domaine kinase (**Figure 29**). DDR1a et b sont les isoformes principalement exprimées dans diverses cellules et les plus étudiées [149]. Ces isoformes, très rarement étudiées

simultanément, peuvent présenter des effets différents au sein du même cancer. Par exemple, dans le cancer du poumon non à petites cellules, DDR1a induit des effets plus importants sur la migration et l'invasion que DDR1b [150].

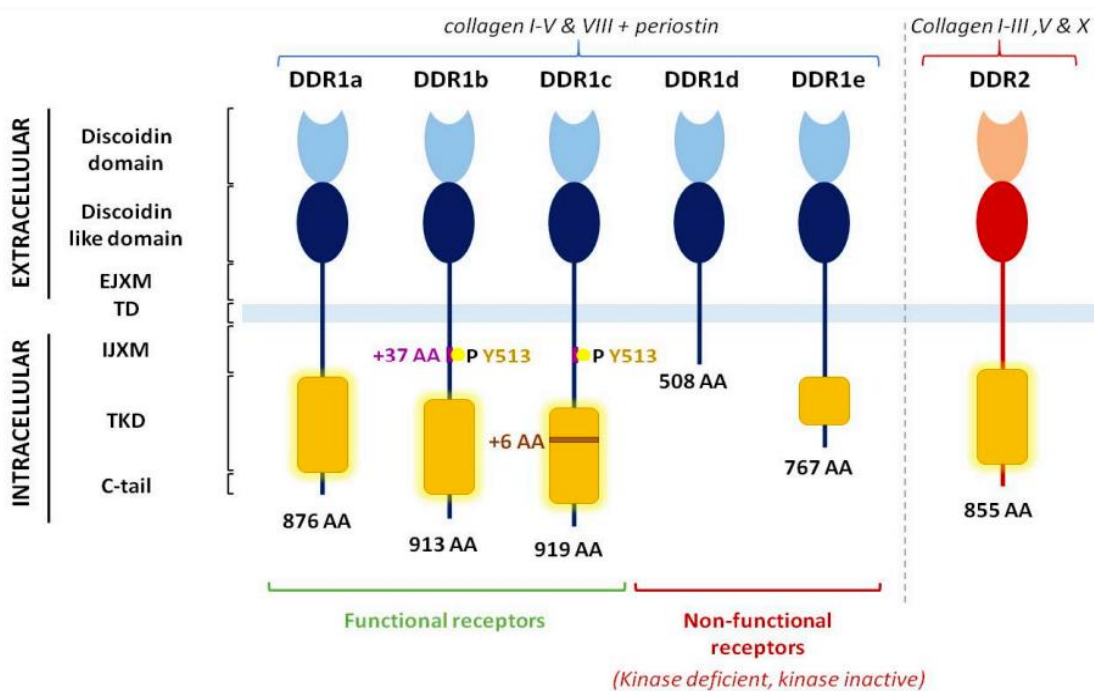


Figure 29 : Représentation schématique des DDR. DDR1 possède 5 isoformes dont 3 (a, b, c) dites fonctionnelles et possédant une activité tyrosine kinase active et 2 (d et e) considérées comme non fonctionnelles au niveau de leur activité tyrosine kinase inactive. A ce jour il n'y a pas d'isoforme connue pour DDR2 [149].

- **Activation**

L'activation des récepteurs est initiée par la liaison des ligands (principalement les collagènes). Les deux récepteurs lient les collagènes fibrillaires (mais ne reconnaissent pas les dérivés du collagène comme la gélatine) et possèdent des spécificités de ligands. En effet, DDR1 lie préférentiellement les collagènes I-V et VIII alors que DDR2 se lie aux collagènes I-III, V et X [151].

Les DDR sont des récepteurs à tyrosine kinase particuliers du fait de leur temps d'activation. En effet, contrairement aux autres récepteurs à tyrosine kinase dont l'activation ne prend que quelques secondes à quelques minutes, l'activation des DDR est très lente, optimale au bout de quelques heures et pouvant persister pendant plus de 24h [148]. En l'absence de ligands, une population mixte de monomères et d'homodimères de DDR est exprimée à la surface cellulaire. La liaison du ligand induit la phosphorylation de résidus tyrosines ainsi qu'un changement de conformation des récepteurs provoquant l'oligomérisation et la clusterisation rapide de DDR1 (isoforme b). En revanche, dans un

premier temps, après liaison du ligand, la distribution de DDR2 semble inchangée et homogène à la surface cellulaire, ne formant des clusters qu'après une stimulation prolongée par le collagène [152]. L'activation canonique des récepteurs DDR induit la phosphorylation des résidus (par exemple Tyr792, 796, 513 (isoforme b) pour DDR1 et Tyr740 pour DDR2) menant aux recrutements de protéines adaptatrices et à l'expression de diverses voies de signalisation en aval [148] (**Figure 30**). L'implication de la kinase Src s'est avérée importante pour l'activation maximale de DDR2, phosphorylant la Tyr740 lors de la liaison du collagène [153]. Par ailleurs, l'implication de cette kinase dans l'activation et la phosphorylation complète de DDR1 a aussi été démontrée dans la migration des cellules musculaires lisses [154].

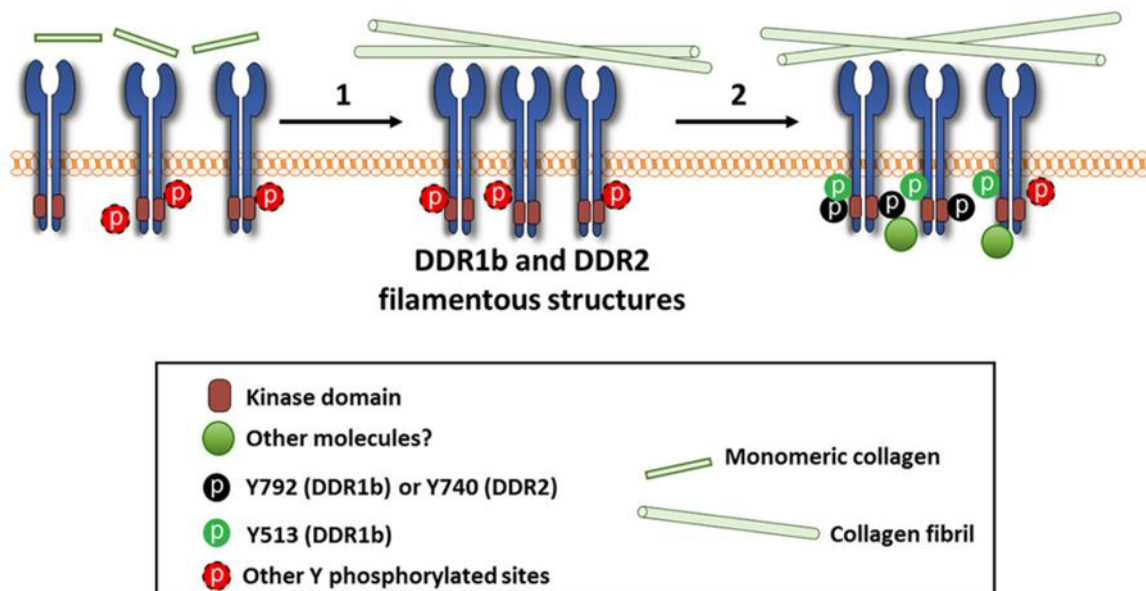


Figure 30 : Représentation schématique de l'activation des récepteurs DDR. La fixation du collagène sur le récepteur entraîne la phosphorylation de divers résidus tyrosines et la formation de clusters menant à l'activation de multiples voies intracellulaires. Adaptée de [152].

Récemment, une voie non canonique d'activation a été décrite pour DDR1b. Dans ce cas-là, la liaison du collagène soluble monomérique sur DDR1b induit un regroupement rapide en petits clusters (30 min), menant à l'internalisation par endocytose et à la réexpression à la surface cellulaire de DDR1b phosphorylée sur la tyrosine 513 située dans l'IJXM. Actuellement, l'étape à laquelle se produit la phosphorylation (lors de l'internalisation ou du recyclage à la membrane) n'est pas clairement identifiée. Par la suite, si des collagènes fibrillaires sont présents, des clusters linéaires de DDR1b se forment menant à l'activation canonique du récepteur. Cette voie est dite non canonique car elle mène à la phosphorylation de tyrosine kinase dans l'IJXM et non dans le domaine kinase. Cette dernière n'est possible qu'avec DDR1b

et c, l'isoforme a ne possédant pas la tyrosine 513 qui, par ailleurs, ne possède pas non plus d'équivalent chez DDR2 (**Figure 31**) [155].

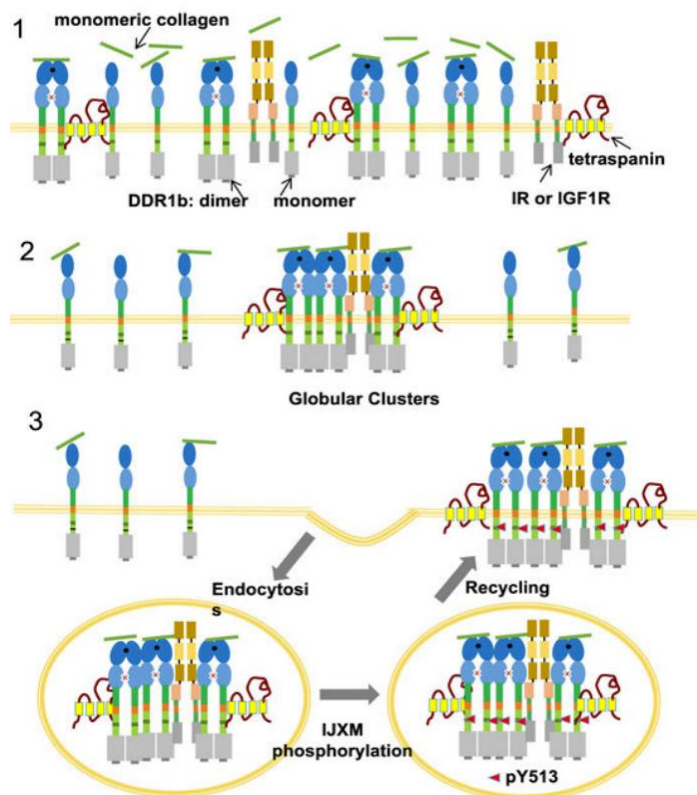


Figure 31 : Représentation schématique de l'activation non canonique des DDR.

1-2 : Les dimères DDR1b se regroupent en clusters après liaison du collagène soluble. Dans ces clusters il est possible de trouver d'autres récepteurs avec lequel DDR1 interagit comme les récepteurs du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGFR1) ou les récepteurs à l'insuline (IR). 3 : Ces clusters nouvellement formés sont internalisés par endocytose puis réexprimés à la surface cellulaire en présentant une phosphorylation sur le résidu Y513 [155].

- *Signalisation*

L'implication des DDR dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la migration ou l'invasion est médiée par l'activation de diverses voies intracellulaires telles que Ras/Raf/ERK/MEK, PI3K/AKT (DDR1) ou encore JAK/ERK (DDR2). Il est important de noter que ces récepteurs peuvent induire des signalisations intracellulaires indépendantes de la liaison du collagène ou de leur activité tyrosine kinase. De plus, les DDR sont capables d'interagir avec d'autres récepteurs (par exemple les intégrines (DDR1) ou les récepteurs à l'insuline (DDR2)) afin de moduler les processus cellulaires (**Figure 32**) [156]. Des interactions entre DDR1 et les récepteurs à l'insuline ont aussi été démontrées par exemple dans le cancer de la thyroïde induisant la prolifération et l'invasion cellulaire [157]. Actuellement, plus de connaissances sont disponibles sur les signalisations intracellulaires induites par DDR1.

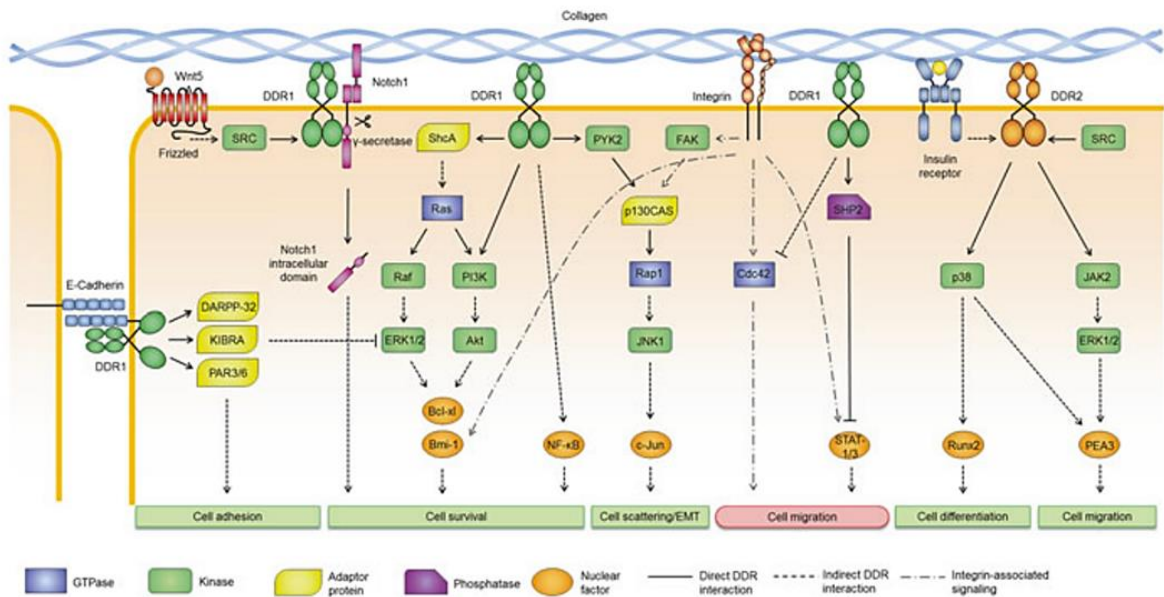


Figure 32 : Signalisations intracellulaires induites par les DDR. Représentation schématique des voies de signalisation induites par les récepteurs DDR ou leurs interactions avec d'autres partenaires régulant des processus biologiques comme la migration, la survie ou l'adhésion cellulaire [156].

- **Fonctions**

Les DDR jouent des rôles lors de processus physiologiques notamment lors du développement. En effet, DDR1 est crucial lors de l'organogenèse et DDR2 est impliqué dans la croissance osseuse. DDR1 est plus particulièrement exprimé dans les cellules épithéliales (notamment du rein mais aussi du poumon, du cerveau, etc.) et DDR2 est plutôt exprimé dans les cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif (fibroblastes, chondrocytes et ostéoblastes) [148].

Les souris dépourvues de DDR1 sont de petites tailles, les femelles présentant de nombreux défauts de reproduction avec une altération possible de l'implantation des blastocystes les rendant infertiles [158]. L'effet le plus prononcé est un défaut dans le branchement des glandes mammaires conduisant à un manque de lactation. DDR1 participe à la signalisation régulant le processus de lactation en contrôlant la transcription et la phosphorylation de Stat 5 [159]. Un défaut d'expression de DDR1 chez la souris mène aussi à des altérations architecturales du rein et de l'oreille interne. Au niveau des reins, aucun défaut n'est apparent. Cependant ces derniers possèdent une membrane glomérulaire altérée menant à une surproduction de matrice et au développement d'une légère protéinurie [160].

Les souris dépourvues de DDR2 présentent un nanisme, avec un museau et des os longs plus courts, dû à une diminution de prolifération des chondrocytes [161]. DDR2 est un

régulateur crucial de la croissance osseuse et est impliqué à différentes étapes du processus notamment dans l'ossification endochondrale en contrôlant la maturation des chondrocytes et dans l'ossification membranaire (développement des os du crâne) en régulant la différenciation des ostéoblastes via la modulation d'expression de Runx2 [162].

Mis à part leur rôle lors du développement, les DDR sont aussi impliqués lors de processus pathologiques comme la fibrose. Ainsi, DDR1 est impliqué dans la régulation des processus fibrotiques et d'inflammation pulmonaire via p38MAPK, les souris DDR1^{-/-} ne présentant pas d'activation de p38MAPK et étant protégées des lésions pulmonaires induites par la bléomycine [163]. De même, DDR2 semble impliqué dans le processus de fibrose hépatique. En effet, DDR2 est crucial pour l'activation, la prolifération et l'invasion des cellules stellaires hépatiques impliquées dans la fibrose [164]. Cependant, des résultats contradictoires montrent que les souris DDR2^{-/-} présentent une augmentation de l'inflammation et de la fibrose hépatique en réponse à du tétrachlorure de carbone suggérant un rôle protecteur de DDR2 régulant l'interaction entre les macrophages et les cellules stellaires hépatiques [165].

L'implication des DDR dans les cancers, autres processus pathologiques, fait l'objet d'un grand nombre de publications. En effet, la modulation de l'expression des DDR à la hausse est souvent associée à de plus mauvais pronostics et contribue au développement tumoral.

B) DDR1 et développement tumoral

1. DDR1 et Hallmark du cancer

En 2000 puis 2011, Hanahan & Weinberg ont défini en tout 8 capacités distinctives acquises par les cellules cancéreuses au cours du développement tumoral, ainsi que 2 paramètres permissifs favorisant l'apparition des cancers. Ces différentes caractéristiques mettent en lumière et récapitulent la complexité du développement tumoral nécessitant des interactions permanentes entre les cellules tumorales et le microenvironnement [166]. L'implication de DDR1 et DDR2 a été prouvée dans certaines de ces caractéristiques cruciales dans la progression tumorale et la formation des métastases et considérées comme acquises dans la grande majorité, voire la totalité, des cancers (**Figure 33**) [167].

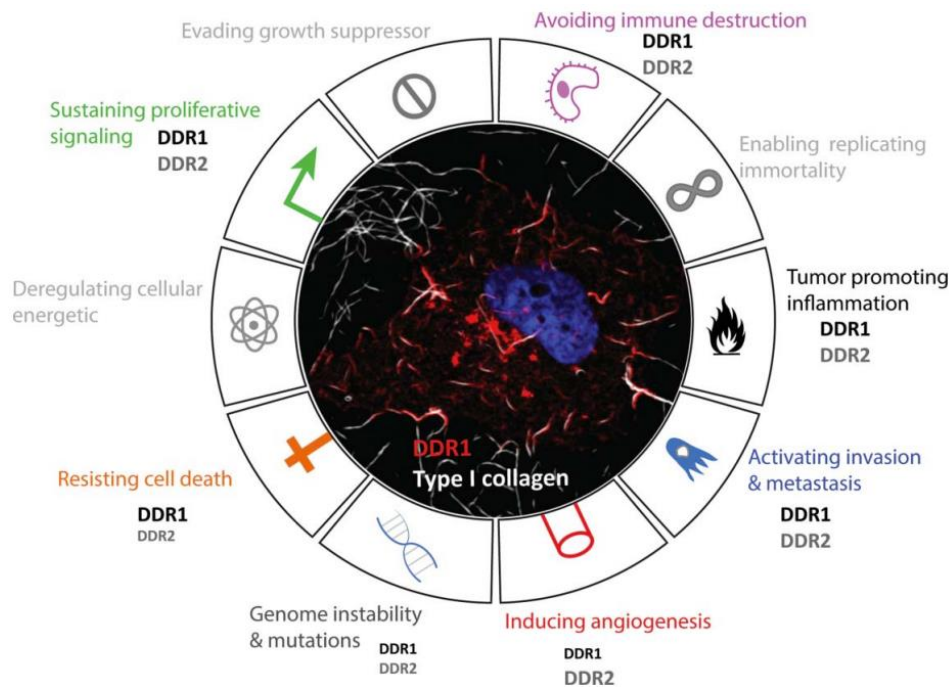


Figure 33 : Implication des DDR dans les différentes hallmarks du cancer. Ces récepteurs jouent un rôle important dans la grande majorité des hallmarks du cancer et contribuent aux divers mécanismes de la progression tumorale [167].

Ce travail de thèse s'étant focalisé sur le rôle de DDR1, l'implication de DDR2 dans le développement tumoral ne sera pas détaillée dans la partie suivante. Ainsi DDR1 peut avoir un impact positif ou négatif sur la croissance tumorale en contrôlant la prolifération et l'apoptose, en favorisant l'inflammation via l'activation de cellules immunitaires ainsi que l'invasion et la dissémination métastatique par divers mécanismes. De plus, des mutations de DDR1 sont retrouvées dans les cancers de l'endomètre et les leucémies myéloïdes contribuant à l'instabilité génomique [167].

2. Implication de DDR1 dans le développement tumoral

Le développement tumoral peut être divisé en 3 grandes étapes à savoir, la formation et la croissance de la tumeur primaire suivie de son invasion locale puis à distance vers d'autres sites.

a) Formation et croissance de la tumeur primaire

Le développement tumoral débute par la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse, via de nombreux processus comme l'activation ou l'inactivation de certains gènes. Bien qu'un rôle de DDR1 lors de l'initiation tumorale n'ait pas été mis en évidence, ce dernier est essentiel lors des phases précoces du développement et de la progression tumorale d'un adénocarcinome pulmonaire induit par l'altération du gène *KRAS*

[168]. La prolifération de cette cellule cancéreuse va aboutir à la génération de la tumeur primaire.

De nombreuses études ont montré l'implication positive ou négative de DDR1 dans la croissance tumorale. En effet, dans de nombreux cancers (gastrique, pancréatique, sarcome, sein, poumon etc.) DDR1 favorise la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* via divers mécanismes. Par exemple, dans le cancer de la prostate, l'antigène PCA-1 augmente les niveaux d'expression de DDR1 et de la molécule anti-apoptotique Bcl-xl entraînant une inhibition de l'apoptose [169]. De plus, DDR1 favorise la survie des cellules cancéreuses via le contrôle de la voie Ras/Raf/MEK/MAPK entraînant l'expression d'une boucle positive sur l'expression de la protéine suppresseur de tumeur p53. L'augmentation de p53 induit aussi une hausse d'expression de sa cible transcriptionnelle DDR1, favorisant à son tour la survie des cellules par l'expression de AKT [170]. *In vivo*, dans le cas de l'adénocarcinome pancréatique, les souris dépourvues de DDR1 présentent des tumeurs moins prolifératives [171]. Enfin, dans le cancer du sein, le rôle de DDR1 dans la prolifération ou la survie des cellules cancéreuses est en partie dépendant du type cellulaire. En effet, la lignée cellulaire MCF-7 de type luminal présente un niveau d'expression élevé pour DDR1 et bas pour MT1-MMP, alors que la lignée MDA-MD-231 de type basal présente au contraire un niveau d'expression bas de DDR1 et élevé pour MT1-MMP. Dans le cas des cellules MCF-7, DDR1 induit l'inhibition de la croissance cellulaire et favorise l'apoptose via la régulation positive d'une molécule pro-apoptotique BIK. A contrario, dans les cellules MDA-MD-231, la dégradation du collagène I et le clivage de DDR1 par MT1-MMP protègent les cellules de l'apoptose et favorisent la prolifération cellulaire [172], [173].

Comme évoqué plus haut, le microenvironnement est impliqué dans la progression de la tumeur primaire du fait de son organisation structurale et de sa composition cellulaire (**Figure 34**). Afin de poursuivre son développement, la tumeur va transformer à son avantage les cellules du stroma et notamment les fibroblastes devenant des fibroblastes associés au cancer (CAF). Certaines études ont mis en évidence une interaction entre DDR1 et les CAF *in vitro* et *in vivo*. En effet, *in vitro* le potentiel tumorigène des cellules cancéreuses gastriques est augmenté par les CAF qui régulent à la hausse l'expression de DDR1 dans les cellules tumorales via l'activation de STAT 3. Dans ce même cancer, l'inhibition de DDR1 *in vivo* entraîne une diminution du nombre de nodules tumoraux altérant la tumorigénèse initiée par les CAF [174]. Les fibroblastes ne sont pas les seules cellules détournées par la tumeur à son

avantage, les cellules immunitaires et les adipocytes sont aussi contrôlés par la tumeur, lui permettant, entre autres, d'échapper à la surveillance immune. Par ailleurs, DDR1 est capable de réguler certaines propriétés des cellules immunitaires. En effet, DDR1 favorise la migration des lymphocytes T helper 17 via différentes voies de signalisation : p38 MAPK [175], ou la voie RhoA/ROCK/MAPK/ERK [176].

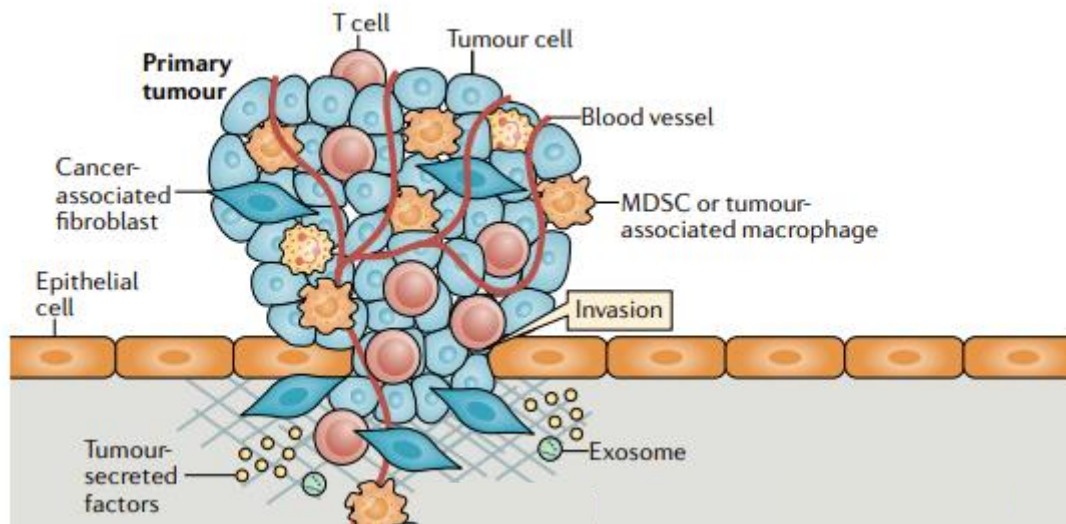


Figure 34 : Représentation schématique du microenvironnement de la tumeur primaire. La tumeur primaire est composée de cellules cancéreuses et de cellules stromales détournées à son profit comme les fibroblastes ou les cellules immunitaires (macrophages ou les cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSC) par exemple). Adaptée de [213].

b) Mécanismes d'invasion locale

Le processus d'invasion locale des tumeurs ne peut débuter qu'après la destruction de la membrane basale délimitant les compartiment épithéliaux et conjonctifs adjacents.

➤ Remodelage et dégradation de la matrice extracellulaire

Le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire sont rendus possibles par l'activité d'enzymes en particulier les métalloprotéinases matricielles (MMP), mais aussi d'autres enzymes comme les lysyl oxydases (LOX) (**Figure 35**) [177].

Les MMP, principales enzymes de la MEC, sont capables de dégrader l'ensemble des constituants de cette dernière. Actuellement 23 MMP ont été identifiées chez l'humain et ces enzymes sont divisées en 6 familles, en fonction du ligand qu'elles dégradent. Ainsi, on peut distinguer notamment la famille des collagénases (MMP1, 8 et 13) dégradant le collagène et ses dérivés, la famille des gélatinases (MMP2 et 9) dégradant la gélatine et la famille des MMP membranaires au nombre de 5 (MT-MMP1 à 5 ou MMP14, 15, 16, 17 et 24). Elles sont

synthétisées et sécrétées sous la forme de proenzymes inactives qui seront activées par protéolyse. La régulation de ces enzymes passe par des inhibiteurs comme l' α 2-macroglobuline dans le plasma et les TIMP au nombre de 4 (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) dans les tissus [178].

Dans les cancers, ce sont surtout les MMP2 et 9 qui ont été identifiées comme impliquées dans le remodelage et la dégradation de la membrane basale. Un certain nombre d'études ont mis en évidence la capacité de DDR1 à augmenter l'expression et l'activité de ces MMP dans le cancer colorectal [179] ou le cancer du rein (MMP2) [180] par exemple. DDR1 peut interagir avec d'autres molécules pour contrôler les MMP comme c'est le cas dans le cancer du foie où l'association de DDR1 avec un composant de la voie du complément C1q permet d'augmenter l'expression de MMP2 et 9 entraînant par la suite la migration et l'invasion des cellules [181].

Outre l'activité enzymatique, la dégradation de cette membrane basale est facilitée par la formation de structures spécialisées, appelées invadosomes qui sont capables de dégrader la matrice tout en préservant l'intégrité tissulaire et les contacts cellules-cellules. DDR1 est aussi impliqué dans la formation de ces structures dans différents cancers. Par exemple, dans le cancer du pancréas, une interaction entre une tétraspanine TM4SF1, DDR1 et les MMP2 et 9 aboutit à la mise en place des invadosomes et favorise par la suite la migration et l'invasion [182]. Dans le cancer du sein, la liaison du collagène I sur son récepteur DDR1 provoque l'activation de Tuba, un facteur d'échange de la guanine de la GTPase Cdc42 et le recrutement de composants des invadosomes comme la cortactine ou la protéine Tks5 menant à la formation d'invadosomes linéaires. Ce processus est indépendant de l'activité tyrosine kinase de DDR1 [183].

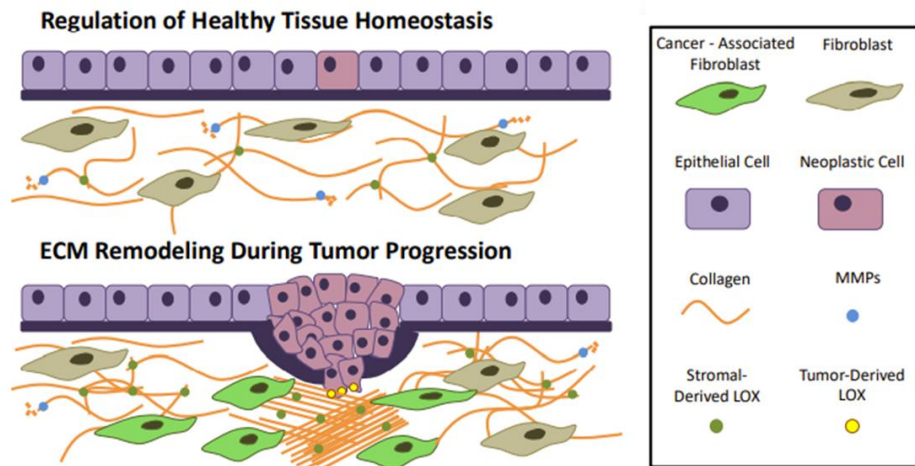


Figure 35 : Dégradation et remodelage de la MEC. Représentation schématique de la dégradation de la membrane basale par les MMP induisant la migration et l'invasion locales des cellules cancéreuses ainsi que le remodelage de la matrice par les cellules cancéreuses et les cellules stromales (CAF par exemple). Adaptée de [177].

➤ Production d'une nouvelle matrice

Lors de l'invasion locale, la dégradation de la matrice n'est pas le seul facteur important dans le remodelage de la MEC. La production d'une nouvelle matrice, produite par les cellules tumorales elles-mêmes mais aussi par les cellules stromales, est cruciale pour la suite du développement tumoral [184]. En effet, afin de migrer et envahir d'autres tissus, les cellules cancéreuses doivent s'adapter pour survivre et prospérer dans un environnement différent de celui d'origine. L'adaptation fonctionnelle de ces cellules est nommée plasticité. Cette dernière est régulée par les interactions entre les cellules cancéreuses et les composants du microenvironnement menant d'une part à l'ajustement des réponses des cellules tumorales et d'autre part au remodelage actif de la matrice pour faciliter la survie et la progression tumorale.

Ainsi, les CAF sont capables de sécréter des éléments de la MEC (comme la periostine) et jouent un rôle dans le maintien de la niche de cellules souches cancéreuses [185]. Mis à part ces derniers, d'autres cellules stromales sont détournées au profit de la tumeur favorisant entre autres la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Par exemple, les macrophages associés au cancer (TAM) sont aussi capables de contribuer à la production d'éléments de la nouvelle matrice (collagène, fibronectine, ostéopontine etc.) ainsi qu'à son remodelage via la production d'enzymes telles que les MMP ou les enzymes lysosomales favorisant l'invasion tumorale [186]. D'autres cellules, comme les neutrophiles et les adipocytes associés au cancer, sont aussi importantes pour le remodelage de la MEC. Enfin, les cellules cancéreuses peuvent produire différents composants de la MEC entre autres la

fibronectine, les laminines, du collagène (de type I, III, IV, V et VI) ainsi que les enzymes de remodelage de la MEC comme les lysyl oxydases [185].

L'organisation et la structure du collagène peuvent accélérer la progression tumorale (**Figure 36**). En effet, après destruction de la lame basale, la tumeur fait face à de grandes quantités de collagène I dans la matrice interstitielle. L'orientation du collagène aux limites de la tumeur a permis la définition de 3 signatures de collagènes associés aux tumeurs (TACS). TACS-1 est représentée par un dépôt élevé de collagènes aux abords de la tumeur et qui apparaît précocement dans la formation tumorale. A mesure que la tumeur se développe les 2 autres signatures sont visualisables et définies. TACS-2 est caractérisée par la présence de fibres de collagène étirées autour de la tumeur et dans la TACS-3 les fibres de collagène sont alignées perpendiculairement à la tumeur, offrant une voie migratoire empruntée par les cellules cancéreuses pour se propager plus rapidement [187], [188]. L'alignement des fibres de collagène est considéré dans les carcinomes du sein comme facteur de mauvais pronostic [189]. DDR1, comme DDR2, est impliqué dans l'alignement des fibres de collagènes et est associé avec la TACS-3 [190].

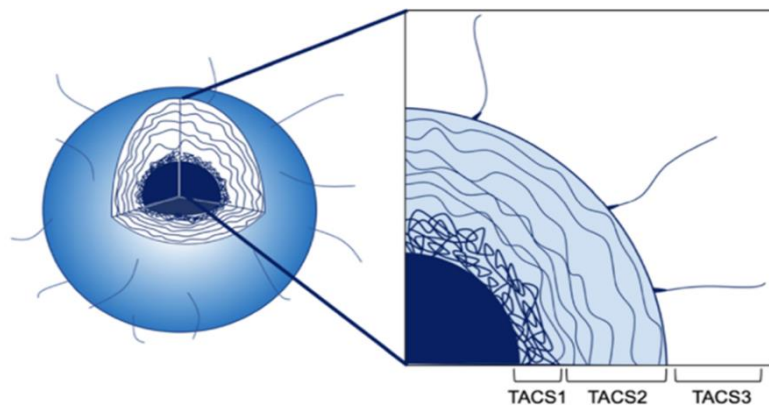


Figure 36 : Représentation schématique des 3 signatures de collagènes associés aux tumeurs (TACS). Adaptée de [188].

Par ailleurs, la structure du collagène peut être modifiée, augmentant le niveau de crosslink [191] et générant une glycation avancée de ses extrémités [192] lors du vieillissement, entraînant différentes réponses cellulaires et des modifications de sa dégradation par les enzymes protéolytiques. DDR1, considéré comme un senseur du collagène présent dans la MEC, est capable de détecter ces changements et module sa signalisation intracellulaire en conséquence. Ainsi la dégradation du collagène I par l'enzyme MT1-MMP augmente lors du vieillissement, entraînant une diminution d'activation de DDR1 se traduisant par une augmentation de la prolifération cellulaire et une inhibition de l'apoptose [193].

➤ Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

Afin de pouvoir poursuivre l'invasion au sein du tissu environnant, les cellules tumorales doivent être en mesure de se déplacer et pour cela elles doivent subir une EMT. Initialement, l'EMT était considérée comme un processus binaire présentant deux populations cellulaires différentes : épithéliales et mésenchymateuses. La transition vers l'état mésenchymateux était marquée par la perte d'expression de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine et l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine. Récemment, des études ont montré que ce processus se déroule de façon progressive et est caractérisé par la présence de plusieurs états cellulaires. Ces derniers sont définis non seulement par différents niveaux d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux mais aussi par des caractéristiques morphologiques, épigénétiques et transcriptionnelles intermédiaires entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Ces états intermédiaires ont été nommés états partiels, incomplets ou hybrides et sont représentés dans la **figure 37** ci-dessous. Ce processus est régulé par l'induction ou la répression de nombreux facteurs de transcription comme entre autres Zeb1/2, Snail 1/2 et Twist et la modulation de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux [194].

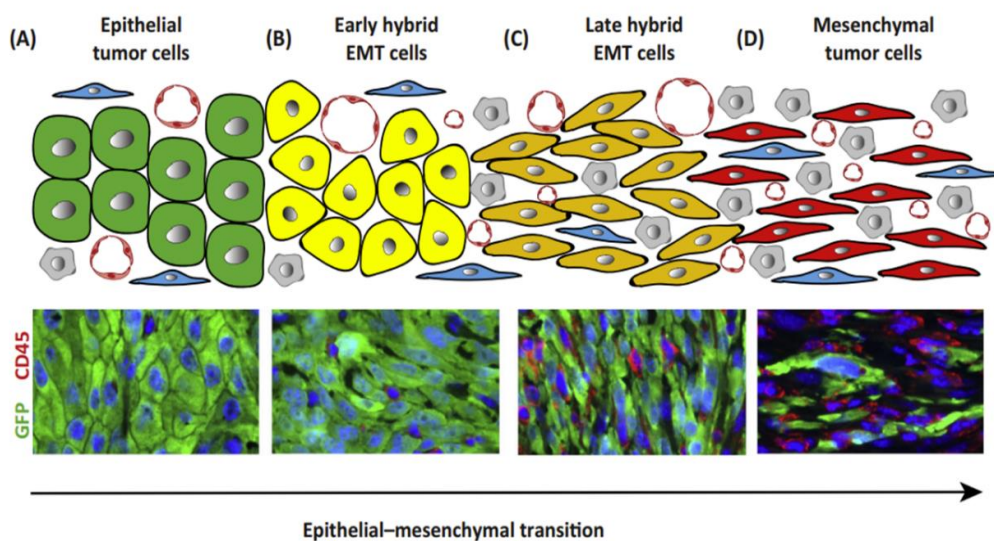


Figure 37 : Représentation des différentes phases de l'EMT. L'EMT n'est plus considérée comme un processus binaire mais comme l'enchaînement de stades hybrides se situant entre l'état épithélial et l'état mésenchymateux [194].

Dans plusieurs cancers, une association entre DDR1 et l'EMT a été décelée. De nombreuses études ont montré que DDR1 peut induire l'EMT *in vitro* et dans de plus rares cas *in vivo*. Par exemple, dans le carcinome hépatocellulaire, DDR1 favorise l'EMT *in vitro* et *in vivo*

en régulant STAT 3 [195]. DDR1 peut aussi induire l'EMT dans le cancer de la prostate en activant Pyk2 et MKK7, menant à l'augmentation de l'expression de la vimentine au détriment de l'expression de l'E-cadhérine [196]. L'impact de DDR1 sur l'EMT a aussi été démontré dans les lignées rénales OS-RC-2 et ACHN. L'activation de DDR1 par le collagène a entraîné l'augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux et la diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux [180].

A contrario, diverses études ont constaté une diminution de l'expression de DDR1 durant l'EMT. En effet, une corrélation négative a été décelée entre DDR1 et Zeb1 dans les tissus de cancers du sein. H-ras est capable d'induire l'EMT tumorale en augmentant l'expression de Zeb1 et en diminuant l'expression de miR-200c. Par la suite, Zeb1 entraîne la suppression de l'expression de la E-cadhérine et la diminution de l'expression de DDR1 [197]. L'effet inhibiteur de DDR1 sur l'EMT a aussi été étudié *in vivo* également dans le cancer du sein. Le croisement de souris DDR1^{-/-} et MMTV-PyMT a montré que la perte d'expression de DDR1 augmentait le niveau de vimentine dans la tumeur primaire alors que le niveau de la E-cadhérine diminuait. En effet, les cellules cancéreuses possèdent, en l'absence de DDR1, un phénotype basal associé à une invasion accrue et caractéristique de cancers du sein de mauvais pronostic [198].

➤ Migration et invasion

La migration et l'invasion locales des cellules cancéreuses sont des processus cruciaux dans la formation des métastases. Afin de pouvoir migrer efficacement, les cellules cancéreuses doivent adhérer tout d'abord à la MEC. Ce processus peut être médié dans certains cas par les DDR. Par exemple, le laboratoire a montré que la partie extracellulaire des récepteurs DDR (DDR1 et/ou DDR2) était suffisante pour favoriser l'adhésion sur le collagène I de cellules HEK293T [199]. Cependant, dans d'autres situations, l'adhésion peut se faire indépendamment de l'action de DDR1. En effet, dans le cancer du sein, l'adhésion des cellules MCF-7 au collagène est effectuée sous l'action prédominante des intégrines $\beta 1$ [200]. Une fois les cellules adhérentes à la matrice, 2 mécanismes de migration cellulaire peuvent être observés impliquant des cellules se déplaçant individuellement (migration amiboïde ou mésenchymateuse) ou collectivement (migration collective) (**Figure 38**). Différents éléments exercent une influence sur la migration comme les interactions entre les cellules et la MEC

(incluant le remodelage de la MEC dû à la migration cellulaire) ou l'organisation du cytosquelette [201].

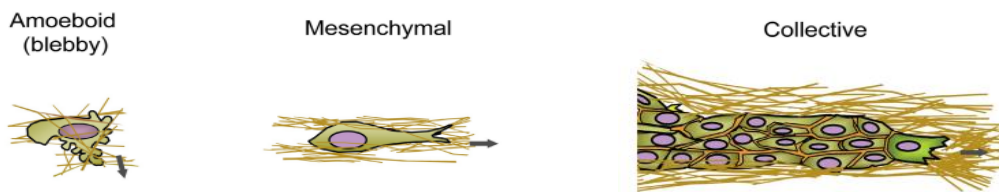


Figure 38 : Représentation schématique des modes de migration individuels (amiboïde / mésenchymateux) et collectifs. Adaptée de [201].

De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence l'implication positive de DDR1 dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Par exemple DDR1 est capable de contrôler la migration via la régulation de l'organisation du cytosquelette. En effet, dans le carcinome épidermoïde, l'association entre DDR1 et la E-cadhérine aux jonctions cellulaires régule plus particulièrement l'organisation de l'actomyosine du cytosquelette ainsi que la migration collective et se fait indépendamment de l'activation de DDR1 par le collagène. L'interaction entre le complexe DDR1 - E-cadhérine et Par3/Par6 module la localisation de RhoE qui, à son tour, antagonise Rho/ROCK, modulant la contractilité de l'actomyosine et permettant des mouvements cellulaires coordonnés, sous la forme de clusters [202]. Dans le cancer du sein, l'interaction de DDR1 avec la tétraspanine CD9 induit la migration cellulaire [203]. La migration et l'invasion sont impactées en fonction de l'expression de DDR1. Effectivement, dans le cancer gastrique la modulation de l'expression de DDR1 est assurée par miR-221-5p. L'expression de DDR1 est augmentée par la régulation à la baisse de miR-221-5p, entraînant la migration et l'invasion [204]. L'impact *in vivo* de DDR1 sur la migration et l'invasion a été moins étudié au profit de l'étude de la dissémination métastatique. Par exemple, dans le cancer colorectal, l'ARN circulaire NSD2 inhibe l'expression de miR-199b-5p menant à la régulation positive de l'expression de DDR1 et améliorant la migration et l'invasion *in vitro* et *in vivo* [205]. De plus, il a été démontré dans le cancer colorectal que DDR1 est impliqué dans l'invasion *in vitro*, ce qui a pour conséquence une augmentation des métastases *in vivo*. En effet, l'activation du récepteur par le collagène entraîne la phosphorylation de BCR qui ne peut plus se lier à la β -caténine. Cette dernière, libre, peut alors activer l'expression de gènes impliqués dans l'invasion cellulaire. L'inhibition de DDR1 par le nilotinib réduit les capacités invasives et métastatiques des lignées cellulaires du colon [206]–[208].

Cependant, DDR1 peut être impliqué dans l'inhibition de ces 2 mécanismes. Dans le cancer du sein, la liaison du domaine IJXM de DDR1 sur la phosphoprotéine DARPP-32 a pour conséquence la diminution de l'invasion de cellules stimulées par le collagène [209].

c) Invasion distante : formation des métastases

La formation des métastases est un processus complexe pouvant être divisé en plusieurs étapes. Une fois que les cellules cancéreuses ont envahi les tissus environnants, les vaisseaux sanguins et lymphatiques deviennent accessibles et constituent les 2 voies de dissémination tumorale. La première étape de la dissémination métastatique est l'intravasation au cours de laquelle les cellules cancéreuses entrent dans la circulation sanguine ou lymphatique. Cette étape peut être favorisée par la fixation des cellules cancéreuses sur les TAM capables d'induire une perméabilité transitoire dans le système vasculaire et permettant le passage des cellules dans les vaisseaux sanguins [210]. Les cellules cancéreuses peuvent aussi accéder à la circulation sanguine via le réseau vasculaire ou lymphatique anarchique, désorganisé et perméable aux cellules de la tumeur. Une fois dans la circulation sanguine, la plupart des cellules tumorales vont mourir en raison de dommages dus à de fortes pressions hydrodynamiques ou à l'attaque des leucocytes. Afin de survivre dans la circulation, les cellules peuvent s'entourer de plaquettes les protégeant et leur permettant d'atteindre les sites secondaires d'invasion.

Il existe différents mécanismes d'arrêt des cellules dans la circulation du tissu cible. Une fois arrivées aux abords de capillaires sanguins perfusant un organe, les cellules cancéreuses sont bloquées à l'intérieur dans un premier temps car leur diamètre est trop important pour passer à travers. Les cellules prolifèrent alors à l'intérieur du capillaire jusqu'à sa rupture permettant à ces dernières de rejoindre le tissu de l'organe touché lors de l'étape d'extravasation du processus métastatique. Une autre possibilité est l'arrêt des cellules via l'interaction entre des molécules d'adhérences des cellules tumorales et des cellules endothéliales ce qui favorise l'extravasation [211]. Enfin, les plaquettes peuvent faciliter l'arrêt et le passage des cellules tumorales dans le tissu à coloniser [212].

La survie et la prolifération des cellules cancéreuses dans leur nouvel environnement constituent les étapes les plus importantes de ce processus. Les métastases ne se développent pas dans tous les organes, certains fournissant un environnement plus favorable pour leur colonisation. Les sites de prédilection pour la dissémination, nommés niches pré-

métastatiques, peuvent être préparés par les TAM, les CAF et les exosomes tumoraux avant l'arrivée des cellules. Dans un premier temps lors de leur arrivée, le nouvel microenvironnement n'est pas favorable à la croissance tumorale et les cellules forment des petites tumeurs invisibles appelées micrométastases ou entrent en dormance [213]. La dormance métastatique se définit par l'absence de développement, pouvant durer des mois ou des décennies, selon le cancer, entre l'ablation et/ou le traitement de la tumeur primaire et la rechute de la maladie disséminée. Les cellules en dormance sont caractérisées principalement par un état de quiescence profond, une survie accrue et une pluripotence latente [214]. La notion de plasticité cellulaire évoquée plus haut va permettre aux cellules tumorales de s'adapter et détourner le nouvel microenvironnement afin d'établir, à partir des micrométastases établies, des macrométastases et coloniser le tissu (**Figure 39**) [213].

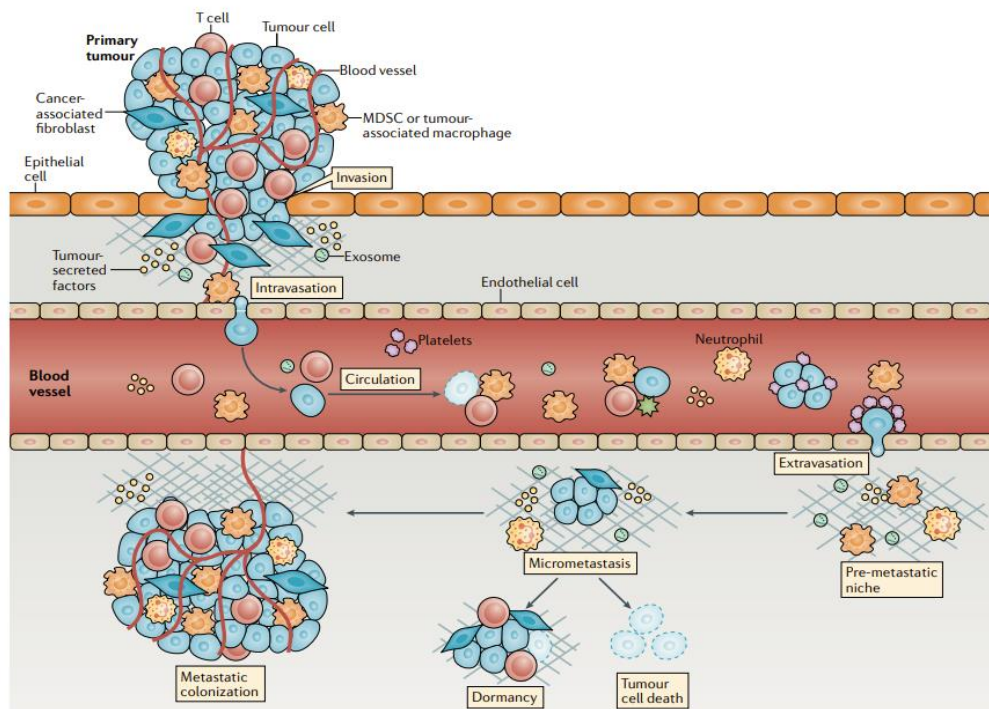


Figure 39 : Processus de dissémination métastatique. Ce processus est constitué de 4 grandes étapes : l'entrée des cellules dans la circulation sanguine nommée intravasation, la dissémination des cellules dans l'organisme grâce à la circulation sanguine, la sortie des cellules de la circulation nommée extravasation et enfin l'adaptation cellulaire au nouvel environnement permettant la colonisation de ce dernier avec l'établissement dans un premier temps de micrométastases puis de macrométastases [213].

DDR1 est impliqué à différentes étapes du processus de dissémination métastatique. Tout d'abord, certaines études ont mis en évidence le rôle de DDR1 dans l'angiogenèse des vaisseaux sanguins et lymphatiques. En effet, DDR1 provoque la sécrétion de facteurs angiogéniques comme VEGF-A, VEGF-B et PDGF-B dans les cancers gastriques [215] mais aussi

dans les carcinomes rénaux [180]. Le rôle de DDR1 lors de la lymphangiogenèse a aussi été démontré dans les tumeurs gastriques où l'inhibition de DDR1 a pour conséquence un nombre réduit de vaisseaux lymphatiques [215]. Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant un rôle potentiel de DDR1 dans les étapes d'intravasation ou dans la survie des cellules tumorales dans la circulation. L'implication de DDR1 dans l'extravasation et l'établissement de micrométastases est également peu documentée. Cependant une étude a montré que la présence de DDR1 était importante dans la migration cellulaire lors de l'établissement de métastases osseuses dans le cancer du poumon. En revanche, l'étape visée par l'action de DDR1 (survie dans la circulation, extravasation et/ou micrométastases) n'a pas clairement été déterminée [216]. Récemment une étude a mis en évidence l'importance de l'expression de DDR1 dans les niches pré-métastatiques du foie, dans l'établissement des micrométastases de carcinome du colon. En effet, l'injection dans le foie des souris d'un siARN dirigé contre DDR1 inhibait le développement des myofibroblastes et de l'angiogenèse et par conséquent diminuait la production de collagène dans la niche hépatique et réduisait le nombre de micrométastases [217]. Enfin, quelques études ont démontré l'implication de DDR1 lors de la colonisation tumorale. La première démonstration a été faite dans les métastases pulmonaires du cancer du sein. En effet, les cellules cancéreuses produisent et déposent du collagène I dans la MEC pulmonaire permettant sa liaison avec DDR1 et le recrutement de la tétraspanine TM4SF1. Cette dernière entraîne le couplage, indépendamment de son activité tyrosine kinase, de DDR1 à PKC α et à la synténine 2 qui provoqueront la phosphorylation et l'activation de JAK2 et STAT3 et la colonisation métastatique [218]. Une autre évidence du rôle de DDR1 dans la colonisation a été montrée dans les métastases hépatiques des cancers gastriques où l'injection intrasplénique de cellules tumorales gastriques inactivées pour DDR1 n'a révélé aucune différence dans l'établissement des micrométastases mais une inhibition de la colonisation métastatique [215].

3. Stratégie thérapeutique : inhibition de DDR1

L'augmentation d'expression de DDR1, comme DDR2, dans de nombreux cancers a mené au développement d'inhibiteurs, considérés comme une stratégie intéressante dans le traitement de ces cancers et comme outil afin d'analyser l'implication des DDR. Une partie des inhibiteurs spécifiques et non spécifiques de DDR1 sont listés dans le **tableau 15** ci-dessous.

Inhibiteurs	Kinases	Essais <i>in vitro</i>	Préclinique	Clinique
NON SPECIFIQUES A DDR				
Nilotinib	DDR1, DDR2, CSF1R, PDGFRA-B, ABL1, Kit	DDR1 : Colon [206]: ↘ pDDR1 ↗ Invasion		NCT02029001 Néoplasmes solides malins. DDR1/DDR2 mutés. Phase 2 (en recrutement)
Dasatinib	DDR1, DDR2, famille kinase SRC, BCR-ABL	DDR1 : Gastrique [219] : Prolifération, ↘ migration et ↗ invasion		NCT01491633 Cancer du poumon squameux DDR2 muté Phase 2 (non évaluable, toxique)
SPECIFIQUES A DDR				
7rh	DDR1 > DDR2	Gastrique [174] : ↘ Prolifération Poumon [220]: ↗ Apoptose	Pancréas (souris) : ↘ Développement tumoral	
DDR1-IN1	DDR1 > DDR2	Prostate [196]: Prolifération ↘ Migration ↘ Invasion ↗ Apoptose		
DDR1-IN2	DDR1 > DDR2	↘ pDDR1 /prolifération (Sein, colon, poumon etc.)		

Tableau 15 : Tableau récapitulatif de quelques inhibiteurs non spécifiques et spécifiques des DDR. Pour chaque inhibiteur a été indiqué les kinases ciblées, des exemples d'essais *in vitro* ainsi que d'essais précliniques et cliniques menés ou en cours (issus de Clinical Trial.gov). Adapté de [149].

Le traitement des cancers est rendu difficile du fait de l'hétérogénéité tumorale ainsi que de l'absence de traitements efficaces conduisant à l'apparition de résistances et de rechutes cancéreuses. Quelques études ont mis en évidence l'implication des DDR dans la résistance aux traitements. Ainsi, dans le glioblastome, DDR1 stimule la chimiorésistance en association avec le complexe 14-3-3/BECN1 (Beclin1) AKT1 ce qui améliore la survie cellulaire et la résistance via la signalisation AKT /mTOR [221]. D'autres phénomènes de résistance impliquant DDR1 ont été décrits par exemple dans le cancer du poumon [220], du sein [222] ou du pancréas [223]. A l'inverse, DDR1b peut aussi améliorer la sensibilité des cellules cancéreuses de la prostate [224]. Si l'inhibition de DDR1 semble prometteuse et intéressante dans certains cancers, dans le cas des cancers du rein l'expression de DDR1 est réduite et son inhibition ne semble pas appropriée [225].

OBJECTIFS

Le développement tumoral est un mécanisme complexe résultant de l'interaction entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Durant ces dernières années, de nombreuses études ont démontré que la fonction de la MEC, constituant non cellulaire du microenvironnement, ne se résumait pas à un réseau inerte de soutien structurel cellulaire. Au contraire, cette dernière joue un rôle important via ses composants et ses récepteurs dans le contrôle et la régulation des comportements cellulaires et intervient dans divers mécanismes clés de la progression tumorale.

Une des thématiques de recherche du laboratoire s'intéresse aux interactions entre les cellules et leur microenvironnement, plus particulièrement la MEC, ainsi que leurs répercussions au niveau cellulaire. Mon projet de thèse fait partie de cette thématique et a pour objectif d'étudier les effets, peu connus, de la MEC et de ses récepteurs cellulaires sur le développement des cancers du rein adultes et pédiatriques.

Ainsi, une première partie de mon projet de thèse s'est concentrée sur l'effet des composants de la MEC (Collagène de type I, Fibronectine et Matrigel) sur plusieurs caractéristiques phénotypiques de lignées cellulaires de RCC (Renca, 786-O, Caki-2). Cette analyse a démontré que le collagène I est le principal modulateur du devenir des cellules de RCC. Ce dernier peut influencer le comportement cellulaire via diverses signalisations intracellulaires engendrées par ses récepteurs, notamment les récepteurs aux collagènes DDR1. L'expression de DDR1 est dérégulée dans de nombreux cancers et engendre des effets anti ou protumoraux. Cependant, peu de choses sont connues en ce qui concerne le rôle de ce récepteur dans les RCC. C'est pourquoi le rôle de DDR1 a été étudié par la suite dans le développement de ces RCC.

Enfin, la formation du rein résulte d'un enchaînement précis et extrêmement coordonné d'expression de facteurs de transcription et d'activation de voies de signalisation. Des dérégulations de l'expression de ces facteurs de transcription ou de l'activation de ces voies de signalisation sont impliquées dans le développement de cancers comme la WT. Au cours de ces dernières années, des études de transcriptomiques et de génomiques à grande échelle ont permis l'identification d'altérations génétiques pouvant être impliquées dans le développement de ces tumeurs. Pourtant, peu d'études protéomiques ont été effectuées sur les WT. Le but du projet a été d'effectuer une étude protéomique comparative entre les restes

néphrogéniques et les 3 contingents tumoraux. Cette étude a mis en évidence une régulation à la baisse de l'expression des collagènes (plus particulièrement I, IV, VI) dans les contingents tumoraux. Ainsi, à l'instar des RCC, le rôle du récepteur DDR1 a aussi été étudié dans le développement de ces tumeurs.

Ces projets permettront d'approfondir les connaissances dans le développement tumoral des cancers du rein et mèneront potentiellement à l'identification de nouveaux biomarqueurs et stratégies thérapeutiques utilisables dans ces derniers.

MATERIELS ET METHODES

A) Matériels

1. Cellules

a) Renca

Les cellules Renca sont une lignée de cellules épithéliales adhérentes issues d'un adénocarcinome cortical rénal apparu spontanément chez une souris Balb/c. Ces cellules sont classées en tant que lignée de ccRCC et reproduisent certaines caractéristiques telles que l'apparition de métastases aux poumons et au foie. Au niveau génétique, cette lignée n'est pas mutée pour le gène *VHL* (données de l'ATCC).

b) 786-O

Les cellules 786-O sont une lignée de cellules épithéliales adhérentes dérivées d'un adénocarcinome primitif à cellules claires chez un homme de 58 ans. Les cellules 786-O sont mutées pour le gène *VHL*, avec des altérations dans les voies HIF et VEGF, et aboutissent à la formation de ccRCC chez des souris nude [226].

c) Caki-2

Les cellules Caki-2 sont une lignée de cellules épithéliales adhérentes établie à partir d'une tumeur primitive du rein et initialement caractérisée en tant que lignée cellulaire humaine de ccRCC. Cependant, certains travaux suggèrent que cette lignée est un modèle de pRCC. En effet, les tumeurs formées après injection de cellules Caki-2 dans un rein de souris nude sont de types papillaires kystiques. Le statut de mutation du gène *VHL* n'est pas bien défini mais les cellules expriment HIF1 α et HIF2 α [226].

d) WT-CLS1

Les cellules WT-CLS1 sont une lignée de cellules épithéliales adhérentes établie à partir d'une tumeur primaire de Wilms chez une enfant de 5 ans par Cell Line Service en 1998. Ces cellules, préalablement classées comme tumeur de Wilms, possèdent des caractéristiques rhabdoïdes, ne sont pas mutées pour les gènes CTNNB1 et WT1 et n'ont pas de LOH [227].

2. Patients

Les blocs d'échantillons des 3 patients inclus dans l'étude protéomique préliminaire ont été fournis par nos collaborateurs, les Dr Anne RULLIER (service d'anatomopathologie du CHU de Bordeaux) et Aurore COULOMB (service d'anatomie et cytologie pathologiques, hôpital Armand-Trousseau, AP-HP). Dans ces 3 cas de WT, ont été retrouvées des régions de rein non tumorales, des restes néphrogéniques quiescents et hyperplasiques ainsi que les 3 contingents tumoraux.

3. Anticorps

Les anticorps utilisés au cours de cette thèse sont répertoriés dans le **tableau 16** ci-dessous :

Gène cible	Clone	Espèce	Référence	Utilisation	Dilution
Primaires					
DDR1	Polyclonal	Lapin	Cell Signaling : 5583S	WB, IF	WB : 1/1000 IF : 1/800
C-myc	Monoclonal	Souris	Fisher : 13-2500	WB	1/4000
GAPDH	Monoclonal	Souris	Santa Cruz Biotechnology : SC- 166545	WB	1/1000
p21	Monoclonal	Lapin	Cell Signaling : 2947S	WB	1/1000
CDK2	Polyclonal	Lapin	Upstate sigma : 07631	WB	1/1000
p53	Monoclonal	Souris	Santa Cruz Biotechnology : SC-126	WB	1/1000
CDK1	Monoclonal	Lapin	Abcam 32384	WB	1/1000
CDK6	Polyclonal	Lapin	Santa Cruz Biotechnology : SC-177	WB	1/1000
Secondaires					
IR Dye 800 Anti-Souris	Polyclonal	Chèvre	Eurobio : 926-32210	WB	1/5000
IR Dye 800 Anti-Lapin	Polyclonal	Chèvre	Eurobio : 926-32211	WB	1/5000
Alexa 556 Anti-Lapin	Polyclonal	Chèvre	FluoProbes	IF	1/200

Tableau 16 : Récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés dans ce travail. Pour chaque anticorps est indiqué le clone, l'espèce, l'utilisation, la dilution et la référence. WB : western blot, IF : immunofluorescence.

4. Amorces

Les amorces utilisées dans ces travaux sont répertoriées dans le **tableau 17** ci-dessous :

Gène cible	Séquences humaines	Séquences murines
MMP2	GGAGACAAGTTCTGGAGATAACAATG	GGAGACAAGTTCTGGAGATAACAATG
	TTTGGTTCTCCAGCTTCAGGTA	TTTGGTTCTCCAGCTTCAGGTA
MMP9	GTTCCCGGAGTGAGTTGAAC	CGTGTCTGGAGATTCGACTTGA
	TTTACATGGCACTGCCAAAGC	TGGAAACTCACACGCCAGAA
MMP14	ACTGCCAAGCCACCCTAAGA	GCCCTCTGTCCCAGATAAGC
	CTGAGCAACGAAGACCCTCTCT	CCAGAACCATCGCTCCTTGA
Heparanase	ACTTCTTCACCCAGGAGCCG	AGTTTTACACCAAGCGGCCGC
	AGGTACGCAGGAGACAAGCC	GTATGCAGGAGATAAGCCTCTAG
Zeb1	TTACACCTTTGCATACAGAACCC	GCTGGCAAGACAACGTGAAAG
	TTTACGATTACACCCAGACTGC	GCCTCAGGATAAATGACGGC
Zeb2	GGAGACGAGTCCAGCTAGTGT	ATTGCACATCAGACTTTGAGGAA
	CCACTCCACCCTCCCTTATTTTC	ATAATGGCCGTGTGCTTCG
Snail1	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	CACACGCTGCCTTGTGTCT
	AGATGAGCATTGGCAGCGAG	GGTCAGCAAAGCACGGTT
Snail2	CGAACTGGACACACATACAGTG	TGGTCAAGAAACATTTCAACGCC
	CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT	GGTGAGGATCTCTGGTTTTGGTA
GAPDH	CAAGGAGTAAGACCCCTGGA	TGCCCCATGTTTGTGATG
	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG	TGTGGTCATGAGCCCTTCC
DDR1	CCGACTGGTTCGCTTCTACC	TCTCCCGAAGCTATCGGTTG
	CGGTGTAAGACAGGAGTCCATC	TACCCGAAATCACCTCCTGTC

Tableau 17 : Récapitulatif des amorces utilisées lors de ce travail. Pour chaque gène cible est indiqué le couple d'amorces humain et murin.

B) Méthodes

1. Culture cellulaire

a) Culture

Les cellules de RCC murines (Renca) et humaines (786-O, Caki-2) ont été cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher), 100 U/mL de pénicilline (Gibco) et 100µg/mL de streptomycine (Gibco) (milieu complet RCC).

Les cellules WT-CLS1 ont été cultivées dans du milieu Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM, Dutscher) supplémenté de la même manière que le milieu RPMI (milieu complet WT). Dans certaines conditions afin de maintenir la pression de sélection, 5µg/mL (Renca et 786-O) ou 2,5µg/mL (WT-CLS1) de puromycine ont été ajoutés dans le milieu de culture des cellules transduites avec des lentivirus vides ou permettant la surexpression du récepteur. Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ en atmosphère humide.

b) Génération des différentes lignées cellulaires

➤ Lignées surexprimant DDR1

Les lignées Renca et 786-O exprimant un niveau basal de DDR1 (CTL), surexprimant DDR1 (DDR1) ou la forme dominante négative du récepteur (DDR1DN) ont été générées avant mon arrivée au laboratoire. Brièvement, des transductions ont été effectuées avec des lentivirus générés par la plateforme de Vectorologie de l'Université de Bordeaux : d'une part, des lentivirus vides permettant l'expression basale de DDR1 et d'autre part, permettant la surexpression du récepteur murin, isoforme a, ou de sa forme dominante négative dont la partie intracellulaire a été remplacée par une séquence myc qui permet sa détection en western blot. Une MOI de 10 a été utilisée pour chaque transduction.

Pour la lignée WT-CLS1, une lignée CTL et 2 lignées surexprimant différents niveaux de DDR1 (DDR1-1 et DDR1-2) ont été générées par transduction du même lentivirus vide et des lentivirus permettant la surexpression du récepteur à 2 multiplicités d'infections différentes (MOI 5 et 10).

Les populations de cellules ont été sélectionnées par l'ajout de 5µg/mL (Renca et 786-O) ou de 10µg/mL de puromycine (WT-CLS1).

L'expression de DDR1 dans les différentes lignées a été vérifiée par western blot.

➤ Lignées inactivées pour l'expression de DDR1 (DDR1 KO)

L'inactivation de l'expression de DDR1 dans les lignées de RCC (Renca et 786-O) et de WT (WT-CLS1) a été réalisée par la technique CRISPR-CAS9 en collaboration avec la plateforme CRISP'Edit de l'Université de Bordeaux.

Concernant les lignées de RCC, une fois l'inactivation réalisée, les cellules ont été triées à l'aide d'un trieur de cellules Sorter Aria PSM à raison d'une cellule par puits dans 4 plaques 96 puits. La réalisation d'un séquençage pour l'expression de DDR1 le jour du tri par la plateforme a révélé un pourcentage d'édition du gène de 8%-15% pour la lignée 786-O et de 38-45% pour la lignée Renca. Afin de sélectionner les cellules DDR1 KO, un criblage a été effectué au laboratoire. Une fois à confluence, chaque population clonale a été divisée en 2 et introduite dans 2 puits d'une plaque 24 puits, un puits servant à l'amplification de la population (successivement en plaques 6 puits suivies de boîtes de pétris de 6 cm), l'autre étant utilisée pour la vérification de l'expression de DDR1 par western blot. Pour cela, les cellules ont été lysées à l'aide de 40µL de tampon de charge Laemmli SDS-PAGE contenant du β-mercaptoéthanol. Après analyse de l'expression par western blot, les clones jugés inactivés ont été vérifiés par séquençage. Des lignées DDR1 KO ont été générées par mélange de 3 à 5 clones inactivés. Les lignées contrôles (CRISPR CTL) ont été obtenues de la même façon que les lignées DDR1 KO mais l'ARN guide utilisé lors de la technique de CRISPR-CAS9 était de type aléatoire (Random).

Concernant la lignée WT-CLS1, des cycles itératifs de transfection ont été réalisés par la plateforme afin d'obtenir un pourcentage d'édition de 80%. Contrairement aux lignées de RCC, les cellules WT-CLS1 ne poussent pas lorsqu'elles sont isolées. Afin de réaliser le criblage, les cellules ont dû êtreensemencées à faible concentration (10 000 et 50 000) dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre afin d'obtenir des cellules les plus isolées possible. Les colonies formées par les cellules après 15 jours ont été récupérées et criblées selon le même déroulé que les lignées Renca et 786-O.

c) Stimulation des cellules par différentes MEC

La stimulation cellulaire « 2D » a consisté à recouvrir les puits ou les boîtes de cultures des différentes matrices pendant 1h à 37°C. Après 3 lavages en PBS des différentes matrices, les puits ou les boîtes ont étéensemencés avec des cellules (2D) ou des sphéroïdes (3D). La plupart des stimulations et expériences 2D ont été réalisées avec les matrices et

concentrations suivantes : collagène de type I de queue de rat (400µg/mL, Corning), collagène de type IV de souris (50µg/mL, Corning), Fibronectine I de bovin (5µg/mL, Sigma) et du Matrigel (33µg/mL, BD Biosciences). Dans le cas où d'autres concentrations ont été utilisées, la nouvelle concentration sera indiquée dans l'expérience.

La stimulation cellulaire « 3D » a consisté à inclure les cellules ou les sphéroïdes dans une matrice de collagène I (1mg/mL). Pour 1 mL de solution de collagène 1, 100µL de RPMI 10X sont mélangés avec 100µL de SVF, 100µL de NaHCO₃ 0,26M et 1mg de collagène I de queue de rat. Le volume est complété à 1mL avec de l'eau et le pH réajusté à 7,4 avec quelques µL de NaOH 0,35%. Cette solution est conservée dans la glace pour éviter la polymérisation du collagène.

2. Analyses phénotypiques (in vitro)

a) Expression et localisation protéiques

➤ Western blot

Après 48h de stimulation et élimination du surnageant, les cellules ont été rincées à l'aide de PBS afin de retirer tout reste de milieu de culture puis décollées à l'aide d'un grattoir. Après une centrifugation de 10 min à 5 000 rpm, le culot de cellules est lysé en utilisant soit un tampon de lyse constitué de 50mM d'HEPES pH 7,5, 150mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, Glycérol 10%, triton X100 1%, NP40 0,5% contenant des inhibiteurs de protéases (Roche), soit un tampon RIPA (Sigma) supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche).

Après détermination de la concentration protéique à l'aide du kit Pierce BCA protein Assay (Thermoscientific), 30 à 40µg de protéines ont été dénaturées pendant 5 min à 95°C dans du tampon de charge Laemmli (Concentrations finales : 25mM Tris Hcl (pH6,8), Glycérol 5%, SDS 1%, β-mercaptoéthanol 0,01% et Bleu de bromophénol). Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE dans un tampon de migration TGS (Euromedex) et transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'une solution de transfert (TG (Euromedex) contenant 10% d'éthanol) pendant 1h10 à 100 volts. Les protéines totales sont détectées par coloration de la membrane au Rouge Ponceau et prises en photo à l'aide du système d'imagerie Fusion FX (Vilbert). La saturation de la membrane a été réalisée pendant 1h sous agitation à température ambiante dans un tampon de blocage TBS-T 5% BSA (Tris Buffer Saline (Euromedex) contenant 0,1% de Tween 20 et 5% d'albumine sérique bovine). La membrane est incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans le tampon de blocage.

Le lendemain, après 5 lavages de 5 min avec du TBS-T, la membrane est incubée 1h à température ambiante sous agitation avec l'anticorps secondaire dilué dans le tampon de blocage. A la fin de l'incubation, la membrane est de nouveau lavée 3 fois avec une solution de TBS-T et 2 fois avec du TBS avant d'être révélée à l'aide du Chemidoc (Biorad). Les anticorps primaires et secondaires utilisés dans les western blots sont indiqués dans le **tableau 16**.

➤ Immunofluorescence (IF)

Les expériences d'IF ont été réalisées selon le protocole présent dans l'annexe 2 et les anticorps utilisés dans les différentes expériences sont répertoriés dans le **tableau 16**.

b) Expression génétique

➤ RT-qPCR

Dans le cas des qPCR « 2D », 400 000 (Renca) ou 300 000 (786-O) cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture stimulées ou non par les différentes matrices. Dans le cas de qPCR « 3D », les puits d'une plaque 96 puits ont étéensemencés à raison de 50 000 cellules / puits sur un coussinet de collagène I. Pour cela 30µL de collagène I à 1mg/mL sont déposés au fond d'un puits d'une plaque 96 puits. Après polymérisation du coussinet pendant au moins 10 min à 37°C, les cellules sont resuspendues dans 100µL de la solution de collagène I à 1mg/mL et déposées sur le coussinet. Après polymérisation de la solution de collagène I, 100µL de milieu complet sont ajoutés.

L'extraction des ARN après 48h de stimulation a été effectuée en utilisant la méthode du TRIzol (TRIzol Reagent, Molecular Research Center) ou le kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel) en suivant les instructions du fabricant. La quantification des ARN a été déterminée à l'aide d'un spectromètre (Nanodrop, DS-11 DeNovix).

La RT-qPCR a été réalisée selon le protocole décrit dans l'annexe 2 et les amorces utilisées sont répertoriées dans le **tableau 17**.

c) Adhésion

Les expériences d'adhésion ont été réalisées selon le protocole présent dans l'annexe 2.

d) Prolifération

➤ Technique 2D et 3D de prolifération

Afin d'étudier la prolifération « 2D », 2 000 (Renca) et 1 500 (786-O) cellules ont étéensemencées par puits (plaque 96 puits) préalablement recouverts des différentes matrices dans 100µL de milieu complet. Au bout de 5 jours, 10µL de MTS (Promega) ont été ajoutés à chaque puits et laissés 2h à 37°C. La coloration a été analysée à une densité optique de 490nm à l'aide d'un lecteur de plaque CLARIOstar (BMG LABTECH). L'étude de la prolifération des cellules WT-CLS1 a été effectuée de la manière suivante : 2 000 cellules par puits ont étéensemencées dans 4 plaques 96 puits. Le lendemain, le milieu a été remplacé par 50µL de milieu complet WT contenant ou non du collagène I (à 100µg/mL) ou du collagène IV (à 50µg/mL). La prolifération cellulaire a été mesurée avant stimulation (t0) ou après 24, 48 et 72h de stimulation par les différentes matrices selon le même procédé que les cellules Renca et 786-O.

Lors de la prolifération « 3D », 5 000 (Renca et 786-O) et 7 500 (WT-CLS1) cellules par puits ont étéensemencées dans une matrice de collagène I semblable à celle utilisée dans les qPCR. Après 7 (Renca et 786-O) ou 8 (WT-CLS1) jours les cellules ont été comptées. Pour cela, la matrice de collagène I a été digérée à l'aide de Libérase (Roche), libérant les cellules de la matrice et permettant leur comptage à l'aide de la cellule de Malassez après centrifugation et resuspension dans 200 µL de milieu complet.

➤ Test de sensibilité aux drogues

La sensibilité à différentes drogues utilisées dans le traitement des RCC a été analysée à l'aide d'un test MTS. Les drogues testées, leurs concentrations et le protocole utilisé sont disponibles dans l'annexe 2.

e) Cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire a été réalisée à l'aide de 2 méthodes de marquages différentes : le marquage à l'iodure de propidium et le marquage à l'EDU.

➤ Marquage à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium est un agent intercalant d'acide nucléique couramment utilisé en tant que marqueur de l'ADN permettant d'identifier les noyaux des cellules ayant perdu leurs intégrités membranaires. L'analyse de la quantité d'iodure de propidium incorporée dans les noyaux est utilisée pour le suivi du cycle cellulaire.

300 000 (Renca) ou 150 000 (786-O) cellules ont été cultivées pendant 48h dans 10mL de milieu complet dans une boîte de pétri de 10cm de diamètre recouverte ou non par du collagène I. Les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine, lavées une fois en PBS avant d'être fixées et perméabilisées à l'aide d'éthanol 70% pendant 2h à 4°C (à ce stade les cellules peuvent être conservées à -20°C). Les cellules ont été ensuite lavées une fois en PBS avant d'être resuspendues dans 1mL de la solution de coloration d'ADN (0,1% TritonX100, 20µg/mL d'iodure de propidium, 200µg /ml de RNase A (DNase free) dans du PBS) et introduites dans des tubes prévus pour la cytométrie de flux. Après au moins 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante, les cycles des différentes cellules ont été analysés à l'aide de l'analyseur BD FACSCanto II de la plateforme de cytométrie en flux de l'Université de Bordeaux. L'analyse des cycles cellulaires a été effectuée à l'aide du logiciel Flowjo 10.

➤ Marquage à l'EDU

L'EDU (ou 5-ethynyl-2'-deoxyuridine) est un analogue nucléosidique de la thymidine incorporé dans l'ADN lors de sa synthèse dans des cellules en division. Ce composé permet de ce fait d'analyser le nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire.

Pour cela, 2 000 (Renca) ou 1 500 (786-O) cellules par puits ont été cultivées pendant 48h dans 100µL de milieu complet dans une plaque 96 puits recouverte ou non par le collagène I. Le marquage des cellules avec l'EDU a été réalisé à l'aide du kit EdU HTS fluorescent (Sigma) en suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, après stimulation, les cellules ont été incubées 2h avec 10µM d'EDU en condition normale de culture puis lavées à l'aide de PBS contenant 1% de BSA avant d'être fixées 15 min à température ambiante avec du PFA 4% (paraformaldéhyde, Fischer). Puis, après 2 lavages, les cellules ont été perméabilisées pendant 20min avec une solution composée de PBS et de tritonX100 0,5%. Par la suite les cellules ont été incubées pendant 30 min à température ambiante avec une solution permettant la détection de l'EDU, puis rincées avec une solution de lavage. Les noyaux des cellules ont été marqués à l'aide de DAPI. Par la suite, 5 photos par puits ont été prises à l'aide de l'In Cellis cell imager (Bertin) puis quantifiées grâce au logiciel Image J.

➤ Etude des protéines impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire

Afin d'étudier les protéines impliquées dans les contrôles du cycle cellulaire, les différentes cellules ont été cultivées comme précédemment pour l'analyse du cycle cellulaire.

Par la suite, les protéines régulant les points de contrôle du cycle cellulaire ont été analysées par western blot en utilisant des anticorps répertoriés dans le **tableau 16**.

f) Migration et invasion

➤ A partir de cellules

- *Migration / invasion*

La migration et l'invasion cellulaire ont été étudiées en utilisant la méthode transwell. Un test dit de blessure a aussi été utilisé pour analyser la migration. Les protocoles de ces tests sont disponibles dans l'annexe 2.

➤ A partir de sphéroïdes

- *Génération des sphéroïdes*

Afin de générer les sphéroïdes, 10 000 cellules (786-O ou WT-CLS1) ont été cultivées pendant 3-4 jours dans 100µL de milieu complet contenant 0,5% de méthylcellulose dans une plaque 96 puits à fond rond non traitée pour la culture cellulaire (empêchant l'adhésion des cellules).

- *Migration*

Les puits d'une plaque 24 puits ont été recouverts ou non avec les différentes matrices. Après 1h à 37°C, les matrices ont été aspirées et les puits lavés 3 fois au PBS afin d'enlever tout excédent de matrice. Les sphéroïdes générés ont été récupérés et lavés dans du PBS afin d'éliminer la méthylcellulose pouvant interférer avec le processus de migration. Les sphéroïdes ont été resuspendus dans 80µL de milieu complet et déposés délicatement sur les différentes matrices à raison d'un sphéroïde par puits. Après avoir laissé les sphéroïdes adhérer sur les différentes matrices pendant 30 min, 500µL de milieu complet ont été ajoutés. Au bout de 24h, des photos des sphéroïdes ont été prises à l'In Cellis cell imager. La migration des sphéroïdes a été quantifiée à l'aide d'une tablette (Wacom) et avec le logiciel Image J. La

zone de migration correspond à la différence entre la zone totale et la zone du core du sphéroïde (**Figure 40**).

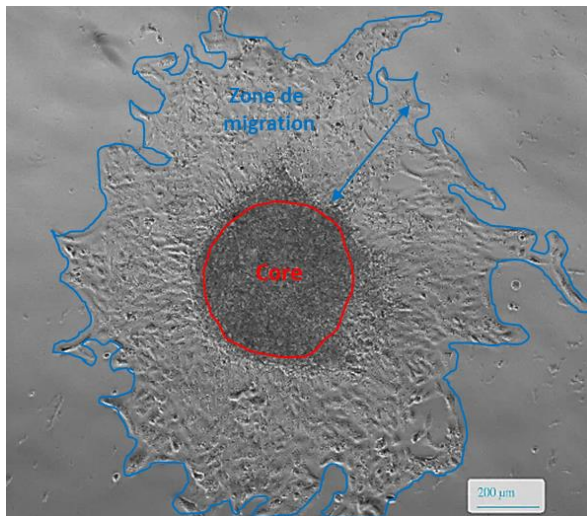


Figure 40 : Représentation schématique du core et de la zone de migration d'un sphéroïde.

- *Invasion*

Afin d'étudier l'invasion des sphéroïdes dans une matrice de collagène I, un coussinet de collagène I à 1mg/mL a été préalablement déposé dans chaque puits d'une plaque 96 puits pour éviter que les sphéroïdes ne migrent sur le plastique. Les sphéroïdes ont été lavés comme dans la section « migration », resuspendus dans 100μL de collagène I puis déposés délicatement sur le coussinet. Après polymérisation de la solution contenant le sphéroïde (10 min à 37°C), 100μL de milieu complet ont été rajoutés par-dessus dans chaque puits. Au bout de 24h, la prise de photos et la quantification ont été effectuées de la même manière que dans la section « migration ». La zone invasive correspond à la différence entre la zone totale invasive et la zone du core du sphéroïde.

g) Activités des gélatinases MMP2 et MMP9 (Zymographie)

L'analyse des activités des métalloprotéinases matricielles MMP2 et MMP9 a été effectuée dans les surnageants des différentes cellules. Cette expérience a été réalisée selon le protocole décrit dans l'annexe 2.

3. Analyses *in vivo* de la croissance tumorale

a) Implantation cellulaire

Les implantations orthotopiques cellulaires ont été réalisées par l'animalerie de l'Université de Bordeaux. Les cellules ont été cultivées dans du milieu complet puis décollées à l'aide de Trypsine. Les cellules ont été ensuite lavées 2 fois en milieu RPMI. Puis 100 000

cellules Renca et 5 millions de cellules 786-O dans 25µL de milieu RPMI ont été implantées dans la capsule rénale de souris femelle Balb/c et RAG/γ, respectivement.

b) Préparation des organes et coupes au microtome

Après sacrifice des souris, les reins injectés avec les cellules tumorales et les reins controlatéraux non injectés ont été prélevés puis pesés afin de suivre le développement de la tumeur. Ces reins pesés et les poumons également prélevés ont été fixés pendant 48h dans du PFA 4% à 4°C sous agitation. Puis les organes ont été lavés 3 fois pendant 1h à 4°C sous agitation dans du PBS avant d'être conservés à 4°C dans de l'éthanol 70% jusqu'au traitement. Après la mise en cassettes des différents organes, leur inclusion en paraffine (insoluble dans l'eau) a nécessité une première étape de déshydratation dans des bains successifs d'éthanol de plus en plus concentrés (96%, une nuit ; 100%, 3h puis 100%, 2h). Par la suite, des bains de toluène (VWR) ont été effectués (50% éthanol - 50% Toluène, 2h ; Toluène, une nuit puis Toluène, 4h) avant de laisser les organes dans un premier bain de paraffine (VWR) pendant 4h et dans un deuxième bain toute une nuit avant leur inclusion à l'aide d'un enrobeur de paraffine. Une fois inclus, des coupes de 5µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM2255), puis déposées sur lame (ThermoScientific) et conservées à température ambiante jusqu'à réalisation des différents marquages.

c) Immunohistochimie

La morphologie des tissus a été visualisée grâce à une coloration hématoxyline-éosine constituée d'un colorant nucléaire l'hématoxyline et d'un colorant cytoplasmique l'éosine. Les noyaux et le cytoplasme sont colorés respectivement en violet et en rose.

Les coupes des différents organes ont été déparaffinées par 2 bains de Toluène de 5min puis réhydratées par des bains successifs de moins en moins concentrés en éthanol (50% éthanol – 50% Toluène, 5 min ; 2 bains d'éthanol 100% de 1 min puis un bain d'éthanol 96, 80, 50 % de 1 min), puis pour finir par 2 bains d'eau distillée de 1 min. La coloration nucléaire a été réalisée dans un bain contenant de l'hématoxyline (Hématoxyline Papanicolaou, solution 1a Harris, Merck) pendant 1 min suivi d'un lavage sous l'eau du robinet pendant 10 min pour retirer l'excédent de colorant. La coloration cytoplasmique a été effectuée pendant 30 sec dans un bain d'éosine (Thermoscientific) suivi de la déshydratation des tissus par rinçages successifs dans des bains de plus en plus concentrés en éthanol (2 fois en éthanol 70%, 2 fois en éthanol 80% et une fois en éthanol 95 et 100%). Les lames ont par la suite été plongées

pendant 1 min dans un bain constitué de 50% Toluène- 50% Ethanol et 5 min dans 2 bains de Toluène avant d'être montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage (Vectamount). Les photos des lames ont été prises au scanner de lames Nanozoomer à la plateforme BIC de l'Université de Bordeaux et visualisées à l'aide du logiciel NDP.view 2.

4. Analyses protéomiques des tumeurs de Wilms

L'analyse protéomique a été réalisée par microdissection laser couplée à la spectrométrie de masse en collaboration avec la plateforme Oncoprot de l'Université de Bordeaux. Pour cela, des coupes de 5µm de blocs de WT incluses dans la paraffine ont été réalisées. La coloration de coupes à l'hématoxyline - éosine - safran (coloration HES) a permis d'identifier les régions d'intérêts. Une fois déterminées, la microdissection laser de ces régions a été réalisée à l'aide du système de microdissection PALM MicroBean (Zeiss). La durée et la puissance du laser ont été ajustées afin d'optimiser l'efficacité de la capture. Au minimum 1mm² de chaque région d'intérêt (tissu non tumoral, restes néphrogéniques et contingents tumoraux) a été collecté dans des bouchons de silicone afin de permettre leur analyse ultérieure. Les protéines de chaque région d'intérêt ont été séparées sur gel SDS-PAGE et digérées par la trypsine. Les peptides résultants ont été analysés par spectrophotométrie de masse et interprétés à l'aide d'outils bioinformatiques.

5. Analyse *in silico* de la survie des patients à 5 ans

L'analyse *in silico* a été effectuée, avant mon arrivée au laboratoire, comme décrite dans l'annexe 2.

6. Tests statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 et seront indiqués par la suite dans les expériences. Les différents niveaux de significativité seront indiqués de la manière suivante : ★, $p < 0,05$; ★★, $p < 0,01$; ★★★ $p < 0,001$.

RESULTATS

PROJET 1 - PARTIE I : IMPACT DE LA MEC DANS LA MODULATION PHENOTYPIQUE DES CELLULES DE RCC

Cette partie fait l'objet d'une publication en première auteure dans le journal Frontier in Oncology (Annexe 2)

De plus en plus d'études ont mis en évidence un rôle de la MEC, et notamment de ses composants, dans le contrôle et la régulation des comportements cellulaires dans divers processus biologiques. Cependant, peu de choses sont connues en ce qui concerne les interactions entre la MEC et les cellules de RCC.

Afin de mieux comprendre l'influence de la MEC dans les RCC, une analyse *in silico* a tout d'abord été effectuée à l'aide de la banque de données « The Human Protein Atlas » afin d'identifier des corrélations entre l'expression de composants de la MEC et l'agressivité des RCC, en analysant la survie à 5 ans des patients atteints de ces cancers. Cette analyse a montré qu'une expression élevée de composants de la matrice interstitielle (comme le collagène I ou la fibronectine 1) était associée à un mauvais pronostic, alors qu'une expression élevée de composants de la membrane basale (comme les laminines β ou le collagène IV) était associée à une amélioration de la survie.

Ces résultats ont conduit à l'analyse *in vitro* de l'impact des composants de la matrice interstitielle de la MEC (le collagène I et la fibronectine 1) et de la membrane basale (à l'aide de Matrigel) sur différentes caractéristiques phénotypiques de 3 lignées cellulaires de RCC (Renca, 786-O, Caki-2).

Les cellules présentent des changements phénotypiques en présence des différentes matrices, probablement dus à des changements dans la signalisation cellulaire ou à la rigidité de la MEC. Alors que l'impact des matrices est mineur sur la prolifération, des profils d'adhérence différents sont observés et sont dépendants du type cellulaire. Ainsi, les cellules Renca adhèrent très mal sur le collagène I contrairement aux cellules 786-O et Caki-2 traduisant des différences d'expression dans des récepteurs de la MEC (comme les intégrines ou les DDR). Le collagène I est le seul composant de la MEC capable d'augmenter les capacités de migration et l'activité des gélatinases MMP2 et 9, impliquées dans le processus d'invasion dans les 3 lignées cellulaires de RCC. De plus, le collagène I est capable d'augmenter l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'EMT dans les cellules Renca (Zeb2)

et les Caki-2 (Snail2). L'ensemble de ces résultats montre que le collagène I est un facteur de pronostic défavorable et participe activement à la progression tumorale.

Principaux résultats

Le collagène I est :

- ✓ Associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de RCC.
- ✓ Le principal modulateur du devenir des cellules de RCC.
- ✓ Capable de stimuler la migration cellulaire, l'EMT et l'activité des MMP2 et 9.

PROJET 1 - PARTIE II : ROLE DE DDR1 DANS LE DEVELOPPEMENT DES RCC

Les résultats précédents montrent que le collagène I est un régulateur clé dans la modulation des caractéristiques phénotypiques des cellules de RCC. Quelques récepteurs aux collagènes ont été mis en évidence dans les RCC, les intégrines et les DDR. L'impact de ces DDR (plus majoritairement DDR1) a été étudié dans de nombreux cancers (poumon, sein etc.) engendrant des effets protumoraux ou antitumoraux cancer et contexte dépendants. Cependant, le rôle de DDR1 n'a été que très peu étudié dans le développement des RCC.

A) Impact de l'expression de DDR1 sur la survie des patients

Afin d'appréhender le rôle de DDR1 dans le développement de ces RCC, une analyse *in silico* à l'aide de la banque de données « The Human Protein Atlas » a permis de regarder l'existence de corrélations entre l'expression de DDR1 et la survie des patients atteints de ces cancers. Les patients ont été séparés en 2 groupes possédant d'une part un taux d'expression des ARNm de DDR1 dans les tumeurs significativement plus bas (ou équivalent) ou d'autre part un taux d'expression plus élevé par rapport au tissu rénal non tumoral utilisé comme contrôle (**Figure 41**).

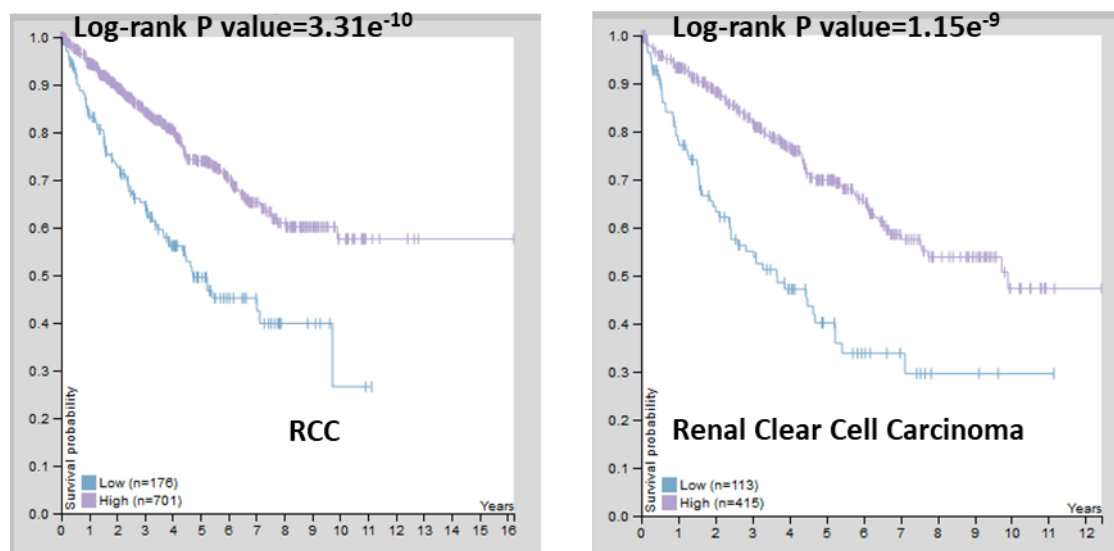


Figure 41 : Analyse *in silico* des corrélations entre l'expression de DDR1 et la survie des patients atteints de RCC. Les données ont été obtenues à l'aide de la banque de données « The Human Protein Atlas ».

Les résultats de cette analyse, dans l'ensemble des RCC mais aussi dans le sous-type le plus fréquent ccRCC, montrent que les patients présentant de fortes expressions de DDR1 ont une survie plus élevée que les patients exprimant DDR1 en plus faible quantité (**Figure 41**).

B) Expression de DDR1 dans les RCC

Afin de vérifier les résultats précédents, des extractions d'ARN ont été effectuées à partir de pièces opératoires de néphrectomies tumorales (108 tumeurs) et non tumorales utilisées comme contrôles (98 tissus). L'expression des ARNm DDR1 dans les différents échantillons a été analysée par RT-qPCR à la plateforme Transcriptome du Neurocentre Magendie à Bordeaux.

Les résultats des RT-qPCR représentés dans la **figure 42** démontrent que les ARNm de DDR1 sont sous-exprimés dans les RCC humains, en comparaison des tissus sains appariés. Cette baisse est significative dans l'ensemble des tumeurs, ou plus particulièrement dans le cas des tumeurs localisées (stades 1 et 2), ou localement avancées (stade 3). Une tendance à la baisse non significative est observée dans le cas des tumeurs métastatiques (stade 4).

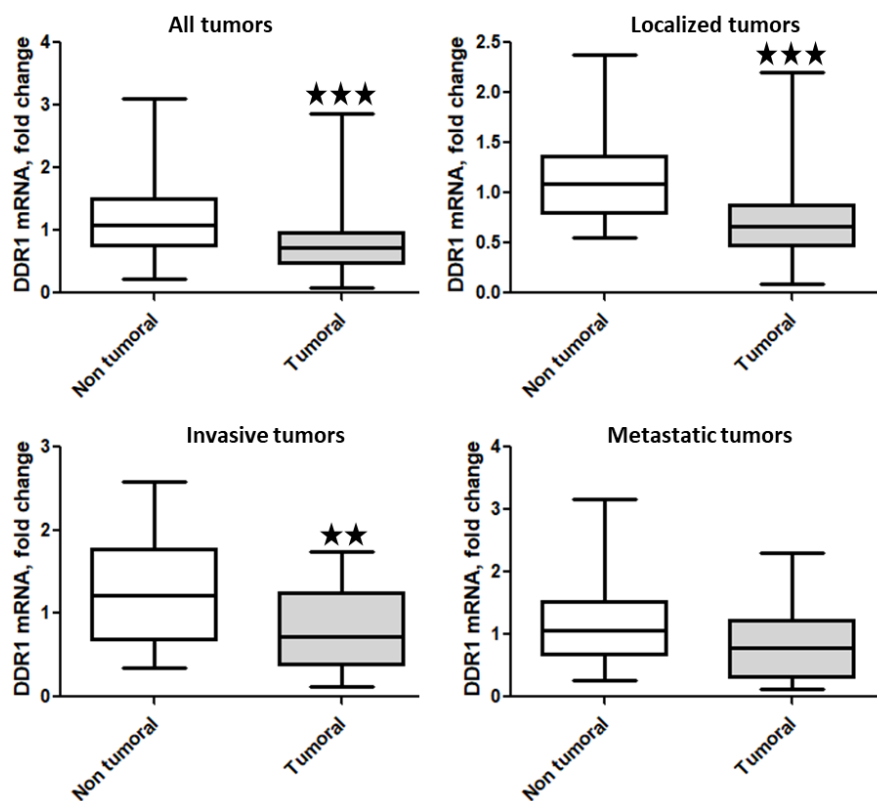


Figure 42 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de DDR1 dans les tissus de patients atteints de RCC. L'expression de DDR1 a été analysée vis-à-vis de l'ensemble de tumeurs, ou plus précisément dans les tumeurs localisées (stades 1 et 2), invasives (stade 3) et métastatiques (stade 4).

C) Hypothèse et modèle d'étude

Les résultats de l'analyse *in silico* et des RT-qPCR suggèrent que le développement des RCC est associé à une baisse d'expression de DDR1 et ont mené à l'élaboration de l'hypothèse selon laquelle la surexpression de DDR1 pourrait inhiber le développement des ccRCC. Afin de vérifier ce postulat, l'expression de DDR1 a été augmentée dans une lignée cellulaire de RCC murine Renca. Ces cellules constituent un modèle de choix, syngénique et orthotopique, exprimant DDR1 de manière endogène et étant capables de former des tumeurs lorsqu'elles sont implantées dans le rein de souris Balb/c. Cependant, elles ne possèdent pas le gène *VHL* muté.

Pour étudier l'effet de DDR1 dans une lignée portant une mutation sur le gène *VHL*, l'expression de DDR1 a également été augmentée dans des cellules humaines de RCC, les 786-O. Ainsi, des lignées Renca et 786-O contrôles exprimant DDR1 de manière endogène (CTL), ou surexprimant DDR1 (DDR1), ont été générées au laboratoire. De plus, afin de différencier les effets dus à la signalisation intracellulaire de ceux dus à l'adhérence des cellules sur le collagène, une forme dominante-négative de DDR1 (DDR1DN), tronquée dans sa partie intracellulaire, a aussi été développée au laboratoire. Afin de permettre sa détection par western blot, la forme DDR1DN possède un tag myc dans sa partie intracellulaire. Enfin, des lignées inactivées pour l'expression de DDR1 (DDR1 KO) et leurs contrôles (CRISPR CTL) ont également été générées au laboratoire avec l'aide de la plateforme CRISPR'Edit de l'Université de Bordeaux.

D) Niveau d'expression et localisation de DDR1 dans les différentes lignées cellulaires

1. Expression de DDR1

a) Analyse par western blot

Régulièrement, le niveau d'expression de DDR1 a été vérifié dans les différentes lignées cellulaires par western blot.

L'analyse à l'aide d'un anticorps anti-DDR1 montre une bande d'intensité variable, visible à la taille attendue (120kDa) dans les lignées Renca et 786-O. Ainsi, une bande de faible intensité est visible dans les CTL reflétant le niveau d'expression endogène de DDR1 dans ces lignées. Dans les lignées DDR1 sont observées des bandes de fortes intensités 12,6 fois (Renca) et 29,5 fois (786-O) supérieures aux contrôles correspondants. Dans les lignées DDR1DN, une

bande d'intensité similaire à celle du contrôle est observable, reflétant l'expression endogène du récepteur. Une seconde bande particulièrement visible à un poids moléculaire de 60kDa correspond au phénomène de shedding de DDR1. La métalloprotéase ADAM10 ou MMP14 interagit avec DDR1 et clive le récepteur au niveau du domaine juxta-membranaire extracellulaire [228], [229].

L'anticorps anti-DDR1 ne reconnaît que la partie intracellulaire du récepteur et ne permet pas la détection de la forme DDR1DN. L'expression de cette forme a été confirmée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le tag c-myc, positionné dans sa partie intracellulaire. Ainsi dans les lignées Renca et 786-O DDR1DN, une bande de forte intensité est observée, confirmant la surexpression de la forme dominante négative de DDR1 (**Figure 43**).

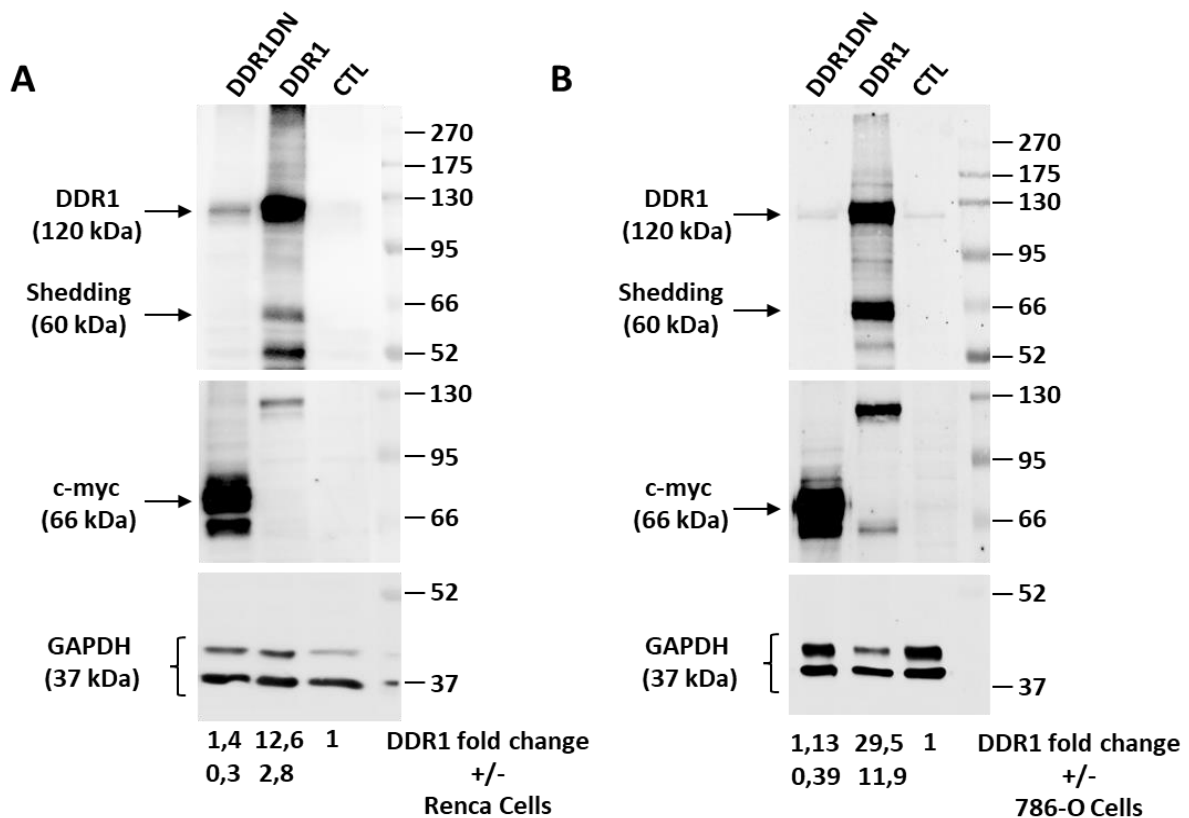


Figure 43 : Vérification du niveau d'expression de DDR1 ou DDR1DN par western blot dans les différentes lignées cellulaires de RCC. **A/** Western blot représentatif de l'expression de DDR1 (haut) ou DDR1DN (milieu) dans les lignées Renca. **B/** Western blot représentatif de l'expression de DDR1 (haut) ou DDR1DN (milieu) dans les lignées 786-O. Les blots du bas représentent la détection de la GAPDH dans les 2 lignées. Après quantification de l'intensité des bandes et normalisation par l'intensité des bandes GAPDH correspondantes, l'augmentation de l'expression de la protéine DDR1 a été mesurée. N=5. c-myc = tag c-myc.

Dans les lignées Renca ou 786-O DDR1 KO, aucune expression de la protéine DDR1 n'est observée contrairement aux lignées contrôles (CRISPR CTL) où une bande de faible intensité est visualisable et correspond à l'expression endogène du récepteur. De plus, le

phénomène de shedding du récepteur décrit plus haut est également visible dans les lignées CRISPR CTL (Figure 44).

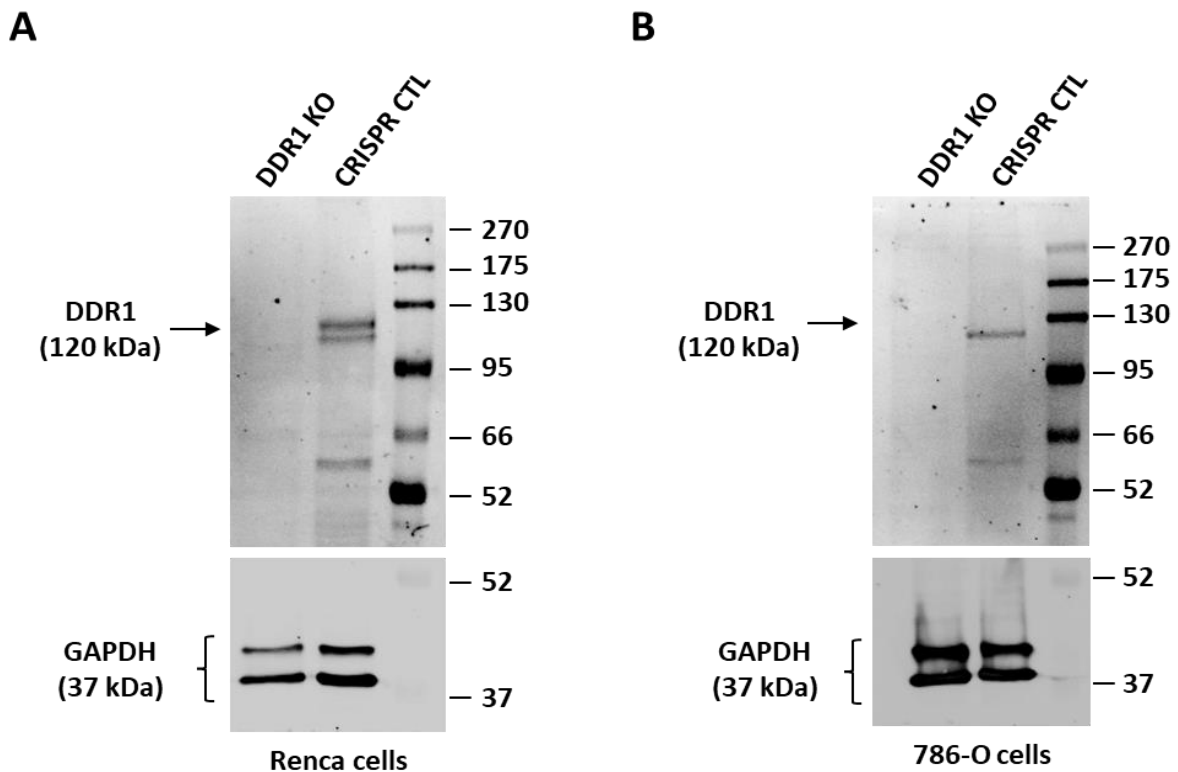


Figure 44 : Vérification de l'inactivation de l'expression de DDR1 par western blot dans les différentes lignées cellulaires de RCC. A/ Western blot représentatif de l'inactivation de DDR1 dans les lignées Renca. B/ Western blot représentatif de l'inactivation de DDR1 dans les lignées 786-O. Le blot GAPDH sert de contrôle de charge. N=5.

b) Analyse par RT-qPCR

En parallèle, la surexpression de DDR1 a aussi été vérifiée par RT-qPCR à l'aide d'amorces ciblant la partie extracellulaire du récepteur et, par conséquent, capables de détecter également, la forme DDR1DN. Ainsi, dans les lignées Renca et 786-O DDR1, l'expression des ARNm de DDR1 est augmentée 10 et 50 fois lorsque les cellules ont été cultivées dans une matrice de collagène I (3D) (figure 45A et B). Enfin, dans les lignées Renca et 786-O DDR1DN, l'expression des ARNm est augmentée de 25 et 30 fois (figure 45A et B).

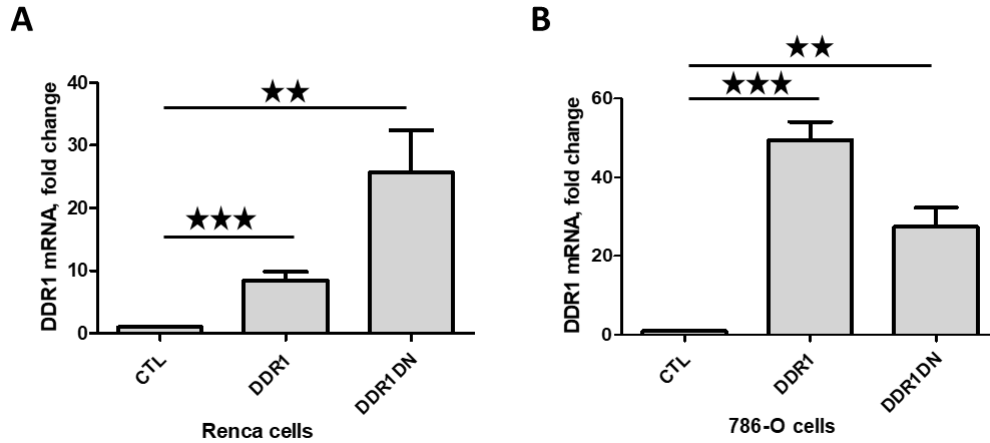


Figure 45 : Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression de DDR1 ou de DDR1DN dans les différentes lignées cellulaires de RCC. **A/** Quantification de l'expression de DDR1 ou DDR1DN dans les lignées Renca après stimulation cellulaire par une matrice de collagène I (cellules cultivées en 3D), N=7. **B/** Quantification de l'expression de DDR1 ou DDR1DN dans les lignées 786-O après stimulation cellulaire par une matrice de collagène I (cellules cultivées en 3D), N=4. Le test statistique utilisé est un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni.

2. Localisation de DDR1

Afin de connaître la localisation de DDR1 dans la cellule, une expérience d'immunofluorescence a été effectuée après stimulation des différentes cellules par le collagène I.

Dans des conditions basales d'expression (CTL ou DDR1DN) des cellules Renca et 786-O, DDR1 est uniquement visualisé à proximité des noyaux. Par contre, lorsque DDR1 est surexprimé, sa localisation dans les cellules Renca ou 786-O est détectée au niveau des différentes jonctions cellules-cellules, comme attendu et déjà reporté dans la littérature [230]. DDR1 est également détecté ponctuellement sur la membrane des cellules (**Flèches sur la figure 46A et B**). Ces marquages ponctiformes représentent très certainement l'agrégation des récepteurs en présence de stimulation par du collagène I [183].

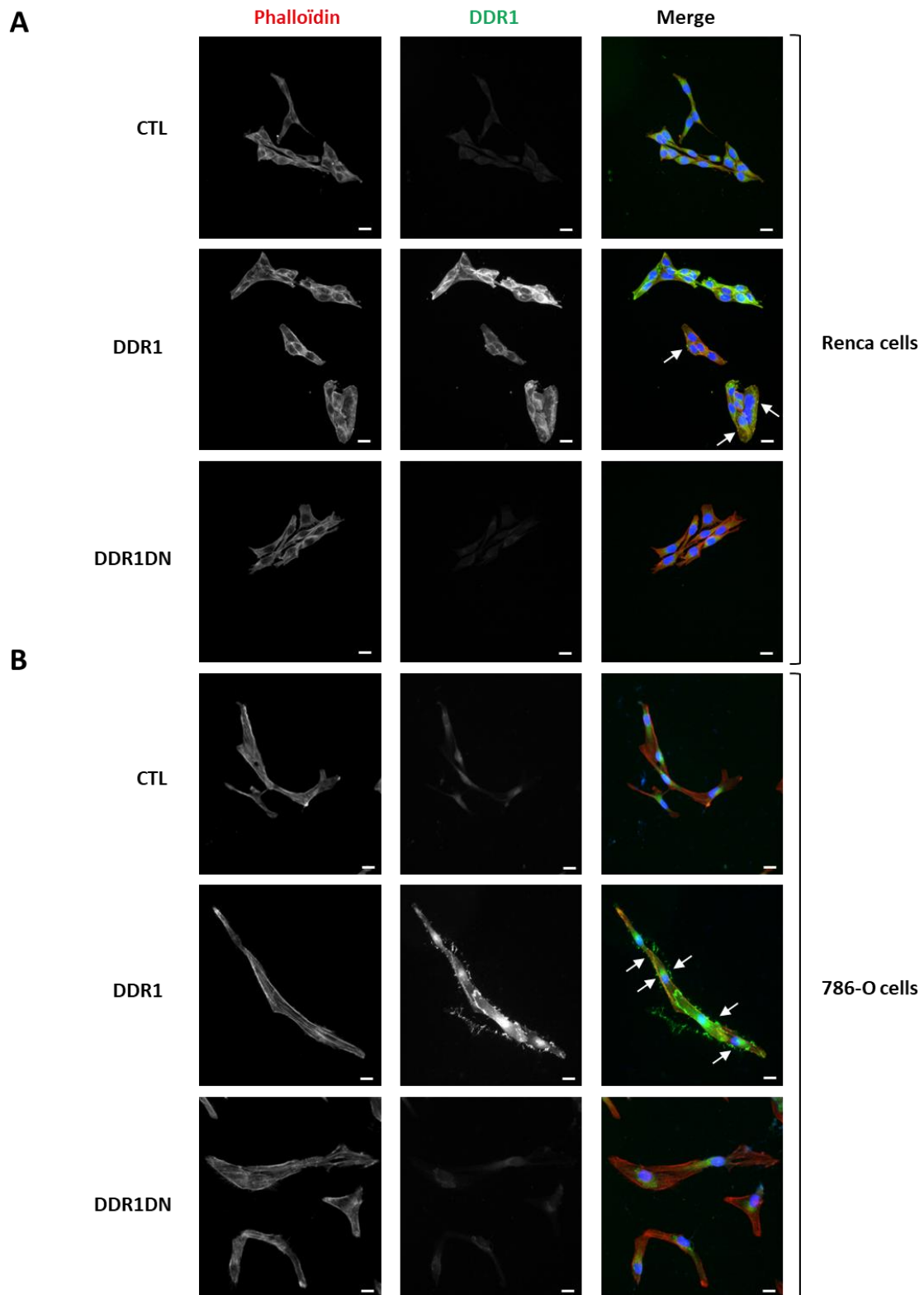


Figure 46 : Localisation de DDR1 dans les cellules de RCC. Après 24h de stimulation sur du collagène I, la localisation de DDR1 a pu être visualisée à l'aide d'un anticorps anti-DDR1 (vert) dans les cellules Renca (A) et 786-O (B). La phalloïdine marque l'actine filamentaire (rouge) et les noyaux sont marqués par du DAPI (bleu). Flèches : agrégation de DDR1, échelle : 20µm, N=3.

E) Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été évaluée *in vitro* à l'aide de tests en 2 dimensions (2D), avec ou sans stimulation par le collagène I, et en 3 dimensions (3D) en cultivant les cellules au sein d'une matrice épaisse de collagène I (à 1mg/mL).

Concernant la lignée Renca, comme le montre la **figure 47A**, les cellules DDR1 prolifèrent significativement moins vite que les cellules CTL ou DDR1DN dans un test de prolifération en 2D. De plus, la déplétion de DDR1 ne provoque aucun changement significatif dans la prolifération cellulaire.

En 3D, les cellules DDR1 et DDR1DN prolifèrent moins vite que les cellules CTL. La différence de prolifération dans la condition DDR1DN pourrait être due à la conformation cellulaire adoptée en 3D, ou à la différence de rigidité de la MEC. De nouveau la déplétion de DDR1 n'induit aucun changement significatif dans la prolifération (**Figure 47B**).

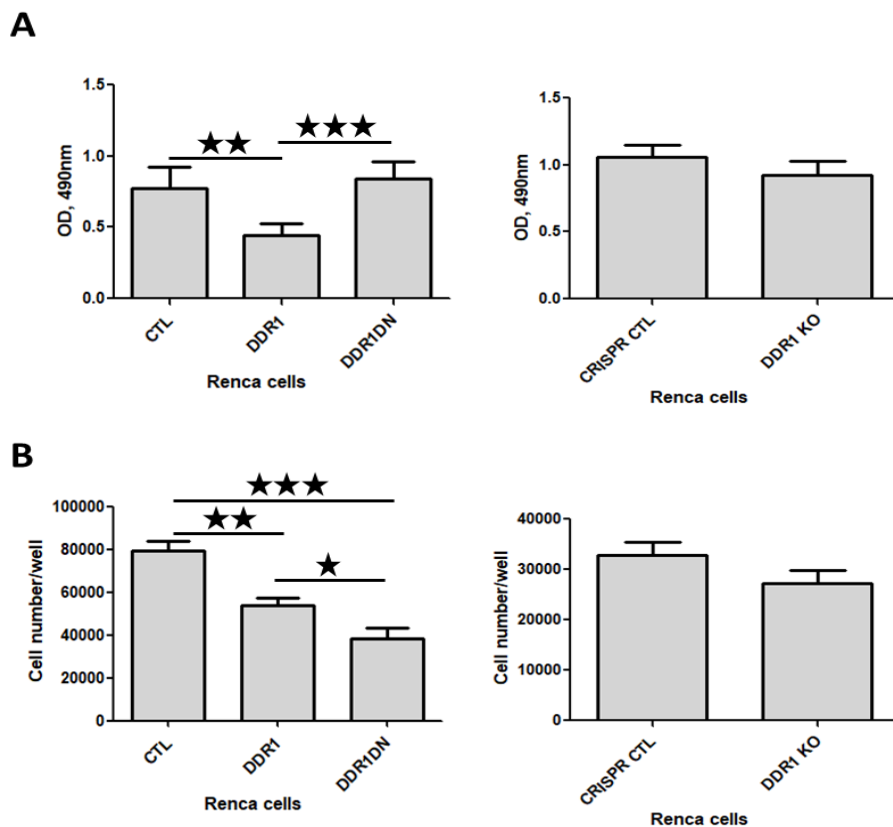


Figure 47 : Impact de l'expression de DDR1 sur la prolifération *in vitro* des cellules Renca. A/ Test de prolifération en 2D où les cellules ont été cultivées sur une matrice de collagène I (N=5 pour la surexpression, N=4 pour l'inactivation) **B/** Test de prolifération en 3D où les cellules ont été stimulées au sein d'une matrice de collagène I (N=5 pour la surexpression, N=6 pour l'inactivation). Les tests statistiques utilisés sont : un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (à gauche) et un t-test bilatéral (à droite).

Pour la lignée 786-O, à l'image des Renca cultivées en 2D, les cellules DDR1 prolifèrent significativement moins vite que les cellules CTL ou DDR1DN et la déplétion du récepteur n'induit aucun changement dans la prolifération cellulaire (**Figure 48A**).

Cultivées en 3D, les lignées CTL, DDR1 et DDR1DN présentent le même profil de prolifération qu'en 2D. En revanche, en 3D, lorsque l'expression de DDR1 est déplétée, la prolifération cellulaire est significativement augmentée, phénomène inverse de celui observé lors de la surexpression du récepteur (**Figure 48B**).

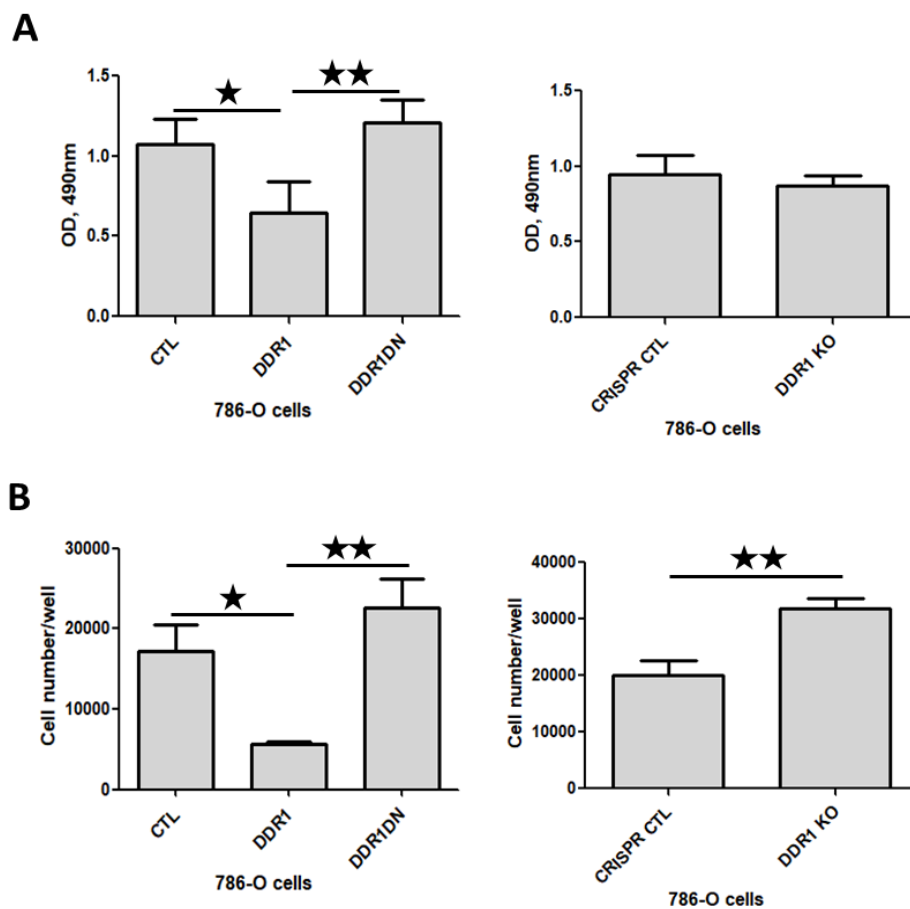


Figure 48 : Impact de l'expression de DDR1 sur la prolifération in vitro des cellules 786-O. A/ Test de prolifération en 2D où les cellules ont été cultivées sur une matrice de collagène I (N=3 pour la surexpression, N=4 pour l'inactivation) B/ Test de prolifération en 3D où les cellules ont été stimulées au sein d'une matrice de collagène I (N=4 pour la surexpression, N=6 pour l'inactivation). Les tests statistiques utilisés sont : un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (à gauche) et un t-test bilatéral (à droite).

L'ensemble de ces résultats démontre que la surexpression de DDR1 dans les lignées cellulaires de RCC Renca ou 786-O inhibe la prolifération cellulaire.

F) Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur le cycle cellulaire

La prolifération et la croissance cellulaire sont des mécanismes régulés par le cycle cellulaire. Deux marquages cellulaires ont été effectués, afin d'analyser le cycle cellulaire et déterminer si une phase était impactée en particulier et pouvait expliquer la diminution de prolifération des cellules DDR1.

1. Etude du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium

Après 48h de stimulation par le collagène I, les cycles cellulaires des cellules marquées à l'iodure de propidium ont été analysés par cytométrie de flux.

L'étude du cycle cellulaire des cellules Renca indique qu'après stimulation par le collagène I, la surexpression du récepteur provoque une augmentation du nombre de cellules en phase G1 et une diminution du nombre de cellules en phase S. Aucun changement n'est visualisé dans les cellules Renca DDR1DN (**Figure 49A**). La déplétion de DDR1 induit une diminution du nombre de cellules en phase G1 et une augmentation du nombre de cellules en phase G2 (**Figure 49B**).

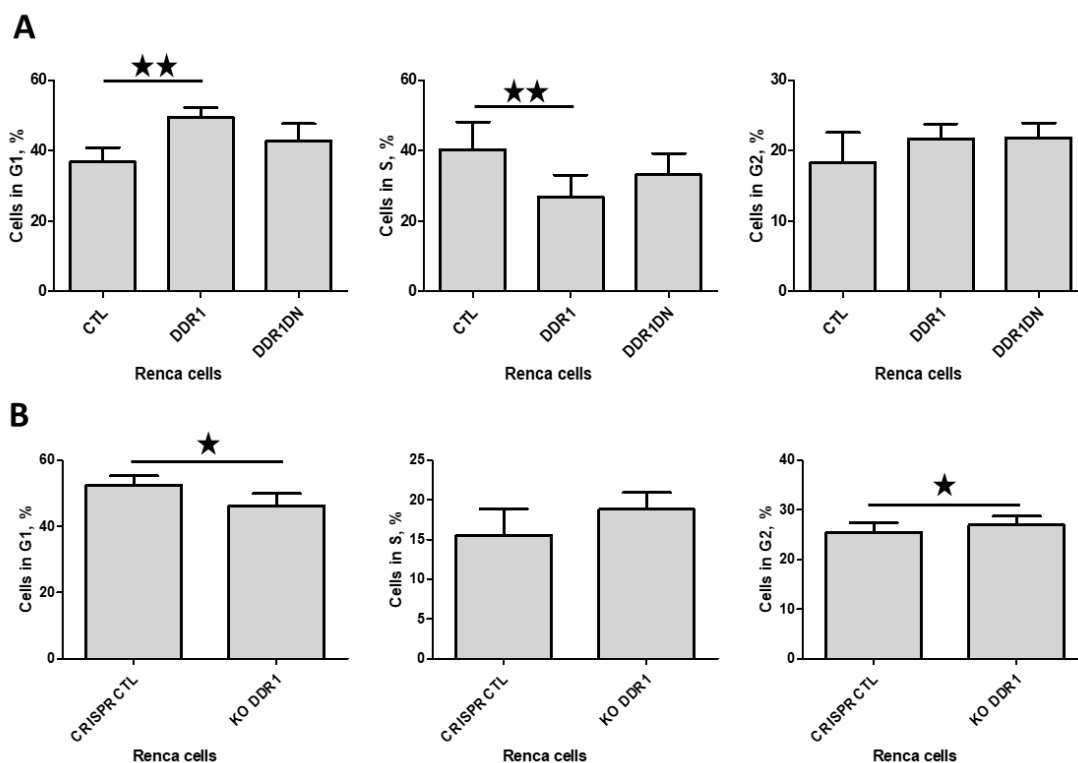


Figure 49 : Impact de l'expression de DDR1 sur le cycle cellulaire des cellules Renca. Le nombre de cellules dans chaque phase du cycle a été évalué au regard de la quantité d'iodure de propidium incorporé dans les cellules. **A/** Quantification de l'effet de la surexpression de DDR1 et DDR1DN sur le nombre de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire des cellules Renca. **B/** Quantification de l'effet de l'inactivation de DDR1 sur le nombre de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire des cellules Renca. Les tests statistiques utilisés sont : un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (**A**) et un t-test bilatéral (**B**). N=5 pour la surexpression et N=4 pour l'inactivation.

Les analyses montrent que, dans les cellules 786-O DDR1 stimulées par le collagène I, à l'instar des cellules Renca, le nombre de cellules en phase G1 est augmenté alors que le nombre de cellules en phase S diminue (**Figure 50A**). La surexpression de DDR1DN ou la déplétion de DDR1 n'induisent aucun changement significatif dans le cycle cellulaire de ces cellules (**Figure 50A et B**).

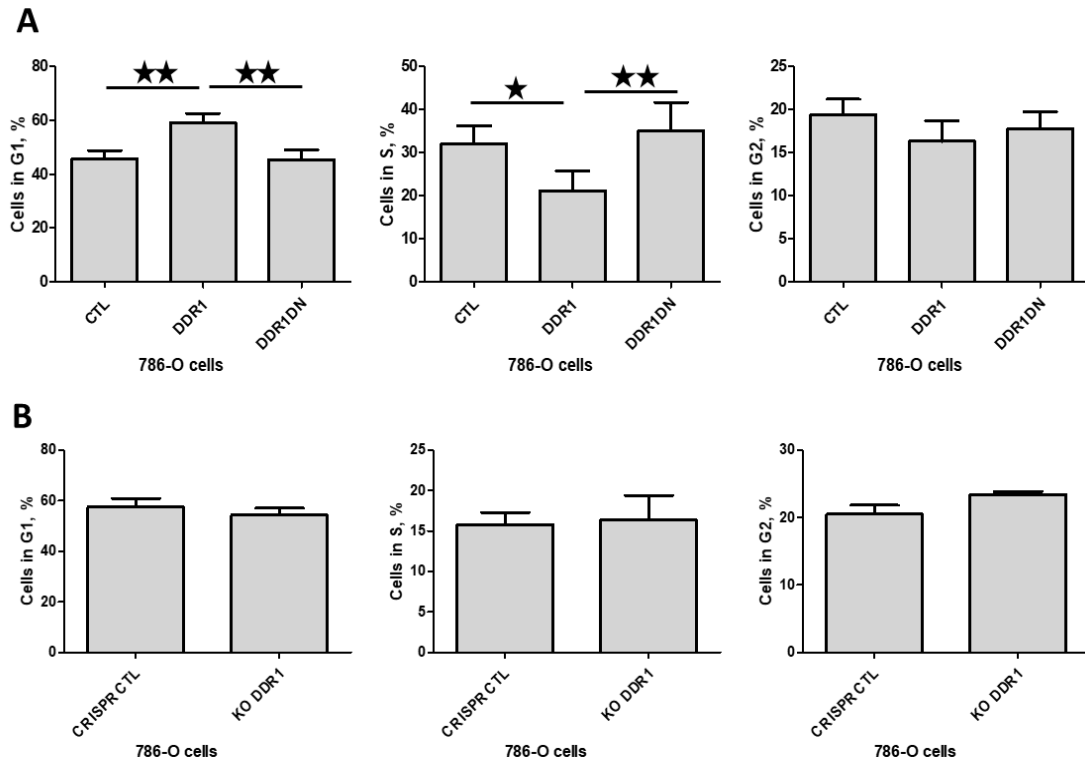


Figure 50 : Impact de l'expression de DDR1 sur le cycle cellulaire des cellules 786-O. Le nombre de cellules dans chaque phase du cycle a été évalué au regard de la quantité d'iodure de propidium incorporé dans les cellules. **A/** Quantification de l'effet de la surexpression de DDR1 et DDR1DN sur le nombre de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire des cellules 786-O. **B/** Quantification de l'effet de l'inactivation de DDR1 sur le nombre de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire des cellules 786-O. Les tests statistiques utilisés sont : un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (**A**) et un t-test bilatéral (**B**). N=5 pour la surexpression et N=4 pour l'inactivation.

Ces résultats suggèrent que, dans les lignées Renca et 786-O, la surexpression de DDR1 provoque un ralentissement du cycle cellulaire, plus particulièrement une diminution de l'entrée des cellules en phase S. Cette diminution est dépendante de l'activité intracellulaire du récepteur dans les 2 lignées testées.

2. Etude du cycle cellulaire par marquage à l'EDU

Afin de confirmer le résultat précédent, un marquage avec un analogue de la thymidine, l'EDU, a été effectué. La révélation de l'incorporation de l'EDU permettra de quantifier le pourcentage de cellules en phase S.

L'analyse des marquages à l'EDU dans les cellules Renca montre une tendance à la diminution du nombre de cellules en phase S, lorsque DDR1 est surexprimé, et un nombre similaire de cellules en phase S, dans les conditions DDR1DN et DDR1 KO. Des expériences supplémentaires devront être réalisées afin de confirmer cette tendance (**Figure 51**).

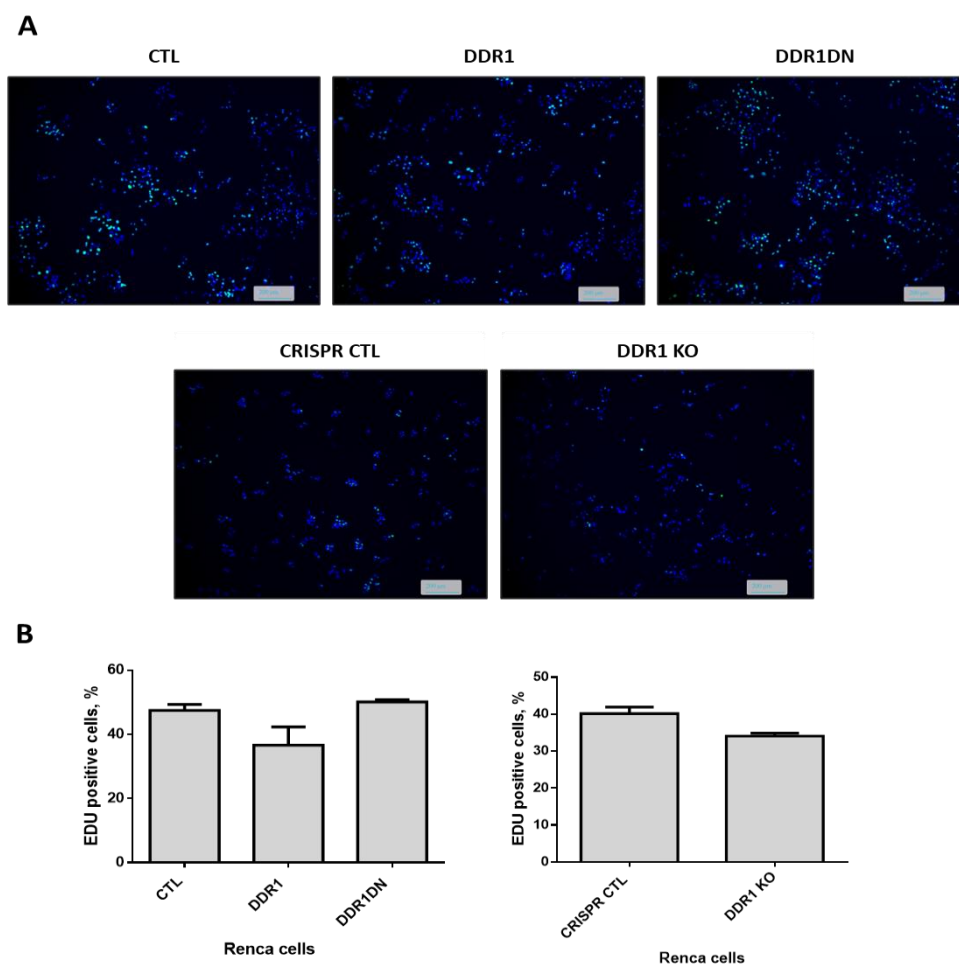


Figure 51 : Impact de l'expression de DDR1 sur l'entrée en phase S des cellules Renca. A/ Image représentative des cellules Renca marquées. Les cellules en phase S du cycle cellulaire ont pu être détectées par incorporation de l'EDU (vert). Les noyaux ont été marqués en bleu à l'aide du DAPI. **B/** Quantification du marquage cellulaire. Les tests statistiques utilisés sont : un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (à gauche) et un t-test bilatéral (à droite). N=4.

L'analyse de l'incorporation de l'EDU dans l'ADN des cellules 786-O a montré que seule la surexpression de DDR1 induit une diminution significative du nombre de cellules ayant incorporé l'EDU, traduisant une diminution du nombre de cellules en phase S. Il n'y a aucune

différence dans le nombre de cellules DDR1 KO ayant incorporé l'EDU par rapport aux cellules contrôles (**Figure 52**). L'ensemble corrobore les observations de l'analyse du cycle cellulaire.

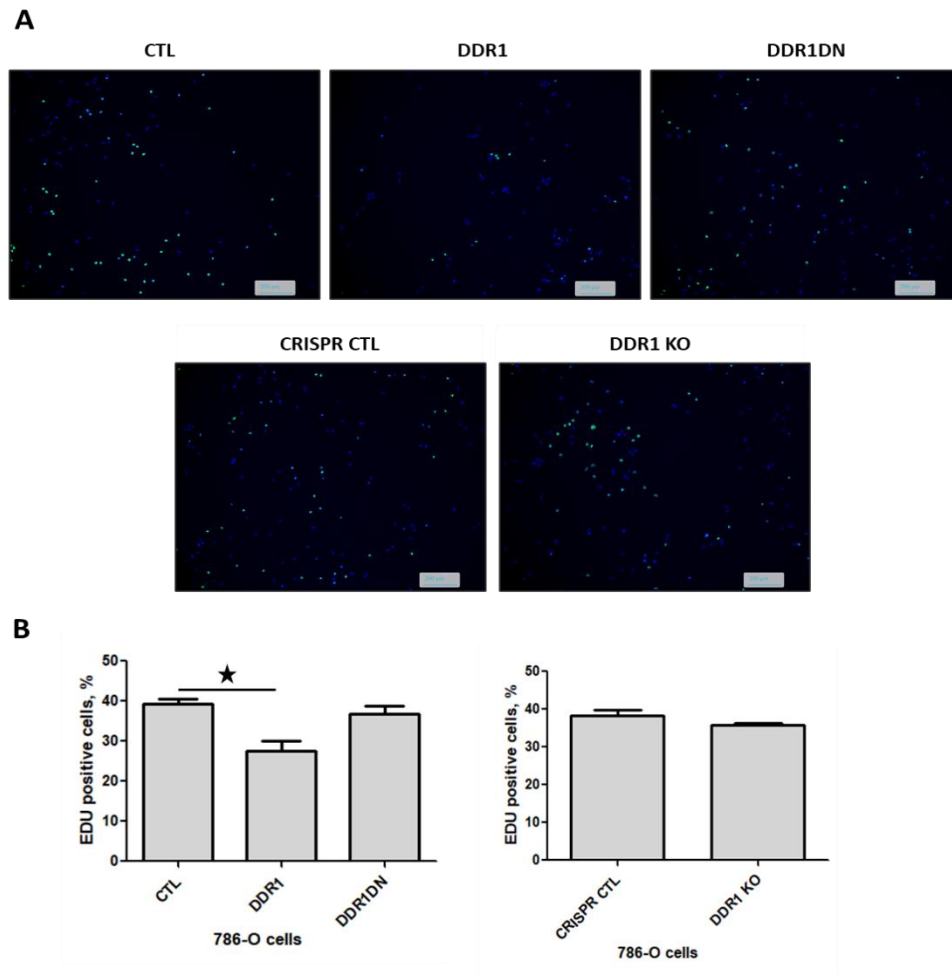


Figure 52 : Impact de l'expression de DDR1 sur l'entrée en phase S des cellules 786-O. A/ Image représentative des cellules 786-O marquées. Les cellules en phase S du cycle cellulaire ont pu être détectées par incorporation de l'EDU (vert). Les noyaux ont été marqués en bleu à l'aide du DAPI. B/ Quantification du marquage cellulaire. Les tests statistiques utilisés sont : un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (à gauche) et un t-test bilatéral (à droite). N=4.

Ces résultats confirment, pour la lignée 786-O tout du moins, que la surexpression de DDR1 induit une diminution du nombre de cellules entrant en phase S, suggérant un ralentissement du cycle cellulaire au niveau de la transition entre les phases G1 et S.

3. Etude des protéines impliquées dans le passage des points de contrôle du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire est régulée par divers points de contrôle, dont le passage est régi par l'association entre des cyclines et des kinases cyclines dépendantes (CDK), représentée dans la **figure 53**.

Le niveau d'expression dans les cellules 786-O de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire, à savoir CDK6 (phase G1), CDK2, p21 (transition G1/S), p53 (transition G1/S et G2/M) ou CDK1 (transition G2/M), a été analysé à l'aide d'anticorps par western blot.

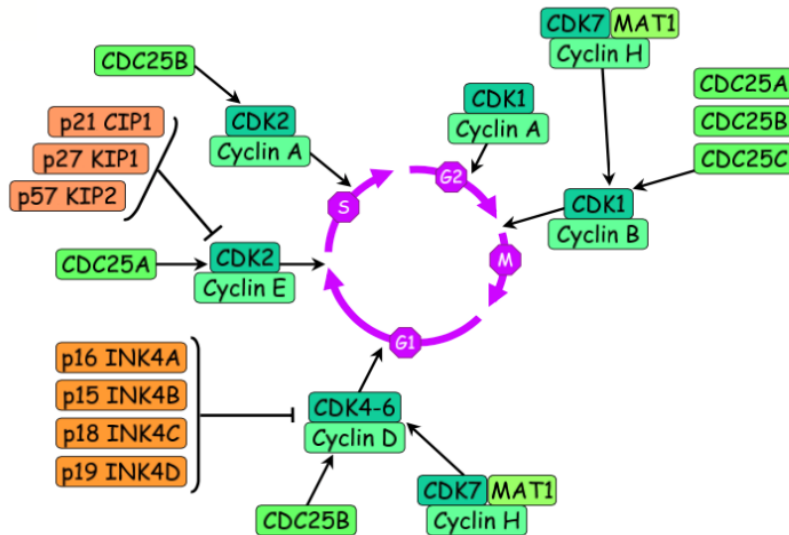


Figure 53 : Représentation schématique du cycle cellulaire et des protéines impliquées dans sa régulation.

L'étude de ces diverses protéines a révélé que la surexpression de DDR1 ou DDR1DN n'induisait aucun changement d'expression de CDK1, CDK2, CDK6 et p53. En revanche, une augmentation significative de l'expression de p21 est observée dans les cellules 786-O DDR1 par rapport aux cellules CTL ou DDR1DN. La déplétion de DDR1 dans les cellules 786-O n'induit aucun changement d'expression des protéines p21, CDK1, CDK6 et p53. En revanche, une augmentation significative de l'expression de CDK2 est observée dans les cellules DDR1 KO (Figure 54).

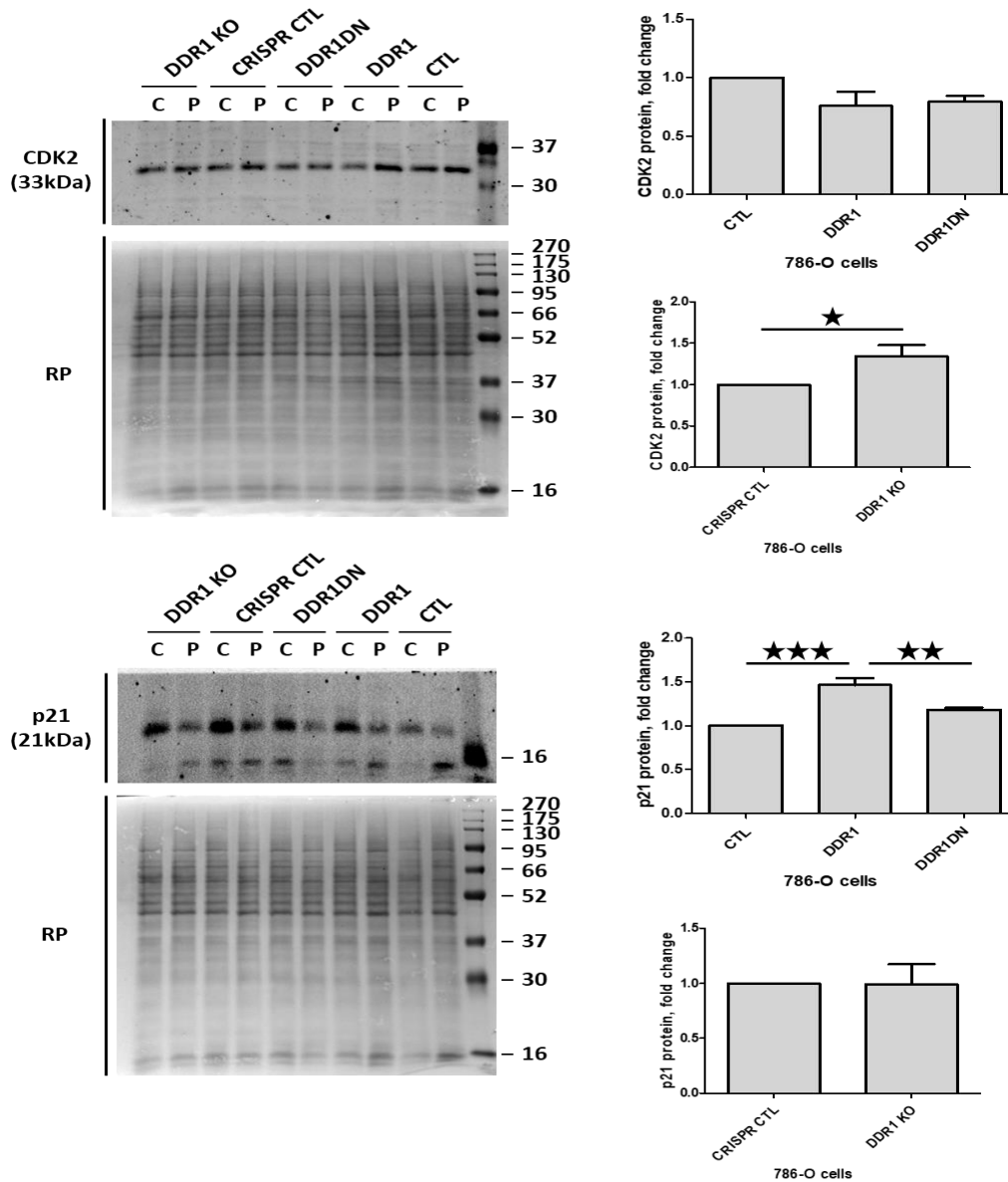


Figure 54 : Impact de DDR1 sur l'expression des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire par les cellules 786-O. L'expression des protéines a été mesurée par western blot après 48h de stimulation par une matrice de collagène I (C) ou sur des cellules non stimulées (P) (à gauche). Les graphiques (à droite) ne prennent en compte que la quantification de l'intensité des bandes des cellules stimulées par le collagène I normalisé par rapport à l'intensité du rouge ponceau (RP). Les tests statistiques utilisés sont : un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (en haut) et un t-test bilatéral (en bas). N=5 pour la surexpression et N=6 pour l'inactivation.

L'ensemble de ces résultats montrent que, dans les cellules 786-O, la surexpression de DDR1 entraîne une augmentation de l'expression de p21, qui peut expliquer la diminution de prolifération de ces cellules. Ce résultat pourrait également expliquer la petite augmentation de prolifération des cellules DDR1 KO par rapport aux CRISPR CTL. Ces expériences vont être répétées avec les différentes cellules Renca.

G) Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la migration cellulaire

L'impact de la modulation de DDR1 dans les cellules de ccRCC a aussi été appréhendé dans d'autres mécanismes nécessaires à la progression tumorale, en commençant par la migration.

1. Migration à partir de sphéroïdes

L'ensemble de ces expériences réalisées à partir des sphéroïdes n'a pu être effectué que sur la lignée cellulaire 786-O. Cette lignée forme des sphéroïdes denses et aisément manipulables (**Figure 55A**). Par contre, les sphéroïdes des cellules murines Renca, formés selon la technique présentée dans la section « génération des sphéroïdes », sont très peu jointifs, fragiles et se détruisent lors des manipulations (**Figure 55B**). La formation des sphéroïdes Renca a été effectuée selon une deuxième méthode, dite d'encapsulation, en collaboration avec la plateforme VoxCell de l'Université de Bordeaux. Cette technologie repose sur la formation d'une coque externe, composée d'alginate, confinant les cellules en son sein et favorisant la formation de sphéroïdes dans des lignées réticentes comme les Renca. Cette méthode a abouti à la génération de sphéroïdes d'aspects plus compacts mais constitués d'un amas de cellules mortes n'adhérant pas sur le plastique ou les différentes matrices précédemment citées (**Figure 55C**), et n'envahissant pas la matrice de collagène (**Figure 55D**). En conclusion, l'obtention de sphéroïdes à partir des cellules Renca n'a pas été possible.

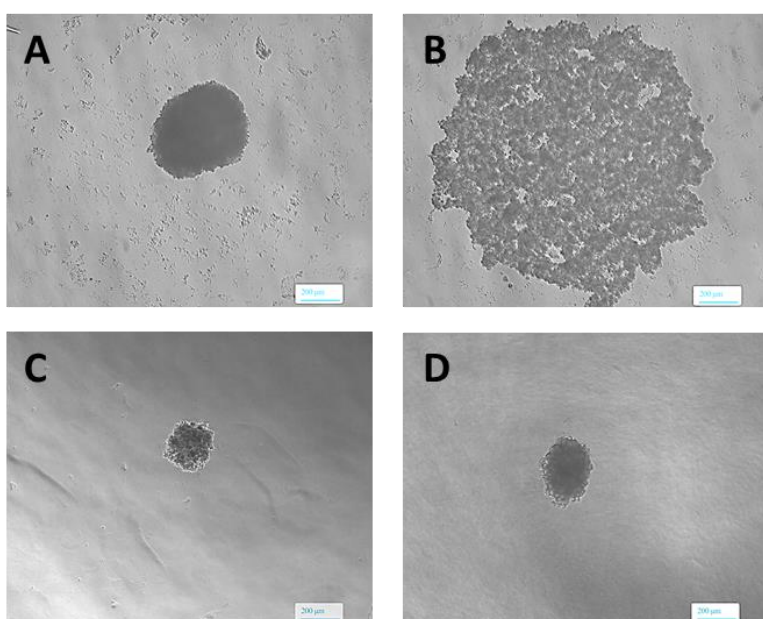


Figure 55 : Génération des sphéroïdes à partir de cellules de RCC.

Aspect d'un sphéroïde formé à partir de cellules 786-O (**A**) ou Renca (**B**) en présence de méthylcellulose.

Aspect des sphéroïdes des cellules Renca générés par encapsulation et déposés sur une matrice de collagène I (**C**) ou inclus en collagène I (**D**).

La migration cellulaire des différentes lignées 786-O, stimulées ou non (plastique) par différentes matrices (Collagène I, Fibronectine, Matrigel), a été étudiée à partir de sphéroïdes après 24h.

Les lignées 786-O CTL ou DDR1DN possèdent des profils de migration similaires en absence de stimulation ou en présence des différentes matrices. En absence de stimulation ou en présence de fibronectine, les cellules 786-O DDR1 migrent de manière similaire aux cellules CTL ou DDR1DN. En revanche, une inhibition complète ou une forte diminution de la migration est observée lorsque les cellules sont stimulées respectivement par du collagène I, ou du Matrigel constitué notamment de collagène IV, un autre ligand de DDR1 (**Figure 56**).

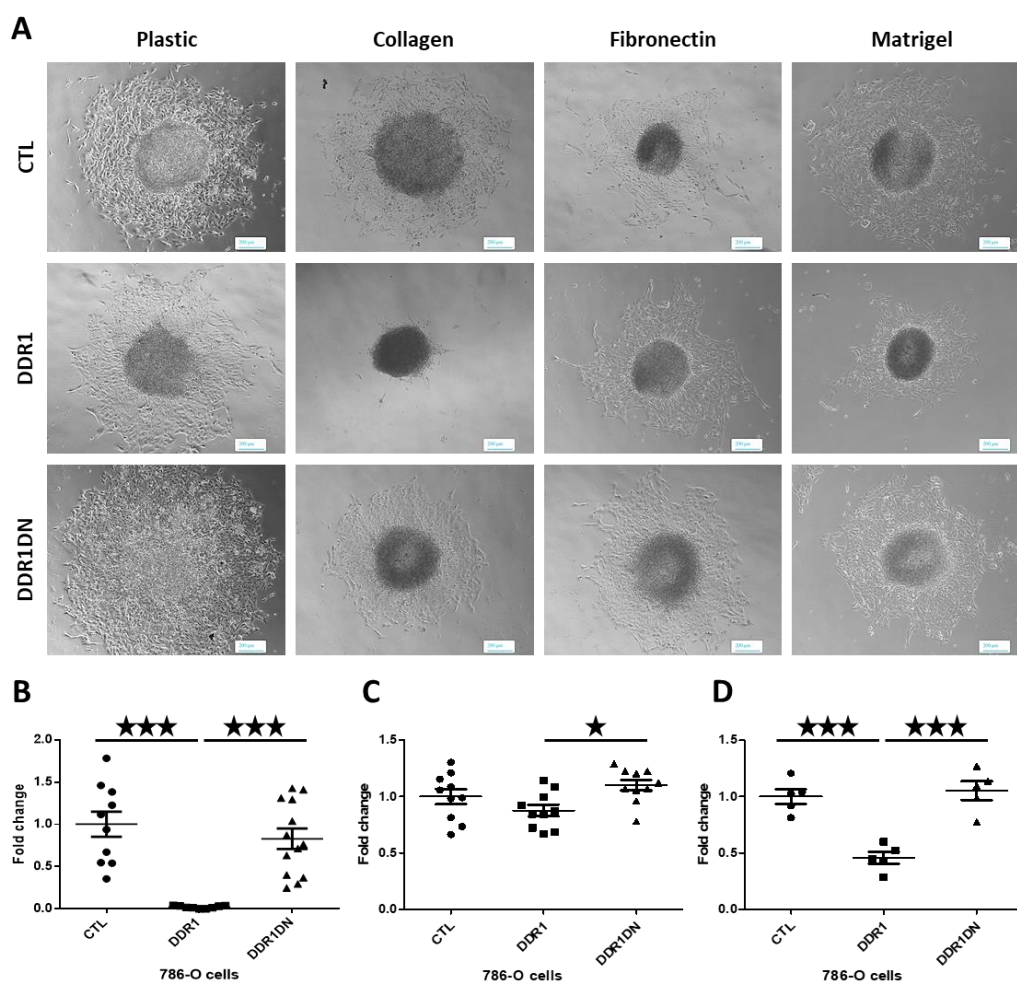


Figure 56 : Impact de l'expression de DDR1 sur la migration cellulaire in vitro des sphéroïdes formés à partir de cellules 786-O. A/Les différents sphéroïdes ont été déposés sur du plastique ou différentes matrices (Collagène I, Fibronectine et Matrigel). Quantification de la migration des sphéroïdes sur le collagène I (B), la fibronectine (C) et le Matrigel (D). Le test statistique utilisé est un ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. n= 20-25 N=5.

A l'inverse, les sphéroïdes issus de cellules DDR1 KO déposés sur des matrices de collagène I ou de Matrigel présentent une augmentation de migration par rapport aux

sphéroïdes issus de cellules contrôles. L'absence de stimulation ou la présence d'une autre matrice cellulaire ne faisant pas partie des ligands de DDR1, telle que la fibronectine n'induit aucun changement dans le profil migratoire (**Figure 57**).

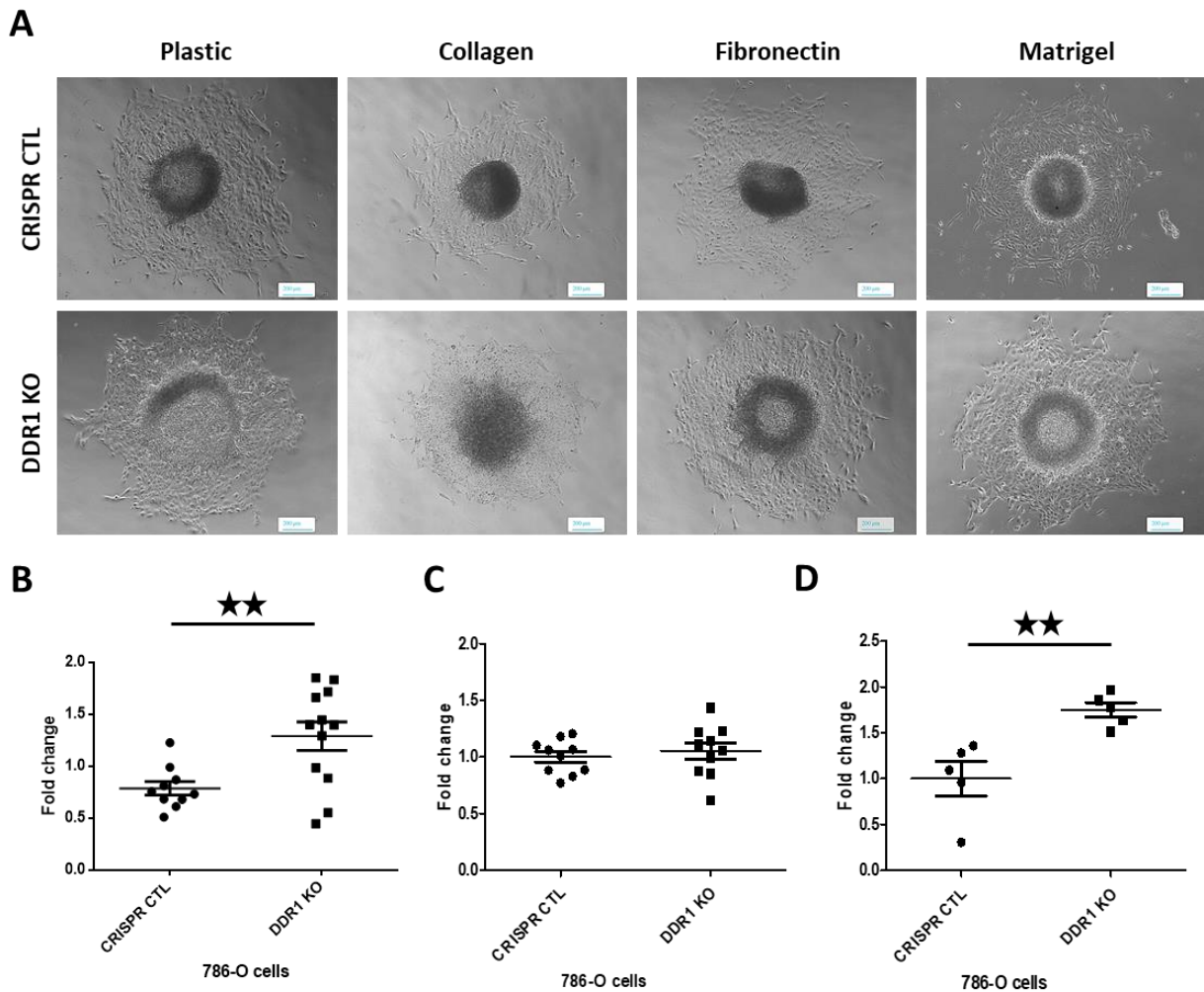


Figure 57 : Impact de l'inactivation de DDR1 sur la migration cellulaire in vitro des sphéroïdes formés à partir de cellules 786-O. A/ Les différents sphéroïdes ont été déposés sur du plastique ou différentes matrices (Collagène I, Fibronectine et Matrigel). Quantification de la migration des sphéroïdes sur le collagène I (B), la fibronectine (C) et le Matrigel (D). Le test statistique utilisé est un t-test bilatéral. n= 20-25, N=5.

En conclusion, ces résultats montrent que la surexpression de DDR1 inhibe la migration cellulaire des 786-O lorsqu'elles sont stimulées par des matrices de collagènes I ou IV. Cette inhibition de migration dépend de la signalisation intracellulaire de DDR1. En revanche, lorsque DDR1 est déplété, le phénotype est inversé et la migration est stimulée en présence de matrices contenant les collagènes, ligands de DDR1.

2. Expression des facteurs de transcription de l'EMT

La modulation de la migration cellulaire en fonction de l'expression de DDR1 pourrait entraîner des changements dans l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. Pour ce faire, l'influence de DDR1 sur l'expression de Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2 a été testée par RT-qPCR à partir d'ARNm provenant de cellules cultivées en 2D et en 3D, après stimulation des cellules pendant 48h par du collagène I.

La surexpression de DDR1 dans les cellules Renca induit une inhibition de l'expression des facteurs de transcription Zeb2 et Snail1 des cellules cultivées en 2D ou en 3D (**Figure 58**). Lorsque les cellules Renca surexpriment la forme DDR1DN du récepteur, une diminution significative de Zeb2 et Snail1 est observée dans les cellules cultivées en 2D (**Figure 58A**) mais n'est pas retrouvée si les cellules sont cultivées en 3D (**Figure 58B**).

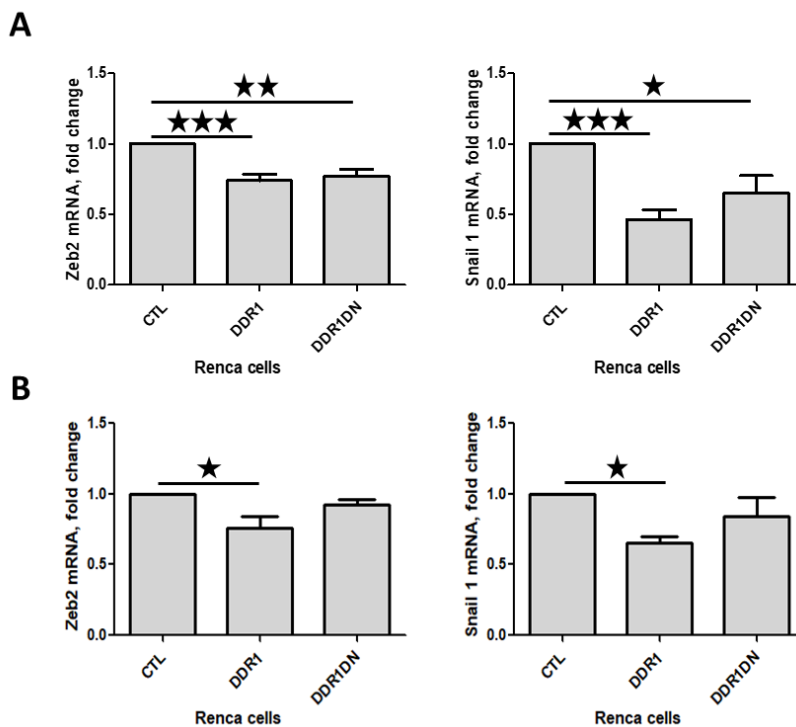


Figure 58 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. Les niveaux d'ARNm de Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2 dans les cellules Renca ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (2D, N=5) (A) ou d'inclusion dans une matrice de collagène I (3D, N=5) (B). Le test statistique utilisé est un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni.

Au contraire, la déplétion de DDR1 dans ces cellules favorise le processus d'EMT en augmentant l'expression de Zeb1 et Snail1 dans les cellules cultivées en 2D et 3D et de Zeb2 uniquement dans les cellules cultivées en 2D (**Figure 59A et B**).

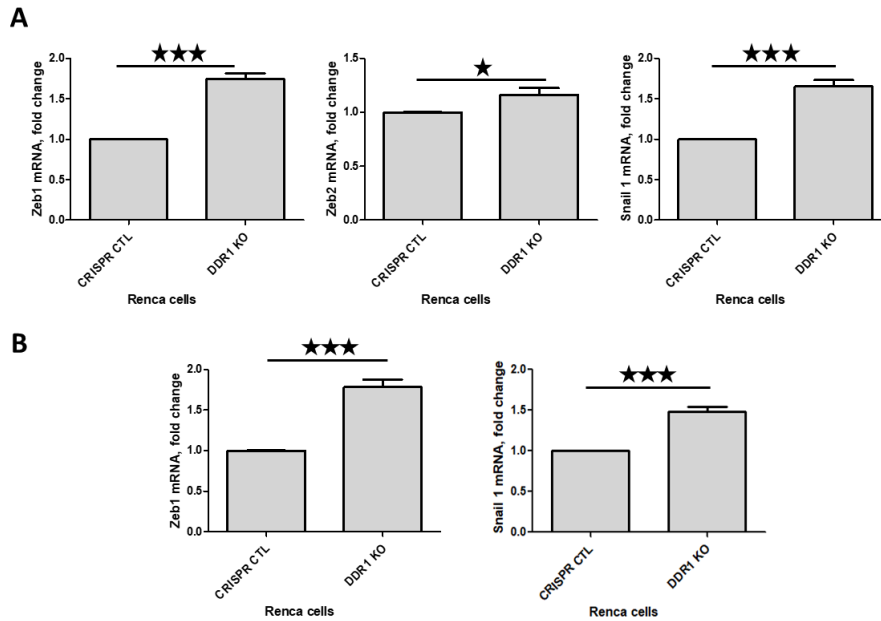


Figure 59 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. Les niveaux d'ARNm de Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2 dans les cellules Renca ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (2D, A) ou d'inclusion dans une matrice de collagène I (3D, B). Le test statistique utilisé est un t-test bilatéral. N=4.

En outre, dans les cellules 786-O la surexpression et la déplétion de DDR1 induisent les effets inverses à ceux précédemment observés chez les cellules Renca. Ainsi, la surexpression de DDR1 dans les cellules 786-O induit l'augmentation de l'expression de Snail1 et de Snail2 si les cellules sont cultivées en 2D (Figure 60A), qui n'est pas retrouvée si les cellules sont cultivées en 3D où seulement une tendance à l'augmentation est observée (Figure 60B).

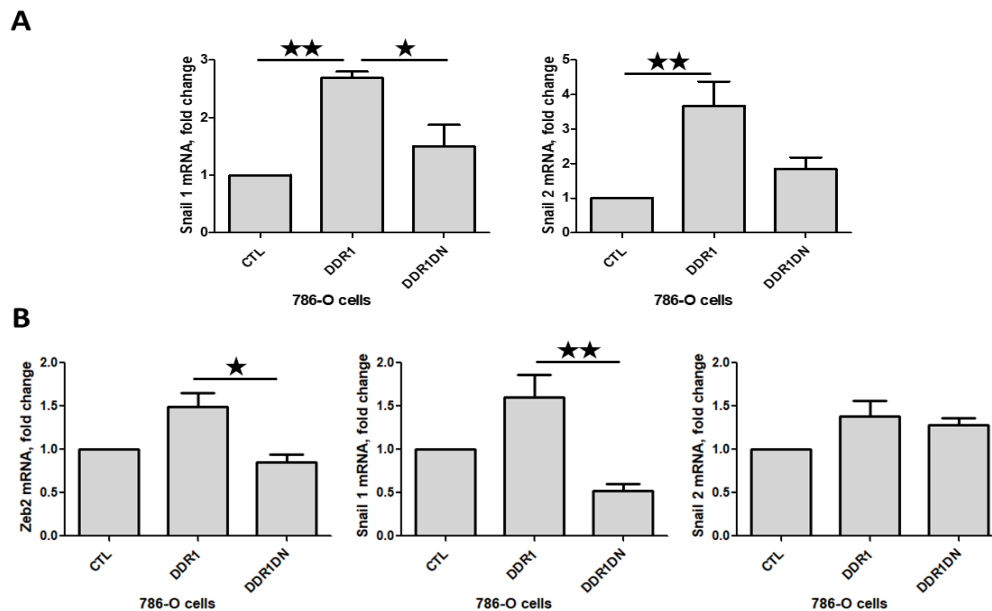


Figure 60 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. Les niveaux d'ARNm de Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2 dans les cellules 786-O ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (2D, N=4) (A) ou d'inclusion dans une matrice de collagène I (3D, N=3) (B). Le test statistique utilisé est un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni.

A contrario, la déplétion de DDR1 dans ces cellules 786-O inhibe l'expression de Zeb2 et de Snail1 si les cellules sont cultivées en 2D et en 3D. De façon surprenante, les expressions de Zeb1 et Snail2 sont également inhibées si les cellules sont cultivées en 3D (**Figure 61**).

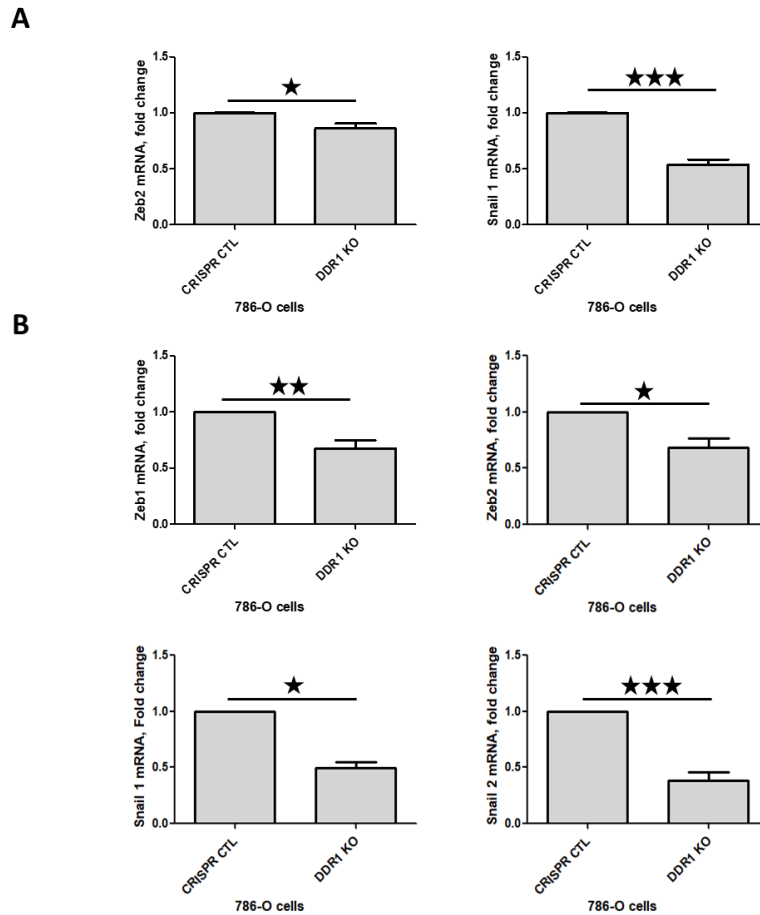


Figure 61 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. Les niveaux d'ARNm de Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2 dans les cellules 786-O ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (2D, A) ou d'inclusion dans la matrice de collagène I (3D, B). Le test statistique utilisé est un t-test bilatéral. (N=4).

En conclusion, la surexpression de DDR1 impacte de manière inverse les facteurs de transcription de l'EMT dans les 2 lignées cellulaires de RCC. Dans les cellules Renca, DDR1 inhibe l'expression de ces facteurs de transcription, ce qui suggère une diminution de l'EMT dans ces cellules. A l'inverse, dans les cellules 786-O, DDR1 favorise l'expression de ces facteurs de transcription suggérant une EMT augmentée. A contrario, les déplétions de DDR1 dans les 2 lignées inversent les phénotypes observés lors de la surexpression.

H) Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur l'invasion cellulaire

L'invasion fait partie, tout comme la prolifération et la migration, de mécanismes importants permettant la progression tumorale. Les 2 premiers étant impactés par

l'expression et la déplétion de DDR1, le rôle du récepteur a été appréhendé dans l'invasion cellulaire.

1. Invasion à partir de sphéroïdes

Les capacités invasives des différentes cellules 786-O ont été regardées à partir de sphéroïdes inclus dans une matrice de collagène I au bout de 24h.

Comme reporté dans la **figure 62**, la surexpression de DDR1 induit une forte diminution de l'invasion comparée aux conditions CTL et DDR1DN. Les effets de la déplétion de DDR1 sur l'invasion des cellules des sphéroïdes sont en cours de quantification.

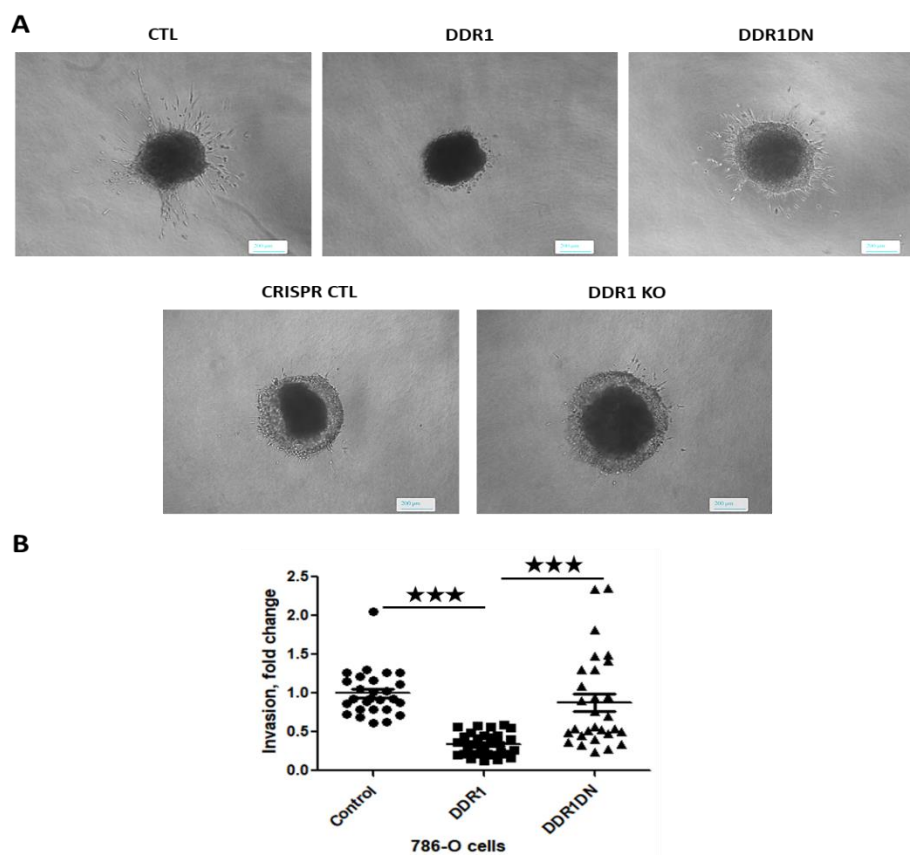


Figure 62 : Impact de l'expression de DDR1 sur l'invasion cellulaire in vitro à partir de sphéroïdes issus de cellules 786-O. A/ Les différents sphéroïdes ont été inclus dans une matrice de collagène I. B/ Quantification de l'invasion cellulaire au sein du collagène I. Le test statistique utilisé est un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. n =20-25, N=5.

DDR1 provoque, à l'instar des processus de prolifération et de migration, une inhibition de l'invasion au sein d'une matrice de collagène I. Comme pour la migration, l'inhibition de l'invasion est dépendante de la signalisation intracellulaire de DDR1 et non pas de la capacité des cellules à mieux adhérer sur le collagène I car les cellules DDR1DN sont capables d'envahir la matrice aussi bien que les cellules contrôles.

2. Expressions et activités de MMP2 et MMP9

Afin d'envahir le tissu environnant, les cellules tumorales doivent dégrader la MEC. La destruction de celle-ci est effectuée par différentes enzymes, en particulier par les MMP2 et MMP9. La capacité des différentes cellules à sécréter, dans le milieu de culture, des protéases capables de dégrader une matrice de gélatine a été évaluée à l'aide d'expériences de zymographie après 24h de stimulation des cellules par du collagène I.

Les zymogrammes des cellules Renca et 786-O mettent en exergue l'apparition de bandes de protéolyse au niveau de 92kDa mettant en évidence la forme inactive précurseur ou pro-MMP9 et une autre bande de protéolyse de plus petit poids moléculaire (82kDa) correspondant à la forme active de MMP9. De plus, des bandes de protéolyse de taille apparente comprises entre 62 et 64kDa montrent les formes actives de MMP2. La quantification des activités de ces protéases dans les cellules Renca fait ressortir une tendance à la diminution non significative de l'activité de MMP2 et 9 lorsque DDR1 est surexprimé. La surexpression de DDR1DN diminue l'activité de MMP9 (**Figure 63**).

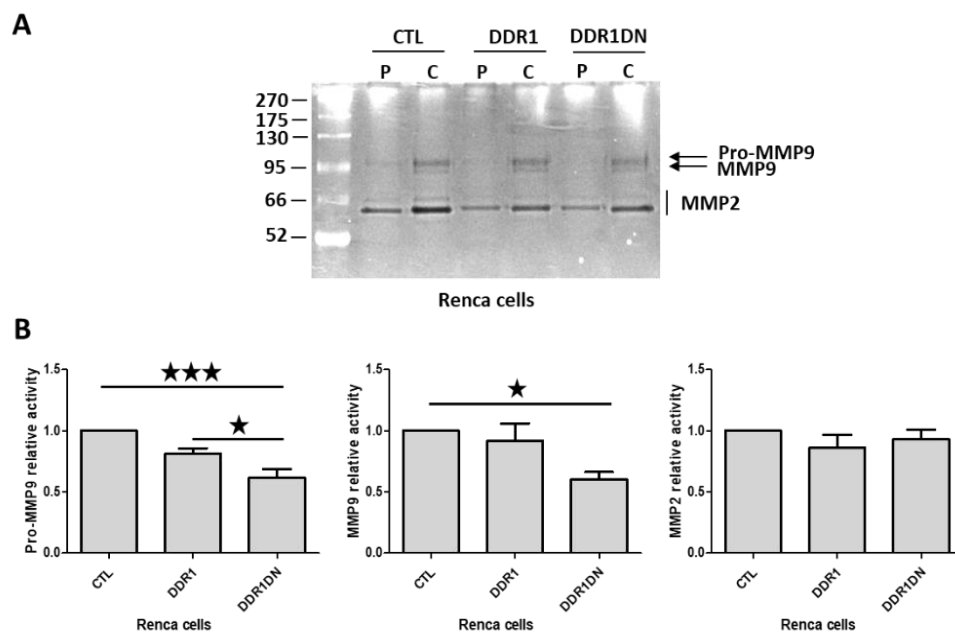


Figure 63 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules Renca.
A/ Gel représentatif des expériences de zymographie menées afin d'analyser la capacité des surnageants des cellules CTL, DDR1 et DDR1DN à dégrader une matrice de gélatine après 24h de stimulation par une matrice de collagène I (C) ou sans stimulation (P). **B/** Quantification des activités de la forme inactive de MMP9 (Pro-MMP9) et des formes actives de MMP9 et MMP2 des cellules stimulées par le collagène I. Le test statistique utilisé est un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (N=5).

La déplétion de DDR1 dans les cellules Renca n'induit aucun changement significatif dans l'activité des MMP2 et MMP9 (**Figure 64**).

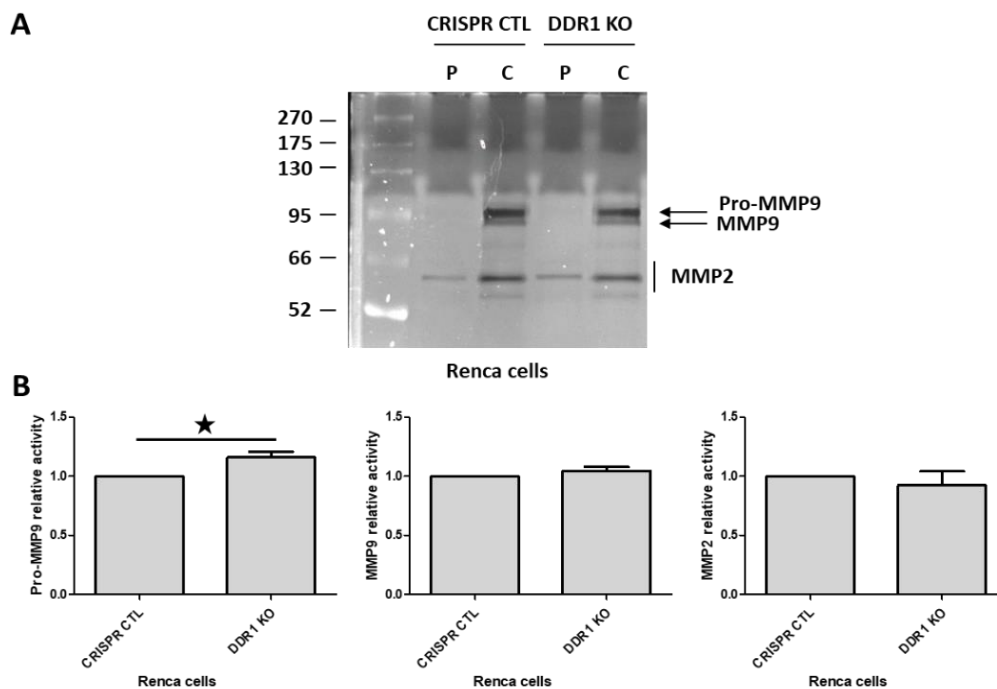


Figure 64 : Impact de la déplétion de DDR1 sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules Renca. A/ Gel représentatif des expériences de zymographie menées afin d'analyser la capacité des surnageants des cellules CRISPR CTL et DDR1 KO à dégrader une matrice de gélatine après 24h de stimulation par une matrice de collagène I (C) ou sans stimulation (P). **B/** Quantification des activités de la forme inactive de MMP9 (Pro-MMP9) et des formes actives de MMP9 et MMP2 des cellules stimulées par le collagène I. Le test statistique utilisé est un t-test bilatéral (N=5).

Le niveau d'expression des ARNm des protéases MMP2 et MMP9 a ensuite été analysé. Le niveau d'expression de MMP14 impliqué dans l'activation de MMP2 et dans certains cas de MMP9 a aussi été regardé. Les niveaux d'ARNm des protéases MMP2, MMP9 et MMP14 sont similaires, que les cellules Renca soient stimulées sur une matrice de collagène I (2D) ou incluses en son sein (3D). Les surexpressions de DDR1 et DDR1DN n'induisent qu'une baisse d'expression significative de MMP2 en 2D et 3D. Les niveaux d'ARNm de MMP9 et MMP14 restent inchangés (**Figure 65**).

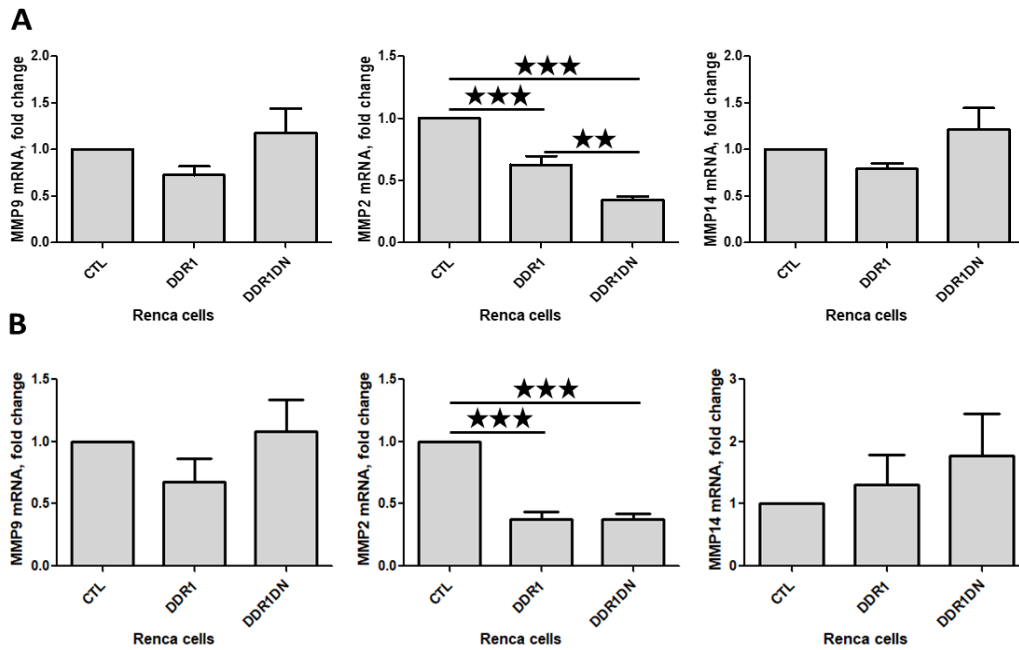


Figure 65 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules Renca. Les niveaux d'ARNm de MMP2, MMP9 et MMP14 dans les cellules Renca CTL, DDR1 et DDR1DN ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (A) ou incluses dans une matrice de collagène I (B). Le test statistique utilisé est un ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. (N=5).

La stimulation 2D ou 3D par le collagène I des cellules Renca DDR1 KO provoque une augmentation significative des niveaux d'expression des ARNm des protéinases MMP2 et MMP9 et n'a aucun effet sur le niveau d'expression des ARNm de MMP14 (Figure 66).

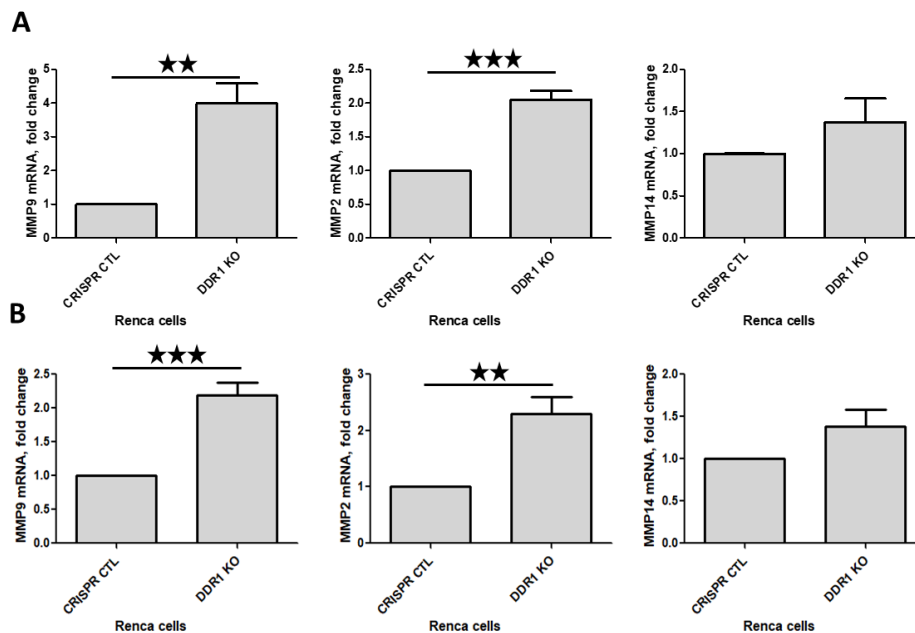


Figure 66 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules Renca. Les niveaux d'ARNm de MMP2, MMP9 et MMP14 dans les cellules Renca CRISPR CTL et DDR1 KO ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (A) ou incluses dans une matrice de collagène I (B). Le test statistique utilisé est un t-test bilatéral. (N=4)

Le zymogramme des cellules 786-O montre que la surexpression de DDR1 et DDR1DN entraîne une forte diminution de l'activité de MMP9. Par ailleurs, seule la surexpression de DDR1DN est capable d'engendrer une augmentation significative de l'activité de MMP2 (Figure 67).

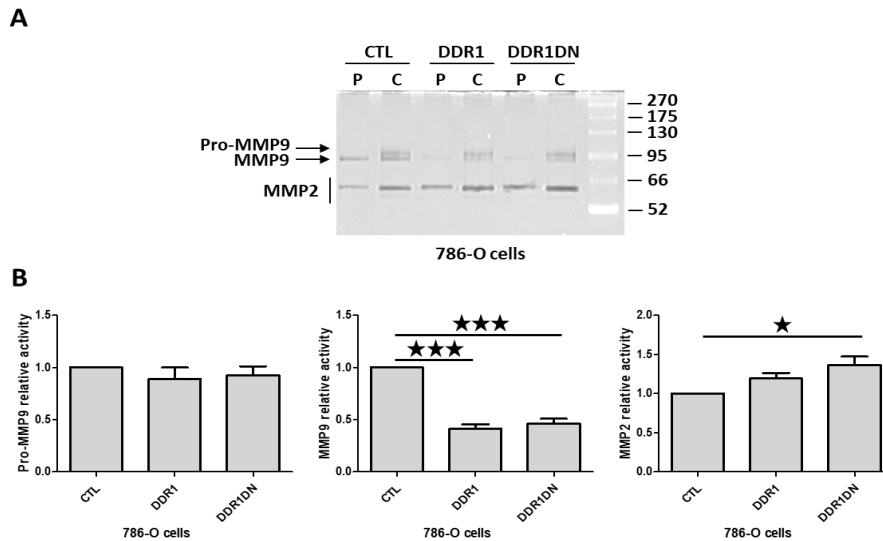


Figure 67 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules 786-O. **A/** Gel représentatif des expériences de zymographie menées afin d'analyser la capacité des surnageants des cellules CTL, DDR1 et DDR1DN à dégrader une matrice de gélatine après 24h de stimulation par une matrice de collagène I (C) ou sans stimulation (P). **B/** Quantification des activités de la forme inactive de MMP9 (Pro-MMP9) et des formes actives de MMP9 et MMP2 des cellules stimulées par le collagène I. Le test statistique utilisé est un test ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni (N=5).

La déplétion de DDR1 dans les cellules 786-O induit une légère diminution de l'activité de MMP9 et aucun changement significatif de l'activité de MMP2 (Figure 68).

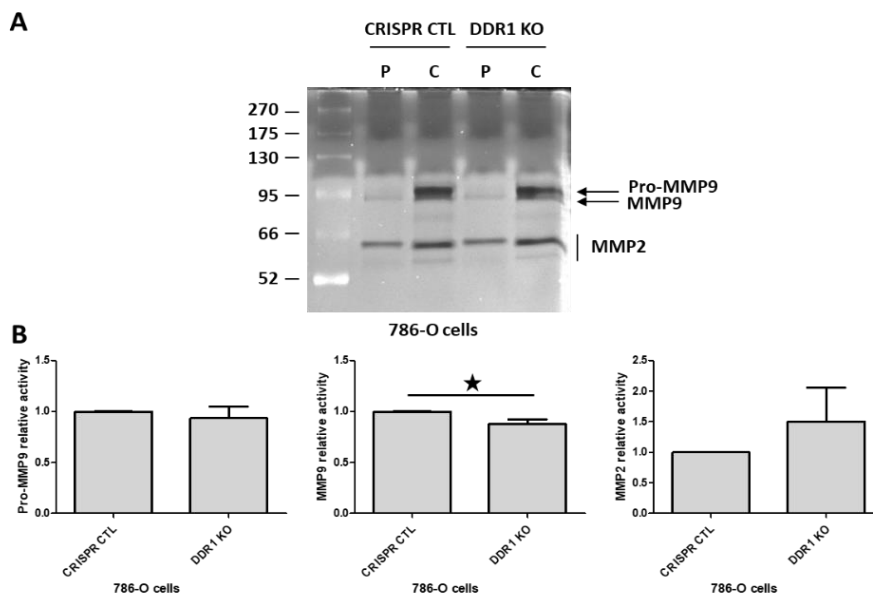


Figure 68 : Impact de la déplétion de DDR1 sur les activités de MMP2 et MMP9 des cellules 786-O. **A/** Gel représentatif des expériences de zymographie menées afin d'analyser la capacité des surnageants des cellules CRISPR CTL et DDR1 KO à dégrader une matrice de gélatine après 24h de stimulation par une matrice de collagène I (C) ou sans stimulation (P). **B/** Quantification des activités de la forme inactive de MMP9 (Pro-MMP9) et des formes actives de MMP9 et MMP2 des cellules stimulées par le collagène I. Le test statistique utilisé est un t-test bilatéral (N=5).

Les analyses par RT-qPCR des niveaux d'expression des ARNm dans les cellules 786-O, après stimulation en 2D ou en 3D par le collagène I montrent des profils similaires. En effet, les niveaux d'ARNm de MMP9 sont fortement diminués en 2D, et pratiquement indétectables en 3D, lorsque DDR1 et DDR1DN sont surexprimés. Les cellules DDR1 stimulées en 2D et en 3D par le collagène I expriment plus d'ARNm MMP14 que les autres conditions. Il n'y a aucune différence d'expression des ARNm MMP2 entre les CTL, DDR1 et DDR1DN que les cellules soient stimulées en 2D ou en 3D par le collagène I (**Figure 69**).

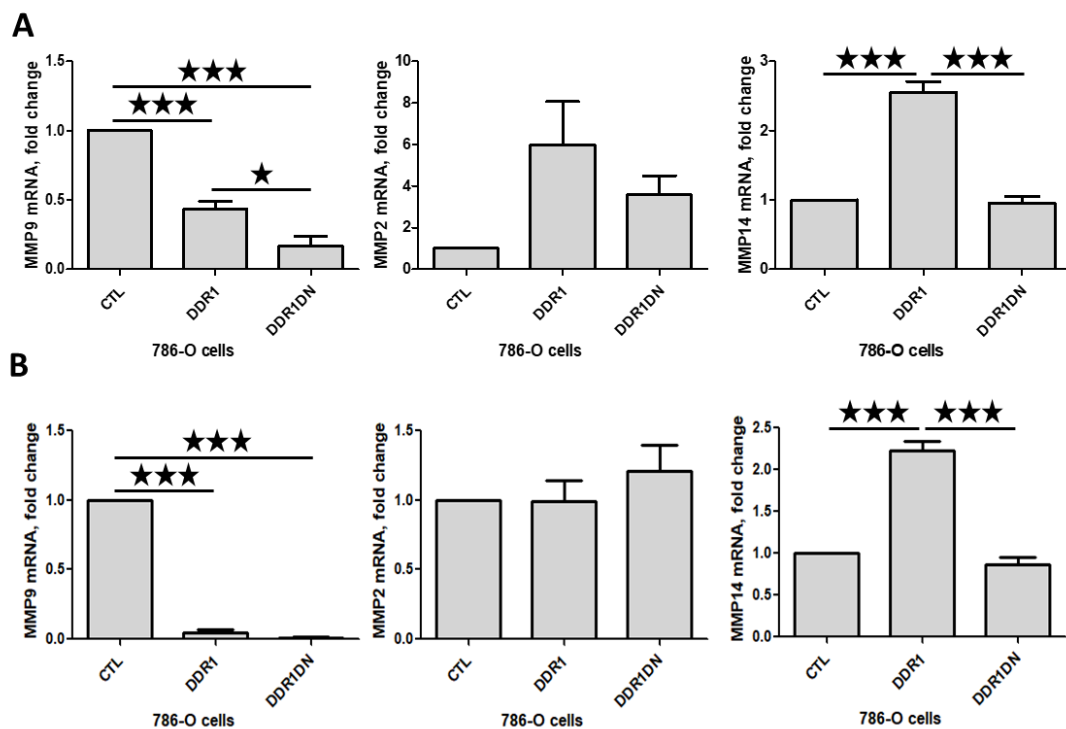


Figure 69 : Impact de la surexpression de DDR1 ou DDR1DN sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules 786-O. Les niveaux d'ARNm de MMP2, MMP9 et MMP14 dans les cellules 786-O CTL, DDR1 et DDR1DN ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (**A**) ou incluses dans la matrice de collagène I (**B**). Le test statistique utilisé est un ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. (N=5).

La déplétion de DDR1 induit une tendance à la diminution des niveaux d'ARNm des MMP2, 9 et 14 lorsque les cellules 786-O sont stimulées en 2D par le collagène I. Cette tendance à la baisse devient significative pour MMP9 et MMP14 quand les cellules sont stimulées en 3D (**Figure 70**).

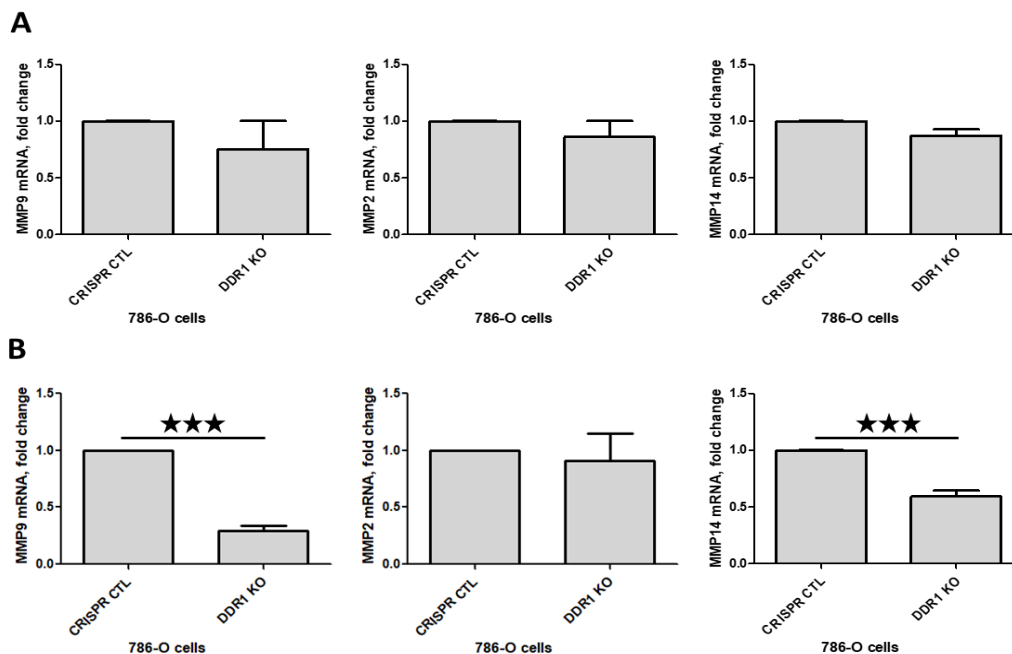


Figure 70 : Impact de la déplétion de DDR1 sur l'expression des ARNm des protéinases MMP2, MMP9 et MMP14 par les cellules 786-O. Les niveaux d'ARNm de MMP2, MMP9 et MMP14 dans les cellules 786-O CRISPR CTL et DDR1 KO ont été détectés après 48h de stimulation sur une matrice de collagène I (A) ou incluses dans la matrice de collagène I (B). Le test statistique utilisé est un t-test bilatéral. (N=4)

L'ensemble des résultats concernant l'activité et l'expression des MMP est résumé dans le **tableau 18** ci-dessous :

Cellules	Activités des MMP2 / 9			Expression des ARNm des MMP2 / 9		
	DDR1	DDR1DN	DDR1 KO	DDR1	DDR1DN	DDR1 KO
Renca	Pro-MMP9 = MMP9 ↓ MMP2 ↓	Pro-MMP9 ↓ MMP9 ↓ MMP2 =	Pro-MMP9 ↑ MMP9 = MMP2 =	MMP9 (2D/3D) ↓ MMP2 (2D/3D) ↓	MMP9 = (2D/3D) MMP2 (2D/3D) ↓	MMP9 (2D/3D) ↑ MMP2 (2D/3D) ↑
786-O	Pro-MMP9 = MMP9 ↓ MMP2 ↑	Pro-MMP9 = MMP9 ↓ MMP2 ↑	Pro-MMP9 = MMP9 ↓ MMP2 ↑	MMP9 (2D/3D) ↓ MMP2 (2D) ↑	MMP9 (2D/3D) ↓ MMP2 = (2D/3D) =	MMP9 (3D) ↓ MMP2 (2D/3D) ↓

Tableau 18 : Résumé des analyses des activités des MMP2 et MMP9 retrouvées dans le surnageant cellulaire et des expressions des ARNm MMP2 et 9 dans les cellules Renca et 786-O. = : pas de changement par rapport aux cellules CTL, flèches vers le haut ou le bas : augmentation ou inhibition par rapport aux cellules CTL, si la flèche est en pointillé : tendance seulement.

L'intégration des résultats d'activité et d'expression des ARNm des MMP est difficile et semble dépendre du type cellulaire.

Pour les cellules Renca, la régulation des activités enzymatiques de MMP2 ou 9 ne suit pas la régulation de l'expression de leur ARNm.

Pour les cellules 786-O, l'activité de MMP9 suit le niveau d'expression des ARNm. DDR1 inhibe l'expression des ARNm MMP9 mais de façon indépendante de son activité intracellulaire puisque l'inhibition est retrouvée chez les cellules surexprimant DDR1DN. De plus, cette inhibition est retrouvée chez les cellules DDR1 KO, ce qui suggère un effet de DDR1 sur l'expression des ARNm MMP9 de type « cloche » où une certaine quantité de DDR1 est nécessaire pour permettre l'expression des ARNm MMP9, des niveaux trop faibles ou trop élevés de DDR1 induisant une inhibition des ARNm MMP9. Pour MMP2, comme pour les cellules Renca, la régulation de l'activité ne suit pas les niveaux d'expression des ARNm. L'expression des ARNm MMP14 est dépendante de l'expression de DDR1 et de sa signalisation intracellulaire.

Cette complexité d'intégration, entre les activités des MMP et les niveaux d'expression des ARNm, peut s'expliquer par les multiples possibilités de régulation de ces différentes activités à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

I) Impact *in vivo* de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur le développement des ccRCC

Les différentes analyses *in vitro* montrent une inhibition des processus de prolifération, migration et invasion, impliqués dans la progression tumorale, lorsque DDR1 est surexprimé. L'effet du récepteur sur le développement tumoral a par la suite été analysé *in vivo*.

1. Développement tumoral

Les cellules Renca et 786-O ont été injectées dans la capsule rénale de souris Balb/C pour la lignée Renca et de souris RAG/γ immunodéficientes pour la lignée 786-O.

Concernant les cellules Renca, après environ 3 semaines, les souris ont été sacrifiées et les reins injectés pesés afin de mesurer la croissance tumorale. Les résultats montrent que les surexpressions de DDR1 et DDR1DN induisent une forte inhibition du développement tumoral, plus marquée pour les cellules Renca DDR1. De façon surprenante, le développement

tumoral des cellules Renca DDR1 KO est également diminué en comparaison des tumeurs contrôles (**Figure 71A**).

Concernant les cellules 786-O, des injections sont en cours pour déterminer l'impact de la surexpression de DDR1 et DDR1DN sur le développement tumoral chez des souris RAG/γ. Mais, comme pour les cellules Renca, l'injection de cellules 786-O KO DDR1 induit une inhibition du développement tumoral en comparaison des tumeurs contrôles, après environ 45 jours de croissance (**Figure 71B**).

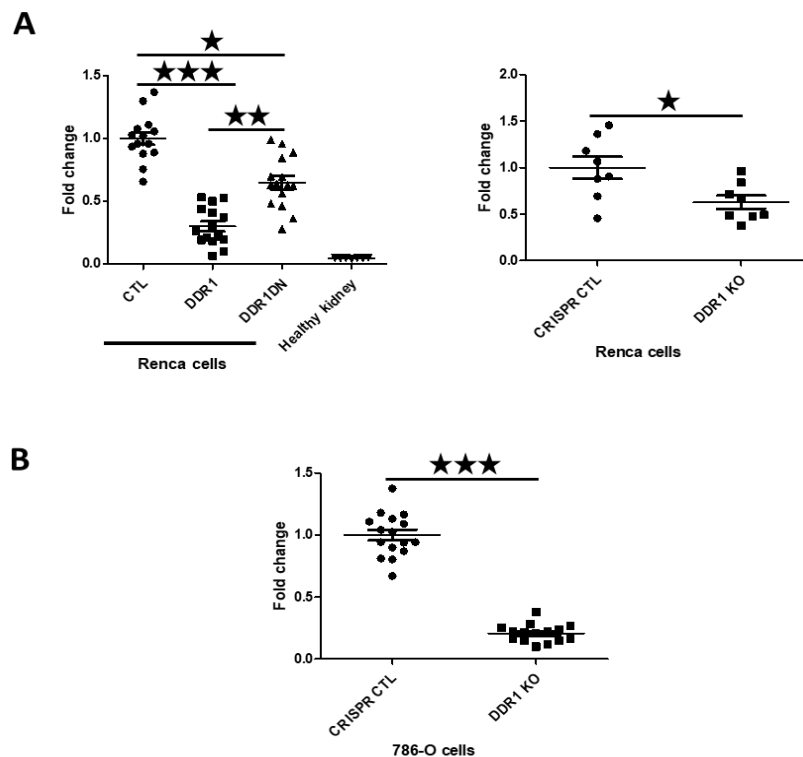


Figure 71 : Impact de l'expression de DDR1 sur le développement tumoral in vivo. A/ Quantification de la croissance des tumeurs provenant de cellules Renca CTL, DDR1 ou DDR1DN (à gauche, N=2, n=15) et CRISPR CTL, DDR1 KO (à droite, N=1, n=8) injectées dans la capsule rénale de souris Balb/c. Après 3 semaines, les reins injectés ont été pesés. Les tests statistiques utilisés sont un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post test de Dunn (à gauche) et un test de Mann et Whitney (à droite). **B/** Quantification de la croissance de tumeurs provenant de cellules 786-O CRISPR CTL et KO DDR1 (N=2, n=15) injectées dans la capsule rénale de souris RAG/γ et pesées après 45 jours de croissance. Le test statistique utilisé est un test de Mann et Whitney.

En conclusion, la surexpression de DDR1 ou DDR1DN est un inhibiteur puissant du développement tumoral *in vivo* dans les cellules Renca. De manière étonnante, et ce dans les cellules Renca et 786-O, la déplétion de DDR1 induit également une inhibition du développement tumoral.

2. Analyses histologiques

Afin de comprendre les différences observées lors du développement tumoral, la morphologie cellulaire des différentes tumeurs a été observée après inclusion dans la paraffine, coupe de 5 μ m puis coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des coupes.

Les colorations des coupes de reins normaux mettent en évidence la présence d'un ensemble compact de petites cellules arrondies possédant un aspect tubulaire, de grosses vésicules, plus ou moins arrondies représentant les pyramides de malpighi (*) et des vaisseaux sanguins (flèches rouges). On retrouve dans les coupes de tumeurs colorées issues des reins injectés avec les différentes cellules Renca des zones non tumorales (marquées NT) et des zones tumorales (indiquées T) caractérisées par la présence de nombreuses cellules désorganisées. Les zones tumorales des tumeurs issues des cellules Renca DDR1 se distinguent des autres par la présence de régions constituées de noyaux plus petits avec un cytoplasme clair (flèches blanches). Ces zones pourraient correspondre à des cellules en apoptose ou de l'inflammation provoquée par le système immunitaire (**Figure 72**).

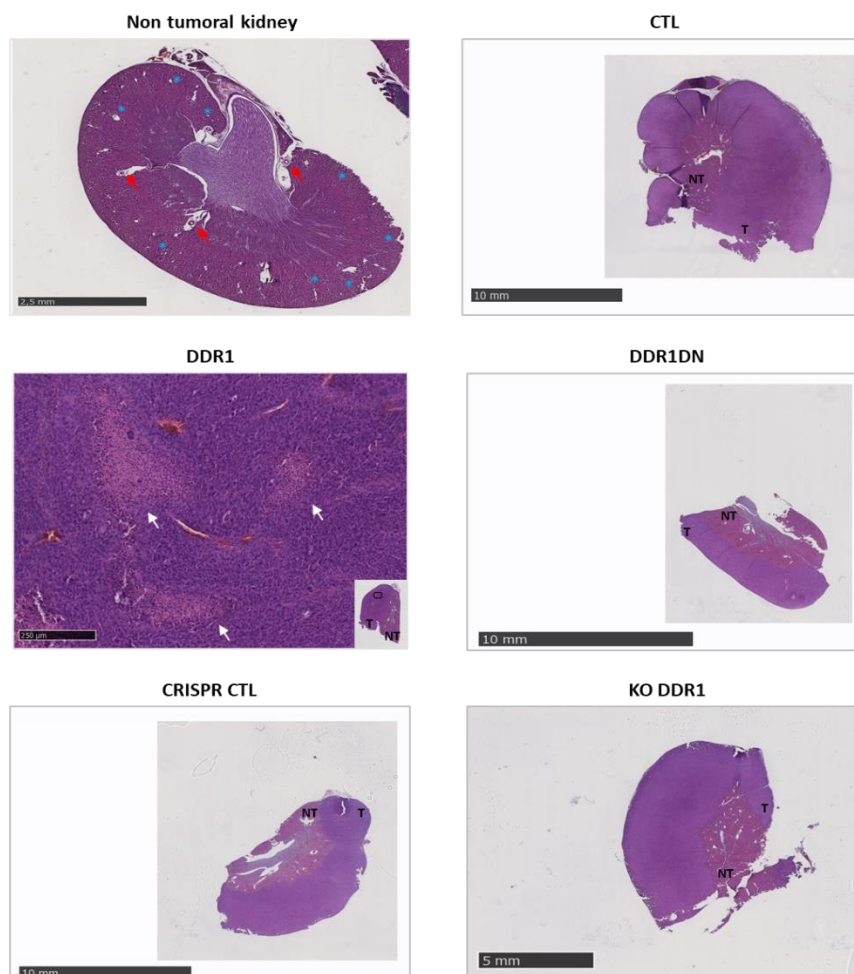


Figure 72 : Coloration Hématoxyline et éosine des coupes de reins et de tumeurs issues des différentes cellules Renca. Les images prises au nanozoomer ont été visualisées sur le logiciel NDP view aux grossissements 1,25X pour les reins non tumoraux, 10X pour les tumeurs DDR1 et 0,35X pour les autres tumeurs.

Principaux résultats	
Concernant la surexpression de DDR1	
<i>In vitro</i> la surexpression de DDR1 induit :	
Lignée Renca	Lignée 786-O
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diminution prolifération (2D/3D) ✓ Ralentissement du cycle cellulaire ✓ Inhibition de l'EMT ✓ Diminution de l'activité MMP9 (DDR1DN) ✓ Diminution ARNm MMP2 2D/3D 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diminution prolifération (2D/3D) ✓ Ralentissement du cycle cellulaire via p21 et CDK2 ✓ Inhibition collagène dépendante de la migration cellulaire ✓ Inhibition de l'invasion cellulaire ✓ Induction de l'EMT ✓ Diminution de l'activité MMP9 ✓ Diminution ARNm MMP9 et augmentation ARNm MMP14 (2D/3D)
<i>In vivo</i> la surexpression de DDR1 induit :	
✓ Forte inhibition du développement	En cours
Concernant la déplétion de DDR1	
<i>In vitro</i> la déplétion de DDR1 induit :	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Induction de l'EMT ✓ Pas d'impact sur activités MMP2/9 ✓ Augmentation ARNm MMP2/9 (2D/3D) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Augmentation de la prolifération en 3D ✓ Augmentation collagène dépendante de la migration cellulaire ✓ Augmentation de l'invasion cellulaire ✓ Inhibition de l'EMT ✓ Diminution de l'activité MMP9 ✓ Diminution ARNm MMP9 et MMP14 (3D)
<i>In vivo</i> la déplétion de DDR1 induit :	
✓ Forte inhibition du développement	✓ Forte inhibition du développement

PROJET 2 : ROLE DE DDR1 DANS LE DEVELOPPEMENT DES TUMEURS DE WILMS

Au cours des dernières années, une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans le développement des WT a pu être mise en évidence à l'aide d'études génomiques et transcriptomiques à grande échelle. Cependant, peu d'informations sont disponibles concernant la composition protéique des différentes lésions lors de l'établissement des WT permettant de les distinguer plus rapidement et de fournir des stratégies thérapeutiques plus ciblées et efficaces.

A) Analyse protéomique

L'analyse protéomique a été effectuée sur 3 malades seulement, comportant chacun des régions non tumorales (NT), des restes néphrogéniques quiescents (RNQ, seuls 2 patients sur les 3) et hyperplasiques (RNH) ainsi que les 3 contingents tumoraux : épithélial (TE), stromal (TS) et blastémateux (TB). Parce que le nombre de patients est faible, cette analyse protéomique sera qualifiée de préliminaire. L'identification des régions d'intérêts à microdissecter et à analyser par spectrométrie de masse a été effectuée après colorations HES dont un exemple d'identification est présenté dans la **figure 73** ci-dessous.

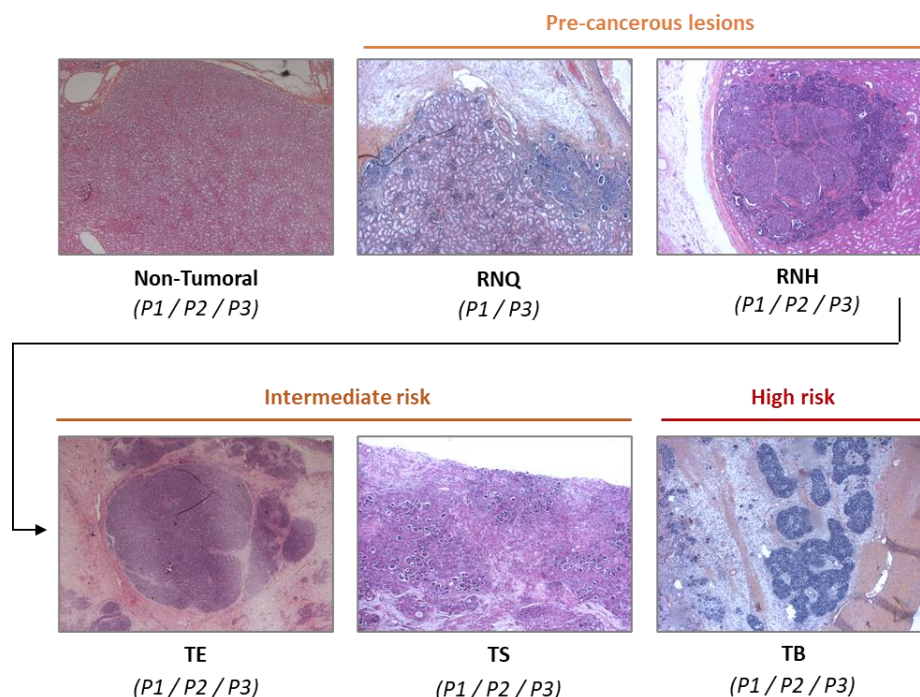


Figure 73 : Images représentatives des différentes régions d'intérêt analysées dans l'étude protéomique préliminaire. Ces régions ont été colorées à l'aide de la coloration Hématoxyline, Eosine et Safran et prises en photo à l'objectif 2,5X du microdissecteur. P : patient.

1. Nombre de protéines détectées

Le nombre de protéines détectées par patient, lors de l'analyse par spectrométrie de masse, est répertorié dans le **tableau 19** ci-dessous :

Patient	Nombre de protéines détectées
1	1334
2	1861
3	1177

Tableau 19 : Nombre de protéines détectées lors de l'analyse par spectrométrie de masse pour chaque patient.

L'analyse des protéines a été effectuée à l'aide du logiciel de classification PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships). Ce logiciel permet de classer les protéines selon différents critères comme leurs fonctions moléculaires ou les voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées. L'analyse s'est focalisée notamment sur la recherche de l'expression dérégulée de composants de la MEC.

2. Analyse comparative entre les RNH et les différents contingents tumoraux

Très peu de différences ont été constatées au niveau de l'expression protéique entre les RNH et les TE. En effet, par rapport aux protéines retrouvées dans les RNH, dans les TE seulement 4 protéines ont été retrouvées sous-exprimées et 3 sur-exprimées chez les 3 patients, l'ensemble de ces dernières n'appartenant pas à la MEC. De plus, aucune voie de signalisation n'a été retrouvée dérégulée entre les RNH et les TE (**Figure 74**).

Entre les RNH et les TS, aucune des 20 protéines, retrouvées sous-exprimées dans les TS des 3 patients, ne sont reliées à la MEC mais sont impliquées dans des processus d'angiogenèse et d'inflammation comme PAK1. En revanche, la majorité des 14 protéines, retrouvées sur-exprimées dans les TS de ces 3 patients, appartiennent à la MEC comme le collagène VI ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), XIV ou la fibrilline (**Figure 74**).

Enfin, parmi les 9 protéines dont l'expression est sous-exprimées dans les TB par rapport aux RNH chez les 3 patients, des protéines de la MEC comme la laminine ou le nidogène sont retrouvées. En revanche, aucune protéine constatée sur-exprimée dans les TB des 3 patients n'appartient à la MEC (**Figure 74**).

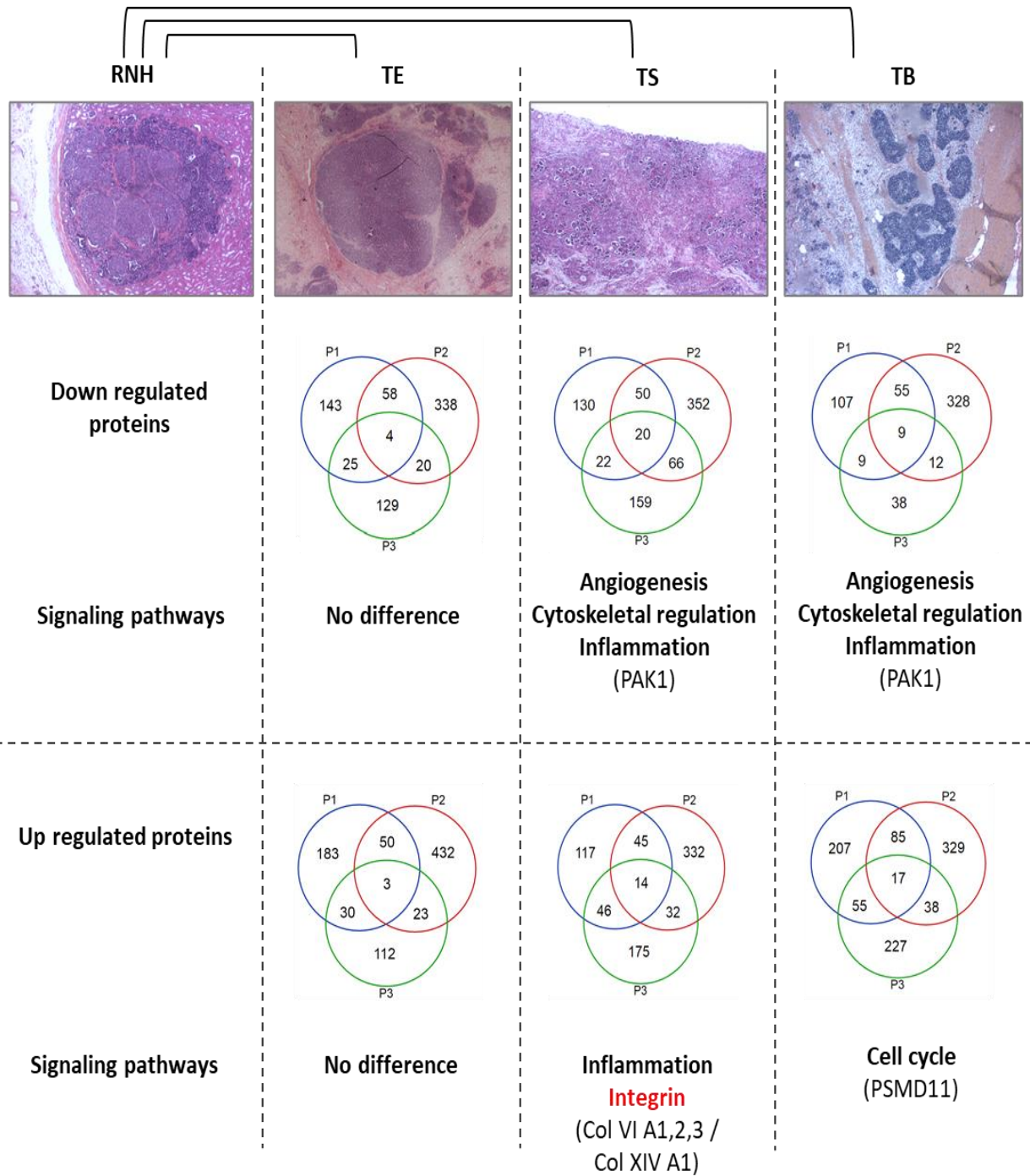


Figure 74 : Récapitulatif de l'analyse comparative entre les RNH et les différents contingents tumoraux. Le nombre de protéines ainsi que certaines voies de signalisation potentiellement sous- ou sur-exprimées sont indiquées. L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel PANTHER.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats préliminaires montrent peu de différences d'expressions protéiques entre les RNH et les contingents tumoraux. Ces observations devront être confirmées par l'inclusion de cas supplémentaires.

3. Analyse comparative entre les RNQ et les différents contingents tumoraux

Compte tenu des faibles différences observées entre les RNH et les contingents tumoraux, une analyse comparative protéique a aussi été réalisée entre les RNQ et les différents contingents avec seulement 2 patients pour les RNQ. Le patient 2 possède des RNQ mais en trop faible quantité pour pouvoir faire une analyse protéomique (**Figure 75**).

En comparaison des RNQ, de nombreuses protéines de la MEC sont retrouvées sous-exprimées dans les TE, par exemple les collagènes I, IV, VI, les laminines $\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 3$ ou les HSPG2. En revanche, dans les protéines sur-exprimées on retrouve beaucoup de protéines impliquées dans l'interaction avec les acides nucléiques (mécanisme de transcription ou stabilisation/dégradation des ARN etc.).

Dans les TS, une diminution de l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme et/ou appartenant à la MEC (collagène I, IV, VI, les laminines $\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 1$ etc.) est observée. A contrario, et comme précédemment dans les TE, une augmentation des protéines impliquées dans l'interaction avec les acides nucléiques est constatée.

Enfin, dans les TB, un profil similaire aux TS précédemment décrit est observé avec plus de protéines communes aux 2 patients analysées (121 contre 74 sous-exprimées et 237 contre 77 sur-exprimées). On retrouve, ainsi, une diminution de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme et de protéines de la MEC (notamment des collagènes I, IV, VI, XVIII et des laminines $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$). En revanche, les protéines sur-exprimées sont importantes dans l'interaction avec les acides nucléiques et la traduction.

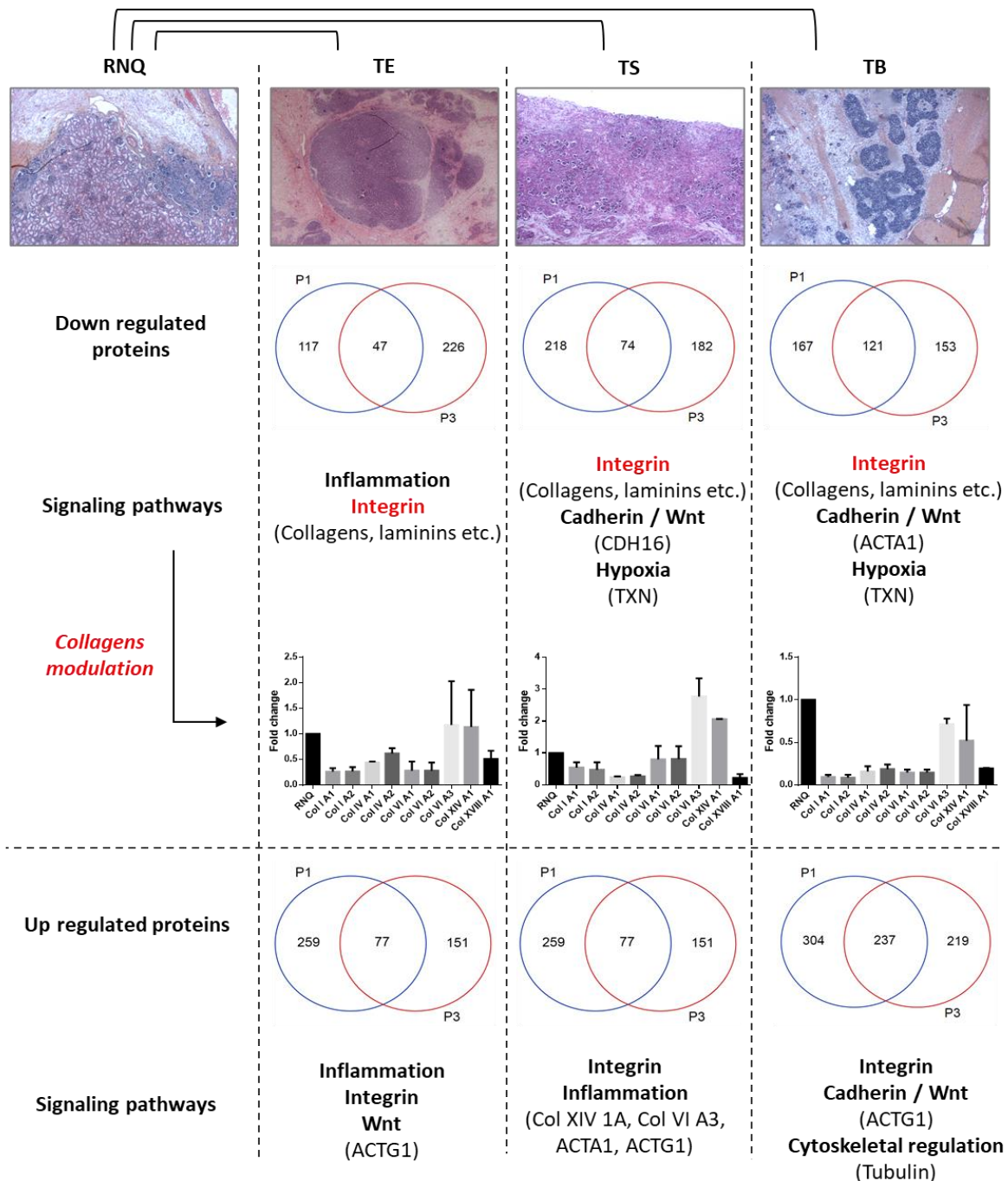


Figure 75 : Récapitulatif de l'analyse comparative entre les RNQ et les différents contingents tumoraux. Le nombre de protéines ainsi que certaines voies de signalisation potentiellement sous- et sur-exprimées sont indiquées. L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel PANTHER.

En conclusion, lors de l'analyse comparative entre les RNQ et les différents contingents tumoraux, une diminution de l'expression des collagènes IA1, IA2, IVA1, IVA2, VIA1, VIA2 et XVIII A1 a été observée dans tous les contingents, et plus marquée dans les TB. Par contre, les collagènes VIA3 et XIVA1 sont sur-exprimés dans les TE et TS et sous-exprimés dans les TB.

B) Hypothèse et modèle d'étude

Les résultats de l'analyse protéomique préliminaire mettent en évidence une diminution de certaines protéines de la MEC, particulièrement des collagènes I, IV, VI dans les RNH et qui persistent dans les contingents tumoraux. Ces résultats, qui devront être confirmés par l'inclusion de cas supplémentaires, suggèrent que de grandes quantités de collagène I, IV et VI pourraient être délétères pour le développement de ces tumeurs. Ce composant principal de la MEC est capable d'influencer le comportement cellulaire, via l'activation de ces récepteurs, principalement les intégrines et les DDR, entraînant diverses voies de signalisation intracellulaires. L'hypothèse formulée ici serait que DDR1 induirait également un effet antitumoral dans les WT, à l'instar des RCC, même si les origines de ces 2 cancers sont différentes. Afin de vérifier cette supposition, plusieurs expériences ont été réalisées à partir de cellules de WT, WT-CLS1, exprimant de manière endogène DDR1 (CTL). Ces cellules, bien qu'issues d'une WT, ont été récemment classifiées comme rhabdoïdes mais sont les seules cellules proches des WT qu'il est possible de conserver en culture [227]. Ces cellules ont par la suite été modifiées au laboratoire pour surexprimer à différents niveaux ce récepteur (DDR1-1 et DDR1-2) mais aussi pour inactiver son expression (DDR1 KO). La plupart des expériences ont été conduites en stimulant les sphéroïdes WT-CLS1 avec du collagène I, appartenant à la matrice interstitielle, et du collagène IV retrouvé dans la membrane basale de la MEC.

C) Niveau d'expression de DDR1 dans les cellules WT-CLS1

Régulièrement et de la même manière que pour les lignées de RCC, l'expression de DDR1 a été vérifiée dans les cellules WT-CLS1 par western blot.

Comme reporté **figure 76**, l'expression endogène de DDR1 est visualisée dans les cellules WT-CLS1 CTL par la présence d'une bande de faible intensité à la taille attendue du récepteur (120kDa). La surexpression de DDR1 dans les lignées WT-CLS1 DDR1-1 et DDR1-2 (de 7,3 fois pour DDR1-1 et 17,6 fois pour DDR1-2) est validée par l'apparition d'une bande de forte intensité à 120kDa. Par ailleurs, le phénomène de shedding décrit précédemment est visible dans les lignées CTL, DDR1-1 et DDR1-2 par la présence d'une bande à 60kDa. Enfin, l'expression de DDR1 est absente dans les cellules DDR1 KO.

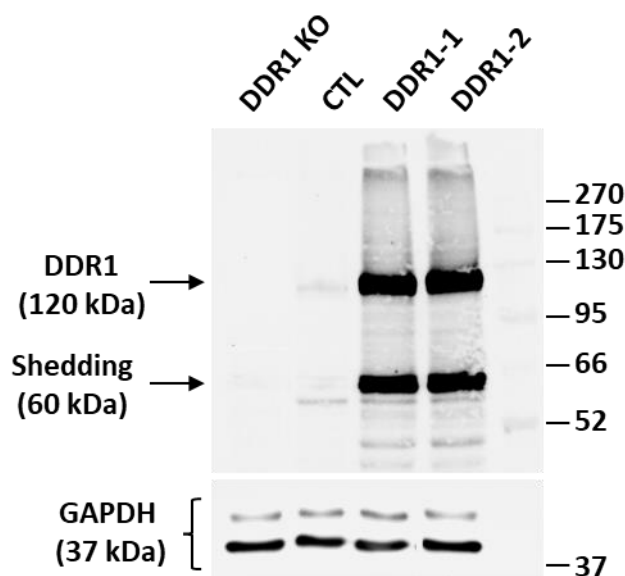


Figure 76 : Vérification du niveau d'expression de DDR1 par western blot dans la lignée cellulaire de WT. Le western blot est représentatif de l'expression de DDR1 dans les lignées WT-CLS1. Les blots du bas représentent la détection de la GAPDH dans les 4 lignées. Après quantification de l'intensité des bandes et normalisation par l'intensité des bandes GAPDH correspondantes, l'augmentation de l'expression de la protéine DDR1 a été mesurée (N=3).

D) Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la prolifération cellulaire

Dans un premier temps, l'étude de la prolifération cellulaire *in vitro*, à partir de sphéroïdes, n'a pas pu aboutir faute de résultats reproductibles. Afin d'évaluer l'impact de DDR1 sur la prolifération cellulaire, des tests de prolifération en 2D des cellules, avec ou sans stimulation par des matrices de collagène I ou IV, ont été réalisés.

Lorsque les cellules sont stimulées par une matrice de collagène I, un profil similaire de prolifération est observé pour les lignées WT-CLS1 CTL et DDR1 KO. En revanche, la prolifération des cellules surexprimant différents niveaux de DDR1 (DDR1-1 et DDR1-2) est fortement inhibée à partir de 48h, en comparaison des cellules CTL et DDR1 KO. De plus, lorsque les cellules sont stimulées par une matrice de collagène IV, les mêmes effets sont globalement constatés pour les 4 lignées analysées. En effet, un profil similaire de prolifération est observé pour les lignées WT-CLS1 CTL et DDR1 KO. Une diminution significative de la prolifération cellulaire est remarquée au bout de 72h lorsque les cellules surexpriment DDR1 par rapport aux lignées CTL et DDR1 KO (DDR1-1) et uniquement aux DDR1 KO (DDR1-2) (**Figure 77**).

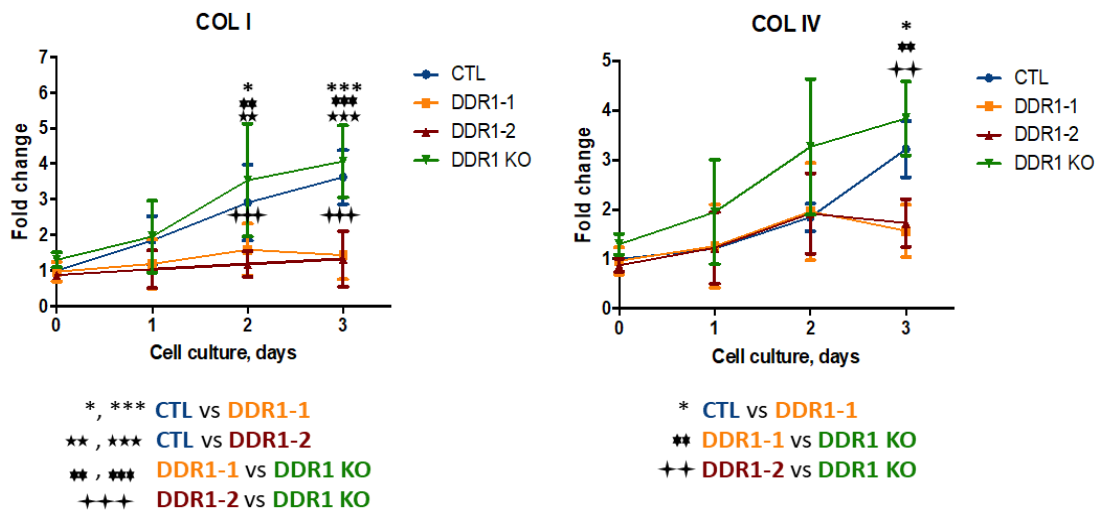


Figure 77 : Impact de l'expression DDR1 sur la prolifération in vitro des cellules WT-CLS1. Test de prolifération 2D où les cellules ont été cultivées sur une matrice de Collagène I ou collagène IV pendant 72h. Le test statistique utilisé est un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un post test de Bonferroni (N=4).

L'analyse de ces résultats montre que la surexpression de DDR1 inhibe la prolifération cellulaire en 2D de manière collagène dépendante. Cette inhibition est plus prononcée lorsque les cellules sont stimulées par une matrice de collagène I.

E) Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur la migration cellulaire

Les résultats précédents montrant une inhibition de la prolifération notamment lorsque DDR1 est surexprimé, le rôle de ce récepteur a aussi été appréhendé dans d'autres mécanismes nécessaires à la progression tumorale en commençant par la migration.

L'analyse de la migration cellulaire des différentes cellules, stimulées ou non (plastique) par plusieurs matrices (collagène I, IV et fibronectine), a été effectuée après 24h à partir de sphéroïdes.

En absence de stimulation, la surexpression et la déplétion de DDR1 induisent une diminution significative de la migration par rapport aux cellules CTL. Un profil similaire de migration est observé lorsque les cellules sont stimulées par une matrice de collagène IV. En présence d'une matrice de collagène I, si un profil similaire à ceux précédemment observés sans stimulation ou en collagène IV est obtenu pour les cellules DDR1 KO, une inhibition totale de la migration est constatée dans les lignées DDR1-1 et DDR1-2. La présence d'une autre matrice ne faisant pas partie des ligands de DDR1 (fibronectine) engendre une petite diminution significative de la migration uniquement dans les cellules DDR1-1 (**Figure 78**).

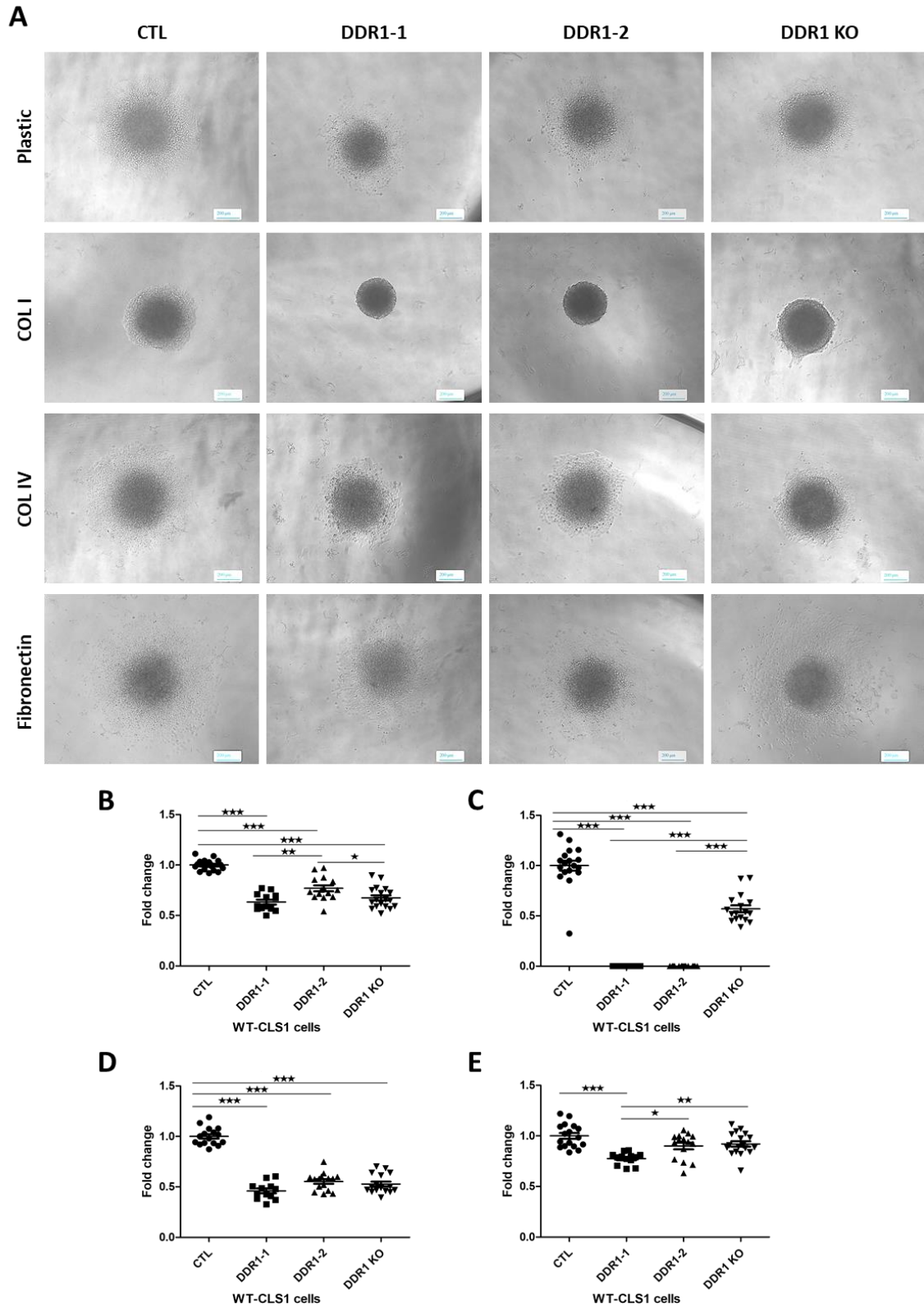


Figure 78 : Impact de l'expression de DDR1 sur la migration cellulaire in vitro à partir de sphéroïdes WT-CLS1. A/ Les différents sphéroïdes ont été déposés sur du plastique ou différentes matrices (collagène I, IV et fibronectine). Quantification de la migration des sphéroïdes non stimulés (plastique) (B), sur le collagène I (C), le collagène IV (D) et la fibronectine (E). Le test statistique utilisé est un ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. n= 12-18 N=4.

En conclusion, ces résultats montrent que la surexpression et/ou l'inactivation de DDR1 inhibe la migration cellulaire des WT-CLS1 sur le plastique ou sur la fibronectine ce qui suggère une modification de la machinerie cellulaire impliquée dans la migration chez ces cellules. La stimulation par le collagène I des cellules DDR1-1 ou -2 inhibe complètement la migration alors que les cellules DDR1 KO conservent une migration cellulaire identique à celle observée sur le plastique. L'inhibition de la migration des cellules DDR1-1, -2 et DDR1 KO sur une matrice de collagène IV est identique à celle observée sur le plastique, laissant supposer que les collagènes I et IV n'activent pas de la même manière DDR1.

F) Impact de l'expression et de la déplétion de DDR1 sur le développement des sphéroïdes

Enfin, l'impact de DDR1 sur le développement des sphéroïdes (prolifération et invasion) a été visualisé pendant 6 jours au sein d'une matrice de collagène I.

Les résultats obtenus dans la **figure 79** montrent un développement similaire des sphéroïdes CTL et DDR1 KO. En revanche, les différents niveaux de surexpression du récepteur (DDR1-1 et DDR1-2) induisent une inhibition quasi complète du développement des sphéroïdes.

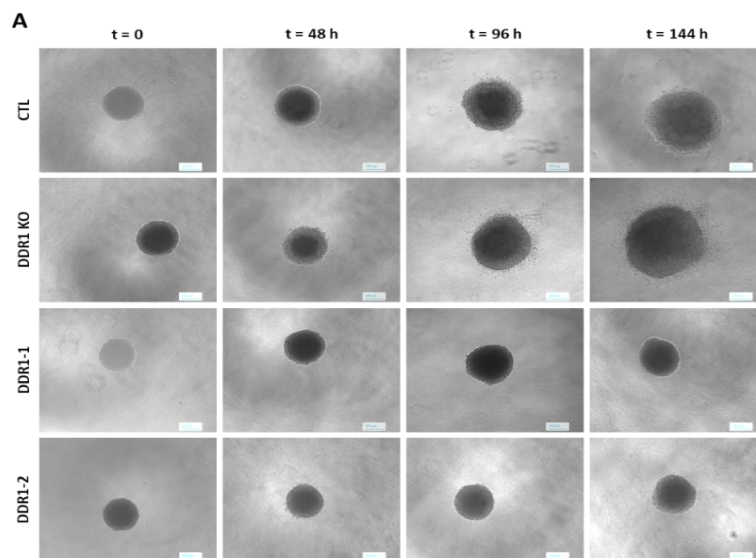


Figure 79 : Impact de DDR1 sur le développement des sphéroïdes WT-CLS1 in vitro.

A/ Les différents sphéroïdes ont été inclus dans une matrice de collagène I.

B/ Quantification du développement des différents sphéroïdes au sein du collagène I. Le test statistique utilisé est un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un post test de Bonferroni. n =15 N=4.

Pour conclure, les différents niveaux de surexpression de DDR1 inhibent le développement des sphéroïdes au sein d'une matrice de collagène I.

Principaux résultats

- ✓ Etude protéomique préliminaire = baisse de l'expression des collagènes dans les contingents tumoraux.

La surexpression de DDR1 induit *in vitro* :

- ✓ Une diminution de la prolifération en 2D.
- ✓ Une inhibition de la migration collagène dépendante.
- ✓ Une inhibition du développement des sphéroïdes (prolifération + invasion).

La déplétion de DDR1 induit *in vitro* :

- ✓ Une prolifération et un développement des sphéroïdes inchangés.
- ✓ Une légère inhibition de la migration collagène I indépendante.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le collagène, facteur pronostique dans les RCC et les WT

Dans les ccRCC, l'analyse *in silico* conduite à l'aide de la banque de données « The Human Protein Atlas » a révélé qu'une augmentation de l'expression des composants de la matrice interstitielle, comme le collagène I, était associée à un plus mauvais pronostic. En revanche, l'augmentation de l'expression de composants de la membrane basale tel que le collagène IV était favorable à la survie des patients atteints de ces tumeurs. De manière intéressante, si une expression élevée de collagène I s'avère être de mauvais pronostic dans tous les ccRCC et les pRCC, l'augmentation de l'expression du collagène IV (A2) est associée à un bon pronostic uniquement dans le sous-type ccRCC, l'analyse globale de tous les RCC et du sous-type papillaire montrent qu'une expression élevée de ce collagène est un facteur de mauvais pronostic [231]. Ces divergences suggèrent un microenvironnement ou l'implication d'acteurs (récepteurs intégrines, DDR etc.) différents entre les 3 sous-types de RCC.

Les expériences *in vitro* effectuées en présence de différentes matrices (Collagène I, Fibronectine et Matrigel) sur 3 lignées de RCC (Renca, 786-O et Caki-2) ont permis de confirmer les données obtenues dans l'analyse *in silico*. En effet, seule la stimulation des cellules par une matrice de collagène I était capable d'augmenter la migration et la sécrétion des protéinases MMP2 et MMP9, importantes dans le phénomène d'invasion cellulaire, dans les 3 lignées testées. De plus, le collagène I était capable d'induire le processus d'EMT dans les lignées Renca et Caki-2 via l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription Zeb2 et Snail2, respectivement, impliqués dans ce mécanisme. Cependant, aucun changement d'expression des facteurs de transcription n'a été constaté dans les cellules 786-O suggérant l'implication potentielle d'autres facteurs non testés ou une expression très élevée des facteurs impliqués dans l'EMT ne pouvant pas être régulée par le collagène I. En effet, ceci pourrait être expliqué en partie par l'absence du gène *VHL*, muté dans ces cellules 786-O et reconnu comme étant impliqué dans l'inhibition de l'EMT [232]. L'inactivation du gène *VHL* dans les Renca induit l'EMT dans ces cellules avec une inhibition d'expression de marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine et l'augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine et les MMP9 [233]. En revanche, la stimulation des cellules par une matrice de Matrigel, constituée entre autres de collagène IV, ne favorise aucun des mécanismes précédemment cités. Ces données sont en accord avec d'autres études

montrant la participation du collagène I dans l'acquisition de caractéristiques malignes dans l'adénocarcinome pancréatique [234] et associé à un mauvais pronostic dans le cancer du foie [235] ou le cancer colorectal [236] par exemple.

L'analyse protéomique préliminaire effectuée sur différentes régions d'intérêts (restes néphrogéniques et contingents tumoraux) de 3 patients atteints de WT a permis tout d'abord de mettre en évidence l'absence de différences dans l'expression protéique entre les RNH et les différents contingents tumoraux laissant supposer que cette lésion, considérée comme pré-cancéreuse, serait plutôt déjà fortement engagée dans un processus tumoral. La comparaison du contenu protéique des RNQ avec les différents contingents tumoraux a permis de révéler une baisse d'expression des collagènes notamment I (A1, A2), IV (A1, A2) et VI dans les différents contingents tumoraux. Ces résultats, nécessitant d'être complétés et confirmés par l'inclusion de cas supplémentaires dans l'étude protéomique, suggèrent qu'une baisse d'expression des collagènes serait associée à un facteur de mauvais pronostic dans les WT. Afin de vérifier cette hypothèse, une analyse supplémentaire a été réalisée en utilisant la plateforme R2 de visualisation et analyse génomique. Les courbes de survie, générées avec les données de 125 patients dans l'étude TARGET du COG (normalisation MAS5.0, plateforme u133p2), ont mis en évidence une diminution de la survie d'environ 20% (COL1A1) et 30% (COL1A2 et COL4A2), lorsque les ARNm de ces collagènes sont faiblement exprimés, corroborant les données de l'étude protéomique préliminaire. En revanche, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la survie et l'expression de COL4A1 (**Figure 80**).

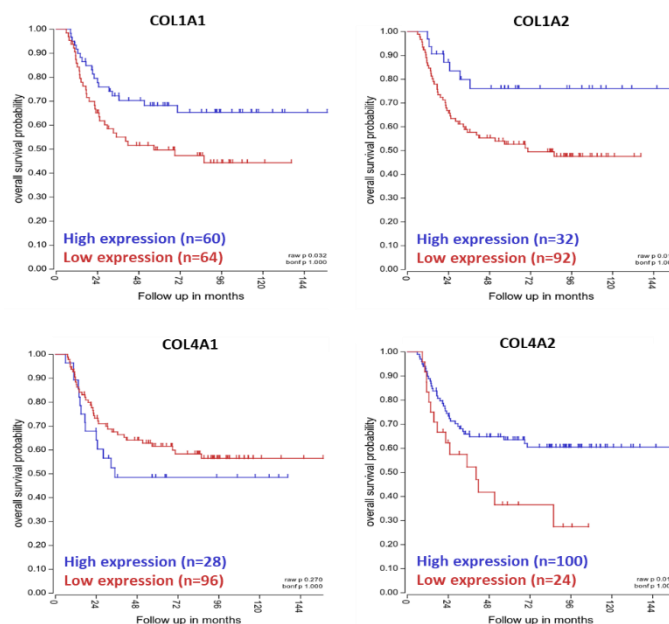


Figure 80 : Graphiques Kaplan-Meier de l'association entre l'expression des collagènes et la survie des patients atteints de WT.

Les courbes ont été générées à l'aide des données de l'étude TARGET COG (MAS5.0, u133p2) disponibles sur la plateforme R2. Les expressions élevées des collagènes sont représentées par les courbes bleues et les faibles expressions sont représentées en rouge. Les p scores sont les suivants : COL1A1 (0,032), COL1A2 (0,016), COL4A1 (0,270), COL4A2 (0,019).

Cependant, les données issues de cette même étude TARGET sur 148 patients (normalisation MAS5.0, plateforme u133a) présentent quelques différences dans les données issues des courbes de survies Kaplan-Meier. Si la diminution de l'expression du COL1A2 est aussi associée à un mauvais pronostic (p value = $2,8e^{-03}$), en revanche l'augmentation d'expression du COL1A1 est ici associée à un plus mauvais pronostic (p value = $7,9e^{-05}$). Aucune corrélation n'a été mise en évidence quant aux niveaux d'expression de COL4A1 et COL4A2 (p value de 0,251 et 0,145 respectivement) dans cette étude.

Les différences soulevées entre ces 2 études par rapport à l'association entre l'expression des collagènes et la survie des patients semblent indiquer qu'il est important et nécessaire de poursuivre l'analyse protéomique débutée sur un plus grand nombre de patients. De plus, aucune analyse à grande échelle sur l'expression des protéines de la MEC n'a été conduite après traitement des malades (dans le contexte de traitements européens des WT).

Que ce soit dans les RCC ou les WT, la modulation de l'expression des collagènes à la hausse (RCC) ou à la baisse (WT) semble être impliquée dans la progression tumorale. L'implication des collagènes dans le développement tumoral peut se faire au moins de 2 manières différentes. La première passe par son organisation dans l'espace pouvant offrir une route migratoire empruntée par les cellules cancéreuses afin de faciliter leur expansion dans l'organisme, comme cela a été démontré dans le cancer du sein [187]. Par ailleurs, cette organisation particulière du collagène a aussi été mise en évidence dans les RCC, où les grades plus élevés présentaient des fibres de collagènes plus denses et alignées en comparaison avec les grades moins élevés [237]. La deuxième manière pour le collagène d'influencer la progression tumorale passe par l'activation de voies intracellulaires via ses récepteurs : les intégrines et les DDR.

DDR1 : rôle antitumoral dans les RCC et les WT

La modulation de l'expression du collagène évoquée laisse penser que les récepteurs aux collagènes jouent un rôle dans la progression tumorale. Ce travail de thèse s'est plus particulièrement focalisé sur le rôle de DDR1 dans les RCC et les WT. Afin d'appréhender le rôle de DDR1 dans le développement des RCC, une analyse *in silico*, réalisée à l'aide de la banque de données « The Human Protein Atlas », a mis en évidence une corrélation positive entre l'augmentation de l'expression de DDR1 et la survie des patients. Ces données ont par

la suite été confirmées par l'analyse RT-qPCR de l'expression de DDR1 dans des tissus de patients atteints de RCC montrant un faible niveau d'expression dans les tumeurs suggérant un rôle antitumoral du récepteur lorsque son expression est élevée. Ces données sont en contradiction avec les résultats obtenus par Song et ses collaborateurs qui ont montré que sur un petit nombre de patients Chinois (96 patients au lieu de 877 dans « The Human Protein Atlas »), une forte expression de DDR1 était corrélée avec la diminution de la survie des patients [180].

Ces données sont en contradiction avec de nombreuses études dans d'autres cancers, où l'expression élevée de DDR1 est associée à un mauvais pronostic comme dans le cancer du poumon non à petites cellules [150] et contribue à la progression tumorale de nombreux cancers (gastrique [238], colon [239] etc.) en favorisant la survie et la prolifération cellulaire.

La surexpression de DDR1 dans les 2 lignées de RCC a induit *in vitro* une diminution de la prolifération avec un ralentissement de l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Cette diminution de l'entrée en phase S des cellules peut être expliquée, dans les cellules 786-O, par l'augmentation de synthèse de la protéine de la famille des CIP/KIF p21. P21 se lie sur les CDK2, 4 et 6, inhibant leurs activités et donc le passage du point de contrôle G1 ou point de restriction permettant aux cellules d'entrer en phase S. L'analyse de l'expression des différents CIP/KIF et des INK4 reste à faire dans les cellules Renca.

La baisse de la prolifération des cellules de RCC par l'expression de DDR1 aurait aussi pu être due à une augmentation de l'apoptose, quelques analyses préliminaires par cytométrie de flux de cellules marquées à l'annexine V nécessitant répétitions semblent indiquer que ce mécanisme n'est pas impliqué. Ces constatations préliminaires corroborent les résultats de l'étude du cycle cellulaire montrant un ralentissement et non un arrêt de ce dernier. Toutefois, des expériences menées sur des lignées de cancers du sein ont mis en évidence un rôle pro-apoptotique de DDR1 dans les cellules MCF-7 via la régulation positive de BIK, une protéine pro-apoptotique. Dans les lignées MDA-MD-231 le clivage du collagène par MMP14 qui empêche l'activation de DDR1 et donc l'augmentation de BIK, favorise la croissance tumorale [172], [173].

L'implication de DDR1 dans la progression tumorale de nombreux cancers passe également par une augmentation des mécanismes de migration, invasion et EMT comme c'est le cas dans le cancer du foie [195], du pancréas [182] ou du colon [205] par exemple. Song et ses collaborateurs ont montré que DDR1 était impliqué dans les mécanismes de progression

tumorale (migration/invasion etc.) de 2 lignées de RCC : ACHN et OS-RC-2 [180]. Ces données semblent en contradiction avec les résultats obtenus dans ce travail avec les lignées Renca et 786-O. Dans les travaux de Song et de ses collaborateurs, la migration et l'invasion des cellules de RCC ont été mesurées à l'aide d'un test de type transwell, différent de la migration à partir de sphéroïdes. De plus les cellules OS-RC-2 sont mutées sur *PTEN* et non sur *VHL* et les cellules ACHN ne sont pas des ccRCC mais des pRCC. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de DDR1 dans ces cellules a été obtenue par transfection transitoire.

Les effets inhibiteurs observés lors des expériences de migration à partir de sphéroïdes sont plus forts lorsque les cellules 786-O DDR1 sont stimulées par une matrice de collagène I que par du Matrigel contenant du collagène IV. Ceci pourrait être en partie expliqué par une clusterisation et une signalisation intracellulaire différentes, induites par la liaison des 2 collagènes se liant sur différents résidus du domaine discoïdine. Lorsque le collagène I lie le récepteur, il entraîne une phosphorylation importante et une dimérisation et clusterisation optimales du récepteur tandis que la liaison du collagène IV induit une activation incomplète du récepteur et une clusterisation moins importante [151]. L'absence de migration peut expliquer l'absence d'invasion des cellules DDR1 dans une matrice de collagène I, indépendamment des conséquences de la surexpression du récepteur sur l'EMT ou sur les MMP.

Les modèles sphéroïdes (3D) utilisés dans l'analyse de la migration et de l'invasion permettent de se rapprocher des conditions tumorales en générant une région hypoxique retrouvée dans le centre des sphéroïdes mais aussi en conservant des interactions cellules-cellules et cellules-MEC. Malheureusement, et malgré de multiples essais avec des méthodes de formation différentes, des sphéroïdes à partir de la lignée Renca n'ont pas pu être générés, ces lignées étant peut-être plus sensibles aux conditions hypoxiques ou ne supportant pas de croître sous forme sphérique. Toutefois, afin d'étudier la migration et l'invasion des différentes cellules Renca, des expériences de type Transwell peuvent être effectuées. Pour cela, les différentes cellules peuvent être cultivées en présence (migration) ou à la surface d'une matrice épaisse (invasion) de collagène I.

La surexpression de DDR1 a aussi induit des effets différents entre les 2 lignées cellulaires de RCC étudiées. Ainsi, la surexpression du récepteur affecte de manière inverse l'EMT dans les lignées, favorisant le processus dans les cellules 786-O et l'inhibant dans les cellules Renca. Ces effets sont confortés par l'étude de l'EMT dans les cellules DDR1 KO où la

déplétion de DDR1 induit les effets opposés à la surexpression. Cette différence peut s'expliquer en partie comme évoquée précédemment par l'expression du gène *VHL* dans la lignée Renca, inhibant le processus. L'inactivation de *VHL* par CRISPR dans ces cellules favorise l'induction de l'EMT [233]. Une autre différence notable réside dans les activités et les niveaux d'expression des MMP impliquées dans le phénomène d'invasion. Ainsi les surexpressions de DDR1 et DDR1DN induisent dans les cellules 786-O une forte inhibition de l'activité de MMP9 pouvant être expliquée par l'absence d'expressions des ARNm. Dans les cellules Renca DDR1, il n'y a aucune diminution de l'activité ou des ARNm MMP9. Dans les cellules 786-O DDR1, une augmentation d'expressions des ARNm de MMP14 est observée qui n'est pas retrouvée dans les cellules Renca. La surexpression du récepteur dans les 2 lignées n'induit pas de différences dans l'activité de MMP2 par rapport aux cellules CTL. Cependant, les cellules Renca DDR1 ont des niveaux d'ARNm MMP2 diminués par rapport aux contrôles, ce qui n'est pas constaté dans les cellules 786-O. Ces différences pourraient être expliquées par un deuxième niveau de régulation des MMP faisant intervenir des inhibiteurs de ces MMP, les TIMP. Mais quoiqu'il en soit, par rapport aux cellules CTL, l'expression des TIMP serait diminuée dans le cas des cellules Renca DDR1 et inchangée dans les cellules 786-O DDR1. Ces résultats mettent en avant des différences dans la régulation des MMP dans les cellules de RCC. L'implication de l'expression et/ou mutation du gène *VHL* dans cette différence reste à déterminer.

In vivo, la surexpression de DDR1 dans les cellules Renca constitue un puissant inhibiteur du développement tumoral, lorsque les cellules sont injectées sous la capsule rénale de souris Balb/c. Cette inhibition de la croissance tumorale peut dépendre, au moins en partie, de la diminution de prolifération constatée *in vitro*. Ce postulat est en cours d'étude par la réalisation de marquages de coupes de tumeurs avec un anticorps anti-Ki67.

Si l'étude de l'effet sur la croissance tumorale des surexpressions de DDR1 et DDR1DN dans les cellules 786-O, après injection dans la capsule rénale de souris immunodéficientes est en cours, la déplétion de DDR1 dans les 2 lignées est aussi capable, de manière surprenante, d'inhiber le développement tumoral. Cette diminution de croissance tumorale observée dans les lignées DDR1 KO (786-O/ Renca) mais aussi dans les cellules Renca DDR1DN par rapport aux tumeurs contrôles, ne peut s'expliquer que par une modulation des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, en particulier avec les cellules immunitaires. Afin de confronter cette hypothèse, sur des coupes de tumeurs provenant de l'injection des cellules Renca, des marquages immunohistochimiques des

différentes cellules immunitaires sont en cours de réalisation à l'aide d'anticorps spécifiques des différents types cellulaires murins : anti-CD3 (tous les types de lymphocytes T), anti-FOXP3 (Treg), anti-CD14 (cellules myéloïdes, macrophages, monocytes et cellules dendritiques), anti-CD11c (cellules dendritiques) et anti-CD11b (macrophages, neutrophiles, monocytes et certaines cellules NK). Des marquages préliminaires ont montré une forte augmentation de cellules CD11c+ dans les tumeurs DDR1 et DDR1 KO en comparaison de leur contrôle respectif (pas de différence évidente entre les CTL et les CRISPR CTL). Ces résultats suggèrent une augmentation du nombre de cellules dendritiques dans les tumeurs DDR1 et DDR1KO par rapport aux contrôles (**Figure 81**).

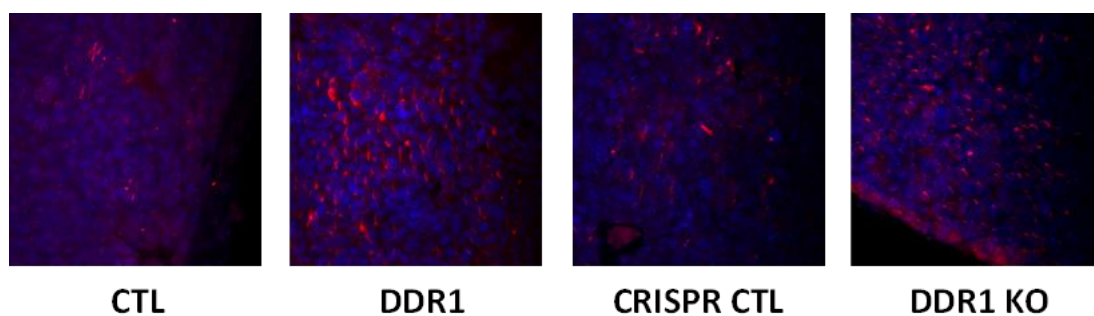


Figure 81 : Marquages des différentes coupes de tumeurs à l'aide d'un anticorps anti CD11c. Images représentatives prises à l'objectif 40x du microscope NIKON Eclipse. Les cellules dendritiques sont marquées en rouge et les noyaux en bleu (DAPI).

Afin d'étudier ces mécanismes *in vivo* dans un second modèle, des expériences d'injections des différentes cellules Renca et 786-O, dans l'espace de Cuvier des embryons du poisson zèbre, peuvent être effectuées comme cela a été reporté pour des cellules du cancer du sein [240]. Les cellules Renca sont capables de former des métastases dans ces conditions. Chez la souris, après injection de cellules Renca les métastases ne sont pas visibles, probablement dû au développement rapide de la tumeur ne laissant pas le temps à une dissémination métastatique, les souris mourant de la grosseur de la tumeur. Il reste également à déterminer si ces expériences de métastases chez le poisson zèbre sont réalisables avec les cellules 786-O.

Il est important de préciser qu'aucune information n'est disponible sur le ou les isoformes regardées dans l'analyse *in silico* ou l'étude RT-qPCR. DDR1, contrairement à DDR2, possède 5 isoformes, la a et la b étant les plus exprimées dans la plupart des cellules. Cependant, dans la plupart des études, l'isoforme regardée n'est pas mentionnée ou connue alors que des effets isoformes dépendants ont pu être mis en évidence. En effet, dans le cancer du poumon non à petites cellules, DDR1a induit des effets plus puissants sur la

migration et l'invasion que DDR1b [150] ou dans le cancer pancréatique, seul DDR1b est capable d'augmenter l'expression de la N-cadhérine par un mécanisme faisant intervenir le résidu tyrosine 513, absent de l'isoforme a [241].

Lors de ce travail, les lignées étudiées de RCC et de WT expriment les isoformes a et b (résultats non montrés) et surexpriment DDR1a. Compte tenu des effets isoformes dépendants reportés dans la littérature, il serait intéressant de reproduire l'ensemble des expériences réalisées au cours de ce travail en surexprimant DDR1b. Ceci permettrait d'identifier de potentielles différences dues à l'activation d'autres signalisations intracellulaires ou l'interaction avec d'autres partenaires. De plus, une étude simultanée sur les 2 isoformes à des niveaux d'expression basaux dans des cellules contrôles permettrait de révéler un éventuel switch d'expressions entre ces isoformes.

Dans les WT, la modulation d'expressions des collagènes dans les contingents tumoraux a mené à l'étude du rôle de DDR1 dans le développement de ces tumeurs. L'objectif était aussi dans une certaine mesure de comparer si ce récepteur induisait des effets similaires dans 2 cancers du rein d'origines différentes (épithéliale pour les RCC et embryonnaire pour les WT). Tout d'abord, une analyse à l'aide de la plateforme R2 de visualisation et analyse génomique a permis de regarder les associations entre les niveaux d'expression de DDR1 et la survie des patients atteints de WT. Cette analyse montre que contrairement aux RCC, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre les niveaux d'expression de DDR1 et la survie des patients, et ce dans les 2 jeux de données disponibles ($p=0,103$ (TARGET plateforme u133p2) $p = 0,106$ (TARGET plateforme u 133a)). Par ailleurs, aucune étude sur le rôle de DDR1 dans le développement des WT n'a été reportée dans la littérature.

Les expériences menées *in vitro* sur une lignée de WT, WT-CLS1, stimulées ou non par des matrices de collagène I et IV ont permis de mettre en évidence également un rôle antitumoral de la surexpression de ce récepteur dans le développement de ces tumeurs. L'effet antitumoral de la surexpression de ce récepteur se traduit par une inhibition de la prolifération (2D), de la migration et du développement (prolifération + invasion 3D) des sphéroïdes *in vitro*. De manière intéressante, les effets inhibiteurs sont beaucoup plus conséquents lorsque les cellules sont stimulées par une matrice de collagène I probablement dus à une activation optimale du récepteur. La stimulation par le collagène IV ne provoque pas d'effets différents, en comparaison de l'absence de stimulation des cellules suggérant potentiellement un rôle d'autres récepteurs dans la diminution de cette migration, comme les

intégrines ou d'autres partenaires non connus. Afin de pouvoir expliquer la diminution de prolifération, les phases du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose seront étudiées afin de savoir si la baisse de prolifération est due à l'un des 2 mécanismes ou à une action concertée des 2. De manière similaire aux RCC, ces expériences ont été conduites sur l'isoforme a du récepteur. La surexpression de l'isoforme b pourrait induire des effets plus importants ou similaires mais avec une signalisation différente. Pour finir d'appréhender le rôle de DDR1 dans le développement de ces tumeurs, des études *in vivo* seront réalisées, afin de confirmer les résultats précédemment obtenus, à l'aide de greffes orthotopiques à partir des différentes lignées cellulaires dans des souris.

Comme la lignée WT-CLS1 possède des caractéristiques rhabdoïdes, il serait intéressant de refaire ces expériences sur de « vraies » lignées de WT récapitulant chacun des composants de la tumeur. Très récemment, des lignées de WT ont pu être conservées à très long terme sous forme de sphéroïdes sans altération du phénotype des cellules. Les cellules ainsi cultivées peuvent être modifiées et utilisées comme les cellules WT-CLS1 [99]. Alternativement, ces expériences peuvent être répétées sur des tumoroïdes issus directement des patients et transduits à l'aide d'un lentivirus permettant l'expression de DDR1.

Que ce soit dans les RCC ou les WT, la modulation de l'expression de DDR1 par les cellules tumorales se révèle cruciale pour permettre leur progression optimale. En effet, un niveau trop important du récepteur inhibe les mécanismes clés du développement (prolifération, migration, invasion). De plus, lorsque DDR1 est déplété, l'absence d'effets ou la stimulation des mécanismes précédemment cités, laisse penser que le collagène I induit des effets via d'autres récepteurs, certainement les intégrines. Il serait intéressant d'étudier les interactions physiques ou lors des signalisations intracellulaires entre DDR1 et les intégrines.

La famille des DDR est constituée de 2 membres qui sont très souvent exprimés dans le même cancer. Pourtant très peu d'études, y compris ce travail, analysent de manière simultanée l'impact des 2 récepteurs. L'analyse simultanée de DDR1b et DDR2 dans des cellules de fibrosarcome a révélé un impact différent des 2 récepteurs. En effet, DDR1b est capable d'inhiber la formation des métastases pulmonaires alors que DDR2 n'était pas impliqué dans ce mécanisme de dissémination métastatique [242]. De plus, un switch d'expressions de DDR1 vers DDR2 durant des processus comme l'EMT a été mis en évidence dans les cellules MDCK exprimant Slug et présentant une diminution de l'expression de DDR1 accompagnée de l'augmentation de l'expression de DDR2 [243]. Des graphiques Kaplan-Meier

représentant l'association entre DDR2 et la survie des patients ont été générés à l'aide de la banque de données « The Human Protein Atlas » pour les ccRCC et des données de l'étude TARGET disponibles sur la plateforme R2 pour les WT. Dans ces 2 cancers, il a été reporté **figure 82** que l'augmentation de l'expression de DDR2 était un facteur de meilleur pronostic concernant la survie des patients atteints de ces cancers.

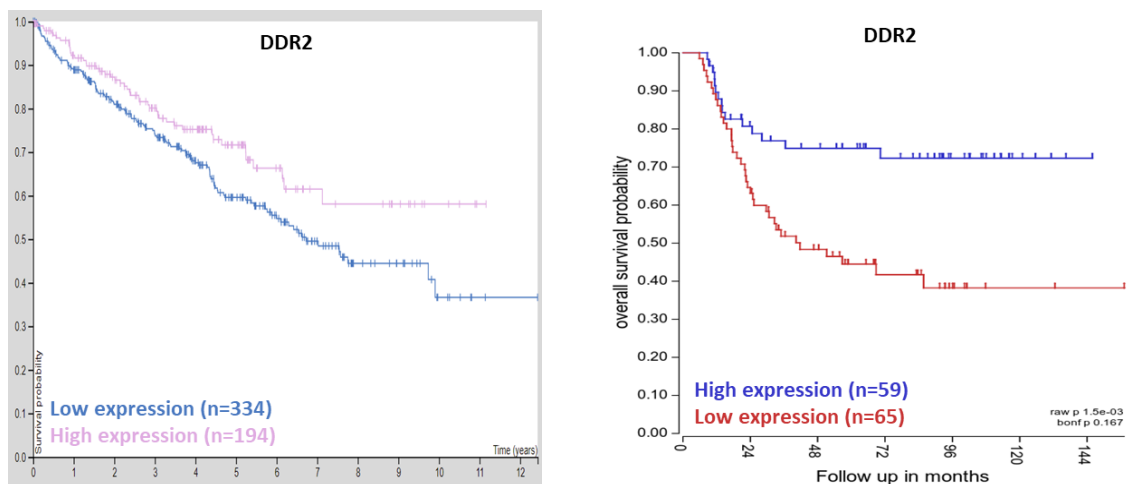


Figure 82 : Graphiques Kaplan-Meier de l'association entre l'expression de DDR2 et la survie des patients atteints de ccRCC (gauche) et WT (droite). A gauche les courbes ont été générées à l'aide de la banque de donnée « The Human Protein Atlas ». L'expression élevée de DDR2 dans les patients atteints de RCC est représentée en rose et la faible expression en bleu. Le p score est de 0,029. A droite Les courbes ont été générées à l'aide des données de l'étude TARGET COG (MAS5.0, u133p2) disponibles sur la plateforme R2. L'expression élevée de DDR2 dans les patients atteints de WT est représentée en bleu et la faible expression en rouge. Le p score est de $1,5e^{-03}$.

Il serait intéressant de reproduire les expériences de ce travail en surexprimant le récepteur DDR2.

DDR1, cible thérapeutique intéressante dans les RCC et WT ?

D'un point de vue thérapeutique, le ciblage direct du collagène, composant principal de la MEC s'avère impossible. Les stratégies thérapeutiques actuelles du RCC font intervenir, entre autres, des inhibiteurs de tyrosine kinase. Si dans les cancers où DDR1 exerce un effet protumoral, l'action de ces inhibiteurs peut être bénéfique, les résultats obtenus lors de ce travail sur les RCC et WT, suggèrent qu'une inhibition partielle du récepteur par ces inhibiteurs à large spectre semble être délétère. Il faut une totale inactivation de DDR1 pour que le développement tumoral soit altéré (cf cellules Renca et 786-O DDR1 KO injectées chez la souris).

Par ailleurs, la stratégie de traitement optimale pour ces tumeurs serait de surexprimer le récepteur à l'aide de vecteurs capables de délivrer l'ADNc DDR1, seulement dans les cellules tumorales. Une autre possibilité serait de réactiver l'expression de DDR1 en inhibant l'expression de miR199, car ce dernier a été montré comme essentiel dans l'inhibition de DDR1 dans les RCC [225]. Alternativement, une hyperméthylation du gène DDR1 peut expliquer une diminution d'expression du récepteur, comme cela a été montré dans l'azoospermie idiopathique non obstructive [244]. Il suffirait d'inhiber l'hyperméthylation du gène de DDR1 pour permettre son expression.

Cependant, le ciblage du récepteur en lui-même pourrait s'avérer complexe, en raison de son implication dans des processus physiologiques du développement. En effet, dans le cancer pancréatique, une inhibition à long terme du récepteur semble induire l'atrophie des organes, DDR1 étant essentiel pour l'homéostasie tissulaire [171]. Si l'impact de la surexpression du récepteur à long terme n'est pas connu, l'apparition d'effets indésirables n'est pas à exclure.

Une piste envisageable serait alors l'identification et le ciblage des voies de signalisation activées ou inhibées lors du développement tumoral par DDR1. Diverses voies de signalisation intracellulaires activées par DDR1 (et d'autres récepteurs tyrosine kinase) ont été décrites dans la littérature notamment les voies Ras/raf/MEK/ERK et PI3K/AKT jouant un rôle dans la croissance tumorale [245]. Des premiers résultats au laboratoire, sur les lignées cellulaires de RCC (786-O) et WT (WT-CLS1) surexprimant DDR1, mettent en évidence une diminution d'activation de AKT et une modulation de l'activité de FAK.

De plus, il est fortement possible que DDR1 interagisse avec d'autres partenaires afin de réguler les différents mécanismes de la progression tumorale. Des interactions entre DDR1 et l'autre classe de récepteurs aux collagènes, les intégrines ont été démontrées. Ainsi, dans les cellules rénales MDCK la surexpression de DDR1 inhibe la migration cellulaire en inhibant la signalisation intracellulaire médiée par l'intégrine $\alpha2\beta1$. Cette inhibition empêche l'activation de FAK qui ne peut plus activer cdc42, importante dans la formation des filopodes et la migration [246].

CONCLUSION GENERALE

Chez les adultes, les RCC font partie des 20 types de cancers les plus fréquents et chez les enfants, les WT constituent la 3^{ème} tumeur solide diagnostiquée. Le travail effectué pendant cette thèse s'est concentré sur l'étude des interactions entre la MEC et ses récepteurs présents sur les cellules tumorales lors du développement de ces cancers du rein.

Le premier projet sur les RCC a, tout d'abord, mis en évidence le rôle crucial du collagène I dans la modulation des caractéristiques phénotypiques et l'acquisition de caractères agressifs des différentes lignées de RCC. Cette constatation a par la suite orienté le projet vers l'étude d'un récepteur aux collagènes, DDR1, dans le développement des RCC. Les résultats obtenus soulignent le potentiel antitumoral de la surexpression du récepteur, inhibant les processus clés de la progression tumorale (prolifération, migration, invasion) *in vitro*, après stimulation des cellules avec une matrice de collagène I et le développement *in vivo*. Ils montrent, également, qu'une absence totale d'expression de DDR1 inhibe la progression tumorale.

Le second projet sur les WT a débuté par une analyse protéomique préliminaire qui suggère, de nouveau, l'importance de la modulation des collagènes dans le développement de ces tumeurs. L'étude du rôle de DDR1 dans ces tumeurs, a également mis en exergue le potentiel antitumoral de la surexpression de ce récepteur, inhibant *in vitro* la prolifération, la migration et l'invasion lorsque les sphéroïdes sont stimulés par une matrice de collagène I.

L'ensemble de ces résultats suggère que la cellule tumorale rénale, d'origine embryonnaire ou épithéliale adulte, doit ajuster l'expression de l'isoforme α de DDR1 afin de favoriser la progression de la tumeur. L'absence d'expression ou un niveau trop élevé de DDR1 sont délétères pour la progression tumorale des RCC, alors que la surexpression de DDR1 a un effet délétère *in vitro* sur le développement de la WT.

VALORISATION SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL DE THESE

Les résultats générés pendant cette thèse ont été présentés dans les événements suivants :

1. **Sandra MAJO**, Sarah COURTOIS, Wilfried SOULEYREAU, Andreas BIKFALVI, Patrick AUGUSTE, Impact of Extracellular Matrix Components to Renal Cell Carcinoma Behavior, 08/09/2020, Workshop "Matrice extracellulaire & cancer ", Toulouse, France (Cancéropole Grand Sud-Ouest) [Oral communication].
2. **Sandra MAJO**, Sarah COURTOIS, Wilfried SOULEYREAU, Andreas BIKFALVI, Patrick AUGUSTE, Impact of Extracellular Matrix Components to Renal Cell Carcinoma Behavior, 02/12/2020, Biological and Medical Sciences Department Day, Bordeaux, France [Flash Poster presentation].
3. **Sandra MAJO**, Aurélie LACOUR, Laurine CHALLEAT, Eva EPINETTE, Anne RULLIER, Valérie PROUZET-MAULEON, Anne NOTZ-CARRERE, Stéphane DUCASSOU, Anne-Aurélie RAYMOND, Sylvaine DI-TOMMASO, Aurore L'HERMINE-COULOMB, Patrick AUGUSTE, Role of collagens and their receptors in the development of Wilms tumors, du 15/11/2021 au 19/11/2021, 17èmes Journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Carcassonne, France [Poster].
4. Participation lors d'une vidéo élaborée pour Groupama Centre Atlantique sur la recherche contre les cancers de l'enfant avec Fatma Zohra KHOUBAI, Christophe GROSSET et Patrick AUGUSTE.

Un dépôt d'abstract a été effectué pour les événements suivants :

1. **Sandra MAJO**, Wilfried SOULEYREAU, Marie-Alix DERIEPPE, Valérie PROUZET-MAULEON, Jean-Christophe BERNHARD, Joris GUYON, Thomas DAUBON, Andreas BIKFALVI, Patrick AUGUSTE, Implication of collagen I and of its discoidin domain receptor DDR1 in the development of Renal Cell Carcinoma, 02/12/2021, Biological and Medical Sciences Department Day 2021, Bordeaux, France [Oral communication].
2. **Sandra MAJO**, Wilfried SOULEYREAU, Marie-Alix DERIEPPE, Valérie PROUZET-MAULEON, Jean-Christophe BERNHARD, Joris GUYON, Thomas DAUBON, Andreas BIKFALVI, Patrick AUGUSTE, Implication of collagen I and of its discoidin domain receptor DDR1 in the development of Renal Cell Carcinoma, du 05/02/2022 au 07/02/2022, CRCL 5th International Cancer Symposium, Lyon, France [Poster].

REFERENCES

- [1] E. C. Amerman, *Human Anatomy & Physiology*, Pearson. 2016.
- [2] G. Kanzaki, N. Tsuboi, A. Shimizu, et T. Yokoo, « Human nephron number, hypertension, and renal pathology », *Anat Rec*, vol. 303, n° 10, p. 2537-2543, oct. 2020, doi: 10.1002/ar.24302.
- [3] V. Acharya, « The Kidney as an Endocrine Organ », p. 3, 2018.
- [4] Dr Franziska Schöni-Affolter (Université de Fribourg), Dr Christine Dubuis-Grieder (Université de Lausanne), Dr Erik Strauch (Université de Berne), « Embryology.ch ». <https://www.embryology.ch/index.html> (consulté le 10 août 2021).
- [5] R. G. James et T. M. Schultheiss, « Bmp signaling promotes intermediate mesoderm gene expression in a dose-dependent, cell-autonomous and translation-dependent manner », *Developmental Biology*, vol. 288, n° 1, p. 113-125, déc. 2005, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.025.
- [6] B. Wilm, R. G. James, T. M. Schultheiss, et B. L. M. Hogan, « The forkhead genes, Foxc1 and Foxc2, regulate paraxial versus intermediate mesoderm cell fate », *Developmental Biology*, vol. 271, n° 1, p. 176-189, juill. 2004, doi: 10.1016/j.ydbio.2004.03.034.
- [7] B. M. Fleming, R. Yelin, R. G. James, et T. M. Schultheiss, « A role for Vg1/Nodal signaling in specification of the intermediate mesoderm », *Development*, vol. 140, n° 8, p. 1819-1829, avr. 2013, doi: 10.1242/dev.093740.
- [8] K. Yun *et al.*, « Non-canonical Wnt5a/Ror2 signaling regulates kidney morphogenesis by controlling intermediate mesoderm extension », *Human Molecular Genetics*, vol. 23, n° 25, p. 6807-6814, déc. 2014, doi: 10.1093/hmg/ddu397.
- [9] Q. Wang, Y. Lan, E.-S. Cho, K. M. Maltby, et R. Jiang, « Odd-skipped related 1 (Odd1) is an essential regulator of heart and urogenital development », *Developmental Biology*, vol. 288, n° 2, p. 582-594, déc. 2005, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.024.
- [10] Y. Lan, C. E. Ovitt, E.-S. Cho, K. M. Maltby, Q. Wang, et R. Jiang, « Odd-skipped related 2 (*Osr2*) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis », *Development*, vol. 131, n° 13, p. 3207-3216, juill. 2004, doi: 10.1242/dev.01175.
- [11] E. A. Perens, J. T. Diaz, A. Quesnel, A. Askary, J. G. Crump, et D. Yelon, « *osr1* couples intermediate mesoderm cell fate with temporal dynamics of vessel progenitor cell differentiation », *Development*, vol. 148, n° 15, p. dev198408, août 2021, doi: 10.1242/dev.198408.
- [12] E. J. Ranghini et G. R. Dressler, « Evidence for intermediate mesoderm and kidney progenitor cell specification by Pax2 and PTIP dependent mechanisms », *Developmental Biology*, vol. 399, n° 2, p. 296-305, mars 2015, doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.005.
- [13] S. K. Boualia *et al.*, « A core transcriptional network composed of Pax2/8, Gata3 and Lim1 regulates key players of pro/mesonephros morphogenesis », *Developmental Biology*, vol. 382, n° 2, p. 555-566, oct. 2013, doi: 10.1016/j.ydbio.2013.07.028.
- [14] M. Bouchard, « Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8 », *Genes & Development*, vol. 16, n° 22, p. 2958-2970, nov. 2002, doi: 10.1101/gad.240102.
- [15] D. Grote, A. Souabni, M. Busslinger, et M. Bouchard, « Pax2/8-regulated Gata3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney », *Development*, vol. 133, n° 1, p. 53-61, janv. 2006, doi: 10.1242/dev.02184.

- [16] A. Pedersen, C. Skjong, et W. Shawlot, « Lim1 is required for nephric duct extension and ureteric bud morphogenesis », *Developmental Biology*, vol. 288, n° 2, p. 571-581, déc. 2005, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.027.
- [17] K. J. Reidy et N. D. Rosenblum, « Cell and Molecular Biology of Kidney Development », *Seminars in Nephrology*, vol. 29, n° 4, p. 321-337, juill. 2009, doi: 10.1016/j.semnephrol.2009.03.009.
- [18] A. J. Davidson, P. Lewis, A. Przepiorski, et V. Sander, « Turning mesoderm into kidney », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 91, p. 86-93, juill. 2019, doi: 10.1016/j.semcdb.2018.08.016.
- [19] R. G. James, C. N. Kamei, Q. Wang, R. Jiang, et T. M. Schultheiss, « Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells », *Development*, vol. 133, n° 15, p. 2995-3004, août 2006, doi: 10.1242/dev.02442.
- [20] J. Xu, H. Liu, O. H. Chai, Y. Lan, et R. Jiang, « Osr1 Interacts Synergistically with Wt1 to Regulate Kidney Organogenesis », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 7, p. e0159597, juill. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0159597.
- [21] J. Xu, H. Liu, J.-S. Park, Y. Lan, et R. Jiang, « Osr1 acts downstream of and interacts synergistically with Six2 to maintain nephron progenitor cells during kidney organogenesis », *Development*, vol. 141, n° 7, p. 1442-1452, avr. 2014, doi: 10.1242/dev.103283.
- [22] C.-T. Yu, K. Tang, J. M. Suh, R. Jiang, S. Y. Tsai, et M.-J. Tsai, « COUP-TFII is essential for metanephric mesenchyme formation and kidney precursor cell survival », *Development*, vol. 139, n° 13, p. 2330-2339, juill. 2012, doi: 10.1242/dev.076299.
- [23] G. Sajithlal, D. Zou, D. Silvius, et P.-X. Xu, « Eya1 acts as a critical regulator for specifying the metanephric mesenchyme », *Developmental Biology*, vol. 284, n° 2, p. 323-336, août 2005, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.029.
- [24] P.-X. Xu, W. Zheng, L. Huang, P. Maire, C. Laclef, et D. Silvius, « Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney », *Development*, vol. 130, n° 14, p. 3085-3094, juill. 2003, doi: 10.1242/dev.00536.
- [25] K.-Q. Gong, A. R. Yallowitz, H. Sun, G. R. Dressler, et D. M. Wellik, « A Hox-Eya-Pax Complex Regulates Early Kidney Developmental Gene Expression », *Mol Cell Biol*, vol. 27, n° 21, p. 7661-7668, nov. 2007, doi: 10.1128/MCB.00465-07.
- [26] B. Trueb, R. Amann, et S. D. Gerber, « Role of FGFR1 and other FGF signaling proteins in early kidney development », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 70, n° 14, p. 2505-2518, juill. 2013, doi: 10.1007/s00018-012-1189-9.
- [27] D. P. Poladia *et al.*, « Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the metanephric mesenchyme », *Developmental Biology*, vol. 291, n° 2, p. 325-339, mars 2006, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.034.
- [28] A. N. Combes *et al.*, « Single cell analysis of the developing mouse kidney provides deeper insight into marker gene expression and ligand-receptor crosstalk », *Development*, p. dev.178673, janv. 2019, doi: 10.1242/dev.178673.
- [29] V. Pachnis, B. Mankoo, et F. Costantini, « Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis », *Development*, vol. 119, n° 4, p. 1005-1017, déc. 1993, doi: 10.1242/dev.119.4.1005.
- [30] F. Costantini et R. Shakya, « GDNF/Ret signaling and the development of the kidney », *Bioessays*, vol. 28, n° 2, p. 117-127, févr. 2006, doi: 10.1002/bies.20357.

- [31] U. Grieshammer, Le Ma, A. S. Plump, F. Wang, M. Tessier-Lavigne, et G. R. Martin, « SLIT2-Mediated ROBO2 Signaling Restricts Kidney Induction to a Single Site », *Developmental Cell*, vol. 6, n° 5, p. 709-717, mai 2004, doi: 10.1016/S1534-5807(04)00108-X.
- [32] T. Kume, K. Deng, et B. L. M. Hogan, « Forkhead genes in kidney and ureter development », p. 9.
- [33] Y. Miyazaki, K. Oshima, A. Fogo, B. L. M. Hogan, et I. Ichikawa, « Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter », *J. Clin. Invest.*, vol. 105, n° 7, p. 863-873, avr. 2000, doi: 10.1172/JCI8256.
- [34] A. Majumdar, S. Vainio, A. Kispert, J. McMahon, et A. P. McMahon, « *Wnt11* and *Ret/Gdnf* pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development », *Development*, vol. 130, n° 14, p. 3175-3185, juill. 2003, doi: 10.1242/dev.00520.
- [35] M. A. Basson *et al.*, « Sprouty1 Is a Critical Regulator of GDNF/RET-Mediated Kidney Induction », *Developmental Cell*, vol. 8, n° 2, p. 229-239, févr. 2005, doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.004.
- [36] D. Grote *et al.*, « Gata3 Acts Downstream of β -Catenin Signaling to Prevent Ectopic Metanephric Kidney Induction », *PLoS Genet*, vol. 4, n° 12, p. e1000316, déc. 2008, doi: 10.1371/journal.pgen.1000316.
- [37] P. Riccio, C. Cebrian, H. Zong, S. Hippenmeyer, et F. Costantini, « Ret and Etv4 Promote Directed Movements of Progenitor Cells during Renal Branching Morphogenesis », *PLoS Biol*, vol. 14, n° 2, p. e1002382, févr. 2016, doi: 10.1371/journal.pbio.1002382.
- [38] H. Zhao *et al.*, « Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the ureteric bud », *Developmental Biology*, vol. 276, n° 2, p. 403-415, déc. 2004, doi: 10.1016/j.ydbio.2004.09.002.
- [39] J. Qiao *et al.*, « Multiple fibroblast growth factors support growth of the ureteric bud but have different effects on branching morphogenesis », *Mechanisms of Development*, vol. 109, n° 2, p. 123-135, déc. 2001, doi: 10.1016/S0925-4773(01)00592-5.
- [40] O. Michos *et al.*, « Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis », *Development*, vol. 134, n° 13, p. 2397-2405, juill. 2007, doi: 10.1242/dev.02861.
- [41] K. T. Bush *et al.*, « TGF- β superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud », *Developmental Biology*, vol. 266, n° 2, p. 285-298, févr. 2004, doi: 10.1016/j.ydbio.2003.10.023.
- [42] M. G. Dumbrava, J. L. Lacanlale, C. J. Rowan, et N. D. Rosenblum, « Transforming growth factor beta signaling functions during mammalian kidney development », *Pediatr Nephrol*, vol. 36, n° 7, p. 1663-1672, juill. 2021, doi: 10.1007/s00467-020-04739-5.
- [43] Y. Wang, C. J. Zhou, et Y. Liu, « Wnt Signaling in Kidney Development and Disease », in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 153, Elsevier, 2018, p. 181-207. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.11.019.
- [44] D. M. Iglesias *et al.*, « Canonical WNT signaling during kidney development », *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, vol. 293, n° 2, p. F494-F500, août 2007, doi: 10.1152/ajprenal.00416.2006.
- [45] M. C. Hu *et al.*, « GLI3-dependent transcriptional repression of *Gli1*, *Gli2* and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis », *Development*, vol. 133, n° 3, p. 569-578, févr. 2006, doi: 10.1242/dev.02220.

- [46] R. Zent *et al.*, « Involvement of Laminin Binding Integrins and Laminin-5 in Branching Morphogenesis of the Ureteric Bud during Kidney Development », *Developmental Biology*, vol. 238, n° 2, p. 289-302, oct. 2001, doi: 10.1006/dbio.2001.0391.
- [47] M. M. Shah, R. V. Sampogna, H. Sakurai, K. T. Bush, et S. K. Nigam, « Branching morphogenesis and kidney disease », *Development*, vol. 131, n° 7, p. 1449-1462, avr. 2004, doi: 10.1242/dev.01089.
- [48] A. C. Brown *et al.*, « Role for compartmentalization in nephron progenitor differentiation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, n° 12, p. 4640-4645, mars 2013, doi: 10.1073/pnas.1213971110.
- [49] S. Boyle, T. Shioda, A. O. Perantoni, et M. de Caestecker, « Cited1 and Cited2 are differentially expressed in the developing kidney but are not required for nephrogenesis », *Dev. Dyn.*, vol. 236, n° 8, p. 2321-2330, août 2007, doi: 10.1002/dvdy.21242.
- [50] K. M. Short *et al.*, « Global Quantification of Tissue Dynamics in the Developing Mouse Kidney », *Developmental Cell*, vol. 29, n° 2, p. 188-202, avr. 2014, doi: 10.1016/j.devcel.2014.02.017.
- [51] M. Kann *et al.*, « WT1 targets *Gas1* to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals », *Development*, vol. 142, n° 7, p. 1254-1266, avr. 2015, doi: 10.1242/dev.119735.
- [52] H. Barak *et al.*, « FGF9 and FGF20 Maintain the Stemness of Nephron Progenitors in Mice and Man », *Developmental Cell*, vol. 22, n° 6, p. 1191-1207, juin 2012, doi: 10.1016/j.devcel.2012.04.018.
- [53] R. Nishinakamura et M. Sakaguchi, « BMP signaling and its modifiers in kidney development », *Pediatr Nephrol*, vol. 29, n° 4, p. 681-686, avr. 2014, doi: 10.1007/s00467-013-2671-9.
- [54] K. Cargill *et al.*, « Von Hippel-Lindau Acts as a Metabolic Switch Controlling Nephron Progenitor Differentiation », *J Am Soc Nephrol*, vol. 30, n° 7, p. 1192-1205, juill. 2019, doi: 10.1681/ASN.2018111170.
- [55] J. Xu *et al.*, « *Eya1* Interacts with *Six2* and *Myc* to Regulate Expansion of the Nephron Progenitor Pool during Nephrogenesis », *Developmental Cell*, vol. 31, n° 4, p. 434-447, nov. 2014, doi: 10.1016/j.devcel.2014.10.015.
- [56] J.-S. Park *et al.*, « *Six2* and *Wnt* Regulate Self-Renewal and Commitment of Nephron Progenitors through Shared Gene Regulatory Networks », *Developmental Cell*, vol. 23, n° 3, p. 637-651, sept. 2012, doi: 10.1016/j.devcel.2012.07.008.
- [57] E. Chung, P. Deacon, S. Marable, J. Shin, et J.-S. Park, « Notch signaling promotes nephrogenesis by downregulating *Six2* », *Development*, vol. 143, n° 21, p. 3907-3913, nov. 2016, doi: 10.1242/dev.143503.
- [58] J. W. Mugford, J. Yu, A. Kobayashi, et A. P. McMahon, « High-resolution gene expression analysis of the developing mouse kidney defines novel cellular compartments within the nephron progenitor population », *Developmental Biology*, vol. 333, n° 2, p. 312-323, sept. 2009, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.06.043.
- [59] T. J. Carroll, J.-S. Park, S. Hayashi, A. Majumdar, et A. P. McMahon, « *Wnt9b* Plays a Central Role in the Regulation of Mesenchymal to Epithelial Transitions Underlying Organogenesis of the Mammalian Urogenital System », *Developmental Cell*, vol. 9, n° 2, p. 283-292, août 2005, doi: 10.1016/j.devcel.2005.05.016.
- [60] S. Tanigawa *et al.*, « *Wnt4* induces nephronic tubules in metanephric mesenchyme by a non-canonical mechanism », *Developmental Biology*, vol. 352, n° 1, p. 58-69, avr. 2011, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.01.012.

- [61] E. W. Brunskill *et al.*, « Atlas of Gene Expression in the Developing Kidney at Microanatomic Resolution », *Developmental Cell*, vol. 15, n° 5, p. 781-791, nov. 2008, doi: 10.1016/j.devcel.2008.09.007.
- [62] M. Mukherjee, E. Fogarty, M. Janga, et K. Surendran, « Notch Signaling in Kidney Development, Maintenance, and Disease », *Biomolecules*, vol. 9, n° 11, p. 692, nov. 2019, doi: 10.3390/biom9110692.
- [63] B. McCright, « Notch signaling in kidney development »:, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 12, n° 1, p. 5-10, janv. 2003, doi: 10.1097/00041552-200301000-00002.
- [64] B. McCright *et al.*, « Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation », *Development*, vol. 128, n° 4, p. 491-502, févr. 2001.
- [65] K. Georgas *et al.*, « Use of dual section mRNA in situ hybridisation/immunohistochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney », *Histochem Cell Biol*, vol. 130, n° 5, p. 927-942, nov. 2008, doi: 10.1007/s00418-008-0454-3.
- [66] K. Georgas *et al.*, « Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment », *Developmental Biology*, vol. 332, n° 2, p. 273-286, août 2009, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.05.578.
- [67] N. O. Lindström *et al.*, « Integrated β -catenin, BMP, PTEN, and Notch signalling patterns the nephron », *eLife*, vol. 4, p. e04000, févr. 2015, doi: 10.7554/eLife.04000.
- [68] E. Chung, P. Deacon, et J.-S. Park, « Notch is required for the formation of all nephron segments and primes nephron progenitors for differentiation », *Development*, p. dev.156661, janv. 2017, doi: 10.1242/dev.156661.
- [69] S. Nakai *et al.*, « Crucial roles of Brn1 in distal tubule formation and function in mouse kidney », *Development*, vol. 130, n° 19, p. 4751-4759, oct. 2003, doi: 10.1242/dev.00666.
- [70] N. Barker *et al.*, « Lgr5+ve Stem/Progenitor Cells Contribute to Nephron Formation during Kidney Development », *Cell Reports*, vol. 2, n° 3, p. 540-552, sept. 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.018.
- [71] R. W. Naylor et A. J. Davidson, « Hnf1beta and nephron segmentation », *Pediatr Nephrol*, vol. 29, n° 4, p. 659-664, avr. 2014, doi: 10.1007/s00467-013-2662-x.
- [72] T. D. Piscione, M. Y. J. Wu, et S. E. Quaggin, « Expression of Hairy/Enhancer of Split genes, Hes1 and Hes5, during murine nephron morphogenesis », *Gene Expression Patterns*, vol. 4, n° 6, p. 707-711, oct. 2004, doi: 10.1016/j.modgep.2004.04.007.
- [73] J. T. White, B. Zhang, D. M. Cerqueira, U. Tran, et O. Wessely, « Notch signaling, wt1 and foxc2 are key regulators of the podocyte gene regulatory network in *Xenopus* », *Development*, vol. 137, n° 11, p. 1863-1873, juin 2010, doi: 10.1242/dev.042887.
- [74] V. Eremina, H. J. Baelde, et S. E. Quaggin, « Role of the VEGF-A Signaling Pathway in the Glomerulus: Evidence for Crosstalk between Components of the Glomerular Filtration Barrier », *Nephron Physiol*, vol. 106, n° 2, p. p32-p37, 2007, doi: 10.1159/000101798.
- [75] P. Lindahl *et al.*, « Paracrine PDGF-B/PDGF-Rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli », *Development*, vol. 125, n° 17, p. 3313-3322, sept. 1998.

- [76] R. W. Naylor, M. R. P. T. Morais, et R. Lennon, « Complexities of the glomerular basement membrane », *Nat Rev Nephrol*, vol. 17, n° 2, p. 112-127, févr. 2021, doi: 10.1038/s41581-020-0329-y.
- [77] H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, et T. M. Ulbright, « The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours », *European Urology*, vol. 70, n° 1, p. 93-105, juill. 2016, doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029.
- [78] M. S. Gee, M. Bittman, M. Epelman, S. O. Vargas, et E. Y. Lee, « Magnetic Resonance Imaging of the Pediatric Kidney », *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, vol. 21, n° 4, p. 697-715, nov. 2013, doi: 10.1016/j.mric.2013.06.001.
- [79] E. Perlman et L. Boccon-Gibod, « Tumeurs du rein de l'enfant », *Ann Pathol*, p. 20, 2004.
- [80] A. H. A. G. Ooms *et al.*, « Renal Tumors of Childhood—A Histopathologic Pattern-Based Diagnostic Approach », *Cancers*, vol. 12, n° 3, p. 729, mars 2020, doi: 10.3390/cancers12030729.
- [81] on behalf of the International Society of Paediatric Oncology—Renal Tumour Study Group (SIOP–RTSG) *et al.*, « The UMBRELLA SIOP–RTSG 2016 Wilms tumour pathology and molecular biology protocol », *Nat Rev Urol*, vol. 15, n° 11, p. 693-701, nov. 2018, doi: 10.1038/s41585-018-0100-3.
- [82] J. N. van der Beek *et al.*, « Characteristics and Outcome of Children with Renal Cell Carcinoma: A Narrative Review », *Cancers*, vol. 12, n° 7, p. 1776, juill. 2020, doi: 10.3390/cancers12071776.
- [83] F. Spreafico *et al.*, « Wilms tumor, medulloblastoma, and rhabdomyosarcoma in adult patients: lessons learned from the pediatric experience », *Cancer Metastasis Rev*, vol. 38, n° 4, p. 683-694, déc. 2019, doi: 10.1007/s10555-019-09831-3.
- [84] on behalf of the International Society of Paediatric Oncology — Renal Tumour Study Group (SIOP–RTSG) *et al.*, « Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP–RTSG 2016 protocol », *Nat Rev Urol*, vol. 14, n° 12, p. 743-752, déc. 2017, doi: 10.1038/nrurol.2017.163.
- [85] R. I. Lopes et A. Lorenzo, « Recent advances in the management of Wilms' tumor », *F1000Res*, vol. 6, p. 670, mai 2017, doi: 10.12688/f1000research.10760.1.
- [86] A. Chu *et al.*, « Wilms' tumour: a systematic review of risk factors and meta-analysis: Wilms' tumour: systematic review », *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, vol. 24, n° 5, p. 449-469, juill. 2010, doi: 10.1111/j.1365-3016.2010.01133.x.
- [87] J. L. Maciaszek, N. Oak, et K. E. Nichols, « Recent advances in Wilms' tumor predisposition », *Human Molecular Genetics*, vol. 29, n° R2, p. R138-R149, oct. 2020, doi: 10.1093/hmg/ddaa091.
- [88] S. Gadd *et al.*, « Clinically Relevant Subsets Identified by Gene Expression Patterns Support a Revised Ontogenic Model of Wilms Tumor: A Children's Oncology Group Study », *Neoplasia*, vol. 14, n° 8, p. 742-IN21, août 2012, doi: 10.1593/neo.12714.
- [89] T. D. Treger, T. Chowdhury, K. Pritchard-Jones, et S. Behjati, « The genetic changes of Wilms tumour », *Nat Rev Nephrol*, vol. 15, n° 4, p. 240-251, avr. 2019, doi: 10.1038/s41581-019-0112-0.
- [90] T. Taniguchi, M. J. Sullivan, O. Ogawa, et A. E. Reeve, « Epigenetic changes encompassing the IGF2/H19 locus associated with relaxation of IGF2 imprinting and silencing of Hi 9 in Wilms tumor », p. 5.

- [91] J. Charlton *et al.*, « Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour », *Genome Med*, vol. 7, n° 1, p. 11, 2015, doi: 10.1186/s13073-015-0136-4.
- [92] F. Tang, H. Zhang, Z. Lu, J. Wang, C. He, et Z. He, « Prognostic Factors and Nomograms to Predict Overall and Cancer-Specific Survival for Children with Wilms' Tumor », *Disease Markers*, vol. 2019, p. 1-11, déc. 2019, doi: 10.1155/2019/1092769.
- [93] E. B. Cone, S. S. Dalton, M. Van Noord, E. T. Tracy, H. E. Rice, et J. C. Routh, « Biomarkers for Wilms Tumor: A Systematic Review », *Journal of Urology*, vol. 196, n° 5, p. 1530-1535, nov. 2016, doi: 10.1016/j.juro.2016.05.100.
- [94] R. D. Williams *et al.*, « Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour », *Oncotarget*, vol. 6, n° 9, p. 7232-7243, mars 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3377.
- [95] P. E. Grundy *et al.*, « Loss of Heterozygosity for Chromosomes 1p and 16q Is an Adverse Prognostic Factor in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the National Wilms Tumor Study Group », *JCO*, vol. 23, n° 29, p. 7312-7321, oct. 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.01.2799.
- [96] K. T. Sadak, M. L. Ritchey, et J. S. Dome, « Paediatric genitourinary cancers and late effects of treatment », *Nat Rev Urol*, vol. 10, n° 1, p. 15-25, janv. 2013, doi: 10.1038/nrurol.2012.218.
- [97] A. M. Davidoff, « Wilms Tumor », *Advances in Pediatrics*, vol. 59, n° 1, p. 247-267, janv. 2012, doi: 10.1016/j.yapd.2012.04.001.
- [98] R. Shukrun, N. Pode Shakked, et B. Dekel, « Targeted therapy aimed at cancer stem cells: Wilms' tumor as an example », *Pediatr Nephrol*, vol. 29, n° 5, p. 815-823, mai 2014, doi: 10.1007/s00467-013-2501-0.
- [99] J. Wegert *et al.*, « High-risk blastemal Wilms tumor can be modeled by 3D spheroid cultures in vitro », *Oncogene*, vol. 39, n° 4, p. 849-861, janv. 2020, doi: 10.1038/s41388-019-1027-8.
- [100] B. Pinto, A. C. Henriques, P. M. A. Silva, et H. Bousbaa, « Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research », *Pharmaceutics*, vol. 12, n° 12, p. 1186, déc. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12121186.
- [101] K. Brodaczewska *et al.*, « Metastatic renal cell carcinoma cells growing in 3D on poly-D-lysine or laminin present a stem-like phenotype and drug resistance », *Oncol Rep*, sept. 2019, doi: 10.3892/or.2019.7321.
- [102] C. Calandrini *et al.*, « An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity », *Nat Commun*, vol. 11, n° 1, p. 1310, déc. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15155-6.
- [103] L. K. Esser *et al.*, « Cultivation of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patient-Derived Organoids in an Air-Liquid Interface System as a Tool for Studying Individualized Therapy », *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 1775, sept. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.01775.
- [104] V. Waehle, R. Ungricht, P. S. Hoppe, et J. Betschinger, « The tumor suppressor WT1 drives progenitor cell progression and epithelialization to prevent Wilms tumorigenesis in human kidney organoids », *Stem Cell Reports*, vol. 16, n° 9, p. 2107-2117, sept. 2021, doi: 10.1016/j.stemcr.2021.07.023.
- [105] H. Sung *et al.*, « Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries », *CA A Cancer J Clin*, vol. 71, n° 3, p. 209-249, mai 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [106] S. Woo et J. Y. Cho, « Imaging Findings of Common Benign Renal Tumors in the Era of Small Renal Masses: Differential Diagnosis from Small Renal Cell Carcinoma: Current

- Status and Future Perspectives », *Korean J Radiol*, vol. 16, n° 1, p. 99, 2015, doi: 10.3348/kjr.2015.16.1.99.
- [107] P. H. Tan *et al.*, « Renal Tumors: Diagnostic and Prognostic Biomarkers », *American Journal of Surgical Pathology*, vol. 37, n° 10, p. 1518-1531, oct. 2013, doi: 10.1097/PAS.0b013e318299f12e.
- [108] S. G. Silverman *et al.*, « Bosniak Classification of Cystic Renal Masses, Version 2019: An Update Proposal and Needs Assessment », *Radiology*, vol. 292, n° 2, p. 475-488, août 2019, doi: 10.1148/radiol.2019182646.
- [109] K. Inamura, « Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification », *IJMS*, vol. 18, n° 10, p. 2195, oct. 2017, doi: 10.3390/ijms18102195.
- [110] S. Kandori, T. Kojima, et H. Nishiyama, « The updated points of TNM classification of urological cancers in the 8th edition of AJCC and UICC », *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 49, n° 5, p. 421-425, mai 2019, doi: 10.1093/jjco/hyz017.
- [111] B. Escudier *et al.*, « Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up », *Annals of Oncology*, vol. 30, n° 5, p. 706-720, mai 2019, doi: 10.1093/annonc/mdz056.
- [112] C. M. Lohse, S. Gupta, et J. C. Cheville, « Outcome prediction for patients with renal cell carcinoma », *Seminars in Diagnostic Pathology*, vol. 32, n° 2, p. 172-183, mars 2015, doi: 10.1053/j.semmp.2015.02.008.
- [113] S. A. Fuhrman, L. C. Lasky, et C. Limas, « Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma », *Am J Surg Pathol*, vol. 6, n° 7, p. 655-663, oct. 1982, doi: 10.1097/00000478-198210000-00007.
- [114] B. Delahunt *et al.*, « Fuhrman Grading is not Appropriate for Chromophobe Renal Cell Carcinoma », *American Journal of Surgical Pathology*, vol. 31, n° 6, p. 957-960, juin 2007, doi: 10.1097/01.pas.0000249446.28713.53.
- [115] B. Delahunt *et al.*, « The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters », *American Journal of Surgical Pathology*, vol. 37, n° 10, p. 1490-1504, oct. 2013, doi: 10.1097/PAS.0b013e318299f0fb.
- [116] G. P. Paner *et al.*, « A Novel Tumor Grading Scheme for Chromophobe Renal Cell Carcinoma: Prognostic Utility and Comparison With Fuhrman Nuclear Grade », *American Journal of Surgical Pathology*, vol. 34, n° 9, p. 1233-1240, sept. 2010, doi: 10.1097/PAS.0b013e3181e96f2a.
- [117] V. Verkarre, A. Morini, T. Denize, S. Ferlicot, et S. Richard, « [Hereditary kidney cancers: The pathologist's view in 2020] », *Ann Pathol*, vol. 40, n° 2, p. 148-167, avr. 2020, doi: 10.1016/j.annpat.2020.02.022.
- [118] I. J. Frew et H. Moch, « A Clearer View of the Molecular Complexity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma », *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 10, n° 1, p. 263-289, janv. 2015, doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040306.
- [119] The Cancer Genome Atlas Research Network, « Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma », *Nature*, vol. 499, n° 7456, p. 43-49, juill. 2013, doi: 10.1038/nature12222.
- [120] The Cancer Genome Atlas Research Network, « Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma », *N Engl J Med*, vol. 374, n° 2, p. 135-145, janv. 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1505917.

- [121] C. F. Davis *et al.*, « The Somatic Genomic Landscape of Chromophobe Renal Cell Carcinoma », *Cancer Cell*, vol. 26, n° 3, p. 319-330, sept. 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.014.
- [122] K. Attalla, S. Weng, M. H. Voss, et A. A. Hakimi, « Epidemiology, Risk Assessment, and Biomarkers for Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma », *Urologic Clinics of North America*, vol. 47, n° 3, p. 293-303, août 2020, doi: 10.1016/j.ucl.2020.04.002.
- [123] S. Mikami *et al.*, « Recent advances in renal cell carcinoma from a pathological point of view: Recent advances in renal cell carcinoma », *Pathology International*, vol. 66, n° 9, p. 481-490, sept. 2016, doi: 10.1111/pin.12433.
- [124] D. A. Braun *et al.*, « Beyond conventional immune-checkpoint inhibition — novel immunotherapies for renal cell carcinoma », *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 18, n° 4, p. 199-214, avr. 2021, doi: 10.1038/s41571-020-00455-z.
- [125] A. Simonaggio, N. Epailard, C. Pobel, M. Moreira, S. Oudard, et Y.-A. Vano, « Tumor Microenvironment Features as Predictive Biomarkers of Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICI) in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma (mccRCC) », *Cancers*, vol. 13, n° 2, p. 231, janv. 2021, doi: 10.3390/cancers13020231.
- [126] M. W. Kattan, V. Reuter, R. J. Motzer, J. Katz, et P. Russo, « A POSTOPERATIVE PROGNOSTIC NOMOGRAM FOR RENAL CELL CARCINOMA », *Journal of Urology*, vol. 166, n° 1, p. 63-67, juill. 2001, doi: 10.1016/S0022-5347(05)66077-6.
- [127] M. Sorbellini *et al.*, « A POSTOPERATIVE PROGNOSTIC NOMOGRAM PREDICTING RECURRENCE FOR PATIENTS WITH CONVENTIONAL CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA », *Journal of Urology*, vol. 173, n° 1, p. 48-51, janv. 2005, doi: 10.1097/01.ju.0000148261.19532.2c.
- [128] Y. Vano *et al.*, « LBA25 Results from the phase II biomarker driven trial with nivolumab (N) and ipilimumab or VEGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) in naïve metastatic kidney cancer (m-ccRCC) patients (pts): The BIONIKK trial », *Annals of Oncology*, vol. 31, p. S1157, sept. 2020, doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.2254.
- [129] N. Sylvie *et al.*, « Recombinant Human Interleukin-2, Recombinant Human Interferon Alfa-2a, or Both in Metastatic Renal-Cell Carcinoma », *The New England Journal of Medicine*, p. 7, 1998.
- [130] B. Escudier *et al.*, « Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma », *The New England Journal of Medicine*, p. 10, 2007.
- [131] D. S. Chen et I. Mellman, « Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle », *Immunity*, vol. 39, n° 1, p. 1-10, juill. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- [132] É. Buache et M.-C. Rio, « Le stroma tumoral: Un terreau fertile pour la cellule cancéreuse », *Med Sci (Paris)*, vol. 30, n° 4, p. 385-390, avr. 2014, doi: 10.1051/medsci/20143004011.
- [133] A. D. Theocharis, D. Manou, et N. K. Karamanos, « The extracellular matrix as a multitasking player in disease », *FEBS J*, vol. 286, n° 15, p. 2830-2869, août 2019, doi: 10.1111/febs.14818.
- [134] J. W. Rick, A. Chandra, C. Dalle Ore, A. T. Nguyen, G. Yagnik, et M. K. Aghi, « Fibronectin in malignancy: Cancer-specific alterations, protumoral effects, and therapeutic implications », *Seminars in Oncology*, vol. 46, n° 3, p. 284-290, juin 2019, doi: 10.1053/j.seminoncol.2019.08.002.
- [135] « Extracellular matrix in renal cell carcinomas », *Histology and Histopathology*, n° 13, p. 785-796, juill. 1998, doi: 10.14670/HH-13.785.

- [136] Y.-C. Ou *et al.*, « Fibronectin Promotes Cell Growth and Migration in Human Renal Cell Carcinoma Cells », *IJMS*, vol. 20, n° 11, p. 2792, juin 2019, doi: 10.3390/ijms20112792.
- [137] M. Kuczyk, « Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma », *Oncol Lett*, janv. 2012, doi: 10.3892/ol.2012.566.
- [138] S. Ricard-Blum, « The Collagen Family », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, n° 1, p. a004978-a004978, janv. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
- [139] J. K. Mouw, G. Ou, et V. M. Weaver, « Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, n° 12, p. 771-785, déc. 2014, doi: 10.1038/nrm3902.
- [140] « Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo », *J. Pathol.*, p. 7, 1998.
- [141] Y. Liang, M. Diehn, A. W. Bollen, M. A. Israel, et N. Gupta, « Type I collagen is overexpressed in medulloblastoma as a component of tumor microenvironment », *J Neurooncol*, vol. 86, n° 2, p. 133-141, janv. 2008, doi: 10.1007/s11060-007-9457-5.
- [142] S. Xu *et al.*, « The role of collagen in cancer: from bench to bedside », *J Transl Med*, vol. 17, n° 1, p. 309, déc. 2019, doi: 10.1186/s12967-019-2058-1.
- [143] A. Kisling, R. M. Lust, et L. C. Katwa, « What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease? », *Life Sciences*, vol. 228, p. 30-34, juill. 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.042.
- [144] M. S. O'Reilly *et al.*, « Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth », *Cell*, vol. 88, n° 2, p. 277-285, janv. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81848-6.
- [145] C. Zeltz et D. Gullberg, « The integrin–collagen connection – a glue for tissue repair? », *Journal of Cell Science*, vol. 129, n° 6, p. 1284-1284, mars 2016, doi: 10.1242/jcs.188672.
- [146] M. Barczyk, S. Carracedo, et D. Gullberg, « Integrins », *Cell Tissue Res*, vol. 339, n° 1, p. 269-280, janv. 2010, doi: 10.1007/s00441-009-0834-6.
- [147] J. Cooper et F. G. Giancotti, « Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance », *Cancer Cell*, vol. 35, n° 3, p. 347-367, mars 2019, doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.007.
- [148] B. Leitinger, « Discoidin Domain Receptor Functions in Physiological and Pathological Conditions », in *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 310, Elsevier, 2014, p. 39-87. doi: 10.1016/B978-0-12-800180-6.00002-5.
- [149] S. Majo et P. Auguste, « The Yin and Yang of Discoidin Domain Receptors (DDR): Implications in Tumor Growth and Metastasis Development », *Cancers*, vol. 13, n° 7, p. 1725, avr. 2021, doi: 10.3390/cancers13071725.
- [150] Moon, « Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas », *Oncol Rep*, vol. 24, n° 2, juin 2010, doi: 10.3892/or_00000861.
- [151] H.-L. Fu *et al.*, « Discoidin Domain Receptors: Unique Receptor Tyrosine Kinases in Collagen-mediated Signaling », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, n° 11, p. 7430-7437, mars 2013, doi: 10.1074/jbc.R112.444158.
- [152] D. A. Yeung *et al.*, « Clustering, Spatial Distribution, and Phosphorylation of Discoidin Domain Receptors 1 and 2 in Response to Soluble Collagen I », *Journal of Molecular Biology*, vol. 431, n° 2, p. 368-390, janv. 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2018.11.015.
- [153] K. Yang, J. H. Kim, H. J. Kim, I.-S. Park, I. Y. Kim, et B.-S. Yang, « Tyrosine 740 Phosphorylation of Discoidin Domain Receptor 2 by Src Stimulates Intramolecular Autophosphorylation and Shc Signaling Complex Formation », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 47, p. 39058-39066, nov. 2005, doi: 10.1074/jbc.M506921200.

- [154] K. K. Lu, D. Trcka, et M. P. Bendeck, « Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src », *Cardiovascular Pathology*, vol. 20, n° 2, p. 71-76, mars 2011, doi: 10.1016/j.carpath.2009.12.006.
- [155] G. Agarwal, A. W. Smith, et B. Jones, « Discoidin domain receptors: Micro insights into macro assemblies », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1866, n° 11, p. 118496, nov. 2019, doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.06.010.
- [156] R. Fridman et P. H. Huang, Éd., *Discoidin Domain Receptors in Health and Disease*. New York, NY: Springer New York, 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-6383-6.
- [157] V. Vella *et al.*, « DDR1 regulates thyroid cancer cell differentiation via IGF-2/IR-A autocrine signaling loop », *Endocrine-Related Cancer*, vol. 26, n° 1, p. 197-214, janv. 2019, doi: 10.1530/ERC-18-0310.
- [158] W. F. Vogel, A. Aszódi, F. Alves, et T. Pawson, « Discoidin Domain Receptor 1 Tyrosine Kinase Has an Essential Role in Mammary Gland Development », *Mol Cell Biol*, vol. 21, n° 8, p. 2906-2917, avr. 2001, doi: 10.1128/MCB.21.8.2906-2917.2001.
- [159] E. Faraci-Orf, C. McFadden, et W. F. Vogel, « DDR1 signaling is essential to sustain Stat5 function during lactogenesis », *J. Cell. Biochem.*, vol. 97, n° 1, p. 109-121, janv. 2006, doi: 10.1002/jcb.20618.
- [160] O. Gross *et al.*, « DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria », *Kidney International*, vol. 66, n° 1, p. 102-111, juill. 2004, doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00712.x.
- [161] J. P. Labrador *et al.*, « The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism », *EMBO Rep*, vol. 2, n° 5, p. 446-452, mai 2001, doi: 10.1093/embo-reports/kve094.
- [162] Y. Zhang *et al.*, « An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation », *J Bone Miner Res*, vol. 26, n° 3, p. 604-617, mars 2011, doi: 10.1002/jbmr.225.
- [163] C. Avivi-Green, M. Singal, et W. F. Vogel, « Discoidin Domain Receptor 1-deficient Mice Are Resistant to Bleomycin-induced Lung Fibrosis », *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 174, n° 4, p. 420-427, août 2006, doi: 10.1164/rccm.200603-333OC.
- [164] E. Olaso *et al.*, « DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells », *J. Clin. Invest.*, vol. 108, n° 9, p. 1369-1378, nov. 2001, doi: 10.1172/JCI200112373.
- [165] E. Olaso, B. Arteta, A. Benedicto, O. Crende, et S. L. Friedman, « Loss of Discoidin Domain Receptor 2 Promotes Hepatic Fibrosis after Chronic Carbon Tetrachloride through Altered Paracrine Interactions between Hepatic Stellate Cells and Liver-Associated Macrophages », *The American Journal of Pathology*, vol. 179, n° 6, p. 2894-2904, déc. 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.002.
- [166] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [167] E. Henriët *et al.*, « Multitasking discoidin domain receptors are involved in several and specific hallmarks of cancer », *Cell Adhesion & Migration*, p. 1-15, juin 2018, doi: 10.1080/19336918.2018.1465156.
- [168] C. Ambrogio *et al.*, « Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma », *Nat Med*, vol. 22, n° 3, p. 270-277, mars 2016, doi: 10.1038/nm.4041.

- [169] K. Shimada *et al.*, « Prostate cancer antigen-1 contributes to cell survival and invasion through discoidin receptor 1 in human prostate cancer », *Cancer Science*, vol. 0, n° 0, Art. n° 0, oct. 2007, doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00655.x.
- [170] P. P. Ongusaha *et al.*, « p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop », p. 13.
- [171] J. M. Ruggeri *et al.*, « Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Is Necessary for Tissue Homeostasis in Pancreatic Injury and Pathogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *The American Journal of Pathology*, vol. 190, n° 8, Art. n° 8, août 2020, doi: 10.1016/j.ajpath.2020.03.020.
- [172] D. Assent *et al.*, « A Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) – Discoidin Domain Receptor 1 Axis Regulates Collagen-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 3, p. e0116006, mars 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116006.
- [173] C. Saby *et al.*, « DDR1 and MT1-MMP Expression Levels Are Determinant for Triggering BIK-Mediated Apoptosis by 3D Type I Collagen Matrix in Invasive Basal-Like Breast Carcinoma Cells », *Front. Pharmacol.*, vol. 10, p. 462, mai 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00462.
- [174] H. Jin *et al.*, « Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Prevents Stroma-Induced Peritoneal Metastasis in Gastric Carcinoma », *Mol Cancer Res*, vol. 16, n° 10, Art. n° 10, oct. 2018, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0710.
- [175] M. Kadiri, M.-A. El Azreq, S. Berrazouane, M. Boisvert, et F. Aoudjit, « Human Th17 Migration in Three-Dimensional Collagen Involves p38 MAPK: Th17 MIGRATION REQUIRES p38 », *J. Cell. Biochem.*, vol. 118, n° 9, Art. n° 9, sept. 2017, doi: 10.1002/jcb.25932.
- [176] M.-A. E. Azreq, M. Kadiri, M. Boisvert, N. Pagé, P. A. Tessier, et F. Aoudjit, « Discoidin domain receptor 1 promotes Th17 cell migration by activating the RhoA/ROCK/MAPK/ERK signaling pathway », *Oncotarget*, vol. 7, n° 29, Art. n° 29, juill. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10455.
- [177] C. Walker, E. Mojares, et A. del Río Hernández, « Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression », *IJMS*, vol. 19, n° 10, p. 3028, oct. 2018, doi: 10.3390/ijms19103028.
- [178] A. Jabłońska-Trypuć, M. Matejczyk, et S. Rosochacki, « Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs », *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 31, n° sup1, p. 177-183, nov. 2016, doi: 10.3109/14756366.2016.1161620.
- [179] Y. Hu *et al.*, « MiR-199a-5p Loss Up-Regulated DDR1 Aggravated Colorectal Cancer by Activating Epithelial-to-Mesenchymal Transition Related Signaling », *Dig Dis Sci*, vol. 59, n° 9, Art. n° 9, sept. 2014, doi: 10.1007/s10620-014-3136-0.
- [180] J. Song *et al.*, « Discoidin domain receptor 1 (DDR1), a promising biomarker, induces epithelial to mesenchymal transition in renal cancer cells », *Tumor Biol.*, vol. 37, n° 8, Art. n° 8, août 2016, doi: 10.1007/s13277-016-5021-2.
- [181] J.-H. Lee *et al.*, « Complement C1q stimulates the progression of hepatocellular tumor through the activation of discoidin domain receptor 1 », *Sci Rep*, vol. 8, n° 1, Art. n° 1, déc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23240-6.
- [182] J. Yang *et al.*, « TM4SF1 Promotes Metastasis of Pancreatic Cancer via Regulating the Expression of DDR1 », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, avr. 2017, doi: 10.1038/srep45895.

- [183] A. Juin *et al.*, « Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42–Tuba pathway », *Journal of Cell Biology*, vol. 207, n° 4, Art. n° 4, nov. 2014, doi: 10.1083/jcb.201404079.
- [184] A. Naba, K. R. Clauser, S. Hoersch, S. A. Carr, et R. O. Hynes, « The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices*□S », p. 18.
- [185] V. Poltavets, M. Kochetkova, S. M. Pitson, et M. S. Samuel, « The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity », *Front. Oncol.*, vol. 8, p. 431, oct. 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00431.
- [186] M. Liguori, G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, et P. Allavena, « Tumor-Associated Macrophages as Incessant Builders and Destroyers of the Cancer Stroma », *Cancers*, vol. 3, n° 4, p. 3740-3761, sept. 2011, doi: 10.3390/cancers3043740.
- [187] P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White, et P. J. Keely, « Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion », *BMC Med*, vol. 4, n° 1, Art. n° 1, déc. 2006, doi: 10.1186/1741-7015-4-38.
- [188] E. A. Brett, M. A. Sauter, H.-G. Machens, et D. Duscher, « Tumor-associated collagen signatures: pushing tumor boundaries », *Cancer Metab*, vol. 8, n° 1, p. 14, déc. 2020, doi: 10.1186/s40170-020-00221-w.
- [189] M. W. Conklin *et al.*, « Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma », *The American Journal of Pathology*, vol. 178, n° 3, Art. n° 3, mars 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.076.
- [190] N. M. Coelho *et al.*, « Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction », *Cell Reports*, vol. 18, n° 7, Art. n° 7, févr. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.061.
- [191] V. M. Monnier *et al.*, « Cross-Linking of the Extracellular Matrix by the Maillard Reaction in Aging and Diabetes: An Update on “a Puzzle Nearing Resolution” », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1043, n° 1, p. 533-544, juin 2005, doi: 10.1196/annals.1333.061.
- [192] A. Simm *et al.*, « Protein glycation — Between tissue aging and protection », *Experimental Gerontology*, vol. 68, p. 71-75, août 2015, doi: 10.1016/j.exger.2014.12.013.
- [193] C. Saby *et al.*, « Age-related modifications of type I collagen impair DDR1-induced apoptosis in non-invasive breast carcinoma cells », *Cell Adhesion & Migration*, p. 1-13, juin 2018, doi: 10.1080/19336918.2018.1472182.
- [194] I. Pastushenko et C. Blanpain, « EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis », *Trends in Cell Biology*, vol. 29, n° 3, p. 212-226, mars 2019, doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001.
- [195] Y. Lin *et al.*, « The cross-talk between DDR1 and STAT3 promotes the development of hepatocellular carcinoma », *Aging*, vol. 12, n° 14, Art. n° 14, juill. 2020, doi: 10.18632/aging.103482.
- [196] R. Azizi, Z. Salemi, F. Fallahian, et M. Aghaei, « Inhibition of discoidin domain receptor 1 reduces epithelial–mesenchymal transition and induce cell-cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines », *J Cell Physiol*, vol. 234, n° 11, Art. n° 11, nov. 2019, doi: 10.1002/jcp.28552.
- [197] M. Koh *et al.*, « Discoidin domain receptor 1 is a novel transcriptional target of ZEB1 in breast epithelial cells undergoing H-Ras-induced epithelial to mesenchymal transition: Discoidin domain receptor 1 is a target of ZEB1 », *Int. J. Cancer*, vol. 136, n° 6, Art. n° 6, mars 2015, doi: 10.1002/ijc.29154.

- [198] K. Takai *et al.*, « Discoidin domain receptor 1 (DDR1) ablation promotes tissue fibrosis and hypoxia to induce aggressive basal-like breast cancers », p. 14.
- [199] C. Croissant *et al.*, « DDR1 and DDR2 physical interaction leads to signaling interconnection but with possible distinct functions », *Cell Adhesion & Migration*, p. 1-11, juin 2018, doi: 10.1080/19336918.2018.1460012.
- [200] J. Dejmek, K. Dib, M. Jönsson, et T. Andersson, « Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion: Wnt-5a and Mammary Cell Adhesion », *Int. J. Cancer*, vol. 103, n° 3, p. 344-351, janv. 2003, doi: 10.1002/ijc.10752.
- [201] P. Friedl et K. Wolf, « Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model », *Journal of Cell Biology*, vol. 188, n° 1, p. 11-19, janv. 2010, doi: 10.1083/jcb.200909003.
- [202] C. Hidalgo-Carcedo *et al.*, « Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell–cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6 », *Nat Cell Biol*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, janv. 2011, doi: 10.1038/ncb2133.
- [203] L. Castro-Sanchez, A. Soto-Guzman, N. Navarro-Tito, R. Martinez-Orozco, et E. P. Salazar, « Native type IV collagen induces cell migration through a CD9 and DDR1-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells », *European Journal of Cell Biology*, vol. 89, n° 11, Art. n° 11, nov. 2010, doi: 10.1016/j.ejcb.2010.07.004.
- [204] X. Jiang, M. Jiang, S. Guo, P. Cai, W. Wang, et Y. Li, « Promotion of miR-221-5p on the Sensitivity of Gastric Cancer Cells to Cisplatin and Its Effects on Cell Proliferation and Apoptosis by Regulating DDR1 », *OTT*, vol. Volume 13, p. 2333-2345, mars 2020, doi: 10.2147/OTT.S232953.
- [205] L. Chen *et al.*, « NSD2 circular RNA promotes metastasis of colorectal cancer by targeting miR-199b-5p-mediated DDR1 and JAG1 signalling », *J. Pathol.*, vol. 248, n° 1, Art. n° 1, mai 2019, doi: 10.1002/path.5238.
- [206] M. Jeitany *et al.*, « Inhibition of DDR 1- BCR signalling by nilotinib as a new therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer », *EMBO Mol Med*, vol. 10, n° 4, avr. 2018, doi: 10.15252/emmm.201707918.
- [207] M. Lafitte, A. Sirvent, et S. Roche, « Collagen Kinase Receptors as Potential Therapeutic Targets in Metastatic Colon Cancer », *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 125, févr. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00125.
- [208] A. Sirvent, M. Lafitte, et S. Roche, « DDR1 inhibition as a new therapeutic strategy for colorectal cancer », *Molecular & Cellular Oncology*, vol. 5, n° 4, p. e1465882, juill. 2018, doi: 10.1080/23723556.2018.1465882.
- [209] C. Hansen, P. Greengard, A. C. Nairn, T. Andersson, et W. F. Vogel, « Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1 », *Experimental Cell Research*, vol. 312, n° 20, Art. n° 20, déc. 2006, doi: 10.1016/j.yexcr.2006.09.003.
- [210] A. S. Harney *et al.*, « Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2^{hi} Macrophage–Derived VEGFA », *Cancer Discovery*, vol. 5, n° 9, p. 932-943, sept. 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0012.
- [211] P. Auguste, L. Fallavollita, N. Wang, J. Burnier, A. Bikfalvi, et P. Brodt, « The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation », *Am J Pathol*, vol. 170, n° 5, p. 1781-1792, mai 2007, doi: 10.2353/ajpath.2007.060886.
- [212] M. Schlesinger, « Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis », *J Hematol Oncol*, vol. 11, n° 1, p. 125, oct. 2018, doi: 10.1186/s13045-018-0669-2.

- [213] on behalf of the Cancer Research UK and Cancer Therapeutics CRC Australia Metastasis Working Group *et al.*, « A framework for the development of effective anti-metastatic agents », *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 16, n° 3, p. 185-204, mars 2019, doi: 10.1038/s41571-018-0134-8.
- [214] J. S. Di Martino, T. Akhter, et J. J. Bravo-Cordero, « Remodeling the ECM: Implications for Metastasis and Tumor Dormancy », *Cancers*, vol. 13, n° 19, p. 4916, sept. 2021, doi: 10.3390/cancers13194916.
- [215] R. Yuge *et al.*, « Silencing of Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Concurrently Inhibits Multiple Steps of Metastasis Cascade in Gastric Cancer », *Translational Oncology*, vol. 11, n° 3, Art. n° 3, juin 2018, doi: 10.1016/j.tranon.2018.02.003.
- [216] K. Valencia *et al.*, « Inhibition of Collagen Receptor Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Reduces Cell Survival, Homing, and Colonization in Lung Cancer Bone Metastasis », *Clinical Cancer Research*, vol. 18, n° 4, Art. n° 4, févr. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1686.
- [217] I. Romayor *et al.*, « Silencing of sinusoidal DDR1 reduces murine liver metastasis by colon carcinoma », *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, p. 18398, déc. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-75395-w.
- [218] H. Gao *et al.*, « Multi-organ Site Metastatic Reactivation Mediated by Non-canonical Discoidin Domain Receptor 1 Signaling », *Cell*, vol. 166, n° 1, p. 47-62, juin 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.009.
- [219] R. C. Montenegro *et al.*, « Identification of molecular targets for the targeted treatment of gastric cancer using dasatinib », *Oncotarget*, vol. 11, n° 5, Art. n° 5, févr. 2020, doi: 10.18632/oncotarget.27462.
- [220] M.-J. Nokin *et al.*, « Inhibition of DDR1 enhances in vivo chemosensitivity in KRAS-mutant lung adenocarcinoma », *JCI Insight*, vol. 5, n° 15, Art. n° 15, août 2020, doi: 10.1172/jci.insight.137869.
- [221] A. Vehlow et N. Cordes, « DDR1 (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1) drives glioblastoma therapy resistance by modulating autophagy », *Autophagy*, vol. 15, n° 8, Art. n° 8, août 2019, doi: 10.1080/15548627.2019.1618540.
- [222] F. Baltes, J. Caspers, S. Henze, M. Schlesinger, et G. Bendas, « Targeting Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Signaling and Its Crosstalk with β 1-Integrin Emerges as a Key Factor for Breast Cancer Chemosensitization upon Collagen Type 1 Binding », *Int. J. Mol. Sci.*, p. 21, 2020.
- [223] K. Y. Aguilera *et al.*, « Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Reduces Collagen-mediated Tumorigenicity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Mol Cancer Ther*, vol. 16, n° 11, Art. n° 11, nov. 2017, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0834.
- [224] W. H. Chappell *et al.*, « Influences of TP53 and the anti-aging DDR1 receptor in controlling Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt expression and chemotherapeutic drug sensitivity in prostate cancer cell lines », *Aging*, vol. 12, n° 11, Art. n° 11, juin 2020, doi: 10.18632/aging.103377.
- [225] B. E. Krazinski *et al.*, « Altered Expression of DDR1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Correlates With miR-199a/b-5p and Patients' Outcome », *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 16, n° 3, Art. n° 3, 2019, doi: 10.21873/cgp.20124.
- [226] K. K. Brodaczewska, C. Szczylik, M. Fiedorowicz, C. Porta, et A. M. Czarnecka, « Choosing the right cell line for renal cell cancer research », *Mol Cancer*, vol. 15, n° 1, p. 83, déc. 2016, doi: 10.1186/s12943-016-0565-8.

- [227] E. K. Stroup *et al.*, « WT-CLS1 is a rhabdoid tumor cell line and can be inhibited by miR-16 », *Cancer Reports*, vol. 2, n° 3, juin 2019, doi: 10.1002/cnr2.1110.
- [228] Y. Shitomi, I. B. Thøgersen, N. Ito, B. Leitinger, J. J. Enghild, et Y. Itoh, « ADAM10 controls collagen signaling and cell migration on collagen by shedding the ectodomain of discoidin domain receptor 1 (DDR1) », *MBoC*, vol. 26, n° 4, Art. n° 4, févr. 2015, doi: 10.1091/mbc.E14-10-1463.
- [229] H.-L. Fu *et al.*, « Shedding of Discoidin Domain Receptor 1 by Membrane-type Matrix Metalloproteinases », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, n° 17, p. 12114-12129, avr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.409599.
- [230] C.-Z. Wang, Y.-C. Yeh, et M.-J. Tang, « DDR1/E-cadherin complex regulates the activation of DDR1 and cell spreading », *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 297, n° 2, p. C419-C429, août 2009, doi: 10.1152/ajpcell.00101.2009.
- [231] S. Majo, S. Courtois, W. Souleyreau, A. Bikfalvi, et P. Auguste, « Impact of Extracellular Matrix Components to Renal Cell Carcinoma Behavior », *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 625, avr. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00625.
- [232] O. Iliopoulos, A. Kibel, S. Gray, et W. G. Kaelin, « Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product », *Nat Med*, vol. 1, n° 8, p. 822-826, août 1995, doi: 10.1038/nm0895-822.
- [233] S. Schokrpur *et al.*, « CRISPR-Mediated VHL Knockout Generates an Improved Model for Metastatic Renal Cell Carcinoma », *Sci Rep*, vol. 6, n° 1, p. 29032, sept. 2016, doi: 10.1038/srep29032.
- [234] T. Armstrong *et al.*, « Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Clin Cancer Res*, vol. 10, n° 21, p. 7427-7437, nov. 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0825.
- [235] J. Ji *et al.*, « Let-7g targets collagen type I alpha2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma », *J Hepatol*, vol. 52, n° 5, p. 690-697, mai 2010, doi: 10.1016/j.jhep.2009.12.025.
- [236] X. Zou *et al.*, « Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis », *Journal of Proteomics*, vol. 94, p. 473-485, déc. 2013, doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.020.
- [237] S. L. Best *et al.*, « Collagen organization of renal cell carcinoma differs between low and high grade tumors », *BMC Cancer*, vol. 19, n° 1, p. 490, déc. 2019, doi: 10.1186/s12885-019-5708-z.
- [238] H. Hur *et al.*, « Discoidin domain receptor 1 activity drives an aggressive phenotype in gastric carcinoma », *BMC Cancer*, vol. 17, n° 1, Art. n° 1, déc. 2017, doi: 10.1186/s12885-017-3051-9.
- [239] A. Appert-Collin, « LRP-1 Promotes Colon Cancer Cell Proliferation in 3D Collagen Matrices by Mediating DDR1 Endocytosis », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, p. 15, 2020.
- [240] J. Ren, S. Liu, C. Cui, et P. ten Dijke, « Invasive Behavior of Human Breast Cancer Cells in Embryonic Zebrafish », *JoVE*, n° 122, p. 55459, avr. 2017, doi: 10.3791/55459.
- [241] H. Huang *et al.*, « Up-regulation of N-cadherin by Collagen I-activated Discoidin Domain Receptor 1 in Pancreatic Cancer Requires the Adaptor Molecule Shc1 », *J. Biol. Chem.*, vol. 291, n° 44, Art. n° 44, oct. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.740605.
- [242] B. Wasinski *et al.*, « Discoidin Domain Receptors, DDR1b and DDR2, Promote Tumour Growth within Collagen but DDR1b Suppresses Experimental Lung Metastasis in HT1080

- Xenografts », *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, déc. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59028-w.
- [243] M. Maeyama *et al.*, « Switching in discoid domain receptor expressions in SLUG-induced epithelial-mesenchymal transition », *Cancer*, vol. 113, n° 10, Art. n° 10, nov. 2008, doi: 10.1002/cncr.23900.
- [244] R. Ramasamy, A. Ridgeway, L. I. Lipshultz, et D. J. Lamb, « Integrative DNA methylation and gene expression analysis identifies discoidin domain receptor 1 association with idiopathic nonobstructive azoospermia », *Fertility and Sterility*, vol. 102, n° 4, p. 968-973.e3, oct. 2014, doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.06.028.
- [245] E. Castellano et J. Downward, « Role of RAS in the Regulation of PI 3-Kinase », in *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*, vol. 346, C. Rommel, B. Vanhaesebroeck, et P. K. Vogt, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, p. 143-169. doi: 10.1007/82_2010_56.
- [246] Y.-C. Yeh, C.-Z. Wang, et M.-J. Tang, « Discoidin domain receptor 1 activation suppresses alpha2beta1 integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity », *J Cell Physiol*, vol. 218, n° 1, p. 146-156, janv. 2009, doi: 10.1002/jcp.21578.

ANNEXES

Durant cette thèse, une revue en première auteure sur les rôles des DDR dans le développement tumoral a été publiée dans *Cancers* (Annexe 1) et certains résultats, portant sur l'impact des composants de la MEC dans la modulation phénotypique de lignées cellulaires de RCC, ont mené à une publication en première auteure dans *Frontier in Oncology* (Annexe 2).

Review

The Yin and Yang of Discoidin Domain Receptors (DDR): Implications in Tumor Growth and Metastasis Development

Sandra Majo and Patrick Auguste *

Inserm Bmgic U1035, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; sandra.majo@u-bordeaux.fr

* Correspondence: patrick.auguste@inserm.fr; Tel.: +33-557-571-702

Simple Summary: The tumor microenvironment plays an important role in tumor development and metastasis. Collagens are major components of the extracellular matrix and can influence tumor development and metastasis by activating discoidin domain receptors (DDRs). This work shows the different roles of DDRs in various cancers and highlights the complexity of anti-DDR therapies in cancer treatment.

Abstract: The tumor microenvironment is a complex structure composed of the extracellular matrix (ECM) and nontumoral cells (notably cancer-associated fibroblasts (CAFs) and immune cells). Collagens are the main components of the ECM and they are extensively remodeled during tumor progression. Some collagens are ligands for the discoidin domain receptor tyrosine kinases, DDR1 and DDR2. DDRs are involved in different stages of tumor development and metastasis formation. In this review, we present the different roles of DDRs in these processes and discuss controversial findings. We conclude by describing emerging DDR inhibitory strategies, which could be used as new alternatives for the treatment of patients.

Keywords: discoidin domain receptors; extracellular matrix; tumor growth; metastasis



Citation: Majo, S.; Auguste, P. The Yin and Yang of Discoidin Domain Receptors (DDRs): Implications in Tumor Growth and Metastasis Development. *Cancers* **2021**, *13*, 1725. <https://doi.org/10.3390/cancers13071725>

Academic Editors: Nikos Karamanos and Zoi Piperigkou

Received: 13 February 2021

Accepted: 25 March 2021

Published: 6 April 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The development of tumors, particularly those of epithelial origin that lead to carcinoma (Figure 1a,b), begins with rapid and anarchic proliferation of cells, giving a tumor mass (Figure 1c). Soon, the tumor stops growing due to nutrient and oxygen deficiency.

To grow further, the tumor cell mass attracts cells of different types such as endothelial, immune, and fibroblastic cells, together forming the tumor stroma or tumor microenvironment (TME, Figure 2a) [1]. At this stage, the primary tumor is well confined and surgical resection combined with adjuvant therapies can cure a vast majority of cancers. Nevertheless, tumor cells can escape from the primary tumor and colonize other organs in a process called metastasis.

The multistep metastatic cascade was established in 2003 by Fidler [2] and refined several times since then [3,4]. The first step in the cascade is the invasion by tumor cells of the extracellular matrix (ECM) and the multilayer of stromal cells, forming the primary tumor (Figure 2a). Then, to disseminate, tumor cells intravasate into lymphatics or blood vessels (Figure 2b) where they survive anoikis, flow pressure, and the presence of immune cells (Figure 3a).

Subsequently, tumor cells arrest in the vasculature of distant organs and extravasate (Figure 3b). In the target organ tissues, tumor cells survive in a hostile microenvironment and form quiescent micrometastasis (tumor dormancy) (Figure 3c), before growing again in a step called macrometastasis or metastatic colonization (Figure 3c). During this process, tumor cells are exposed to different microenvironments, including different ECMs.

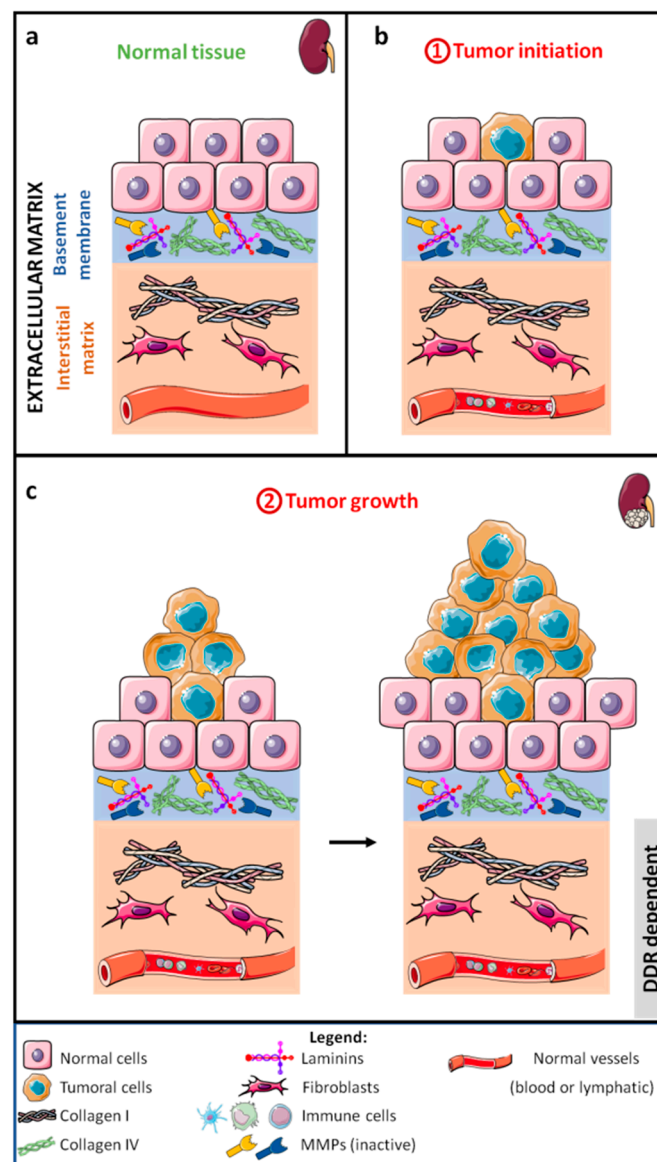


Figure 1. Schematic representation of normal tissue (a), carcinoma initiation (b), and initial stages of carcinoma development (c).

The ECM, one of the noncellular components of the TME, is composed of proteins, glycoproteins, proteoglycans, and polysaccharides, and it can be divided into the basement membrane and interstitial matrix. Epithelial cells are surrounded by the basement membrane, which is mainly composed of laminins, type IV collagen, nidogen, and heparan sulfate proteoglycans. The basement membrane separates the epithelial cells from the interstitial matrix. The latter is composed of collagens, elastin, proteoglycans, fibronectin, and other proteins. As a whole, the ECM forms an interconnected network. During tumor development, the ECM is continuously remodeled, with new synthesis and proteolytic degradation of the matrix components [5]. Collagens are the most abundant proteins in the ECM and, to date, 28 different collagens (I to XXVIII) have been found expressed in tissues and tumors. All collagens have in common the presence of three α chains forming a triple-helical domain. Depending of the collagen, the triple-helix domain represents a mass ranging from more than 90% (collagen I) to less than 10% (collagen XII) of the protein. The diversity of the collagens is increased by the existence of molecules with more than one chain in some of them [6]. Collagens are classified into six different families, such

as fibril-forming collagens (I–III, V, XI, XXIV, and XXVII) and network-forming collagens (IV, VIII, and X) [6].

In most cancers, e.g., colorectal or breast cancer, high collagen expression is associated with a poor prognosis. However, in some cancers, collagens may play an important role in limiting tumor cell activation or in constituting an obstacle to tumor growth [7]. In addition, proteolytic fragments of some collagens, such as endostatin, may inhibit tumor growth [8]. These antagonistic roles need to be further investigated in the perspective of anti-collagen therapies [7]. Collagens are primarily responsible for tumor rigidity and can affect tumor behavior through mechanical processes, e.g., by providing either a barrier for tumor development or a track for tumor cell migration [9,10]. On the other hand, collagens can influence tumor cell behavior by binding to extracellular receptors that induce intracellular signaling. The major collagen receptors present in carcinoma cells are integrins, $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$, and $\alpha11\beta1$. Intracellular integrin signaling is primarily mediated by activation of FAK (Focal Adhesion Kinase) and SFK (Src Family Kinase) proteins. In addition to these well-known receptors, collagens can bind cluster of differentiation 44 (CD44) and discoidin domain receptors (DDRs) [11].

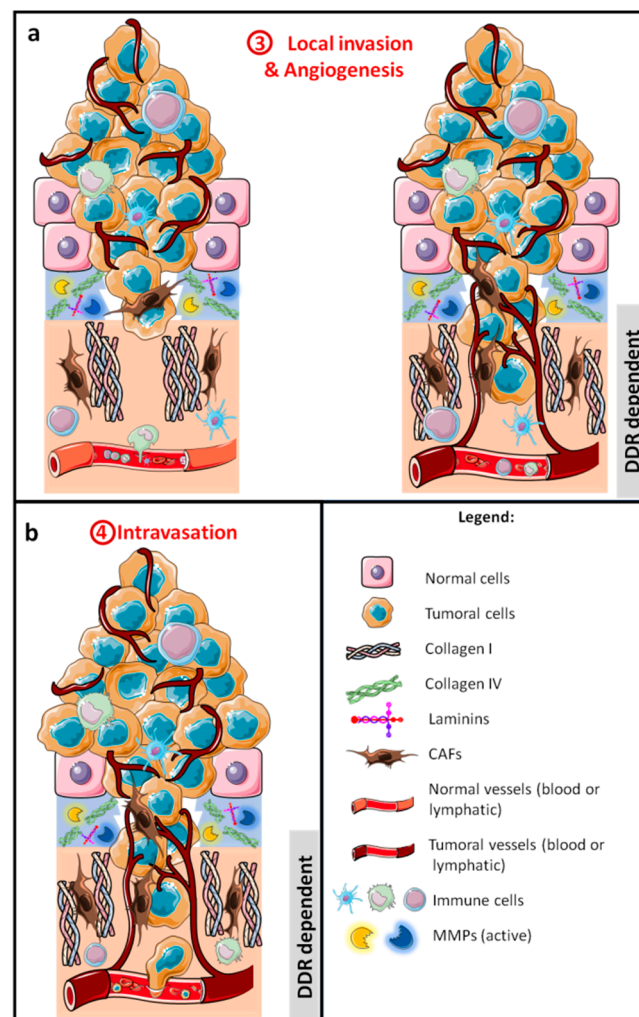


Figure 2. Schematic representation of the development of a carcinoma with the first metastatic stages, local invasion of tumor cells, and angiogenesis (a), allowing tumor cells to intravasate into lymphatic and/or blood vessels (b).

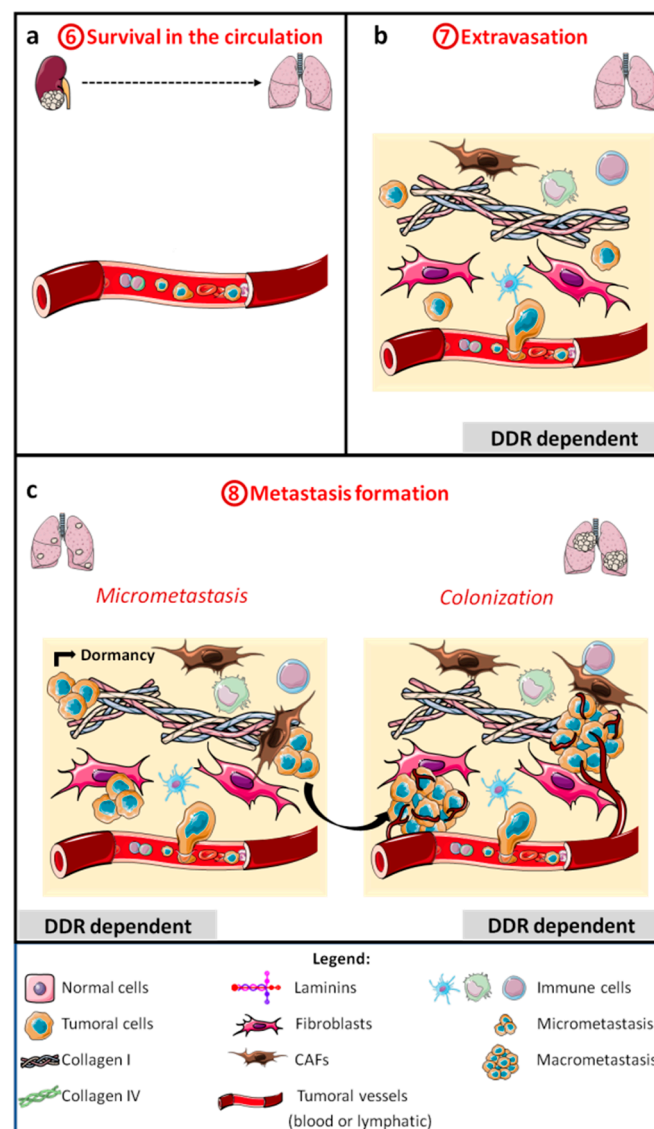


Figure 3. Schematic representation of the late metastatic stages: survival in the circulation (a), extravasation (b), micrometastasis, and colonization or macrometastasis formation (c).

DDRs are a family of tyrosine kinase receptors (TKRs) with two members, DDR1 and DDR2. DDRs share an extracellular domain similar to the discoidin I lectin of the amoeba *Dictyostelium discoideum*, a discoidin-like domain, and an extracellular juxta-membrane domain (EJXM). The transmembrane domain is followed by an intracellular juxta-membrane domain (IJXM) and by the tyrosine kinase domain (TKD). DDR1 and DDR2 are encoded by single genes present in chromosome 6 (6p21.33) and 1 (1q23.3), respectively. Alternative splicing results in DDR1 isoforms, a, b, c, d, and e (Figure 4). DDR1b and c share a 37 amino-acid sequence inserted within the IJXM domain, compared to DDR1a. This stretch of 37 amino-acid insertion includes a tyrosine residue (Tyr 513) essential for DDR1 signaling. DDR1c has six extra amino acids in the kinase domain compared to DDR1b. DDR1a and b are the major isoforms expressed. Isoforms d and e are deleted or mutated in the TKD, resulting in inactive tyrosine kinase isoforms. In contrast, only one form of DDR2 is found (Figure 4) [12].

Both receptors bind to fibrillar collagens with certain ligand specificities; DDR1 preferentially binds to collagen I–V and VIII while DDR2 binds to collagen I–III, V, and X [13]. In addition, DDR1 is able to bind periostin, another component of the ECM [14]. In the absence of any ligand and as for other TKRs, a mixed population of DDR monomers

and homodimers is expressed at the cell surface. However, unlike other TKRs, fibrillar ligand-induced DDR activation is very slow, taking hours to set up and persisting for more than 24 h. In this step, the DDRs cluster, the tyrosine kinase activity is induced, and the dimers phosphorylate each other [15,16].

Several tyrosine residues are phosphorylated, notably Tyr513 and Tyr792, 796, and 797 within a clustering DDR1b, allowing the recruitment of various adaptor proteins involved in signal transduction [17]. Recently, a noncanonical activation mode was proposed for DDR1b, in which the binding of monomeric collagen to DDR1b induces a rapid (30 min) clustering, leading to internalization and re-expression at the cell surface as Tyr513-phosphorylated DDR1b. Then, if fibrillar collagens are present, linear clusters of DDR1b are formed, and canonical activation of the receptors occurs with the phosphorylation of Tyr740 and 792. Since Tyr513 is not present in DDR1a and has no equivalent in DDR2, this noncanonical pathway is only possible with DDR1b and c [18,19]. Activation of DDR2 appears to be more complex and requires phosphorylation by Src kinase. Binding of collagen to DDR2 induces phosphorylation of Tyr740 by Src, thereby releasing the autoinhibitory activity of the kinase, allowing phosphorylation of other tyrosine residues and recruitment of adaptor proteins [20]. Heterodimers or at least heteroclusters between DDR1 and DDR2 have been found in coimmunoprecipitation assays [21]. DDRs activate various intracellular signaling pathways such as extracellular signal-related kinase (ERK), signal transducer and activator of transcription (STAT), Src, protein kinase B (AKT), or Yap [17,21–23].

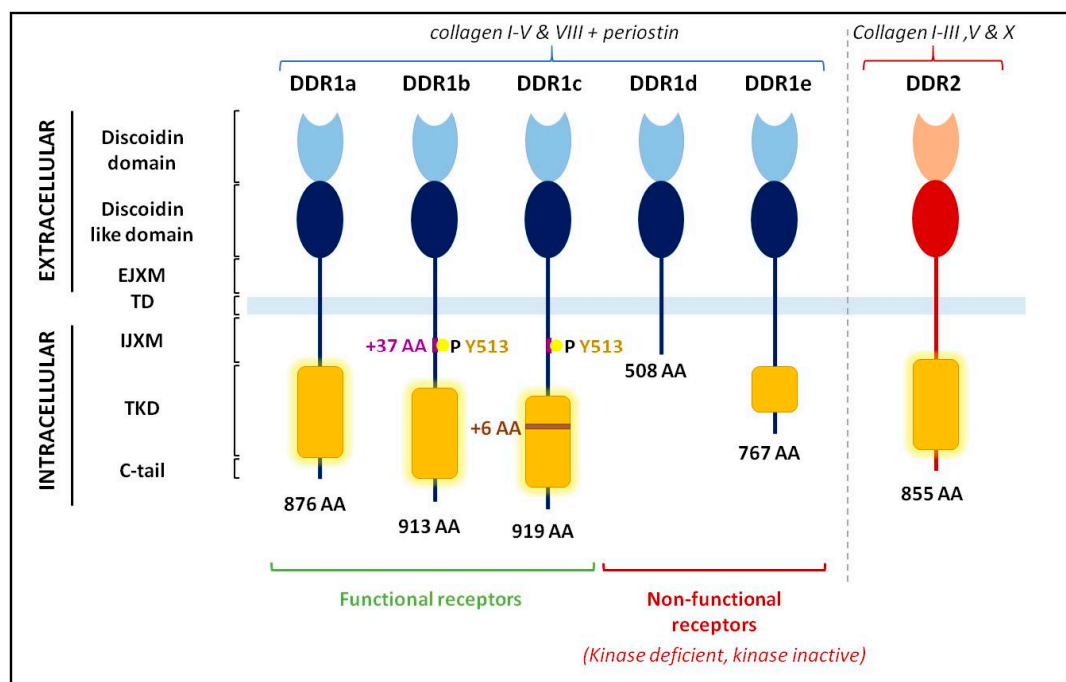


Figure 4. Schematic representation of the five discoidin domain receptor 1 (DDR1) isoforms and of the only DDR2 form. EJXM: extracellular juxta-membrane domain, TD: transmembrane domain, IJXM: intracellular juxta-membrane domain, TKD: tyrosine kinase domain, C-tail: C-terminal part of the receptors. Adapted from [12,17].

Nevertheless, DDRs can induce intracellular signaling independent of tyrosine kinase activity or of collagen binding. The formation of linear invadosomes is mediated by collagen binding to DDR1 and activation of the Cdc42-GEF (guanine nucleotide-exchange factor) Tuba, and it is independent of tyrosine kinase activity [24]. The involvement of DDR1 in the process of collective invasion is collagen-independent and only requires DDR1 interaction with E-cadherin to induce activation of Par3 and 6 [25]. DDR1 is also able to interact with other partners such as the tetraspanin-like protein TM4SF1 (Transmembrane

4 L Six Family Member 1) to mediate intracellular signaling [26]. Less is known about DDR2 interactions with its partners.

The regulation of DDR expression is not well understood. Hypoxia is a positive regulator of DDR1 and DDR2 expression in nontumor cells, such as mesenchymal stem cells and smooth muscle cells [27,28], and in pituitary adenoma and breast tumor cells [29,30]. The transcription factors Zeb1 and Twist1, involved in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process, increase the expression of DDR1 or DDR2, respectively [31,32]. E2F1 and P53, two cell-cycle transcription factors, increase DDR1 messenger RNA (mRNA) expression in different tumor cell lines [33,34]. In hepatocellular carcinoma, DDR1 activates STAT3 which, in turn, increases DDR1 mRNA expression [35]. ATF4 (Activating Transcription Factor 4) mediates osteoclast differentiation by increasing DDR2 gene transcription [36]. Angiotensin II and TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) increase DDR2 mRNA expression [37,38], whereas TGF β 1 increases DDR1 at both mRNA and protein level [39]. In lung fibroblasts, collagen I activates DDR2 and, in turn, JAK2 (Janus Kinase 2) and ERK1/2 signaling pathways leading to up-regulation of DDR1 [40]. MicroRNAs (miRNAs) are potent regulators of DDR expression, with miR-199-a/b 5p [41] and miR-486-3p [42] for DDR1 and miR-615-5p [43] for DDR2. Lastly, a growing body of evidence suggests epigenetic control of DDR1 mRNA expression. In patients with idiopathic nonobstructive azoospermia or ovarian or lung cancers, DDR1 expression was found to correlate with the methylation of the promoter [44–46].

DDR1 activity may be regulated by a shedding mechanism. Collagens are able to activate DDR1 and some batimastat-sensitive proteinases. In turn, active proteinases, such as MT1-MMP-1, MT2-MMP, MT3-MMP (Membrane Type Matrix Metalloproteinases), and a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10 cleave DDR1 at EJXM, leaving a 62 kDa intracellular membrane anchored protein. This cleavage is responsible for inhibiting the tyrosine kinase activity of DDR1, but nothing is known about the function of the extracellular part of DDR1 [13,47,48].

In this review, we focus primarily on the involvement of DDRs in carcinoma development and metastasis. We discuss the potential roles of these receptors in certain stages of metastasis.

2. Roles of DDRs in Cancer Progression

2.1. Tumor Growth

2.1.1. DDRs and Tumor Cells

The transformation of a normal cell into a cancer cell involves different mechanisms such as gene activation/inactivation and chromosomal abnormalities. DDR1 is not important for tumor initiation, but it is critical in early tumor development and progression in KRAS (Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)-driven lung adenocarcinoma [49] (Figure 1a,b). DDR1 is not expressed in normal gastric epithelial cells, but it is expressed in half of gastric carcinoma, showing that DDR1 is an important mediator of gastric cancer aggressiveness [50]. DDR2 has been shown to be a cancer-related gene associated with prostate cancer aggressiveness and progression, and its expression is upregulated in advanced benign prostate hyperplasia and prostate cancer compared to normal tissue [51]. This involvement of DDRs in the development and aggressiveness of tumors translates into an effect in several biological processes. Thus, numerous studies have shown that DDRs have an impact in vitro and in vivo on tumor growth by promoting or inhibiting proliferation and apoptosis in a cancer- and context-dependent manner, alone or in combination with other molecules (Figure 1c).

DDR1 has been shown to play a critical role in promoting the proliferation of several cancer cells, in vitro and in vivo. In different cancer cell lines, DDR1 promotes survival by regulating the Ras/Raf/MEK/MAPK (Rat sarcoma/Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-activated protein kinase kinase/Mitogen-activated protein kinase) pathway, resulting in positive feedback on the expression of the tumor suppressor P53 and the activation of AKT [34]. In Hodgkin's lymphoma, latent membrane protein 1 (LMP1) in-

duces DDR1 expression in germinal center B cells and protects tumor cells from death [52]. In prostate cancer, prostate cancer antigen 1 (PCA-1) increases the level of DDR1 and Bcl-xl, an antiapoptotic molecule, resulting in the inhibition of apoptosis [53]. In non-small-cell lung carcinoma (NSCLC), DDR1 induces tumor cell proliferation *in vivo*. Inhibition of DDR1 or Tmprss4 (Transmembrane protease serine 4), a membrane-bound serine protease, reduces proliferation to various extents with little alteration of cell-cycle progression or apoptosis. These effects are potentiated when DDR1 and Tmprss4 are co-inhibited, resulting in complete inhibition of proliferation with disappearance of cyclin A and B1, increased P21 expression, and gap 0 (G0)/G1 cell-cycle arrest [54]. DDR1 can also promote proliferation *in vivo*. For example, inhibition of DDR1 in a subcutaneous gastric cancer xenograft slows tumor growth [50]. Furthermore, in pancreatic ductal adenocarcinoma, tumors from DDR1^{-/-} mice have significantly fewer Ki-67⁺ proliferative cells [55]. This is consistent with an *in vitro* study of pancreatic cancer cells which showed that DDR1 inhibits TGFβ1 expression, thereby promoting tumor cell proliferation [56]. The role of DDR1 in breast cancer proliferation or survival appears to depend, at least in part, on tumor type or culture method. *In vitro*, targeting DDR1 expression inhibits proliferation of T47D and MCF-7 luminal cells or MDA-MB-435 triple-negative cells [57,58]. In contrast, in other breast cancer studies, DDR1 was found to be a proapoptotic receptor. Luminal breast cancer MCF-7 cells and basal-like breast cancer MDA-MD-231 cells express high and low levels of DDR1 and low and high levels of MT1-MMP, respectively. When cells are cultured in a three-dimensional (3D) collagen matrix, DDR1 in MCF-7 cells is involved in apoptosis and cell growth inhibition through upregulation of the proapoptotic mediator BIK (Bcl-2-interacting killer) [59]. Conversely, in MDA-MD-231 cells, MT1-MMP has a protective effect through degradation of collagen I and cleavage of DDR1, altering the collagen/DDR1/BIK pathway to induce apoptosis and suppress tumor growth [60]. In colon cancer, DDR1 interacts with LRP1, a lipoprotein receptor inducing DDR1 endocytosis, thereby controlling its expression at the plasma membrane. The DDR1/LRP1 interaction increases 3D cell proliferation and cell-cycle progression, as well as decreases apoptosis [61].

DDR2 has been shown to promote proliferation in human melanoma [62], oral squamous cell carcinoma [63], gastric cancer [64], hepatocellular carcinoma [65], lymphoma [43], and lung cancer [66] among others. Indeed, *in vitro* inhibition of DDR2 expression results in decreased proliferation in melanoma cell lines via JNK (c-Jun N-terminal kinase) phosphorylation [62] and induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [65]. In oral squamous cell carcinoma, downregulation of colon cancer-associated transcript 1 (CCAT1) prevents proliferation via inhibition of DDR2, resulting in inactivation of ERK/AKT pathways [63]. Lastly, Circ-LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1), the circular RNAs most expressed in T-cell lymphoblastic lymphoma, is capable of promoting proliferation by inhibiting apoptosis through modulation of miR-615-5P and its target DDR2 [43]. DDR2 has also been shown to enhance tumor growth *in vivo*. Indeed, in hepatocellular carcinoma xenograft, small interfering RNA (siRNA)-mediated inhibition of DDR2 expression in SNU182 cells led to decrease tumor growth [65]. In gastric cancer, overexpression of DDR2 promotes tumorigenesis *in vivo* by inducing tumor growth [67]. On the contrary, DDR2 may also inhibit cell proliferation in melanoma and fibrosarcoma cells *in vitro*. In these cells, fibrillar collagen activates DDR2 resulting in inhibition of proliferation characterized by growth arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle [68].

Tumor cell proliferation can be modulated by DDR mutations. Indeed, some mutations have been identified in DDR1 and DDR2 throughout their structures, but the impact of mutations has been studied mainly for DDR2 and more particularly in lung cancer. DDR2 is mutated in 3–4% of cases. Some mutations such as E655K play a role in tumor progression by weakening the growth-inhibitory effect induced by collagen via DDR2, while V582E or L595F mutations also increase colony size *in vitro* [69,70].

As shown above, the impact of DDRs may be different in *in vitro* and *in vivo* situations, and it may depend on the structural organization of the TME. In the case of breast carcinoma [71], *in vitro* inhibition of DDR1 promotes tumor growth only in 3D. The rigidity

of the microenvironment plays a critical role and can either activate or inhibit proliferation and invasion. The NSCLC cell line H1299 grown on a soft matrix expresses p300 at low levels, leading to reduced acetylation of c-myb and weak interaction between the DDR2 promoter and c-myb or LEF1 (Lymphoid enhancer-binding factor-1). Under these conditions, the DDR2 promoter is not very active, resulting in low proliferation and invasion. On the contrary, when the matrix stiffens, the DDR2 promoter is highly active, resulting in increased proliferation and invasion [66]. Table 1 summarizes the different roles of DDRs in cancer-cell survival or proliferation.

The TME is not only composed of cancer cells but also of stromal cells such as CAFs. An interaction between DDRs and CAFs has been established in several cancers. In gastric carcinoma, CAFs induced the upregulation of DDR1 in tumor cells in vitro by potently activating STAT3, increasing its tumorigenic potential. In vivo, on gastric carcinoma, pharmacological inhibition of DDR1 in the mouse xenograft model impeded CAF-induced tumorigenesis with a reduction in the number of tumor nodules [72].

Table 1. Roles of DDRs in tumor cell survival or proliferation. NSCLC, non-small-cell lung cancer; SCC, squamous cell carcinoma.

Receptor	Cell Survival or Cell Proliferation	Cancers
DDR1	increase	-Sarcoma [34] -Colon carcinoma [34] -Breast carcinoma [57,58] -Hodgkin's lymphoma [52] -Prostate carcinoma [53] -Lung (NSCLC) [54], (adenocarcinoma) [49] -Gastric carcinoma [50] -Pancreatic carcinoma [55,56]
	decrease	-Breast carcinoma [59,60,71] -Colon carcinoma [61]
DDR2	increase	-Melanoma [62] -Oral SCC [63] -Gastric carcinoma [64,67] -Hepatocellular carcinoma [65] -Lymphoma [43] -Lung (NSCLC) [66]
	decrease	-Melanoma [68] -Fibrosarcoma [68,73]

2.1.2. DDRs and Immune Cells

The immune system plays an essential role in the response against the tumor. In order to stop tumor progression, this response is mediated by T and B lymphocytes, natural killer cells, macrophages, and dendritic cells. The immune cells migrate through the matrix where collagen is very abundant and enter the bloodstream to reach the tumor site. In 2011, two new characteristics of cancer were revealed and, among them, is the escape from the immune system [74]. DDRs have been shown to control certain characteristics of immune cells.

DDR1 is able to enhance the migration of the T helper 17 (Th17) population of T lymphocytes in 3D collagen matrices through different pathways: RhoA/ROCK/MAPK/ERK (Ras homolog family member A/ Rho-associated protein kinase/ Mitogen-activated protein kinase/ Extracellular Signal-Regulated Kinase) in vitro and in vivo [75] or activation of p38 MAPK [76]. Recently, in breast cancer, an inverse correlation was made between DDR1 expression by tumor cells and the level of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte infiltration. The molecular mechanism involved in these situations is not known [77].

DDR2 plays an important role in the collagen-mediated differentiation of dendritic cells to a mature phenotype producing a high amount of IL-12 (Interleukin-12). DDR2 enhances the functional abilities of these mature dendritic cells to activate T cells, thereby regulating immune responses [78]. While integrins are important mediators of neutrophil migration on a 2D collagen matrix, DDR2, but not DDR1, is involved in neutrophil migration in 3D collagen. DDR2 regulates neutrophil directionality through increased secretion of MMP8 [79]. Furthermore, in adipose tissue, T-cell activity is controlled by myeloid-derived CD45⁺/DDR2⁺ cells. These CD45⁺/DDR2⁺ cells express increased levels of MHC II (major histocompatibility complex II) and CD80, two markers of activation and antigen presentation, and lead to increased production of the proinflammatory cytokines, IFN- γ (Interferon gamma) and TNF- α , by CD4⁺ T cells [80]. The presence and the role of these myeloid-derived CD45⁺/DDR2⁺ cells in tumor progression are not known.

2.2. Local Invasion

2.2.1. Extracellular Matrix Breakdown

In order to spread into different tissues, tumor cells must first breach the surrounding basement membrane, which is mainly composed of collagen IV and laminins. The capacity of tumor cells to overcome the basement membrane is decisive for tumor progression (Figure 2a) [81]. DDRs are able to modulate the expression of MMPs, in particular MMP2 and MMP9, which are involved in the remodeling and degradation of the basement membrane.

In lung cancer, DDR1 inhibition decreases the activity of MMP2 and MMP9 [82]. Modulation and regulation of MMP2 and/or MMP9 activity by DDR1 have also been demonstrated in pituitary adenoma [83], colorectal cancer [84], and renal cancer (MMP2) [85]. In pancreatic cancer, a novel pathway including TM4SF1/DDR1/MMP2 and 9 enhances invadosome formation and activity, thereby enhancing cell migration and invasion capabilities [86]. In liver cancer, the interaction between C1q, a component of the complement system, and DDR1 induces the upregulation of MMP2 and MMP9 expression, leading to migration and invasion [87]. C1q is present in the microenvironment of many tumors such as colon, pancreatic, breast, lung adenocarcinoma, and melanoma, and it is expressed by stromal cells such as fibroblasts [88].

Like DDR1, DDR2 is involved in the modulation of MMP expression in ovarian cancer where it regulates the expression of MMP1–3, 7, and 13 mRNAs and the activity of MMP2 and MT1-MMP [32]. In human melanoma cells, downregulation of DDR2 is associated with decreased MMP2 and MMP9 activities [62]. Overexpression of DDR2, through ERK2/Snail signaling, increases MT1-MMP and MMP2 expression in hepatocellular carcinoma [89] and MT1-MMP expression in breast cancer [90]. Nevertheless, DDR2 was found to be required for collagen I-mediated activation of MT1-MMP in fibroblast but not in fibrosarcoma or in breast cancer [91].

Basement membrane degradation is mediated by the formation of specialized structures called invadosomes which degrade the basement membrane while maintaining cell-cell contacts and tissue integrity [92]. The involvement of DDRs in the formation of these structures has been demonstrated in several studies. In breast cancer cells, the binding of collagen I to DDR1 leads to the activation of the Cdc42-GEF Tuba, thereby inducing the formation of linear invadosomes, as well as promoting the activation of the proteolytic machinery and cell invasion. This process is independent of the tyrosine kinase activity of DDR1 [24]. In hepatocellular carcinoma, DDR1-induced linear invadosome formation is enhanced in the presence of TGF β 1 [39].

DDR2 is required to elaborate linear invadosomes in endothelial cells and to facilitate matrix degradation in association with VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), but it is not known if DDR2 plays the same role in cancer cells [93]. Table 2 summarizes the different roles of DDRs in MMP activation and invadosome formation.

Table 2. Roles of DDRs in matrix metalloproteinase (MMP) activation and invadosome formation.

Receptor	MMP Activation/Invadosome Formation	Cancers
DDR1	Increase	-Lung carcinoma [82] -Pituitary adenoma [83] -Colorectal carcinoma [84] -Renal carcinoma [85] -Pancreatic [86] -Liver [87] -Breast carcinoma [24]
	Decrease	
DDR2	Increase	-Ovarian [32] -Melanoma [62]-Hepatocellular carcinoma [89] -Breast [90]
	Decrease	

After basement membrane degradation, cells encounter collagen I in the interstitial matrix (Figure 2a). Aligned collagen oriented perpendicular to the tumor boundary has been shown to promote invasion, and it is considered as a poor prognostic marker for survival or recurrence in patients with breast carcinoma [94]. Three tumor-associated collagen signatures (TACS) have been defined. TACS-1 is characterized by increased collagen deposition near the tumor that appears very early in tumor formation. As the tumor grows, TACS-2 and -3 have been defined. TACS-2 corresponds to collagen fibers stretched around the tumor, and TACS-3 is the situation in which collagen fibers are aligned perpendicular to the tumor, promoting local invasion [95]. DDR1 and DDR2 participate in collagen fiber alignment and have been associated with TACS-3 [90,96–98]. Accordingly, inhibition of DDR2 expression decreases collagen deposition and fiber alignment and thereby tumor growth, migration and invasion are reduced [90,99].

The structure of collagen I can be impacted by aging, affecting many biological processes. DDR1 is very sensitive to these changes and, consequently, the regulation of proliferation and apoptosis is altered. For instance, the proteolytic degradation of collagen I by MT1-MMP, which increases with aging, was shown to decrease DDR1 activation, tumor growth, and inhibition of apoptosis [71]. This effect is also observed with DDR2; collagen I aging reduces DDR2 activation, resulting in induction of fibrosarcoma cell proliferation. In the presence of old collagen I, DDR2 and the tyrosine phosphatase SHP-2 (Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2) are activated to a lesser extent, JAK2 and ERK1/2 remain phosphorylated, and expression of the cell-cycle negative regulator p21^{CIP1} decreases [73].

DDR2 expressed by cells of the TME is also involved in collagen remodeling. Inhibition of DDR2 in CAFs or in mesenchymal stem cells impacts their mechanotransduction function, disturbs collagen fiber organization, and decreases matrix stiffness and TACS-3 signature, leading to inhibition of breast tumor cell invasion [97,99].

2.2.2. Epithelial–Mesenchymal Transition

EMT is a critical process involved in cancer development and progression. Depending on the context, this mechanism can lead epithelial cells to undergo multiple intermediate steps accompanied by physiological and morphological changes, transforming them in extreme cases into mesenchymal cells. EMT can be reversed by an event called mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Both transitions are regulated by the induction or repression of transcription factors such as Zeb1/2, Snail1/2, and Twist among others, as well as the modulation of the expression of epithelial (E-cadherin) and mesenchymal (N-cadherin, vimentin, MMP9) markers [100]. DDRs have been shown to be associated with EMT in several cancers.

Some studies highlighted that DDR1 can induce EMT *in vitro*. For instance, in prostate cancer, DDR1 activates Pyk2 and MKK7 (Mitogen-activated protein kinase kinase 7), resulting in increased expression of the mesenchymal markers vimentin and N-cadherin and decreased expression of the epithelial marker E-cadherin [101]. In gastric cancer, a correlation among DDR1, E-cadherin, and vimentin has been demonstrated in cancer tissues. Overexpression of DDR1 increases the expression levels of vimentin and Snail1 and decreases that of E-cadherin [102]. Moreover, a negative correlation between miR-221-5p and DDR1 has been demonstrated. Overexpression of miR-221-5p in gastric cancer cells inhibits not only EMT, but also proliferation and invasion through modulation of DDR1 expression [103]. DDR1 induces EMT in hepatocellular carcinoma by regulating STAT3 *in vitro* and *in vivo* [35]. In colorectal cancer, downregulation of miR-199a-5p increases DDR1 expression, resulting in increased expression of mesenchymal markers [84]. In renal cancer OS-RC-2 and ACHN cell lines, collagen-mediated activation of DDR1 leads to increased expression of mesenchymal markers (vimentin/N-cadherin) and decreased expression of epithelial markers (E-cadherin) [85].

Conversely, several studies have shown that DDR1 expression is decreased during EMT. In breast cancer, a negative correlation between DDR1 and Zeb1 was found in carcinoma tissues. In the tumor, H-Ras is able to induce EMT by increasing Zeb1 and decreasing miR-200c expression. Zeb1 leads to suppression of E-cadherin expression and a reduction in DDR1 expression [31]. This negative correlation between Zeb1 and DDR1 is significantly associated in a female-specific manner in breast, ovarian, and liver cancers but not in lung or colon cancers [104]. Similarly, in epithelial ovarian cancer, a decrease in DDR1 expression is observed during the EMT process due to CpG hypermethylation of its promoter, and DDR1 inhibition did not affect E-cadherin expression at the protein level [45]. The effect of DDR1 on EMT inhibition has also been demonstrated *in vivo* in breast cancer. Crossing DDR1^{-/-} and MMTV-PyMT mice revealed that a loss of DDR1 expression increases the level of vimentin in the primary tumor while E-cadherin expression decreases. In the absence of DDR1, tumor cells exhibit a basal phenotype leading to enhanced invasion and are associated with the development of breast cancers of poor prognosis [105]. In the Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell line, Slug (Snail2) induces EMT with no detectable level of E-cadherin and increases the level of mesenchymal markers (MMP9 or vimentin). During this transition, a switch from DDR1 to DDR2 expression is observed. Indeed, MDCK cells expressing Slug show a decrease in DDR1 expression accompanied by an increase in DDR2 expression [106]. This notion of switching between DDR1 and DDR2 has been recently suggested in ovarian cancer, where DDR2 mRNA expression is low in epithelial-like cells and increases in mesenchymal-like cells. Nevertheless, DDR2 protein expression could not be found in these mesenchymal-like cells [45].

The role of DDR2 in EMT activation is less controversial. An association between DDR2 and Snail1 has been revealed in several studies on breast cancer [30,90,98], ovarian cancer [32], papillary thyroid carcinoma [107], and hepatocellular carcinoma [89] via different signaling pathways. Indeed, immunohistochemistry on breast cancer tissues revealed an association of DDR2 expression with nuclear localization of Snail1, as well as with a loss of E-cadherin expression. The tyrosine kinase activity of DDR2 induces stabilization of Snail1 protein and involves stimulation of ERK2 in a Src-dependent manner. Importantly, in this study, DDR2 was induced during EMT but was not required for EMT induction [90]. Similarly, in hepatocellular carcinoma, DDR2 stabilizes Snail1 through ERK2 activity [89]. In gastric cancer, DDR2 promotes EMT by modulating the mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2)/AKT pathway [67].

Although a link has been established between DDRs and some factors modulating the EMT process, especially *in vitro* where a few signaling pathways have started to emerge, the mechanisms involved need to be further elucidated *in vivo*. Table 3 summarizes the different roles of DDRs in EMT.

Table 3. Roles of DDRs in the mechanism of EMT.

Receptor	EMT	Cancers
DDR1	Increase	-Prostate [101] -Gastric [102,103] -Hepatocellular carcinoma [35] -Colorectal [84] -Renal carcinoma [85]
	Decrease	-Breast carcinoma [31,104,105] -Ovarian [45,104] -Liver (female, [104])
DDR2	Increase	-Breast [30,90,98] -Ovarian [32] -Papillary thyroid carcinoma [107] -Hepatocellular carcinoma [89] -Gastric [67]
	Decrease	

2.2.3. Migration and Invasion

DDR1 and DDR2 have been extensively studied for their impact on migration and invasion. There are two main mechanisms of migration: cells moving individually (amoeboid and mesenchymal migration) or collectively in a cohesive multicellular unit (collective migration). Migration can be influenced by cytoskeletal organization, remodeling of the surrounding matrix by migrating cells, and cell–matrix interaction and force generation [108]. Adhesion to the ECM is important for cancer cells to migrate and, subsequently, to disseminate to different tissues. Some studies have shown that adhesion can occur in a DDR-independent manner, e.g., in breast cancer, the adhesion of MCF-7 cells to collagen is predominantly driven by $\beta 1$ integrin rather than DDR1 [109]. Recently, using different combinations of HEK293T cell populations expressing either DDR1 and/or DDR2, we showed that the extracellular part of DDR1 or DDR2 is sufficient to mediate cell adhesion to collagen I in absence of integrin activities [21]. In human A375 melanoma, HT29 colon carcinoma and SK-HEP hepatoma cells, inhibition of DDR1 reduces by 75% very early tumor cell adhesion to collagen I with significant impairment of the cell–cell adhesion molecules ICAM1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) and VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) [110]. In prostate cancer, overexpression of DDR2 improved adhesion to collagen I [111].

DDRs are involved in migration and invasion processes as shown in numerous *in vitro* studies. DDR1 modulates the organization of the cytoskeleton and, consequently, has an impact on cell migration. In squamous cell carcinoma, DDR1 is localized at cell–cell contacts in association with E-cadherin and is able to regulate cytoskeletal organization, particularly actomyosin organization, and collective migration. The DDR1/E-cadherin/Par3/Par6 complex controls the localization of RhoE which antagonizes Rho/ROCK, modulating actomyosin contractility at cell–cell contacts. At these sites, actomyosin forces are weaker, allowing coordinated movement of the clustered cells [25]. In oral squamous cell carcinoma, DDR1 is involved in collective migration and invasion into a collagen matrix, leading to an angiolymphatic invasion *in vivo* [112]. In hepatocellular carcinoma cells, a cross-talk between DDR1 and STAT3 enhances tumor progression by promoting proliferation, migration and invasion *in vitro*, and tumorigenesis *in vivo* [35]. In pancreatic cancer, TM4SF1-induced migration and invasion require DDR1. Overexpression of DDR1 increases cell ability to form invadosomes to degrade the matrix and increases MMP2 and MMP9 [86]. In breast cancer cells, in a pathway involving the CD9 tetraspanin, DDR1 induces cell migration [113]. Collagen causes shedding of the DDR1 ectodomain by the metalloproteinase ADAM10. This ADAM10 and collagen binding-dependent DDR1 shedding is important for more efficient migration of epithelial cells on the collagen I matrix *in vitro* [48]. Consequently, migration is influenced by the control of DDR1 expression. In gastric cancer, miR-221-5p modulates DDR1 expression. When miR-221-5p is downregulated, DDR1

expression increases and promotes migration and invasion [103]. On the contrary, in pancreatic carcinoma, the interplay of DDR1 with E-cadherin and the Par3 signaling pathway was shown to prevent 3D invasion by enhancing cell–cell adhesion [114].

DDR2 has also been shown to promote migration and invasion in many cancers. Inhibition of DDR2 expression in gastric cancer [64] or hepatocellular carcinoma [65] reduces migration and invasion. Inhibition of DDR2 expression in melanoma suppresses migration and invasion through decreased activation of the ERK1/2 and NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) pathways and, consequently, reduced expression of MMP2 and 9 [115]. In oral squamous cell carcinoma, downregulation of CCAT1 prevents proliferation, migration, and invasion through inhibition of DDR2 leading to inactivation of ERK/AKT pathway [63]. In head and neck squamous cell carcinoma, overexpression of DDR2 enhances migration and invasion [116]. In breast cancer, DDR2 can induce tumor cell migration and invasion when expressed by tumor cells and/or by CAF or multipotent stromal cells (MSCs) [90,117].

Although, in most cases, DDR1 and DDR2 have been shown to promote migration and invasion, few studies have shown their involvement in inhibiting both processes. DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) binds to the IJXM domain of DDR1 and decreases collagen-stimulated invasion of breast cancer cells [118].

Very few studies have analyzed the impact of DDRs on migration and invasion in vivo; instead, they focused on the establishment of metastasis as in gastric cancer [119]. PCA-1 increased prostate cancer cell invasion through DDR1 and MMP9 expression in a chick chorioallantoic membrane (CAM) assay [53]. In colorectal cancer, NSD2 (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2) circular RNA inhibits miR-199b-5p expression, which leads to an upregulation of DDR1 expression and promotes migration and invasion in vitro and in vivo [120]. DDR2 increases metastasis in a peritoneal xenograft model of ovarian cancer [32]. In a mouse model of spontaneous breast tumor development, inhibition of DDR2 expression by gene ablation largely reduces metastasis without affecting lung tumor growth [99,117].

Table 4 summarizes the different roles of DDRs in EMT.

Table 4. Roles of DDRs in tumor cell migration and/or invasion.

Receptor	Migration/Invasion	Cancers
DDR1	Increase	-Squamous cell carcinoma [25,112] -Hepatocellular carcinoma [35] -Pancreatic [86] -Breast [113] -Renal carcinoma [85] -Gastric [103] -Prostate [53] -Colorectal [120] -Epidermoid carcinoma [48]
	Decrease	-Breast [118] -Pancreatic [114]
DDR2	Increase	-Gastric [64] -Hepatocellular carcinoma [65] -Melanoma [115] -Squamous cell carcinoma [63,116] -Breast [99,117] -Ovarian [32]
	Decrease	

2.3. Intravasation

There are two different routes for tumor dissemination: blood vessels or lymphatic vessels (Figure 2b). Angiogenesis is the primary vascularization process and is defined as the formation of new blood vessels from existing vasculature [1]. Likewise, lymphangiogenesis is the formation of new lymphatic vessels from pre-existent vessels [121]. During

these processes, tumor blood and lymphatic vessels have the particularities of being disorganized and permeable to cancer cells, which facilitate their passage into the blood or lymphatic streams and, subsequently, the establishment of metastasis by their dispersion in different tissues. Tumor and endothelial DDRs are involved in angiogenesis.

DDR1, in renal cell carcinoma and in gastric cancer cells, induces the secretion of angiogenic factors involved in endothelial cell tube formation *in vitro* [85,119]. In gastric cancer cells, depletion of DDR1 suppresses the expression of key angiogenic factors such as VEGF-A, VEGF-C, and PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor B) [119] and leads to necrosis *in vivo*, as a consequence of impaired angiogenesis [102,119]. A direct role of DDR1 in angiogenesis was demonstrated by inhibiting DDR1 cell surface expression in microvascular endothelial cells (HMEC-1) [122].

DDR1 is also important for lymphangiogenesis. Gastric tumors develop fewer lymphatic vessels if DDR1 expression is inhibited [119] and lymphatic endothelial cells are unable to form tubes when DDR1 expression is suppressed by siRNA or with miR199a/b-5p [123].

In contrast to endothelial cells, in colon carcinoma, DDR2 is weakly expressed at the surface of normal endothelial cells; however, overexpression of the receptor enhances angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. After injection of VEGF-containing Matrigel, angiogenesis is impacted in the *slie* mouse model carrying a deletion in the *DDR2* gene. When melanoma cells are injected, tumor development is impacted with decreased tumor angiogenesis and increased tumor necrosis; nevertheless, the remaining vasculature is mature and functional. In these tumors, proangiogenic factors or receptors such as VEGFR2, Ang-2 (Angiopoietin-2) or MMP9 are decreased, and antiangiogenic factors such as Ang-1 are increased [124]. In hepatocellular carcinoma, an association between DDR2 and VEGF has been found. Indeed, during hypoxia, DDR2 can regulate the VEGF pathway [125].

Nothing is known about the role of DDRs in the mechanism of intravasation.

2.4. Survival in the Circulation, Extravasation, and Micrometastasis Formation

No evidence for a role of DDRs in tumor cell survival in the bloodstream or extravasation has been established (Figure 3a–c). Nevertheless, in a model of liver metastasis, Yuge and collaborators injected gastric cancer cells into the spleen of mice and found no difference in the number of liver micrometastases whether or not cells expressed DDR1. These data suggest that there is no difference for tumor cell survival in the bloodstream or tumor cell extravasation to the liver parenchyma [119]. On the contrary, DDR1 in tumor cells is important for the migration of lung cancer cells to the bone niche after intracardial injection. However, it is not clear which stage of metastasis (survival in blood, extravasation, and/or micrometastasis) is under the dependence of DDR1 [82].

Recently, DDR1 expressed by the liver metastatic niche was found to be important for micrometastasis implantation. DDR1 siRNA-injected mice have fewer hepatic stellate cells (HSCs), differentiated myofibroblasts, and angiogenesis (CD31-positive liver sinusoidal endothelial cell (LSECs)). Consequently, less collagen is secreted into the niche and the number of micrometastases is reduced [126].

The importance of DDR2 in the metastatic niche depends of the metastatic tissue. In a model of liver metastasis, intrasplenic injection of colon cancer cells into $DDR2^{-/-}$ mice showed an increase in micrometastasis foci compared to a $DDR2^{+/+}$ mice. This result can be explained by increased HSC differentiation into myofibroblasts and increased LSEC activation and angiogenesis in $DDR2^{-/-}$ mice. Furthermore, tumor cell adhesion to LSECs from $DDR2^{-/-}$ mice is increased if these cells are exposed to tumor cell supernatants, suggesting that this may cause an increase in tumor cell extravasation *in vivo*. Lastly, the liver tumor niche in $DDR2^{-/-}$ mice promotes tumor cell colonization (see below) [127]. In contrast, in a model of lung metastasis, intravenous tail injection of melanoma cells in *slie* mice showed a reduction in the number of lung metastases [124].

However, different types of collagen are found at higher levels in the serum from patients with cancer, and serum collagen IV is a biomarker for peritoneal dissemination of gastric cancer [128]. In breast cancer, HSP47 induces collagen secretion in the

bloodstream where it can bind to circulating tumor cells and platelets, thereby promoting metastases [129]. C1q, which is part of the complement activation complex, contains a collagen-like domain. It was recently shown that DDR1 is activated in the presence of C1q, with phosphorylation at Tyr513 of DDR1 in hepatocellular carcinoma [87]. Furthermore, DDRs are involved in the activation of the pro-survival AKT pathway [130,131]. It is tempting to speculate that serum collagens and C1q can activate DDRs in circulating tumor cells to induce their survival in the blood stream.

The involvement of DDRs in tumor cell extravasation is still poorly documented.

2.5. Macrometastasis (Colonization)

The first demonstration of DDR1 involvement in tumor colonization (Figure 3c) was elegantly established by the Giancotti group [26]. In lung micrometastases, breast tumor cells produce and deposit collagen I in the ECM. Collagen can bind to DDR1 inducing the recruitment of the tetraspanin TM4SF1. In turn, TM4SF1 induces a large clustering of DDR1 and brings PKC α bound to the adaptor protein syntenin-2 in close proximity to the intracellular part of DDR1. PKC α phosphorylates and activates JAK2 and, consequently, STAT3 is phosphorylated and can, in turn, activate the transcription of genes such as *Sox2*. This mechanism of DDR1-induced metastatic colonization is independent of its tyrosine kinase activity. The formation of large DDR1 clusters is crucial for this mechanism, because collagen IV, which induces only small-size clusters, is not involved in the colonization process. Inhibition of TM4SF1 alters not only the metastases of breast tumors to the lungs, but also to the brain and bone. However, the involvement of DDR1 in brain and bone metastasis has not been assessed [26]. Recently, it was shown that TM4SF1 can regulate AKT and ERK activation via DDR1 in lung carcinoma [130], but it is unclear whether or not these regulations require DDR1 tyrosine kinase activity and whether these pathways are involved in DDR1-induced colonization. DDR1 is involved in gastric liver metastasis colonization, and intrasplenic injection of DDR1-inactivated gastric tumor cells shows no difference in micrometastasis formation but an inhibition of metastasis colonization [119]. In contrast, DDR1b expression in fibrosarcoma cells completely inhibits the formation of lung macrometastases after intravenous tail injection of these cells, but the step in which the metastasis process is altered remains unknown [23].

DDR2 has also been found to play a role in metastasis formation; however, again, it is not clear which step(s) of the metastatic process is (are) involved. In addition, DDR2 expression in tumor cells and in the metastatic niche may influence tumor metastatic colonization. In lung metastases of breast tumor cells, DDR2 expression by tumor cells is important for metastasis development, but its expression in the metastatic niche is dispensable [117]. In contrast, melanoma cells require DDR2 expression in the lung metastatic niche and in tumor cells to develop metastatic colonization [62]. Intrasplenic colon carcinoma cells injected into DDR2^{-/-} mice develop a liver niche favorable for micrometastasis development, as well as for tumor colonization. DDR2^{-/-} HSCs exposed to colon cancer cell supernatants overexpress genes (IL-10, TGF β , and VEGF-A) involved in immune suppression, angiogenesis, and cancer cell growth. Therefore, the number of proliferating tumor cells is increased in liver metastases if DDR2 is not expressed in the liver [127].

2.6. DDR Association and Crosstalk with Other Membrane Receptors

The association or crosstalk of DDR1 with other transmembrane proteins results in distinct outcomes. Through a collagen- and tyrosine kinase-independent mechanism, DDR1 binding to E-cadherin increases the strength of cell–cell interactions. In breast cancer, some studies showed crosstalk between DDR1 and the insulin and IGF receptors, IR-A and IGF-1R (Insulin like Growth Factor 1 Receptor) (Figure 5). IGF-1 and IGF-2 stimulation lead to the upregulation of DDR1 by activating the PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/AKT pathway, thereby inhibiting miR-199a-5p expression. In the absence of collagen and in the presence of IGFs, DDR1 enhances the IR-A and IGF-1R pathways, thereby increasing tumor cell migration and survival through the PI3K/AKT pathway and tumor growth through

the Ras/Raf/MEK/ERK pathway [132]. In addition, insulin or IGF-1 and IGF-2 induce an association between IGF-1R or IR and DDR1. DDR1 can also modulate IR expression by stabilization of both the mRNA and the protein [133]. In thyroid cancer, crosstalk between DDR1 and IGF-2/IR-A is responsible for tumor cell proliferation and invasion in 2D and 3D assays, and it is involved in the maintenance of tumor cell stemness [134]. In bladder cancer, migration and anchorage-independent growth are dependent on DDR1/IGF-1R or DDR1/IR-A crosstalk [135]. In A549 lung cancer cells, as collagen I does, the binding of IGF-1 to its receptor IGF-1R mediates DDR1-induced cell migration [136].

Lastly, DDR1 can associate with TM4SF1 to induce metastatic tumor colonization as described above [26]. No crosstalk between DDR2 and other membrane receptors was found; however, in MCF-7 and NIH-3T3 cells, DDR2 is phosphorylated on tyrosine residues after IGF-2 or insulin stimulation, suggesting possible crosstalk between IGF-1R or/and IR and DDR2 [137].

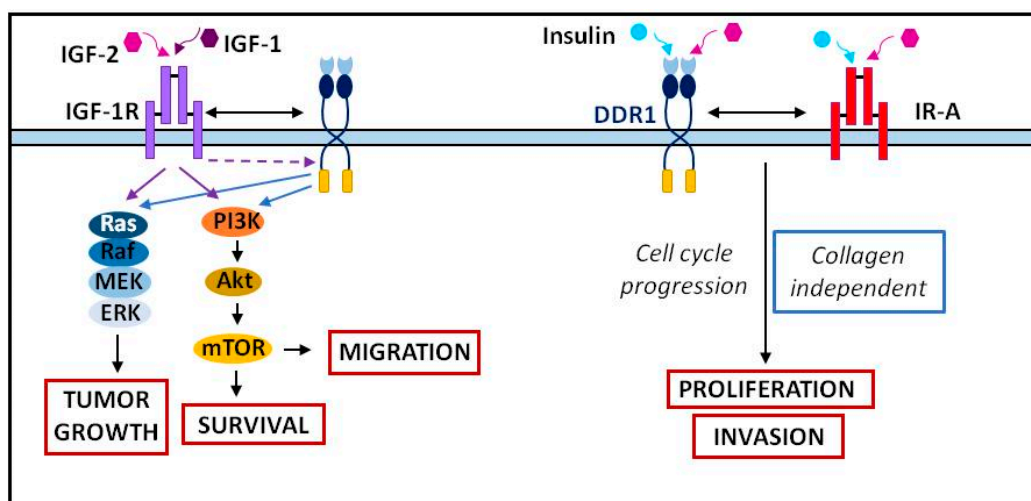


Figure 5. Crosstalk between DDR1 and the IGFs/insulin receptors. Adapted from [132,138].

3. Cancer Treatment

DDRs are upregulated in many cancers and appear to be promising biomarkers; thus, their inhibition an attractive strategy. DDR1 and DDR2 can be targeted by tyrosine kinase inhibitors such as dasatinib, nilotinib, and imatinib [139]. These inhibitors have been shown to be effective on multiple occasions. Dasatinib inhibited DDR1 in lung [54] and gastric cancers [140] and DDR2 in studies of head and neck cancers [141]. Similarly, nilotinib inhibited DDR1 in breast and colon cancer studies [60,61]. Although these compounds are effective in inhibiting DDRs, they have broad specificities and, thus, also inhibit other TKRs. Sitravatinib (MGCD-156) is a multitarget TKR inhibitor that can inhibit DDR2 [142].

Table 5 summarizes the imatinib, dasatinib, nilotinib, and sitravatinib specificities against different TKRs and their use in clinical trials targeting DDR1 or/and DDR2.

Table 5. Nonspecific DDR inhibitors: specificities and clinical trials (adapted from [ClinicalTrials.gov](#)).

Inhibitor	Targeted Kinases	In Vitro Assay (Cancer)	Preclinical (Cancer)	Clinical (DDR Targeted)
Imatinib	BCR-ABL, DDR1, DDR2			
Nilotinib	ABL1, Kit, PDGFRA, PDGFRB, CSF1R, DDR1, DDR2	DDR1: -Breast (decreased apoptosis and DDR1 phosphorylation) -Colon (increased proliferation, decreased DDR1 phosphorylation).		-NCT02029001: Malignant solid neoplasms. Mutated DDR1, mutated DDR2. Phase 2 (recruiting).
Dasatinib	BCR-ABL, SRC kinase family, DDR1, DDR2	DDR1: -Lung (decreased proliferation). -Gastric (decreased proliferation, migration, invasion). DDR2: -Head and neck (decreased proliferation, migration, invasion)	DDR2: -Head and neck (zebrafish): decreased migration	-NCT01491633: Squamous cell lung cancer. Mutated DDR2. Phase 2 (not evaluable, toxicity). -NCT04439305: lymphoma, myeloma, solid neoplasm. Mutated DDR2. Phase 2: withdrawn. -NCT01514864: NSCLC. Mutated DDR2. Phase 2: not completed, disease progression.
Sitravatinib (MGCD156)	MET, AXL, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFRA, PDGFRB, TRKA, TRKB, DDR2			-NCT02219711: NSCLC, renal cell carcinoma. Mutated DDR2. Phase 1 (recruiting).

In recent years, several DDR1-specific inhibitors have been developed. In 2013, the pyrazolo pyrimidin benzamide 7rh and 7rj selective DDR1 inhibitors were discovered. They can inhibit the enzyme activity with IC₅₀ (Half-maximal inhibitory concentration) values of 6.8 and 7.0 nM, respectively [57]. In vitro and in vivo studies have shown 7rh effectiveness for pancreatic [143], gastric [72], and lung [144] cancers. KST9046, with a quinazoline urea scaffold, and 8v, a 3'-(imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamide compound, were designed and optimized to inhibit DDR1 [145,146]. DDR1-IN-1 and DDR1-IN-2, two derivatives of the DDR1-interacting structure of imatinib, are capable of inhibiting DDR1 phosphorylation with EC₅₀ (Half maximal effective concentration) values of 86 nM and 9 nM, respectively [147]. DDR1-IN-1 inhibits proliferation, migration, and invasion, and it increases apoptosis of prostate cancer cells [101]. Recently, a selective DDR1/DDR2 inhibitor called 2.45 was identified using a parallel DNA encoded library. The 2.45 compound preserves renal function and reduces tissue damage in mice with Alport syndrome, a syndrome in which DDR1 is involved [148]. DDR1 inhibition may be a promising solution in some cancers; however, in pancreatic cancer, long-term inhibition of DDR1 appears to lead to organ atrophy, as DDR1 is crucial for tissue homeostasis [55]. Furthermore, in some cancers such as renal cancer, DDR1 is downregulated in cancerous tissues and, therefore, its inhibition does not seem appropriate in this case [41].

Fewer compounds are known that can specifically and selectively inhibit DDR2. Actinomycin D, the potent mammalian transcription inhibitor, can impair the interaction between DDR2 and collagen, preventing DDR2 activation [149]. Compound 1 can inhibit DDR2 phosphorylation but without affecting NSCLC proliferation [150]. WRG-28 inhibits the interaction between DDR2 and collagen through allosteric modulation. WRG-28 impedes breast cancer cell migration and invasion in vitro and inhibits lung metastasis formation after injection of tumor cells in the mouse tail vein [117]. Other ways to inhibit

DDR2 activity include the use of an anti-DDR2 antibody or a recombinant soluble DDR2 form, which prevents collagen binding to DDR2 [79].

Today, the difficulty with patient management lies in the tumor heterogeneity that does not allow a universal treatment, as well as in the lack of effective treatment, which leads to the appearance of resistance and cancer relapse. Some researchers have highlighted the role of DDR1 in treatment resistance in lung [144], breast [151], pancreas [143], glioma [152], ovarian [153], and head and neck cancers [154]. For example, in glioblastoma, DDR1 drives chemoresistance by collaborating with the 14-3-3/BECN1 (Beclin 1)/AKT1 multiprotein complex to enhance cell survival, anti-autophagy, and resistance by AKT/mTOR signaling [152]. However, DDR1 can improve the chemosensitivity of prostate cancer cells, with DDR1b increasing the sensitivity of cells to doxorubicin and paclitaxel [155].

DDR2 is also involved in treatment resistance. DDR2 has been identified as a critical target for improved response to anti-PD1 (Programmed death-ligand 1) immunotherapy. The combination of anti-PD1 therapy and DDR2 inhibition with dasatinib shows a reduction in tumor burden and results in an increase in CD8⁺ T-cell counts in bladder, breast, colon, and sarcoma cancers. Melanoma metastasis in mouse lungs is largely inhibited if mice receive both treatments in combination [156]. Despite the demonstrated efficacy in inhibiting DDR2, acquired resistance to dasatinib can occur through acquisition of the DDR2 gatekeeper mutation T654I in NSCLC [157]. On the other hand, other mutations such as L595P lead to increased sensitivity to dasatinib in squamous cell lung cancer [70]. No specific DDR inhibitors are in clinical trials. Table 6 summarizes the specificities of the different DDR inhibitors and their use in preclinical assays.

Table 6. Specific DDR inhibitors and some examples of their used in preclinical assays. Specificity describes the strength of binding between a receptor and an inhibitor and it is measured by the dissociation constant (K_D).

Inhibitor	Specificity	In Vitro Assay (Cancer)	Preclinical (Cancer)
7rh	DDR1 > DDR2	-Pancreatic (decreased DDR1 phosphorylation, signaling, colony formation, migration) -Gastric (decreased proliferation) -Lung (increased apoptosis)	-Pancreatic (mice): decreased tumor development and proliferation, increased apoptosis and survival (in association with chemotherapy). -Gastric (mice): decreased peritoneal tumor nodules. -Lung (mice): In association with chemotherapy, decreased tumor development and increased apoptosis
7rj	DDR1 > DDR2		
KST9046	DDR1 > ARAF, FLT3, LIMK1, LMK2	-Decreased proliferation (leukemia, lung, colon, brain, melanoma, renal, ovarian, prostate and breast) and DDR1 phosphorylation	
8v	DDR1 > DDR2, BCL-ABL, c-KIT	-Lung: decreased colony formation, proliferation, migration, invasion and DDR1 phosphorylation	
DDR1-IN1	DDR1 > DDR2	-Decreased DDR1 phosphorylation, cell proliferation (colon, breast, lung, uterus, liver). -Prostate: decreased proliferation, cell viability, colony formation, EMT and migration. Increased apoptosis.	
DDR1-IN2	DDR1 > DDR2	Decreased DDR1 phosphorylation, cell proliferation (colon, breast, lung, uterus, liver)	
2.45	DDR1 > DDR2	Decreased DDR1 phosphorylation	
Compound 1	DDR2	Decreased DDR2 phosphorylation and lung cell proliferation.	
WRG-28	DDR2	Breast: decreased migration and invasion.	Decreased breast metastasis to lung

4. Discussion

DDRs are involved in different stages of tumor development and metastasis. No evidence has been observed for their involvement in tumor initiation, but DDR1 and DDR2 play a role in tumor cell proliferation (Figure 1c) and more particularly in TME remodeling (Figure 2a). Both receptors are important for MMP expression, collagen fiber alignment, and immune cell migration and activation, whilst DDR2 is important for CAF activity. They are also associated with tumor angiogenesis and lymphangiogenesis, both processes enabling tumor cell intravasation (Figure 2b). In addition, DDRs are also important in tumor cell migration and invasion. DDR1 is involved in collective migration and, certainly, in individual migration via EMT induction (Figure 2a). After intravasation, no evidence for the involvement of DDRs in the survival of circulating tumor cells was found (Figure 3a). Nevertheless, some collagens and other noncanonical ligands (e.g., C1q) are found in the serum of cancer patients. Furthermore, DDR1 increases cell–cell adhesion; hence, we can hypothesize a role of DDR1 in the adhesion of tumor cells to protective cells such as platelets, CAFs, or immune cells. No direct evidence for the involvement of DDRs in extravasation has been found, although there are clues for roles of DDR1 and DDR2 in extravasation in bone and liver, respectively. The metastatic niche plays a crucial role in the formation of micrometastases (Figure 3c). The role of DDRs in the metastatic niche depends on the metastatic tissue and on the DDR isoform. DDR1, but not DDR2, is important for the formation of the liver niche, whereas DDR2 is necessary for the formation of the lung niche. Only DDR1, in association with TM4SF1, is essential for the development of micrometastases in macrometastases (Figure 3c).

In almost all stages of metastasis, apparently contradictory results have been obtained. Different hypotheses may explain the contrasted effects of DDR1 and DDR2 manipulation on proliferation, EMT, MMP induction, migration, invasion, and metastasis. First, DDR1 activity may depend on the type of cell and of the presence or absence of an interacting protein (such as DARPP-32) [118]. Second, DDR1 and DDR2 activity may be assay-dependent. DDRs induce cell proliferation in a 2D assay; however, in a 3D assay, DDRs inhibit cell proliferation [60]. Third, the activity of DDR1 activities may be isoform-dependent. As mentioned above, DDR1 has five different isoforms, the most commonly studied being DDR1a and DDR1b, although many studies do not mention or distinguish them. In pancreatic cancer, DDR1b is able to upregulate N-cadherin in a collagen-dependent manner. This regulation is due to the interaction between the phosphotyrosine domain of the phosphatase Shc1 (SHC Adaptor Protein 1) and Tyr513, absent in DDR1a or DDR1b [158]. On the other hand, in glioma, DDR1a is able to induce invasion, adhesion, and MMP2 activation [159] and, in NSCLC, DDR1a has a stronger effect in cell migration and invasion than DDR1b [160]. A switch between DDR1 and DDR2 during tumor progression has been demonstrated, but it is not impossible that a switch between the different DDR1 isoforms during tumor progression may exist. These important aspects remain to be elucidated, and this will be important for a better adaptation of treatments in different cancers.

Most of the late metastasis cascade (i.e., blood survival, extravasation, micrometastasis, and macrometastasis) has not been studied individually but as a whole after injection of tumor cells into the bloodstream. It will be interesting to clarify in which step(s) DDRs are involved.

There are not many studies that focused on the analysis of the impact of DDR1 and DDR2 within the same cancer, although, very often, both receptors are expressed. Further studies analyzing the relationship between the two receptors in tumor development are needed.

DDR inhibitors used in cancer treatment, such as dasatinib or nilotinib, are not specific DDR inhibitors. Further in vivo analysis of cancer development during treatment using specific DDR1 or DDR2 inhibitors, such as 7rh, 2.45, or WRG-28, in different cancers are needed.

5. Conclusions

DDR1 and DDR2 are receptors for ECM collagens. They are expressed at the extracellular membrane of tumor cells and of many cells of the TME such as CAFs and immune cells. In many cancers, DDR1 or DDR2 are overexpressed, suggesting a role for DDRs in tumor development and metastasis. They are involved in the proliferation and migration of tumor cells and in the formation of micro- and macrometastases. However, the impact of DDRs in tumor development or metastasis seems to be cancer-dependent and may be explained by the DDR1 isoform expressed or by interaction with other receptors. Further experiments are needed to clarify the activities of DDRs in different cancers. These studies will be facilitated by the development of specific DDR inhibitors that are being characterized in vitro and in vivo.

Author Contributions: S.M. and P.A. wrote, reviewed, and edited the manuscript. Both authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Inserm and University of Bordeaux and from “La Ligue Contre Le Cancer, Region Aquitaine et Charentes” to Patrick Auguste. Sandra Majo was supported by funds from “Region Nouvelle Aquitaine” (2018-1R30223) and by “Fondation Groupama pour la Sante, Groupama Centre Atlantique”. This study was supported by donations from the charity associations Aidons Marina, E.S.CA.P.E., Eva pour la Vie, Les Récoltes de l’Espoir, and Sphères to the MIRCADE team.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: We are grateful to Malak Alannan and Elisabeth Genot for reading the manuscript. We apologize to the authors whose papers were not cited because of space limitations. Figures were generated with images from SMART-Servier medical art (<https://smart.servier.com/>).

Conflicts of Interest: No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

References

1. Auguste, P.; Lemiere, S.; Larrieu-Lahargue, F.; Bikfalvi, A. Molecular Mechanisms of Tumor Vascularization. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *54*, 53–61. [[CrossRef](#)]
2. Fidler, I.J. Timeline—The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The “seed and Soil” Hypothesis Revisited. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 453–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Valastyan, S.; Weinberg, R.A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* **2011**, *147*, 275–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Steinbichler, T.B.; Savic, D.; Dudás, J.; Kvitsaridze, I.; Skvortsov, S.; Riechelmann, H.; Skvortsova, I.-I. Cancer Stem Cells and Their Unique Role in Metastatic Spread. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *60*, 148–156. [[CrossRef](#)]
5. Niland, S.; Eble, J.A. Hold on or Cut? Integrin- and MMP-Mediated Cell-Matrix Interactions in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 238. [[CrossRef](#)]
6. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004978. [[CrossRef](#)]
7. Xu, S.; Xu, H.; Wang, W.; Li, S.; Li, H.; Li, T.; Zhang, W.; Yu, X.; Liu, L. The Role of Collagen in Cancer: From Bench to Bedside. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 309. [[CrossRef](#)]
8. O’Reilly, M.S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W.S.; Flynn, E.; Birkhead, J.R.; Olsen, B.R.; Folkman, J. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* **1997**, *88*, 277–285. [[CrossRef](#)]
9. Iliina, O.; Gritsenko, P.G.; Syga, S.; Lippoldt, J.; La Porta, C.A.M.; Chepizhko, O.; Grosser, S.; Vullings, M.; Bakker, G.-J.; Starruß, J.; et al. Cell–Cell Adhesion and 3D Matrix Confinement Determine Jamming Transitions in Breast Cancer Invasion. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 1103–1115. [[CrossRef](#)]
10. Weigel, B.; Bakker, G.-J.; Friedl, P. Intravital Third Harmonic Generation Microscopy of Collective Melanoma Cell Invasion: Principles of Interface Guidance and Microvesicle Dynamics. *IntraVital* **2012**, *1*, 32–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lorusso, G.; Rueegg, C.; Kuonen, F. Targeting the Extra-Cellular Matrix-Tumor Cell Crosstalk for Anti-Cancer Therapy: Emerging Alternatives to Integrin Inhibitors. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1231. [[CrossRef](#)]
12. Rammal, H.; Saby, C.; Magnien, K.; Van-Gulick, L.; Garnotel, R.; Buache, E.; El Btaouri, H.; Jeannesson, P.; Morjani, H. Corrigendum: Discoidin Domain Receptors: Potential Actors and Targets in Cancer. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Fu, H.-L.; Valiathan, R.R.; Arkwright, R.; Sohail, A.; Mihai, C.; Kumarasiri, M.; Mahasanen, K.V.; Mobashery, S.; Huang, P.; Agarwal, G.; et al. Discoidin Domain Receptors: Unique Receptor Tyrosine Kinases in Collagen-Mediated Signaling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 7430–7437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Han, T.; Mignatti, P.; Abramson, S.B.; Attur, M. Periostin Interaction with Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Promotes Cartilage Degeneration. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0231501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Corcoran, D.S.; Juskaite, V.; Xu, Y.; Gorlitz, F.; Alexandrov, Y.; Dunsby, C.; French, P.M.W.; Leitinger, B. DDR1 Autophosphorylation Is a Result of Aggregation into Dense Clusters. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Juskaite, V.; Corcoran, D.S.; Leitinger, B. Collagen Induces Activation of DDR1 through Lateral Dimer Association and Phosphorylation between Dimers. *eLife* **2017**, *6*, e25716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Leitinger, B. Discoidin Domain Receptor Functions in Physiological and Pathological Conditions. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Jeon, K.W., Ed.; Elsevier Academic Press Inc.: San Diego, CA, USA, 2014; Volume 310, pp. 39–87, ISBN 978-0-12-800180-6.
18. Yeung, D.A.; Shanker, N.; Sohail, A.; Weiss, B.A.; Wang, C.; Wellmerling, J.; Das, S.; Ganju, R.K.; Miller, J.L.C.; Herr, A.B.; et al. Clustering, Spatial Distribution, and Phosphorylation of Discoidin Domain Receptors 1 and 2 in Response to Soluble Collagen I. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 368–390. [[CrossRef](#)]
19. Agarwal, G.; Smith, A.W.; Jones, B. Discoidin Domain Receptors: Micro Insights into Macro Assemblies. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 118496. [[CrossRef](#)]
20. Yang, K.; Kim, J.H.; Kim, H.J.; Park, I.S.; Kim, I.Y.; Yang, B.S. Tyrosine 740 Phosphorylation of Discoidin Domain Receptor 2 by Src Stimulates Intramolecular Autophosphorylation and Shc Signaling Complex Formation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39058–39066. [[CrossRef](#)]
21. Croissant, C.; Tuariihihoa, A.; Bacou, M.; Souleyreau, W.; Sala, M.; Henriët, E.; Bikfalvi, A.; Saltel, F.; Auguste, P. DDR1 and DDR2 Physical Interaction Leads to Signaling Interconnection but with Possible Distinct Functions. *Cell Adhes. Migr.* **2018**, *12*, 324–334. [[CrossRef](#)]
22. Hilton, H.N.; Stanford, P.M.; Harris, J.; Oakes, S.R.; Kaplan, W.; Daly, R.J.; Ormandy, C.J. KIBRA Interacts with Discoidin Domain Receptor 1 to Modulate Collagen-Induced Signalling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2008**, *1783*, 383–393. [[CrossRef](#)]
23. Wasinski, B.; Sohail, A.; Bonfil, R.D.; Kim, S.; Saliganan, A.; Polin, L.; Bouhamdan, M.; Kim, H.-R.C.; Prunotto, M.; Fridman, R. Discoidin Domain Receptors, DDR1b and DDR2, Promote Tumour Growth within Collagen but DDR1b Suppresses Experimental Lung Metastasis in HT1080 Xenografts. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Juin, A.; Di Martino, J.; Leitinger, B.; Henriët, E.; Gary, A.-S.; Paysan, L.; Bomo, J.; Baffet, G.; Gauthier-Rouvière, C.; Rosenbaum, J.; et al. Discoidin Domain Receptor 1 Controls Linear Invadosome Formation via a Cdc42-Tuba Pathway. *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 517–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hidalgo-Carcedo, C.; Hooper, S.; Chaudhry, S.I.; Williamson, P.; Harrington, K.; Leitinger, B.; Sahai, E. Collective Cell Migration Requires Suppression of Actomyosin at Cell–Cell Contacts Mediated by DDR1 and the Cell Polarity Regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 49–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gao, H.; Chakraborty, G.; Zhang, Z.; Akalay, I.; Gadiya, M.; Gao, Y.; Sinha, S.; Hu, J.; Jiang, C.; Akram, M.; et al. Multi-Organ Site Metastatic Reactivation Mediated by Non-Canonical Discoidin Domain Receptor 1 Signaling. *Cell* **2016**, *166*, 47–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wu, E.-H.; Li, H.-S.; Zhao, T.; Fan, J.-D.; Ma, X.; Xiong, L.; Li, W.-J.; Zhu, L.-L.; Fan, M. Effect of Hypoxia on the Gene Profile of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Sheng Li Xue Bao Acta Physiol. Sin.* **2007**, *59*, 227–232.
28. Chen, S.-C.; Wang, B.-W.; Wang, D.L.; Shyu, K.-G. Hypoxia Induces Discoidin Domain Receptor-2 Expression via the P38 Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells to Increase Their Migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *374*, 662–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Li, S.; Zhang, Z.; Xue, J.; Guo, X.; Liang, S.; Liu, A. Effect of Hypoxia on DDR1 Expression in Pituitary Adenomas. *Med. Sci. Monit.* **2015**, *21*, 2433–2438. [[CrossRef](#)]
30. Ren, T.; Zhang, W.; Liu, X.; Zhao, H.; Zhang, J.; Zhang, J.; Li, X.; Zhang, Y.; Bu, X.; Shi, M.; et al. Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) Promotes Breast Cancer Cell Metastasis and the Mechanism Implicates Epithelial-Mesenchymal Transition Programme under Hypoxia. *J. Pathol.* **2014**, *234*, 526–537. [[CrossRef](#)]
31. Koh, M.; Woo, Y.; Valiathan, R.R.; Jung, H.Y.; Park, S.Y.; Kim, Y.N.; Kim, H.-R.C.; Fridman, R.; Moon, A. Discoidin Domain Receptor 1 Is a Novel Transcriptional Target of ZEB1 in Breast Epithelial Cells Undergoing H-Ras-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E508–E520. [[CrossRef](#)]
32. Grither, W.R.; Divine, L.M.; Meller, E.H.; Wilke, D.J.; Desai, R.A.; Loza, A.J.; Zhao, P.; Lohrey, A.; Longmore, G.D.; Fuh, K.C. TWIST1 Induces Expression of Discoidin Domain Receptor 2 to Promote Ovarian Cancer Metastasis. *Oncogene* **2018**, *37*, 1714–1729. [[CrossRef](#)]
33. Wang, Z.; Sun, X.; Bao, Y.; Mo, J.; Du, H.; Hu, J.; Zhang, X. E2F1 Silencing Inhibits Migration and Invasion of Osteosarcoma Cells via Regulating DDR1 Expression. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 1639–1650. [[CrossRef](#)]
34. Ongusaha, P.P.; Kim, J.; Fang, L.; Wong, T.W.; Yancopoulos, G.D.; Aaronson, S.A.; Lee, S.W. P53 Induction and Activation of DDR1 Kinase Counteract P53-Mediated Apoptosis and Influence P53 Regulation through a Positive Feedback Loop. *EMBO J.* **2003**, *22*, 1289–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Lin, Y.; Jin, H.; Wu, X.; Jian, Z.; Zou, X.; Huang, J.; Guan, R.; Wei, X. The Cross-Talk between DDR1 and STAT3 Promotes the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Aging* **2020**, *12*, 14391–14405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lin, K.-L.; Chou, C.-H.; Hsieh, S.-C.; Hwa, S.-Y.; Lee, M.-T.; Wang, F.-F. Transcriptional Upregulation of DDR2 by ATF4 Facilitates Osteoblastic Differentiation through P38 MAPK-Mediated Runx2 Activation. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 2489–2503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. George, M.; Vijayakumar, A.; Dhanesh, S.B.; James, J.; Shivakumar, K. Molecular Basis and Functional Significance of Angiotensin II-Induced Increase in Discoidin Domain Receptor 2 Gene Expression in Cardiac Fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *90*, 59–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lim, J.; Ehsanipour, A.; Hsu, J.J.; Lu, J.; Pedego, T.; Wu, A.; Walthers, C.M.; Demer, L.L.; Seidlits, S.K.; Tintut, Y. Inflammation Drives Retraction, Stiffening, and Nodule Formation via Cytoskeletal Machinery in a Three-Dimensional Culture Model of Aortic Stenosis. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 2378–2389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ezzoukhray, Z.; Henriët, E.; Piquet, L.; Boyé, K.; Bioulac-Sage, P.; Balabaud, C.; Couchy, G.; Zucman-Rossi, J.; Moreau, V.; Saltel, F. TGF- β 1 Promotes Linear Invadosome Formation in Hepatocellular Carcinoma Cells, through DDR1 up-Regulation and Collagen I Cross-Linking. *Eur. J. Cell Biol.* **2016**, *95*, 503–512. [[CrossRef](#)]
40. Ruiz, P.A.; Jarai, G. Collagen I Induces Discoidin Domain Receptor (DDR) 1 Expression through DDR2 and a JAK2-ERK1/2-Mediated Mechanism in Primary Human Lung Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 12912–12923. [[CrossRef](#)]
41. Krazinski, B.E.; Kiewisz, J.; Sliwinska-Jewsiewicka, A.; Kowalczyk, A.E.; Grzegorzolka, J.; Godlewski, J.; Kwiatkowski, P.; Dziegiel, P.; Kmiec, Z. Altered Expression of DDR1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Correlates With MiR-199a/b-5p and Patients' Outcome. *Cancer Genom. Proteom.* **2019**, *16*, 179–193. [[CrossRef](#)]
42. Chou, S.-T.; Peng, H.-Y.; Mo, K.-C.; Hsu, Y.-M.; Wu, G.-H.; Hsiao, J.-R.; Lin, S.-F.; Wang, H.-D.; Shiah, S.-G. MicroRNA-486-3p Functions as a Tumor Suppressor in Oral Cancer by Targeting DDR1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 281. [[CrossRef](#)]
43. Deng, L.; Liu, G.; Zheng, C.; Zhang, L.; Kang, Y.; Yang, F. Circ-LAMP1 Promotes T-Cell Lymphoblastic Lymphoma Progression via Acting as a CeRNA for MiR-615-5p to Regulate DDR2 Expression. *Gene* **2019**, *701*, 146–151. [[CrossRef](#)]
44. Ramasamy, R.; Ridgeway, A.; Lipshultz, L.I.; Lamb, D.J. Integrative DNA Methylation and Gene Expression Analysis Identifies Discoidin Domain Receptor 1 Association with Idiopathic Nonobstructive Azoospermia. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 968–973.e3. [[CrossRef](#)]
45. Chung, V.Y.; Tan, T.Z.; Huang, R.-L.; Lai, H.-C.; Huang, R.Y.-J. Loss of Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) via CpG Methylation during EMT in Epithelial Ovarian Cancer. *Gene* **2017**, *635*, 9–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nelson, H.H.; Marsit, C.J.; Christensen, B.C.; Houseman, E.A.; Kontic, M.; Wiemels, J.L.; Karagas, M.R.; Wrensch, M.R.; Zheng, S.; Wiencke, J.K.; et al. Key Epigenetic Changes Associated with Lung Cancer Development. *Epigenetics* **2012**, *7*, 559–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Vogel, W.F. Ligand-Induced Shedding of Discoidin Domain Receptor 1. *FEBS Lett.* **2002**, *514*, 175–180. [[CrossRef](#)]
48. Shitomi, Y.; Thogersen, I.B.; Ito, N.; Leitinger, B.; Enghild, J.J.; Itoh, Y. ADAM10 Controls Collagen Signaling and Cell Migration on Collagen by Shedding the Ectodomain of Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1). *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 659–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ambrogio, C.; Gómez-López, G.; Falcone, M.; Vidal, A.; Nadal, E.; Crosetto, N.; Blasco, R.B.; Fernández-Marcos, P.J.; Sánchez-Céspedes, M.; Ren, X.; et al. Combined Inhibition of DDR1 and Notch Signaling Is a Therapeutic Strategy for KRAS-Driven Lung Adenocarcinoma. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 270–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hur, H.; Ham, I.-H.; Lee, D.; Jin, H.; Aguilera, K.Y.; Oh, H.J.; Han, S.-U.; Kwon, J.E.; Kim, Y.-B.; Ding, K.; et al. Discoidin Domain Receptor 1 Activity Drives an Aggressive Phenotype in Gastric Carcinoma. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Azemikhah, M.; Ashtiani, H.A.; Aghaei, M.; Rastegar, H. Evaluation of Discoidin Domain Receptor-2 (DDR2) Expression Level in Normal, Benign, and Malignant Human Prostate Tissues. *Res. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 356–363. [[PubMed](#)]
52. Cader, F.Z.; Vockerodt, M.; Bose, S.; Nagy, E.; Brundler, M.-A.; Kearns, P.; Murray, P.G. The EBV Oncogene LMP1 Protects Lymphoma Cells from Cell Death through the Collagen-Mediated Activation of DDR. *Blood* **2013**, *122*, 10. [[CrossRef](#)]
53. Shimada, K.; Nakamura, M.; Ishida, E.; Higuchi, T.; Yamamoto, H.; Tsujikawa, K.; Konishi, N. Prostate Cancer Antigen-1 Contributes to Cell Survival and Invasion Through Discoidin Receptor 1 in Human Prostate Cancer. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 39–45. [[CrossRef](#)]
54. Villalba, M.; Redin, E.; Exposito, F.; Pajares, M.J.; Sainz, C.; Hervas, D.; Guruceaga, E.; Diaz-Lagares, A.; Cirauqui, C.; Redrado, M.; et al. Identification of a Novel Synthetic Lethal Vulnerability in Non-Small Cell Lung Cancer by Co-Targeting TMPRSS4 and DDR1. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ruggeri, J.M.; Franco-Barraza, J.; Sohail, A.; Zhang, Y.; Long, D.; Pasca di Magliano, M.; Cukierman, E.; Fridman, R.; Crawford, H.C. Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Is Necessary for Tissue Homeostasis in Pancreatic Injury and Pathogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **2020**, *190*, 1735–1751. [[CrossRef](#)]
56. Rudra-Ganguly, N.; Lowe, C.; Mattie, M.; Chang, M.S.; Satpayev, D.; Verlinsky, A.; An, Z.; Hu, L.; Yang, P.; Challita-Eid, P.; et al. Discoidin Domain Receptor 1 Contributes to Tumorigenesis through Modulation of TGF β 1 Expression. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Gao, M.; Duan, L.; Luo, J.; Zhang, L.; Lu, X.; Zhang, Y.; Zhang, Z.; Tu, Z.; Xu, Y.; Ren, X.; et al. Discovery and Optimization of 3-(2-(Pyrazolo[1,5-*a*]Pyrimidin-6-Yl)Ethylnyl)Benzamides as Novel Selective and Orally Bioavailable Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3281–3295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Wu, A.; Chen, Y.; Liu, Y.; Lai, Y.; Liu, D. MiR-199b-5p Inhibits Triple Negative Breast Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion by Targeting DDR1. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 4889–4896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Assent, D.; Bourgot, I.; Hennuy, B.; Geurts, P.; Noel, A.; Foidart, J.-M.; Maquoi, E. A Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP)—Discoidin Domain Receptor 1 Axis Regulates Collagen-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0116006. [[CrossRef](#)]
60. Saby, C.; Collin, G.; Sinane, M.; Buache, E.; Van Gulick, L.; Saltel, F.; Maquoi, E.; Morjani, H. DDR1 and MT1-MMP Expression Levels Are Determinant for Triggering BIK-Mediated Apoptosis by 3D Type I Collagen Matrix in Invasive Basal-Like Breast Carcinoma Cells. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 462. [[CrossRef](#)]
61. Appert-Collin, A. LRP-1 Promotes Colon Cancer Cell Proliferation in 3D Collagen Matrices by Mediating DDR1 Endocytosis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 15.
62. Badiola, I.; Villacé, P.; Basaldua, I.; Olaso, E. Downregulation of Discoidin Domain Receptor 2 in A375 Human Melanoma Cells Reduces Its Experimental Liver Metastasis Ability. *Oncol. Rep.* **2011**, *26*, 971–978.
63. Sun, M.; Shen, Z. Knockdown of Long Non-Coding RNA (LncRNA) Colon Cancer-Associated Transcript-1 (CCAT1) Suppresses Oral Squamous Cell Carcinoma Proliferation, Invasion, and Migration by Inhibiting the Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2)/ERK/AKT Axis. *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, e920020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kurashige, J.; Hasegawa, T.; Niida, A.; Sugimachi, K.; Deng, N.; Mima, K.; Uchi, R.; Sawada, G.; Takahashi, Y.; Eguchi, H.; et al. Integrated Molecular Profiling of Human Gastric Cancer Identifies DDR2 as a Potential Regulator of Peritoneal Dissemination. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Park, J.-W.; Lee, Y.-S.; Kim, J.S.; Lee, S.-K.; Kim, B.H.; Lee, J.A.; Lee, N.O.; Kim, S.H.; Hong, E.K. Downregulation of Discoidin Domain Receptor 2 Decreases Tumor Growth of Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2015**, *141*, 1973–1983. [[CrossRef](#)]
66. Kim, D.; You, E.; Jeong, J.; Ko, P.; Kim, J.-W.; Rhee, S. DDR2 Controls the Epithelial-Mesenchymal-Transition-Related Gene Expression via c-Myb Acetylation upon Matrix Stiffening. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Wang, Y.-G.; Xu, L.; Jia, R.-R.; Wu, Q.; Wang, T.; Wei, J.; Ma, J.-L.; Shi, M.; Li, Z.-S. DDR2 Induces Gastric Cancer Cell Activities via Activating MTORC2 Signaling and Is Associated with Clinicopathological Characteristics of Gastric Cancer. *Dig. Dis. Sci.* **2016**, *61*, 2272–2283. [[CrossRef](#)]
68. Wall, S.J.; Werner, E.; Werb, Z.; DeClerck, Y.A. Discoidin Domain Receptor 2 Mediates Tumor Cell Cycle Arrest Induced by Fibrillar Collagen. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40187–40194. [[CrossRef](#)]
69. Terashima, M.; Togashi, Y.; Sato, K.; Mizuuchi, H.; Sakai, K.; Suda, K.; Nakamura, Y.; Banno, E.; Hayashi, H.; De Velasco, M.A.; et al. Functional Analyses of Mutations in Receptor Tyrosine Kinase Genes in Non-Small Cell Lung Cancer: Double-Edged Sword of DDR2. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3663–3671. [[CrossRef](#)]
70. Lee, M.-S.; Jung, E.A.; An, S.B.; Kim, Y.J.; Oh, D.-Y.; Song, J.-Y.; Um, S.-W.; Han, J.; Choi, Y.-L. Prevalence of Mutations in Discoidin Domain-Containing Receptor Tyrosine Kinase 2 (DDR2) in Squamous Cell Lung Cancers in Korean Patients. *Cancer Res. Treat.* **2017**, *49*, 1065–1076. [[CrossRef](#)]
71. Saby, C.; Rammal, H.; Magnien, K.; Buache, E.; Brassart-Pasco, S.; Van-Gulick, L.; Jeannesson, P.; Maquoi, E.; Morjani, H. Age-Related Modifications of Type I Collagen Impair DDR1-Induced Apoptosis in Non-Invasive Breast Carcinoma Cells. *Cell Adhes. Migr.* **2018**, *12*, 335–347. [[CrossRef](#)]
72. Jin, H.; Ham, I.-H.; Oh, H.J.; Bae, C.A.; Lee, D.; Kim, Y.-B.; Son, S.-Y.; Chwae, Y.-J.; Han, S.-U.; Brekken, R.A.; et al. Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Prevents Stroma-Induced Peritoneal Metastasis in Gastric Carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 1590–1600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Saby, C.; Buache, E.; Brassart-Pasco, S.; El Btaouri, H.; Courageot, M.-P.; Van Gulick, L.; Garnotel, R.; Jeannesson, P.; Morjani, H. Type I Collagen Aging Impairs Discoidin Domain Receptor 2-Mediated Tumor Cell Growth Suppression. *Oncotarget* **2016**, *7*, 24908–24927. [[CrossRef](#)]
74. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Azreq, M.-A.E.; Kadiri, M.; Boisvert, M.; Pagé, N.; Tessier, P.A.; Aoudjit, F. Discoidin Domain Receptor 1 Promotes Th17 Cell Migration by Activating the RhoA/ROCK/MAPK/ERK Signaling Pathway. *Oncotarget* **2016**, *7*, 44975–44990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Kadiri, M.; El Azreq, M.-A.; Berrazouane, S.; Boisvert, M.; Aoudjit, F. Human Th17 Migration in Three-Dimensional Collagen Involves P38 MAPK: Th17 MIGRATION REQUIRES P38. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 2819–2827. [[CrossRef](#)]
77. Zhong, X.; Zhang, W.; Sun, T. DDR1 Promotes Breast Tumor Growth by Suppressing Antitumor Immunity. *Oncol. Rep.* **2019**, *42*, 2844–2854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Lee, J.-E.; Kang, C.-S.; Guan, X.-Y.; Kim, B.-T.; Kim, S.-H.; Lee, Y.-M.; Moon, W.-S.; Kim, D.-K. Discoidin Domain Receptor 2 Is Involved in the Activation of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Caused by Type I Collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *352*, 244–250. [[CrossRef](#)]
79. Afonso, P.V.; McCann, C.P.; Kapnick, S.M.; Parent, C.A. Discoidin Domain Receptor 2 Regulates Neutrophil Chemotaxis in 3D Collagen Matrices. *Blood* **2013**, *121*, 1644–1650. [[CrossRef](#)]
80. Sidles, S.J.; Xiong, Y.; Young, M.R.I.; LaRue, A.C. High-Fat Diet Alters Immunogenic Properties of Circulating and Adipose Tissue-Associated Myeloid-Derived CD45⁺ DDR2⁺ Cells. *Mediat. Inflamm.* **2019**, *2019*, 1–15. [[CrossRef](#)]

81. Chang, J.; Chaudhuri, O. Beyond Proteases: Basement Membrane Mechanics and Cancer Invasion. *J. Cell Biol.* **2019**, *218*, 2456–2469. [[CrossRef](#)]
82. Valencia, K.; Ormazabal, C.; Zanduetta, C.; Luis-Ravelo, D.; Anton, I.; Pajares, M.J.; Agorreta, J.; Montuenga, L.M.; Martinez-Canarias, S.; Leitinger, B.; et al. Inhibition of Collagen Receptor Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Reduces Cell Survival, Homing, and Colonization in Lung Cancer Bone Metastasis. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 969–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Yoshida, D.; Teramoto, A. Enhancement of Pituitary Adenoma Cell Invasion and Adhesion Is Mediated by Discoidin Domain Receptor-1. *J. Neurooncol.* **2007**, *82*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hu, Y.; Liu, J.; Jiang, B.; Chen, J.; Fu, Z.; Bai, F.; Jiang, J.; Tang, Z. MiR-199a-5p Loss Up-Regulated DDR1 Aggravated Colorectal Cancer by Activating Epithelial-to-Mesenchymal Transition Related Signaling. *Dig. Dis. Sci.* **2014**, *59*, 2163–2172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Song, J.; Chen, X.; Bai, J.; Liu, Q.; Li, H.; Xie, J.; Jing, H.; Zheng, J. Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), a Promising Biomarker, Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Cancer Cells. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 11509–11521. [[CrossRef](#)]
86. Yang, J.; Zhang, Y.; He, S.; Li, M.; Cai, X.; Wang, H.; Xu, L.; Cao, J. TM4SF1 Promotes Metastasis of Pancreatic Cancer via Regulating the Expression of DDR1. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45895. [[CrossRef](#)]
87. Lee, J.-H.; Poudel, B.; Ki, H.-H.; Nepali, S.; Lee, Y.-M.; Shin, J.-S.; Kim, D.-K. Complement C1q Stimulates the Progression of Hepatocellular Tumor through the Activation of Discoidin Domain Receptor 1. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4908. [[CrossRef](#)]
88. Bulla, R.; Tripodo, C.; Rami, D.; Ling, G.S.; Agostinis, C.; Guarnotta, C.; Zorzet, S.; Durigutto, P.; Botto, M.; Tedesco, F. C1q Acts in the Tumour Microenvironment as a Cancer-Promoting Factor Independently of Complement Activation. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10346. [[CrossRef](#)]
89. Xie, B.; Lin, W.; Ye, J.; Wang, X.; Zhang, B.; Xiong, S.; Li, H.; Tan, G. DDR2 Facilitates Hepatocellular Carcinoma Invasion and Metastasis via Activating ERK Signaling and Stabilizing SNAIL1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*, 101. [[CrossRef](#)]
90. Zhang, K.; Corsa, C.A.; Ponik, S.M.; Prior, J.L.; Piwnicka-Worms, D.; Eliceiri, K.W.; Keely, P.J.; Longmore, G.D. The Collagen Receptor Discoidin Domain Receptor 2 Stabilizes SNAIL1 to Facilitate Breast Cancer Metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 677–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Majkowska, I.; Shitomi, Y.; Ito, N.; Gray, N.S.; Itoh, Y. Discoidin Domain Receptor 2 Mediates Collagen-Induced Activation of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase in Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 6633–6643. [[CrossRef](#)]
92. Genot, E.; Gligorijevic, B. Invadosomes in Their Natural Habitat. *Eur. J. Cell Biol.* **2014**, *93*, 367–379. [[CrossRef](#)]
93. Hammoud, A.A.; Marais, S.; Allain, N.; Ezzoukhry, Z.; Moreau, V.; Saltel, F. DDR2 Induces Linear Invadosome to Promote Angiogenesis in a Fibrillar Type I Collagen Context. *Cell Biol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
94. Conklin, M.W.; Eickhoff, J.C.; Riching, K.M.; Pehlke, C.A.; Eliceiri, K.W.; Provenzano, P.P.; Friedl, A.; Keely, P.J. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 1221–1232. [[CrossRef](#)]
95. Provenzano, P.P.; Eliceiri, K.W.; Campbell, J.M.; Inman, D.R.; White, J.G.; Keely, P.J. Collagen Reorganization at the Tumor-Stromal Interface Facilitates Local Invasion. *BMC Med.* **2006**, *4*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Coelho, N.M.; Arora, P.D.; van Putten, S.; Boo, S.; Petrovic, P.; Lin, A.X.; Hinz, B.; McCulloch, C.A. Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1774–1790. [[CrossRef](#)]
97. Bayer, S.V.; Grither, W.R.; Brenot, A.; Hwang, P.Y.; Barcus, C.E.; Ernst, M.; Pence, P.; Walter, C.; Pathak, A.; Longmore, G.D. DDR2 Controls Breast Tumor Stiffness and Metastasis by Regulating Integrin Mediated Mechanotransduction in CAFs. *eLife* **2019**, *8*, e45508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Slocum, E.; Craig, A.; Villanueva, A.; Germain, D. Parity Predisposes Breasts to the Oncogenic Action of PAPP-A and Activation of the Collagen Receptor DDR2. *Breast Cancer Res.* **2019**, *21*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Gonzalez, M.E.; Martin, E.E.; Anwar, T.; Arellano-Garcia, C.; Medhora, N.; Lama, A.; Chen, Y.-C.; Tanager, K.S.; Yoon, E.; Kidwell, K.M.; et al. Mesenchymal Stem Cell-Induced DDR2 Mediates Stromal-Breast Cancer Interactions and Metastasis Growth. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1215–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Zhang, Y.; Weinberg, R.A. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer: Complexity and Opportunities. *Front. Med.* **2018**, *12*, 361–373. [[CrossRef](#)]
101. Azizi, R.; Salemi, Z.; Fallahian, F.; Aghaei, M. Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Reduces Epithelial–Mesenchymal Transition and Induce Cell-cycle Arrest and Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 19539–19552. [[CrossRef](#)]
102. Xie, R.; Wang, X.; Qi, G.; Wu, Z.; Wei, R.; Li, P.; Zhang, D. DDR1 Enhances Invasion and Metastasis of Gastric Cancer via Epithelial-Mesenchymal Transition. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 12049–12059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Jiang, X.; Jiang, M.; Guo, S.; Cai, P.; Wang, W.; Li, Y. Promotion of MiR-221-5p on the Sensitivity of Gastric Cancer Cells to Cisplatin and Its Effects on Cell Proliferation and Apoptosis by Regulating DDR1. *OTT* **2020**, *13*, 2333–2345. [[CrossRef](#)]
104. Kim, S.; Lee, S.; Lee, E.; Lim, H.; Shin, J.; Jung, J.; Kim, S.; Moon, A. Sex-biased Differences in the Correlation between Epithelial-to-mesenchymal Transition-associated Genes in Cancer Cell Lines. *Oncol. Lett.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Takai, K.; Drain, A.P.; Lawson, D.A.; Littlepage, L.E.; Karpuij, M.; Kessenbrock, K.; Le, A.; Inoue, K.; Weaver, V.M.; Werb, Z. Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Ablation Promotes Tissue Fibrosis and Hypoxia to Induce Aggressive Basal-like Breast Cancers. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 244–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

106. Maeyama, M.; Koga, H.; Selvendiran, K.; Yanagimoto, C.; Hanada, S.; Taniguchi, E.; Kawaguchi, T.; Harada, M.; Ueno, T.; Sata, M. Switching in Discoidin Domain Receptor Expressions in SLUG-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer* **2008**, *113*, 2823–2831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Liang, Z.; Xie, W.; Zhao, M.; Cheng, G.; Wu, M. DDR2 Facilitates Papillary Thyroid Carcinoma Epithelial Mesenchymal Transition by Activating ERK2/Snail1 Pathway. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 8114–8121. [[CrossRef](#)]
108. Friedl, P.; Wolf, K. Plasticity of Cell Migration: A Multiscale Tuning Model. *J. Cell. Biol.* **2010**, *188*, 11–19. [[CrossRef](#)]
109. Dejmeek, J.; Dib, K.; Jonsson, M.; Andersson, T. Wnt-5a and G-Protein Signaling Are Required for Collagen-Induced DDR1 Receptor Activation and Normal Mammary Cell Adhesion. *Int. J. Cancer* **2003**, *103*, 344–351. [[CrossRef](#)]
110. Romayor, I.; Badiola, I.; Olaso, E. Inhibition of DDR1 Reduces Invasive Features of Human A375 Melanoma, HT29 Colon Carcinoma and SK-HEP Hepatoma Cells. *Cell Adhes. Migr.* **2020**, *14*, 69–81. [[CrossRef](#)]
111. Yan, Z.; Jin, S.; Wei, Z.; Huilian, H.; Zhanhai, Y.; Yue, T.; Juan, L.; Jing, L.; Libo, Y.; Xu, L. Discoidin Domain Receptor 2 Facilitates Prostate Cancer Bone Metastasis via Regulating Parathyroid Hormone-Related Protein. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 1350–1363. [[CrossRef](#)]
112. Chen, Y.-L.; Tsai, W.-H.; Ko, Y.-C.; Lai, T.-Y.; Cheng, A.-J.; Shiah, S.-G.; Hsiao, J.-R.; Chang, J.-Y.; Lin, S.-F. Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Is Involved in Angiolymphatic Invasion in Oral Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 841. [[CrossRef](#)]
113. Castro-Sanchez, L.; Soto-Guzman, A.; Navarro-Tito, N.; Martinez-Orozco, R.; Salazar, E.P. Native Type IV Collagen Induces Cell Migration through a CD9 and DDR1-Dependent Pathway in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 843–852. [[CrossRef](#)]
114. Chow, C.R.; Ebine, K.; Knab, L.M.; Bentrem, D.J.; Kumar, K.; Munshi, H.G. Cancer Cell Invasion in Three-Dimensional Collagen Is Regulated Differentially by α_{13} Protein and Discoidin Domain Receptor 1-Par3 Protein Signaling. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 1605–1618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Poudel, B.; Lee, Y.-M.; Kim, D.-K. DDR2 Inhibition Reduces Migration and Invasion of Murine Metastatic Melanoma Cells by Suppressing MMP2/9 Expression through ERK/NF- κ B Pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2015**, *47*, 292–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Xu, J.; Lu, W.; Zhang, S.; Zhu, C.; Ren, T.; Zhu, T.; Zhao, H.; Liu, Y.; Su, J. Overexpression of DDR2 Contributes to Cell Invasion and Migration in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **2014**, *15*, 612–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Grither, W.R.; Longmore, G.D. Inhibition of Tumor-Microenvironment Interaction and Tumor Invasion by Small-Molecule Allosteric Inhibitor of DDR2 Extracellular Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E7786–E7794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Hansen, C.; Greengard, P.; Nairn, A.C.; Andersson, T.; Vogel, W.F. Phosphorylation of DARPP-32 Regulates Breast Cancer Cell Migration Downstream of the Receptor Tyrosine Kinase DDR1. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 4011–4018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Yuge, R.; Kitadai, Y.; Takigawa, H.; Naito, T.; Oue, N.; Yasui, W.; Tanaka, S.; Chayama, K. Silencing of Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Concurrently Inhibits Multiple Steps of Metastasis Cascade in Gastric Cancer. *Transl. Oncol.* **2018**, *11*, 575–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Chen, L.; Zhi, Z.; Wang, L.; Zhao, Y.; Deng, M.; Liu, Y.; Qin, Y.; Tian, M.; Liu, Y.; Shen, T.; et al. NSD2 Circular RNA Promotes Metastasis of Colorectal Cancer by Targeting MiR-199b-5p-mediated DDR1 and JAG1 Signalling. *J. Pathol.* **2019**, *248*, 103–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Larriue-Lahargue, F.; Welm, A.L.; Bouche-careilh, M.; Alitalo, K.; Li, D.Y.; Bikfalvi, A.; Auguste, P. Blocking Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Inhibits Tumor Growth, Lymphangiogenesis, and Metastasis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Xiao, Q.; Jiang, Y.; Liu, Q.; Yue, J.; Liu, C.; Zhao, X.; Qiao, Y.; Ji, H.; Chen, J.; Ge, G. Minor Type IV Collagen A5 Chain Promotes Cancer Progression through Discoidin Domain Receptor-1. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Oh, S.; Seo, M.; Choi, J.-S.; Joo, C.-K.; Lee, S.K. MiR-199a/b-5p Inhibits Lymphangiogenesis by Targeting Discoidin Domain Receptor 1 in Corneal Injury. *Mol. Cells* **2018**, *41*, 93–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Zhang, S.; Bu, X.; Zhao, H.; Yu, J.; Wang, Y.; Li, D.; Zhu, C.; Zhu, T.; Ren, T.; Liu, X.; et al. A Host Deficiency of Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) Inhibits Both Tumour Angiogenesis and Metastasis: DDR2 Regulates Endothelial Function and Tumour Angiogenesis. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 436–448. [[CrossRef](#)]
125. Lee, N.O.; Park, J.-W.; Lee, J.A.; Shim, J.H.; Kong, S.-Y.; Kim, K.T.; Lee, Y.-S. Dual Action of a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Hepatocellular Carcinoma Cells: Novel Involvement of Discoidin Domain Receptor 2. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2012**, *138*, 73–84. [[CrossRef](#)]
126. Romayor, I.; Badiola, I.; Benedicto, A.; Marquez, J.; Herrero, A.; Arteta, B.; Olaso, E. Silencing of Sinusoidal DDR1 Reduces Murine Liver Metastasis by Colon Carcinoma. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Badiola, I.; Olaso, E.; Crende, O.; Friedman, S.L.; Vidal-Vanaclocha, F. Discoidin Domain Receptor 2 Deficiency Predisposes Hepatic Tissue to Colon Carcinoma Metastasis. *Gut* **2012**, *61*, 1465–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Kinoshita, J.; Fushida, S.; Harada, S.; Makino, I.; Nakamura, K.; Oyama, K.; Fujita, H.; Ninomiya, I.; Fujimura, T.; Kayahara, M.; et al. Type IV Collagen Levels Are Elevated in the Serum of Patients with Peritoneal Dissemination of Gastric Cancer. *Oncol. Lett.* **2010**, *1*, 989–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Xiong, G.; Chen, J.; Zhang, G.; Wang, S.; Kawasaki, K.; Zhu, J.; Zhang, Y.; Nagata, K.; Li, Z.; Zhou, B.P.; et al. Hsp47 Promotes Cancer Metastasis by Enhancing Collagen-Dependent Cancer Cell-Platelet Interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 3748–3758. [[CrossRef](#)]

130. Ye, L.; Pu, C.; Tang, J.; Wang, Y.; Wang, C.; Qiu, Z.; Xiang, T.; Zhang, Y.; Peng, W. Transmembrane-4 L-Six Family Member-1 (TM4SF1) Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Proliferation, Invasion and Chemo-Resistance through Regulating the DDR1/Akt/ERK-MTOR Axis. *Respir. Res.* **2019**, *20*, 106. [[CrossRef](#)]
131. Jia, S.; Agarwal, M.; Yang, J.; Horowitz, J.C.; White, E.S.; Kim, K.K. Discoidin Domain Receptor 2 Signaling Regulates Fibroblast Apoptosis through PDK1/Akt. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, *59*, 295–305. [[CrossRef](#)]
132. Matà, R.; Palladino, C.; Nicolosi, M.L.; Presti, A.R.L.; Malaguarnera, R.; Ragusa, M.; Sciortino, D.; Morrione, A.; Maggiolini, M.; Vella, V.; et al. IGF-I Induces Upregulation of DDR1 Collagen Receptor in Breast Cancer Cells by Suppressing MIR-199a-5p through the PI3K/AKT Pathway. *Oncotarget* **2016**, *7*, 7683–7700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Vella, V.; Malaguarnera, R.; Nicolosi, M.L.; Palladino, C.; Spoletti, C.; Massimino, M.; Vigneri, P.; Purrello, M.; Ragusa, M.; Morrione, A.; et al. Discoidin Domain Receptor 1 Modulates Insulin Receptor Signaling and Biological Responses in Breast Cancer Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 43248–43270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Vella, V.; Nicolosi, M.L.; Cantafio, P.; Massimino, M.; Lappano, R.; Vigneri, P.; Ciuni, R.; Gangemi, P.; Morrione, A.; Malaguarnera, R.; et al. DDR1 Regulates Thyroid Cancer Cell Differentiation via IGF-2/IR-A Autocrine Signaling Loop. *Endocr.-Relat. Cancer* **2019**, *26*, 197–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Buraschi, S.; Morcavallo, A.; Neill, T.; Stefanello, M.; Palladino, C.; Xu, S.-Q.; Belfiore, A.; Iozzo, R.V.; Morrione, A. Discoidin Domain Receptor 1 Functionally Interacts with the IGF-I System in Bladder Cancer. *Matrix Biol. Plus* **2020**, *6–7*, 100022. [[CrossRef](#)]
136. Avino, S.; Marco, P.D.; Cirillo, F.; Santolla, M.F.; Francesco, E.M.D.; Perri, M.G.; Rigracciolo, D.; Dolce, V.; Belfiore, A.; Maggiolini, M.; et al. Stimulatory Actions of IGF-I Are Mediated by IGF-IR Cross-Talk with GPER and DDR1 in Mesothelioma and Lung Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 52710–52728. [[CrossRef](#)]
137. Morcavallo, A.; Gaspari, M.; Pandini, G.; Palumbo, A.; Cuda, G.; Larsen, M.R.; Vigneri, R.; Belfiore, A. Research Resource: New and Diverse Substrates for the Insulin Receptor Isoform A Revealed by Quantitative Proteomics After Stimulation With IGF-II or Insulin. *Mol. Endocrinol.* **2011**, *25*, 1456–1468. [[CrossRef](#)]
138. Vella, V.; Malaguarnera, R.; Nicolosi, M.L.; Morrione, A.; Belfiore, A. Insulin/IGF Signaling and Discoidin Domain Receptors: An Emerging Functional Connection. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 118522. [[CrossRef](#)]
139. Day, E.; Waters, B.; Spiegel, K.; Alnadaf, T.; Manley, P.W.; Buchdunger, E.; Walker, C.; Jarai, G. Inhibition of Collagen-Induced Discoidin Domain Receptor 1 and 2 Activation by Imatinib, Nilotinib and Dasatinib. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *599*, 44–53. [[CrossRef](#)]
140. Montenegro, R.C.; Howarth, A.; Ceroni, A.; Fedele, V.; Farran, B.; Mesquita, F.P.; Frejno, M.; Berger, B.-T.; Heinzlmeier, S.; Sailem, H.Z.; et al. Identification of Molecular Targets for the Targeted Treatment of Gastric Cancer Using Dasatinib. *Oncotarget* **2020**, *11*, 535–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. von Maessenhausen, A.; Sanders, C.; Braegelmann, J.; Konantz, M.; Queisser, A.; Vogel, W.; Kristiansen, G.; Duensing, S.; Schroeck, A.; Bootz, F.; et al. Targeting DDR2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Dasatinib. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 2359–2369. [[CrossRef](#)]
142. Gajdosik, Z. Sitravatinib Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment of Solid Tumors. *Drug Future* **2018**, *43*, 181–187. [[CrossRef](#)]
143. Aguilera, K.Y.; Huang, H.; Du, W.; Hagopian, M.M.; Wang, Z.; Hinz, S.; Hwang, T.H.; Wang, H.; Fleming, J.B.; Castrillon, D.H.; et al. Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Reduces Collagen-Mediated Tumorigenicity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 2473–2485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Nokin, M.-J.; Darbo, E.; Travert, C.; Drogat, B.; Lacouture, A.; San José, S.; Cabrera, N.; Turcq, B.; Prouzet-Mauleon, V.; Falcone, M.; et al. Inhibition of DDR1 Enhances in Vivo Chemosensitivity in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *JCI Insight* **2020**, *5*, e137869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Elkamhawy, A.; Park, J.-E.; Cho, N.-C.; Sim, T.; Pae, A.N.; Roh, E.J. Discovery of a Broad Spectrum Antiproliferative Agent with Selectivity for DDR1 Kinase: Cell Line-Based Assay, Kinase Panel, Molecular Docking, and Toxicity Studies. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 158–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Mo, C.; Zhang, Z.; Li, Y.; Huang, M.; Zou, J.; Luo, J.; Tu, Z.-C.; Xu, Y.; Ren, X.; Ding, K.; et al. Design and Optimization of 3'-(Imidazo[1,2-a]Pyrazin-3-Yl)-[1,1'-Biphenyl]-3-Carboxamides as Selective DDR1 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 379–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Kim, H.-G.; Tan, L.; Weisberg, E.L.; Liu, F.; Canning, P.; Choi, H.G.; Ezell, S.A.; Wu, H.; Zhao, Z.; Wang, J.; et al. Discovery of a Potent and Selective DDR1 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2145–2150. [[CrossRef](#)]
148. Richter, H.; Satz, A.L.; Bedoucha, M.; Buettelmann, B.; Petersen, A.C.; Harmeyer, A.; Hermosilla, R.; Hochstrasser, R.; Burger, D.; Gsell, B.; et al. DNA-Encoded Library-Derived DDR1 Inhibitor Prevents Fibrosis and Renal Function Loss in a Genetic Mouse Model of Alport Syndrome. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 37–49. [[CrossRef](#)]
149. Siddiqui, K.; Kim, G.W.; Lee, D.H.; Shin, H.R.; Yang, E.G.; Lee, N.T.; Yang, B.-S. Actinomycin D Identified as an Inhibitor of Discoidin Domain Receptor 2 Interaction with Collagen through an Insect Cell Based Screening of a Drug Compound Library. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 136–141. [[CrossRef](#)]
150. Terai, H.; Tan, L.; Beauchamp, E.M.; Hatcher, J.M.; Liu, Q.; Meyerson, M.; Gray, N.S.; Hammerman, P.S. Characterization of DDR2 Inhibitors for the Treatment of DDR2 Mutated Nonsmall Cell Lung Cancer. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)]
151. Baltes, F.; Caspers, J.; Henze, S.; Schlesinger, M.; Bendas, G. Targeting Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Signaling and Its Crosstalk with B1-Integrin Emerges as a Key Factor for Breast Cancer Chemosensitization upon Collagen Type 1 Binding. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*. [[CrossRef](#)]

152. Vehlow, A.; Cordes, N. DDR1 (Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1) Drives Glioblastoma Therapy Resistance by Modulating Autophagy. *Autophagy* **2019**, *15*, 1487–1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Deng, Y.; Zhao, F.; Hui, L.; Li, X.; Zhang, D.; Lin, W.; Chen, Z.; Ning, Y. Suppressing MiR-199a-3p by Promoter Methylation Contributes to Tumor Aggressiveness and Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer through Promoting DDR1 Expression. *J. Ovarian Res.* **2017**, *10*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Lai, S.L.; Tan, M.L.; Hollows, R.J.; Robinson, M.; Ibrahim, M.; Margielewska, S.; Parkinson, E.K.; Ramanathan, A.; Zain, R.B.; Mehanna, H.; et al. Collagen Induces a More Proliferative, Migratory and Chemoresistant Phenotype in Head and Neck Cancer via DDR1. *Cancers* **2019**, *11*, 1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Chappell, W.H.; Candido, S.; Abrams, S.L.; Akula, S.M.; Steelman, L.S.; Martelli, A.M.; Ratti, S.; Cocco, L.; Cervello, M.; Montalto, G.; et al. Influences of TP53 and the Anti-Aging DDR1 Receptor in Controlling Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt Expression and Chemotherapeutic Drug Sensitivity in Prostate Cancer Cell Lines. *Aging* **2020**, *12*, 10194–10210. [[CrossRef](#)]
156. Tu, M.M.; Lee, F.Y.F.; Jones, R.T.; Kimball, A.K.; Saravia, E.; Graziano, R.F.; Coleman, B.; Menard, K.; Yan, J.; Michaud, E.; et al. Targeting DDR2 Enhances Tumor Response to Anti-PD-1 Immunotherapy. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaav2437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Beauchamp, E.M.; Woods, B.A.; Dulak, A.M.; Tan, L.; Xu, C.; Gray, N.S.; Bass, A.J.; Wong, K.-K.; Meyerson, M.; Hammerman, P.S. Acquired Resistance to Dasatinib in Lung Cancer Cell Lines Conferred by DDR2 Gatekeeper Mutation and NF1 Loss. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 475–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Huang, H.; Svoboda, R.A.; Lazenby, A.J.; Saowapa, J.; Chaika, N.; Ding, K.; Wheelock, M.J.; Johnson, K.R. Up-Regulation of N-Cadherin by Collagen I-Activated Discoidin Domain Receptor 1 in Pancreatic Cancer Requires the Adaptor Molecule Shc1. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 23208–23223. [[CrossRef](#)]
159. Ram, R.; Lorente, G.; Nikolich, K.; Urfer, R.; Foehr, E.; Nagavarapu, U. Discoidin Domain Receptor-1a (DDR1a) Promotes Glioma Cell Invasion and Adhesion in Association with Matrix Metalloproteinase-2. *J. Neurooncol.* **2006**, *76*, 239–248. [[CrossRef](#)]
160. Yang, S.H.; Baek, H.A.; Lee, H.J.; Park, H.S.; Jang, K.Y.; Kang, M.J.; Lee, D.G.; Lee, Y.C.; Moon, W.S.; Chung, M.J. Discoidin Domain Receptor 1 Is Associated with Poor Prognosis of Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Oncol. Rep.* **2010**, *24*, 311–319. [[CrossRef](#)]



Impact of Extracellular Matrix Components to Renal Cell Carcinoma Behavior

Sandra Majo^{1,2}, Sarah Courtois³, Wilfried Souleyreau^{1,4}, Andreas Bikfalvi^{1,4} and Patrick Auguste^{1,2*}

¹ Université de Bordeaux, Bordeaux, France, ² INSERM, U1035, Bordeaux, France, ³ IIS Aragon, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain, ⁴ INSERM, U1029, Pessac, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Hamid Morjani,
Université de Reims
Champagne-Ardenne, France

Reviewed by:

Miguel Ángel Medina,
University of Malaga, Spain
Eswari Dodagatta-Marri,
University of California, San Francisco,
United States

*Correspondence:

Patrick Auguste
patrick.auguste@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 12 January 2020

Accepted: 03 April 2020

Published: 28 April 2020

Citation:

Majo S, Courtois S, Souleyreau W,
Bikfalvi A and Auguste P (2020)
Impact of Extracellular Matrix
Components to Renal Cell Carcinoma
Behavior. *Front. Oncol.* 10:625.
doi: 10.3389/fonc.2020.00625

Renal cell carcinoma (RCC) represents the main renal tumors and are highly metastatic. They are heterogeneous tumors and are subdivided in 12 different subtypes where clear cell RCC (ccRCC) represents the main subtype. Tumor extracellular matrix (ECM) is composed, in RCC, mainly of different fibrillar collagens, fibronectin, and components of the basement membrane such as laminin, collagen IV, and heparan sulfate proteoglycan. Little is known about the role of these ECM components on RCC cell behavior. Analysis from The Human Protein Atlas dataset shows that high collagen 1 or 4A2, fibronectin, entactin, or syndecan 3 expression is associated with poor prognosis whereas high collagen 4A3, syndecan 4, or glypican 4 expression is associated with increased patient survival. We then analyzed the impact of collagen 1, fibronectin 1 or Matrigel on three different RCC cell lines (Renca, 786-O and Caki-2) *in vitro*. We found that all the different matrices have little effect on RCC cell proliferation. The three cell lines adhere differently on the three matrices, suggesting the involvement of a different set of integrins. Among the 3 matrices tested, collagen 1 is the only component able to increase migration in the three cell lines as well as MMP-2 and 9 activity. Moreover, collagen 1 induces MMP-2 mRNA expression and is implicated in the epithelial to mesenchymal transition of two RCC cell lines via Zeb2 (Renca) or Snail 2 (Caki-2) mRNA expression. Taken together, our results show that collagen 1 is the main component of the ECM that enhances tumor cell invasion in RCC, which is important for the metastatic process.

Keywords: renal cell carcinoma, extracellular matrix, migration, invasion, metalloproteinases

INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) represents about 2% of all adult malignancies and 90% of all kidney tumors (1, 2). It is the most lethal urological tumor with ~40% of patient's dead due to disease progression (3). Most of RCCs are sporadic and only 4–5% are inherited. Moreover, RCCs are highly metastatic and 25–30% of patients have metastasis at the time of diagnosis. According to the 2004 WHO classification, 12 histological subtypes are recognized with 3 main represented by clear cell renal cell carcinoma, papillary renal cell carcinoma and chromophobe renal cell carcinoma (4).

Clear cell RCC (ccRCC), the most frequent subtype with a 75% incidence, originates from proximal tubule epithelium. Cells are characterized by a clear or, occasionally eosinophil granular cytoplasm (3, 4). In the majority of the ccRCC, the Von Hippel-Lindau (VHL) gene is inactivated.

This inactivation includes gene mutation, promoter hypermethylation, loss of heterozygosity by allele deletion and concomitant alteration of the second gene. Loss of VHL deregulates and constitutively activates hypoxia-inducible factor HIF1 α and HIF2 α . The two transcription factors play a role in ccRCC, but seem to have opposite effects, HIF1 α is acting as a tumor suppressor with an expression lost in 30–40% of tumors whereas HIF2 α is acting as an oncoprotein. HIF1 α and HIF2 α are both implicated in angiogenesis, cell proliferation, metastasis, resistance against endoplasmic reticulum (ER) and oxidative stresses (5). Nevertheless, a recent meta-analysis study from Kim and colleagues found no correlation between VHL inactivation and patient survival in ccRCC (6).

Papillary renal cell carcinoma (pRCC) is a less aggressive tumor, accounting for 10% of all RCC. They derived from distal tubule epithelium (3) and are organized in papillae with small cells arranged in a single layer (type 1 or basophilic) or with cells of higher nuclear grade, eosinophilic cytoplasm and pseudostratified nuclei (type 2 or eosinophilic) (4). Type 2 is considered as more aggressive than type 1 (7).

Chromophobe renal cell carcinoma is derived from intercalated cells of the collecting duct and represents 5% of all RCC. The tumor is composed of large cells with a clear reticulated cytoplasm and perinuclear halos, but in some variants the cytoplasm is eosinophilic. It is the less aggressive RCC subtype unless a sarcomatoid transformation occurs (3, 4).

The other RCC subtypes, such as the medullary subtype, represent <5% of all RCC and are rare.

In 1982, Fuhrman and al proposed a RCC grading system based on nuclear size and shape and on nucleolar prominence. The Fuhrman tumor grade (I–IV) is directly correlated to patient survival (8) and to metastasis (9). Nevertheless, in several studies on chromophobe RCC, no correlation between the Fuhrman nuclear grade and patient survival was found (10). Beyond the Fuhrman grade, some RCCs with extreme dedifferentiation called sarcomatoid RCC, undergo epithelial to mesenchymal transformation (EMT) and exhibit spindle cells. This sarcomatoid morphology is associated with very poor prognosis and a survival rate of 15–22% at 5 years (10).

In low grade RCC, treatment consists in partial or radical nephrectomy. Targeted- and immuno-therapies are the treatments of choice for inoperable metastatic RCC (11). Hanahan and Weinberg have proposed 10 organizing principles, called hallmarks, which are causative for tumor development and spread. Targeting one or, better, several hallmarks is thought to increase efficacy of anti-tumor therapies (12).

The tumor stroma is composed of cells (fibroblasts, mesenchymal stroma cells, pericytes, immune cells, vascular and lymphatic endothelial cells...) and extracellular matrix (ECM) (13). In RCC, several filamentous collagens are expressed and include type I (Col 1) and type III (Col 3) collagen. These are present in about half of the tumors, the remaining are represented by type V, VI, and XI collagen (14–16). The organization of the collagen fibers depends on the RCC grade. In high grade (Fuhrman grade IV) tumors fibers are aligned and the density is greater than in low grade tumors (17). Fibronectin 1 (FN1) or its alternative splicing variant EDA-FN are widely

distributed in the RCC stroma (14, 16). RCC cells expressed FN1 and silencing its expression inhibits cell proliferation and invasion *in vitro* (18). Other components are derived from the basement membrane and include laminins (LN α 1, β 1-2, and γ 1), collagen type IV (α 1-2 chains), entactin (nidogen-1), tenascin-C, periostin and heparin-sulfate proteoglycans (HSPG) (14, 15, 19–21). ECM remodeling involves metalloproteinases (MMPs, mainly MMP-2, and 9) and cleavage of HSPGs by heparanase. All of these enzymes are increased in many metastatic cancers (22, 23).

In the present study, we analyzed the role of different ECM molecules (i.e., Col 1, FN1) and a mixed basement membrane components (Matrigel) in the phenotypic modulation of RCC cells.

MATERIALS AND METHODS

In silico Analysis of RCC Patient Survival in The Human Protein Atlas

The impact of high protein expression on the survival of RCC patients was analyzed using the Pathology Atlas from The Human Protein Atlas (24). The Human Protein Atlas used transcriptomic data from TCGA. For RCC, data were available for 877 patients, 528 ccRCC patients and 285 pRCC patients. Overall survival was analyzed using Kaplan-Myer plots.

RCC Cell Lines and ECM Used

The human 786-O cell line is derived from ccRCC mutated on the VHL gene (25). The human Caki-2 cell line was first classified as a ccRCC cell line. The VHL gene mutation status of this cell line is not well-defined but HIF1 α and HIF2 α are expressed (26). Caki-2 cells injected in mouse immunodeficient kidney develop in tumors resembling more pRCC (27). The Renca cell is a non VHL mutated ccRCC cell line derived from a spontaneous tumor in a BalbC mouse (28).

Rat tail Col 1 was obtained from Corning, bovine FN1 from Sigma Aldrich and Matrigel from Corning. Matrigel is a soluble basement membrane extract of murine Engelbreth-Holms-Swarm sarcoma tumor composed of LN, collagen IV, entactin, and HSPG where growth factors can be bind.

Cell Culture

The mouse Renca and the human 786-O and Caki-2 cell lines were cultured in complete medium (RPMI complemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS); 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator.

For cell stimulation, dishes were coated with 400 μ g/ml of Col 1, 5 μ g/ml of FN1, or 33 μ g/ml of Matrigel for 1 h at 37°C. Dishes were washed 3 times with PBS (Phosphate Buffer Saline) and used immediately.

Cell Immunolabeling

RCC cells were cultured for 24 h on glass coverslips coated or not with the different ECMs, then fixed 10 min with 4% paraformaldehyde. Coverslips were blocked 1 h with 5% BSA (Bovine Serum Albumin) and 0.3% Triton X100 in PBS and

incubated overnight at 4°C with mouse anti-β-catenin antibody diluted 1/800 (Cell Signaling Technology) in incubation buffer (1% BSA and 0.3% Triton X100 in PBS). After 3 washes in PBS, coverslips were incubated 1 h with appropriate FITC-conjugated secondary antibody, Alexa 556-conjugated Phalloidin (1/500 dilution, FluoProbes) and DAPI (1 μg/ml, FluoProbes) in incubation buffer. After 3 washes in PBS, coverslips were mounted for microscope observation using Fluoromount G (Interchim). Cells were observed and pictures taken under a Nikon microscope.

Cell Proliferation

Ten thousand (786-O and Caki-2) or 20,000 (Renca) cells in 500 μl of complete medium were cultured for 72 h in a 24 well plate coated or not with the different ECMs. Cells were trypsinized and counted using a Coulter Particle Counter (Beckman Coulter France).

Cell Adhesion

Cell adhesion assay was performed as previously described with minor modifications (29). Briefly, cells were quickly trypsinized and washed 5 times in adhesion buffer (RPMI containing 0.1% BSA). Cells were counted, the concentration adjusted to 50,000 cells in 500 μl of adhesion buffer and leave 1 h at 37°C. Five hundred microliter of cells were deposited in a 24 well plate previously coated and blocked 30 min with 500 μl of adhesion buffer. After 1 h of incubation, dishes were washed 3 times with RPMI. Adherent cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and nuclei were labeled 10 min with DAPI (2 μg/ml). Five pictures per dish were taken using a Zoe Fluorescent Cell Imager (Biorad). Nuclei were counted using Image J software.

TABLE 1 | Primers used in q-PCR analysis.

Target	Human sequences	Mouse sequences
MMP-2	GGAGACAAGTTCTGGAGATAC AATG TTTGGTTCTCCAGCTTCAGGTA	GGAGACAAGTTCTGGAGATAC AATG TTTGGTTCTCCAGCTTCAGGTA
MMP-9	GTTCCCGGAGTGAGTTGAAC TTTACATGGCACTGCCAAAGC	CGTGTCTGGAGATTCGACTTGA TGGAAACTCACACGCCAGAA
MMP-14	ACTGCCAAGCCACCCTAAGA CTGAGCAACGAAGACCCTCTCT	GCCCTCTGTCCAGATAAGC CCAGAACCATCGCTCCTTGA
Heparanase	ACTTCTTACCCAGGAGCCG AGGTACGCAGGAGACAAGCC	AGTTTTACACCAAGCGGCCGC GTATGCAGGAGATAAGCCTCTAG
Zeb1	TTTACACCTTTGCATACAGAACC TTTACGATTACACCCAGACTGC	GCTGGCAAGACAACGTGAAAG GCCTCAGGATAAATGACGGC
Zeb2	GGAGACGAGTCCAGCTAGTGT CCACTCCACCCTCCCTTATTT	ATTGCACATCAGACTTTGAGGAA ATAATGGCGTGTGCTTCCG
Snail 1	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA AGATGAGCATTGGCAGCGAG	CACACGCTGCCTTGTGTCT GGTCAGCAAAAGCAGCGTT
Snail 2	CGAACTGGACACATACAGTGT CTGAGGATCTCTGTTGTGGT	TGGTCAAGAAACATTTCAACGCC GGTGAGGATCTCTGTTTGGTA
GAPDH	CAAGGAGTAAGACCCCTGGA AGGGGAGATTGAGTGTGGT	TGCCCCCATGTTTGTGATG TGTGGTCATGAGCCCTTC

Cell Migration/Invasion Assays

Cell migration was assessed in two different assays, a scratch-wound assay and a Transwell assay.

For the scratch-wound assay 60,000 cells in 100 μl of complete medium were cultivated in 96-well plate ImageLock dishes coated or not with the different ECMs. When cells were at confluence the wound was performed using a Wound Maker (Essen BioScience), the cells were washed with PBS and 100 μl of complete medium were added. Cell migration was followed for 24 h using an IncuCyte system (Essen BioScience).

In the Transwell assay, 8 μm pore diameter inserts in 24-well plates (BD Falcon) were used and coated or not with the different ECMs. Twenty five thousand RCC cells in 500 μl of RPMI medium were put inside the insert. One milliliter of complete medium was used as chemoattractant. After 16 h at 37°C, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. After intensive PBS washes, non-migrating cells were removed. Nuclei from migrating cells were labeled with 1 μg/ml of DAPI for 20 min. After three washes, 5 photos/insert were taken and migrated cells counted with Image J software.

Gelatin Zymography

The effect of ECMs on MMP-2 and MMP-9 activity was assessed by gelatin zymography on Renca, 786-O and Caki-2 cell lines.

TABLE 2 | Kidney extracellular matrix and 5 years patient survival.

	All renal cancer	Kidney renal clear cell carcinoma: ccRCC	Kidney renal papillary cell carcinoma: pRCC
Col 1A1	- P (7.2.10 ⁻¹²)	- (4.10 ⁻⁴)	- (8.1.10 ⁻¹⁰)
Col 1A2	- P (1.5.10 ⁻⁹)	- (0.0078)	- (1.7.10 ⁻⁷)
FN1	- P (3.4.10 ⁻⁸)	- (0.0044)	- (1.4.10 ⁻⁷)
LNα1	NS (0.19)	+ (0.02)	- (0.026)
LNβ1	+ (0.029)	- (0.0021)	NS (0.27)
LNγ1	- (0.0019)	+ (0.0038)	- (2.5.10 ⁻⁵)
LNβ2	+ (0.0012)	+ (1.4.10 ⁻⁷)	N/A
Col 4A2	- P (3.5.10 ⁻⁵)	+ (0.004)	- (0.0036)
Col 4A3	+ P (2.5.10 ⁻⁷)	+ (1.3.10 ⁻⁵)	NS (0.31)
Entactin (Nid1)	- P (5.4.10 ⁻⁸)	+ (0.006)	- (5.5.10 ⁻⁷)
HSPG2 (Perlecan)	+ (0.0012)	+ (3.5.10 ⁻⁹)	- (5.2.10 ⁻⁴)
Syndecan 1	NS (0.16)	NS (0.2)	NS (0.44)
Syndecan 2	+ (0.016)	+ (0.0014)	NS (0.54)
Syndecan 3	- P (1.7.10 ⁻⁴)	- (0.0036)	NS (0.15)
Syndecan 4	+ P (2.4.10 ⁻⁷)	NS (0.29)	+ (0.0024)
Glypican 1	NS (0.19)	- (3.3.10 ⁻⁶)	- (0.02)
Glypican 2	- (1.7.10 ⁻⁴)	- (2.9.10 ⁻¹⁰)	+ (0.041)
Glypican 3	- (0.0038)	- (0.008)	- (6.2.10 ⁻⁴)
Glypican 4	+ P (1.2.10 ⁻⁵)	+ (1.4.10 ⁻⁵)	N/A
Glypican 5	- (1.8.10 ⁻⁶)	- (0.0062)	- (0.0091)
Glypican 6	+ (0.0025)	+ (1.3.10 ⁻⁶)	+ (0.018)

Data were obtained from The Human Protein Atlas dataset (<https://www.proteinatlas.org>) for the different ECM components in RCC, ccRCC, or in pRCC. +, high expression is favorable in renal cancer; -, high expression is unfavorable in renal cancer; NS, high expression has no specific effect on patient survival; in parentheses is found the P score 5 year survival value. N/A, non applicable; P, the ECM molecule is a pronostic factor for RCC.

For this, 400,000 cells (Renca) or 300,000 cells (786-O and Caki-2) were cultured in complete medium for 24 h in 6 cm diameter petri dish coated or not with the different ECMs. Then, cells were cultured in fresh RPMI media without FBS for 24 h. Supernatants were harvested and centrifuged 10 min at 13,000 rpm. Thirty microliter of each sample in non-reducing loading buffer were loaded in 10% SDS-PAGE containing 0, 2% porcine gelatin (Sigma) and run at 100 V. Subsequently, the gel was rinsed with 2,5% Triton X-100 before being washed 4 times 15 min in 2,5% Triton X-100 at room temperature. After, the gel was rinsed with a revealing solution allowing enzymatic activity (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl, 10 mM CaCl₂) before being incubated in this solution during 48 h at 37°C under agitation. Finally, the gel was stained with 0.5% Coomassie blue solution (0.5% Coomassie blue, 5% methanol, 10% acetic acid) and treated with destaining solution (30% ethanol, 10% acetic acid) until the appearance of clear bands. The gel was photographed and active MMP-2 and MMP-9 were quantified with image J software.

RT-qPCR

Four thousand (Renca) or 300,000 (786-O and Caki-2) cells were cultivated in a 6 cm diameter dish coated or not with the different ECMs for 24 h. Total RNA was extracted using TRI Reagent (Molecular Research Center) following the manufacturer's instructions and quantified by spectrophotometry (Nanodrop, DS-11 DeNovix). Complementary DNA (cDNA)

was synthesized with random primers from 500 ng of total RNA using reverse transcription kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The quantitative PCR was performed in duplicate on a CFX96 Real-Time System (C1000 Touch Thermal Cycler, Biorad) using TB Green Premix Ex Taq, Bulk (TaKaRa). The cycling parameters included 39 cycles of denaturation at 95°C for 30 s and annealing-elongation at 60°C for 30 s. Sequence specific primers (eurofins) designed and/or used to assess the mRNA expression of target genes are summarized in **Table 1**, and GAPDH was used as a housekeeping gene standard.

Sensibility to Drugs-MTS Cell Viability Assay

Two thousand Renca, 1,500 786-O or 1,000 Caki-2 cells in 100 μ l of complete medium were cultured for 24 h on 96-well plates coated or not with the different ECMs. After removing the media, 100 μ l of new media containing increasing concentrations of Pazopanib and Sorafenib [0.03 to 30 μ M and 0.01 to 10 μ M, respectively, for Pazopanib and Sorafenib (Enzo Life Sciences)] were added. After 24 h of treatment, 10 μ L/well of MTS (Promega) were added to the cells for 2 h at 37°C. Finally, the optical density was read at 490 nm using a microplate reader (CLARIOstar^{Plus}). The results are expressed as (OD experiment—OD blank) where OD blank represent the optical density of the wells with media alone.

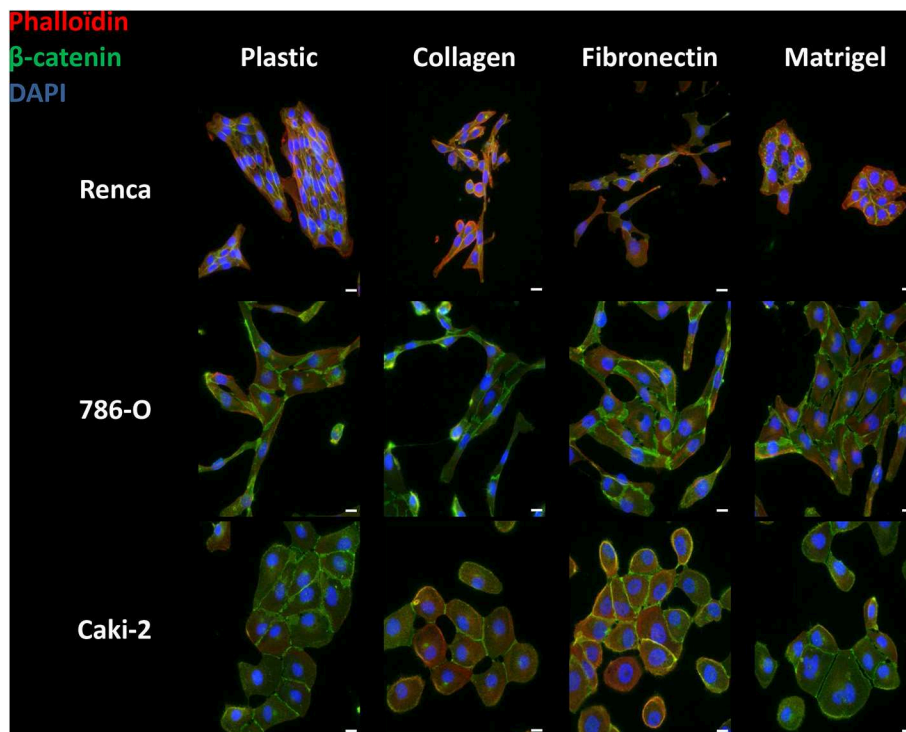


FIGURE 1 | Effect of the different ECM components on the phenotype of RCC cells. Cells were cultured for 24 h on uncoated (Plastic) or Col 1, FN1 or Matrigel glass coverslips, fixed and stained with β -catenin antibody (green), with phalloidin (filamentous actin, red), and with DAPI (nucleus, blue). Images were captured using a Nikon microscope. Bar: 20 μ m. *N* = 3.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 software. Comparisons were performed with One Way ANOVA analysis of variance, followed by Dunnett's Multiple Comparison Test. ★, $P < 0.05$; ★★, $P < 0.01$; ★★★, $P < 0.001$.

RESULTS

Kidney Extracellular Matrix and 5 Years Patient Survival

We first investigated whether expression of the main components of the ECM is correlated to kidney cancer aggressiveness in The Protein Atlas dataset and analyzed the 5-years survival of kidney cancer patients. Col 1 (1A1 or 1A2) or FN1 expressions correlated with reduced survival of ccRCC and pRCC patients (Table 2). In contrast, ccRCC patients with higher expression of LN α 1, LN γ 1, Col 4A2, or entactin (Nidogen 1) have a better survival rate. However for pRCC, survival was reduced in this case (Table 2). In addition, LN β 1, expression is correlated with reduced survival in ccRCC. Furthermore, patients with high Col 4A3 expression have better survival rate in ccRCC (Table 2). For HSPG, high expression of transmembrane receptors of perlecan or syndecan 2, is correlated with better survival in ccRCC patients (Table 2). For GPI anchored HSPG, ccRCC patients with high expression of glypican 1, 2, 3, and 5 have lower survival rate, whereas patients

with high expression of glypican 4 and 6 have higher survival rate (Table 2).

Some highly expressed ECM components (including Col 1A1, 1A2, 4A2, FN1, entactin, syndecan 3) are of bad prognosis. However, high Col 4A3, syndecan 4, and glypican 4 expression is of good prognosis in RCC (Table 2).

Altogether these results suggest a negative correlation between the expression of ECM components, that are not part of the basal lamina, and 5-years survival of ccRCC and pRCC patients. On the contrary, a positive correlation was observed between several basal lamina ECM components and ccRCC patient survival. For pRCC a negative correlation was observed in this case.

Effect of the Different ECM Components on the Phenotype of RCC Cells

RCC cells were cultured for 24 h on the different ECM molecules and immunolabeled with anti- β -catenin antibody for visualization of cell-cell junctions and with phalloidin for actin filament remodeling (Figure 1, Supplementary Figures 1–3).

On plastic and without any stimulation, Renca cells grew in clusters and exhibited cell to cell junctions. On Col 1 or FN1, Renca cell were more dissociated and fusiform with numerous

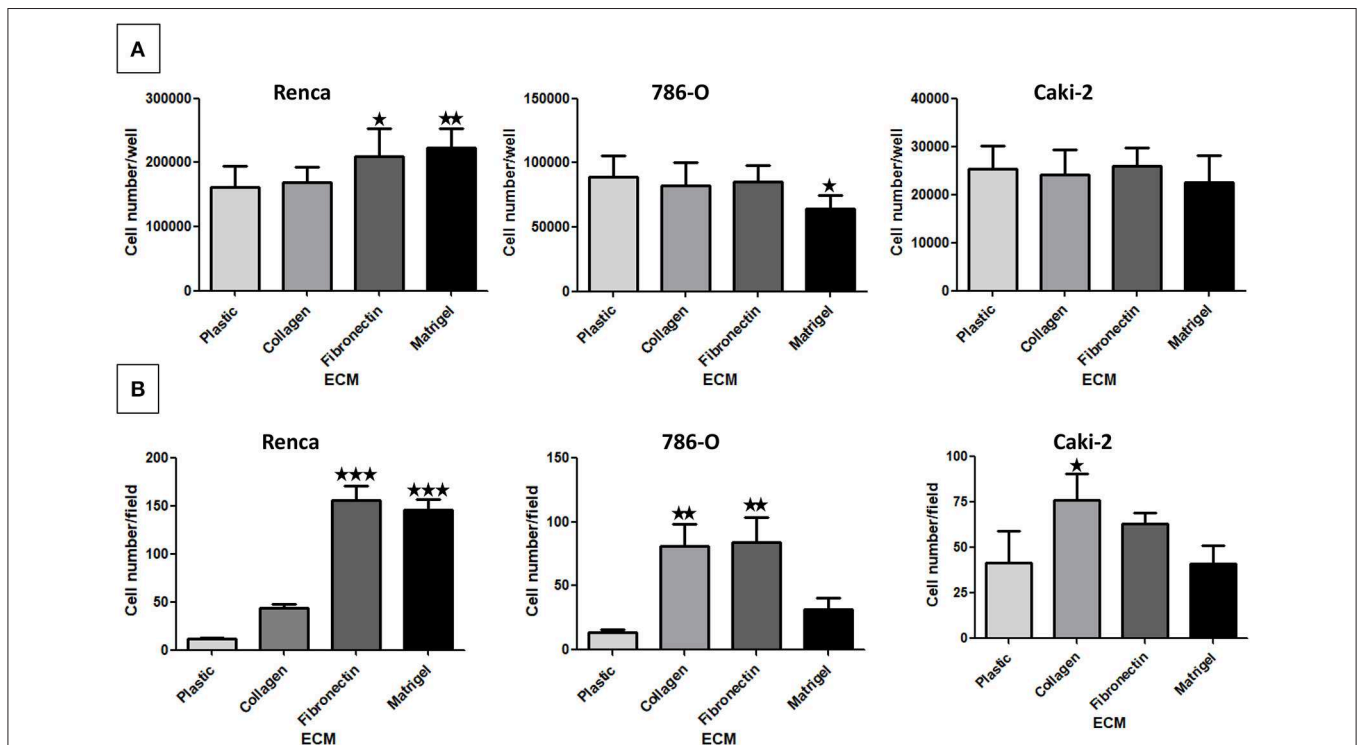


FIGURE 2 | Effect of the different ECM components on RCC cell proliferation (A) and adhesion (B). (A) Renca, 786-O, and Caki-2 cells were cultured on uncoated (Plastic) or Col 1, FN1 or Matrigel coated dishes for 72 h. Then cells were detached and counted. Renca, $N = 4$; 786-O and Caki-2, $N = 3$. (B) Renca, 786-O, and Caki-2 cells were allowed to adhere on plastic, Col 1, FN1, or Matrigel for 1 h, fixed and nuclei labeled. Five photos per well were taken and nuclei counted using ImageJ software. $N = 3$. ★ $P < 0.05$; ★★ $P < 0.01$; ★★★ $P < 0.001$.

membrane extensions. On Matrigel, cells grew in clusters and arrange themselves as acini. Cortical actin was not modified.

The Human RCC 786-O cell line cultured on plastic, Col 1 or FN1, acquired an elongated shape with cell-cell junctions. On Matrigel, cells were not elongated and grew in clusters. On all ECM components, only sparse cortical actin is observed. Furthermore, on Col 1, cortical actin was found at membrane extensions.

The Caki-2 RCC cell line was also tested. Caki-2 cells had a round shape and grew in clusters with β -catenin at cell-cell junctions but with little cortical actin, excepted when grown on FN1.

Taken together, different RCC cells adopted various phenotypic changes when cultured in the different ECMs.

Effect of the Different ECM Components on RCC Cell Proliferation

The impact of the ECM components on RCC cell proliferation was analyzed after 72 h (Figure 2A). We observed only a small increase in proliferation when Renca cells were cultured on FN1 or on Matrigel. On the other end, proliferation of 786-O cells was decreased to some extent when grown on Matrigel. No effect of the ECMs on Caki-2 proliferation was observed. Thus, ECM

components had only a minor impact on the proliferation of RCC cells.

Effect of the Different ECM Components on RCC Cell Adhesion

Cell adhesion to ECM is mainly mediated by integrins (30). Cell adhesion assays were performed on the different ECMs (Figure 2B). Renca cell adhesion was greatly increased on FN1 and on Matrigel. Adhesion of 786-O cells was increased on Col 1 and on FN1. On the contrary, adhesion of Caki-2 cells to Col 1 was only increased to a small extent. These results show that these RCC cell types present different adhesion profiles when cultured in the different ECMs.

Effect of the Different ECM Components on RCC Cell Migration

We next performed a scratch wound assay. In this case, no significant difference in cell migration was observed for 786-O and Caki-2 cells when cultured on the different ECMs. Renca cells did not migrate efficiently in this assay (Figure 3A).

In the Transwell assay, cells are attracted to the lower side of the insert by serum present in the lower chamber. From the 3 cell lines, 786-O cells had a higher migrating capacity in absence of

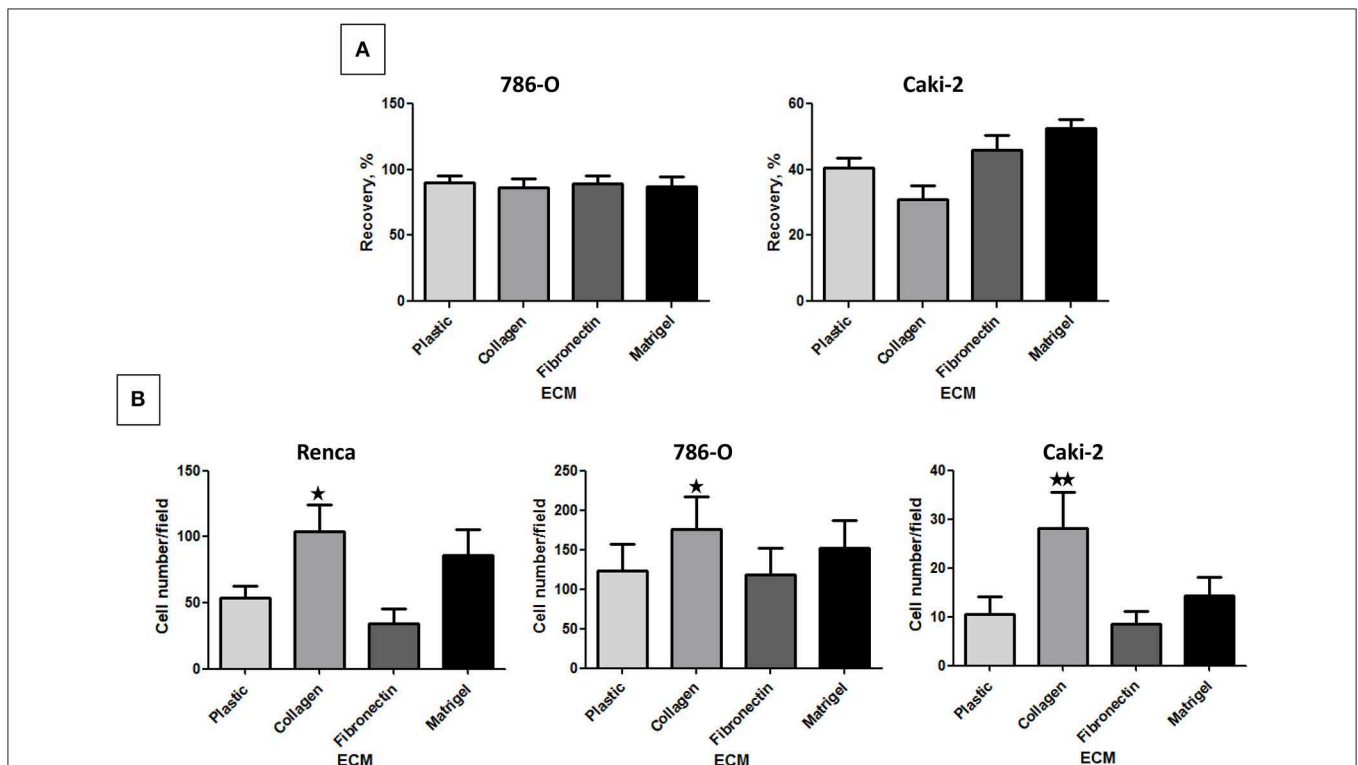
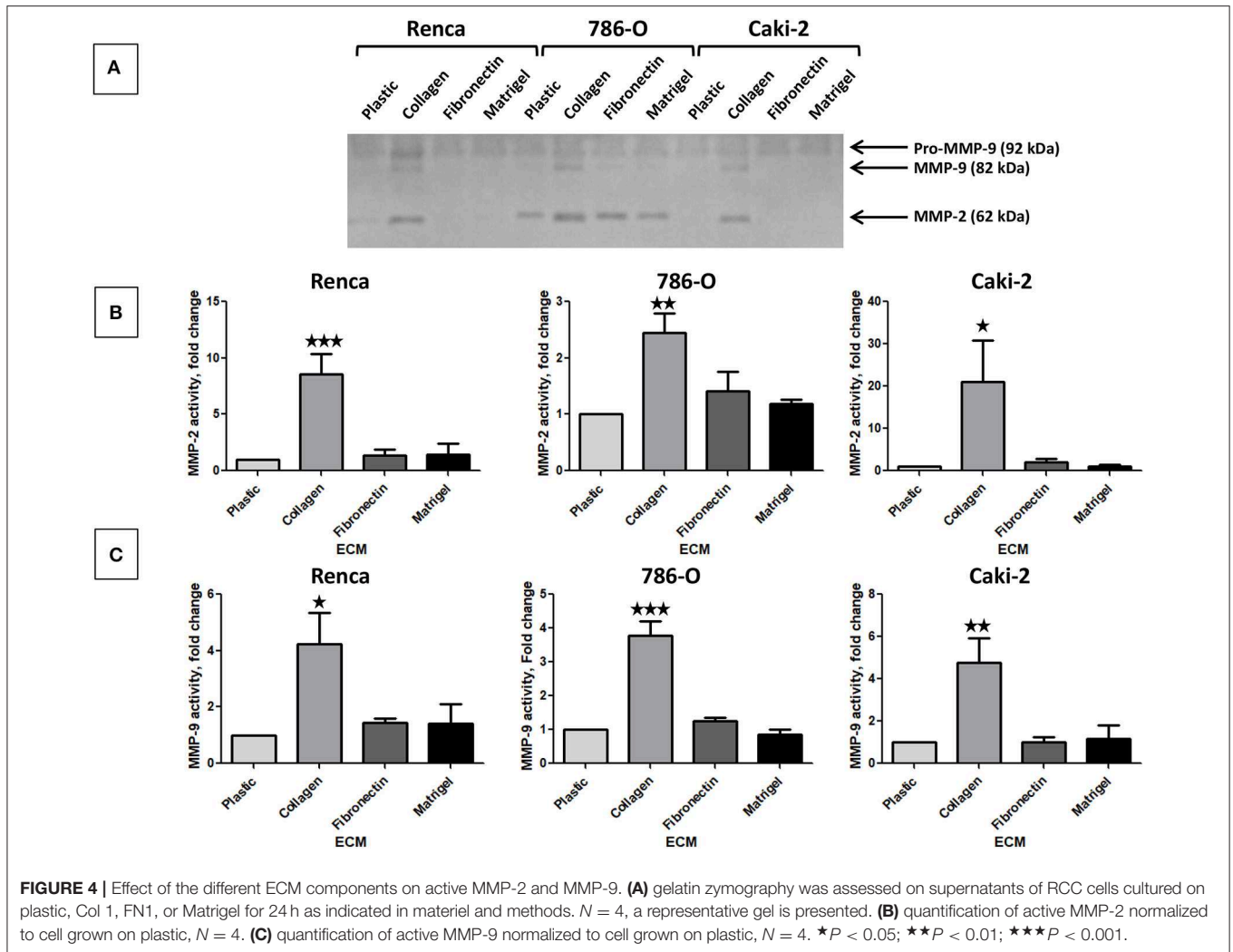


FIGURE 3 | Effect of the different ECM components on RCC cell migration. **(A)** 786-O or Caki-2 cell migration was assessed in a scratch-wound assay with cells cultured on plastic, Col 1, FN1, or Matrigel. The kinetic of the cell migration into the wound was followed using an IncuCyte system (Essen BioScience). The percentage of wound closure was obtained after 24 h of cell migration, $N = 4$. **(B)** Renca, 786-O, or Caki-2 cell migration was assessed in a Transwell assay. Filters were uncoated (Plastic) or previously coated with Col 1, FN1, or Matrigel and FBS was used as chemoattractant. After 16 h, migrated cells were fixed and nuclei labeled. Five photos per well were taken and nuclei counted using ImageJ software. Renca: $N = 4$; 786-O: $N = 5$; Caki-2: $N = 6$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.



ECM. Col 1 was the only ECM, which significantly increased the migration of all 3 cell lines (Figure 3B).

Effect of the Different ECM Components on Active Proteases and on Protease Expression

The activity of secreted MMP-2 and MMP-9 was assessed by gelatin zymography using cell culture supernatants. In absence of ECM, the 3 cell lines expressed Pro-MMP-9 but active MMP-9 or MMP-2 were only detected in 786-O supernatant (Figure 4A). Col 1 was the only ECM molecule that increased MMP-9 and MMP-2 activity in the three cell lines. FN1 and Matrigel had no effect on MMP-9 or 2 activity (Figures 4A–C).

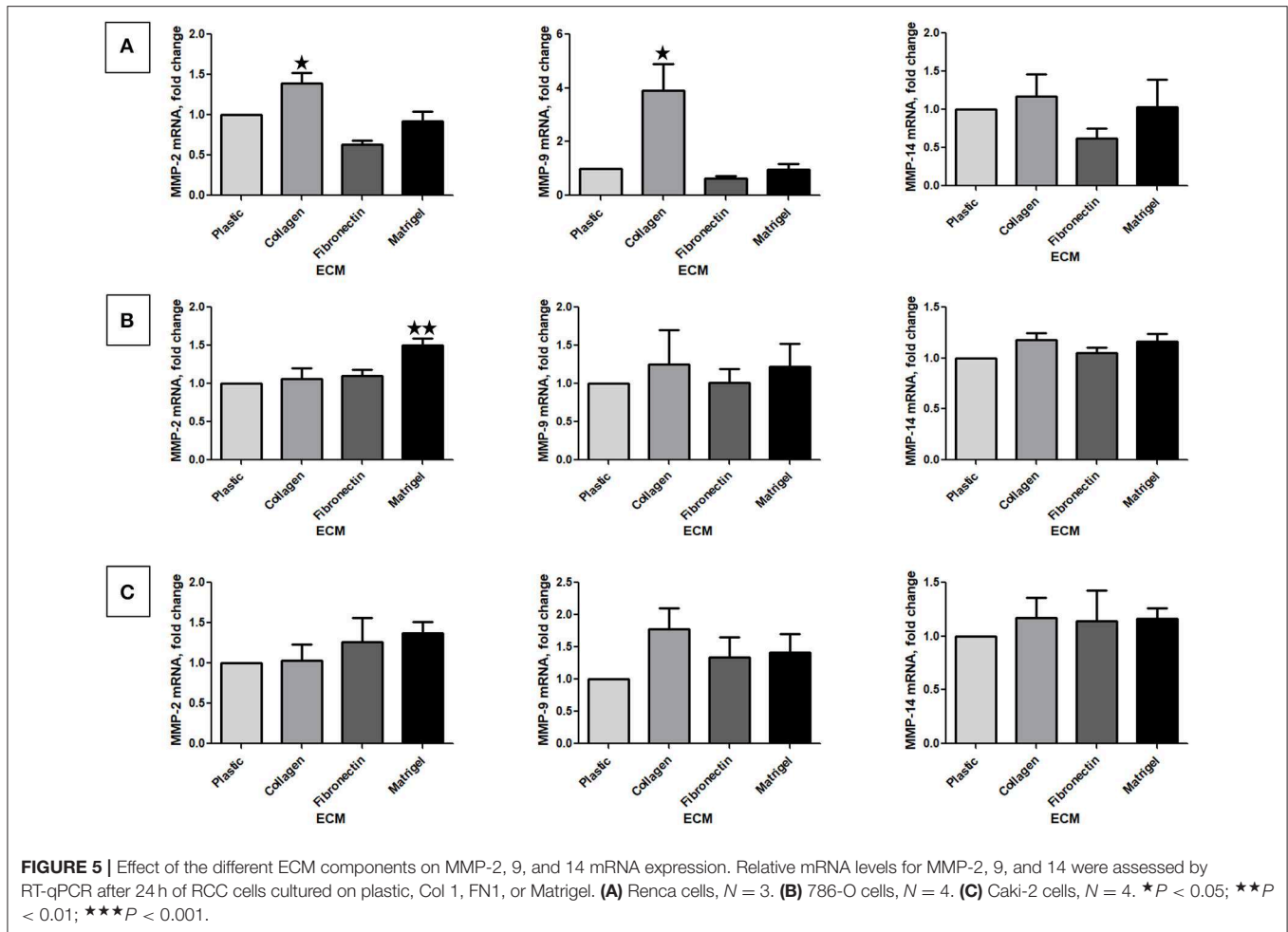
We next investigated MMP-2 and 9 mRNA by RT-qPCR analysis of RNA in RCC cells stimulated or not by the different ECM components. Because it is well-known that the activation of MMP-2 and, in some instance, of MMP-9 is MMP-14 (MT1-MMP)-dependent, we also measured MMP-14 mRNA expression (31, 32). Renca cells cultured on Col 1 exhibited an increase in MMP-2 and MMP-9 mRNA but not in MMP-14

mRNA expression (Figure 5A). This indicates that the increase MMP activity is mediated, at least in part, by an increase in MMP-2 or MMP-9 mRNA. 786-O and Caki-2 cells grown on the different ECMs did not showed changes in MMP mRNA expression, excepted for MMP-2 in 786-O cultured on Matrigel (Figures 5B,C).

Heparanase mRNA expression was quantified by RT-qPCR in RCC cells stimulated or not by the different ECM molecules. Using 2 different sets of primers, no heparanase expression was found in Renca cells. In contrast, heparanase mRNA was expressed in 786-O and Caki-2 cells but no modulation by the different ECMs was observed (Supplementary Figure 4).

Effect of the Different ECM Components on the Expression of Transcription Factors Implicated in EMT

We next measured the expression of mRNA of several transcription factors associated with EMT. No difference in Zeb1, 2 or Snail 1, 2 mRNA was observed in 786-O cells cultured on the different ECMs (Supplementary Figures 5, 6). In contrast,



in Renca cells, Zeb1 and Zeb2 mRNAs were upregulated, respectively, when cells were seeded on Matrigel or Col 1 (Figure 6). In Caki-2, Col 1 increased Snail 2 mRNA expression. In opposite, when cells were seeded on FN1 a small but significant downregulation of Snail 1 mRNA was observed (Figure 6). These results indicate that EMT-associated transcription factors are modulated by ECM components.

Effect of ECM on Drug Sensitivity

We next investigated whether the different ECMs may have a protective effect when cells are exposed to tyrosine-kinase inhibitors (TKI) such as Sorafenib or Pazopanib, two TKI used in clinic. Cells, seeded on the different matrices for 24 h, were incubated with increasing concentrations of Sorafenib or Pazopanib for another 24 h and cell survival was measured with MTS. As shown in Figure 7, ECM components had no effect on the chemosensitivity of the three RCC cell lines to this two TKI.

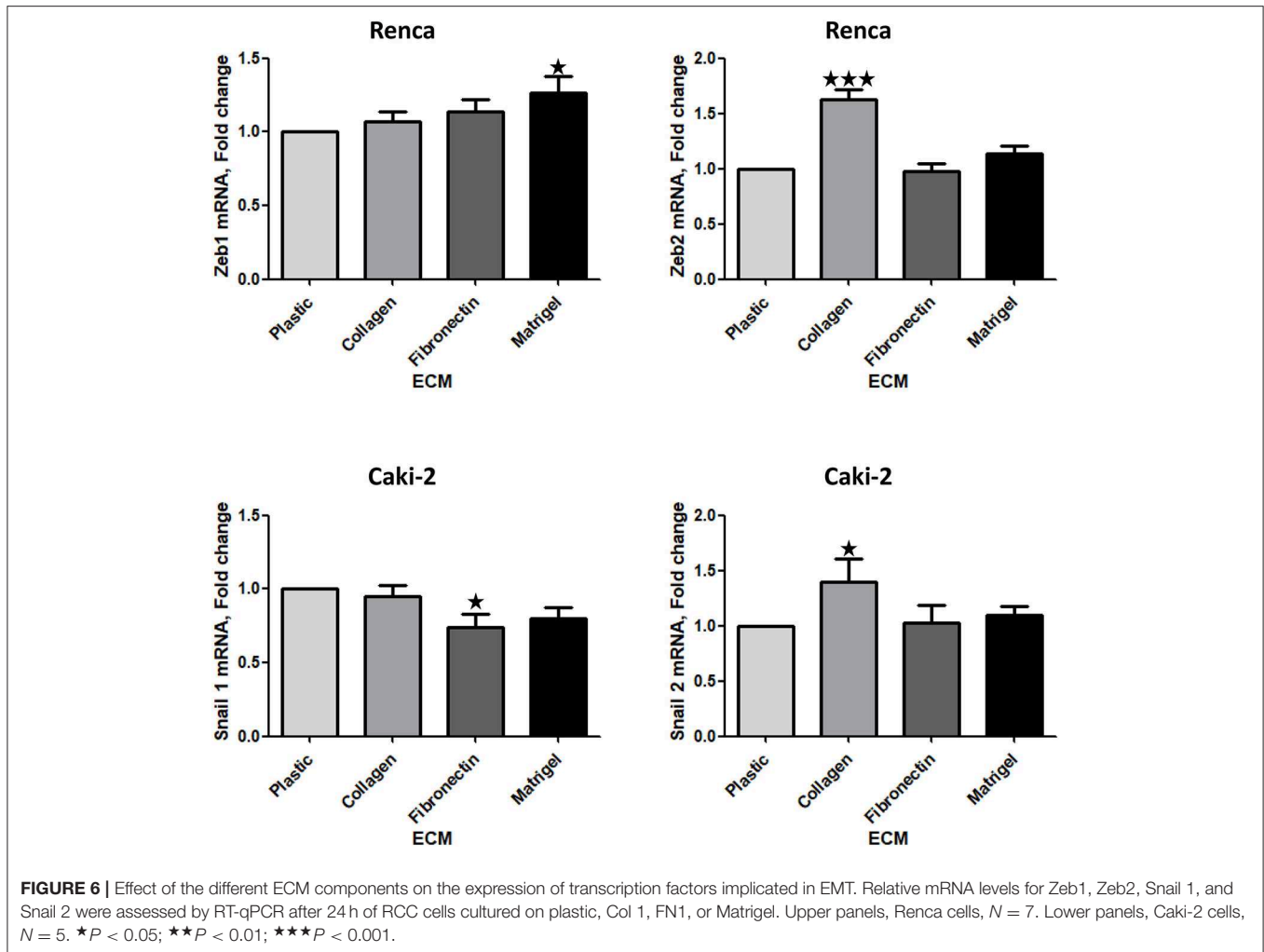
DISCUSSION

Analysis of the 5-year patient survival in the The Human Protein Atlas reveals a negative correlation between ccRCC and pRCC

and high Col 1 expression. This is in agreement with other cancers where collagens are factors of bad prognosis, e.g., Col A1 in colorectal and breast cancers (33).

The different RCC cells adopted various phenotypic changes when cultured in the different ECMs. Cell morphology is mainly dependent on cell signaling and on ECM stiffness (34). The tumor cells, used in this study are genetically different (VHL/HIF2 α) and expressed different integrins and ECM receptors. Consequently, these cells respond differently to different ECM.

In most cancers, collagen expression is related to cell migration, invasion and metastasis. Col 1 increases migration of three RCC cell lines and stimulate MMP-2 and 9 activity, two metalloproteinases implicated in cancer cell invasion and metastasis formation (22). Moreover, Col 1 increases the expression of Zeb2 in Renca cells or Snail 2 in Caki-2 cells, two transcription factors implicated in EMT. However, in 786-O cells, no increase in EMT-related transcription factors was observed. VHL is implicated in the inhibition of EMT (25) and 786-O is a VHL negative cell line. In the Renca cell line, CRISPR inactivation of VHL induced EMT (28). We postulate that, in the VHL negative 786-O, the amount of the transcription factors implicated in EMT is already too high to be regulated by Col 1.



Alternatively in this cell line, Col 1 increases the expression of other transcription factors such as Sox4 or Twist 1 (35).

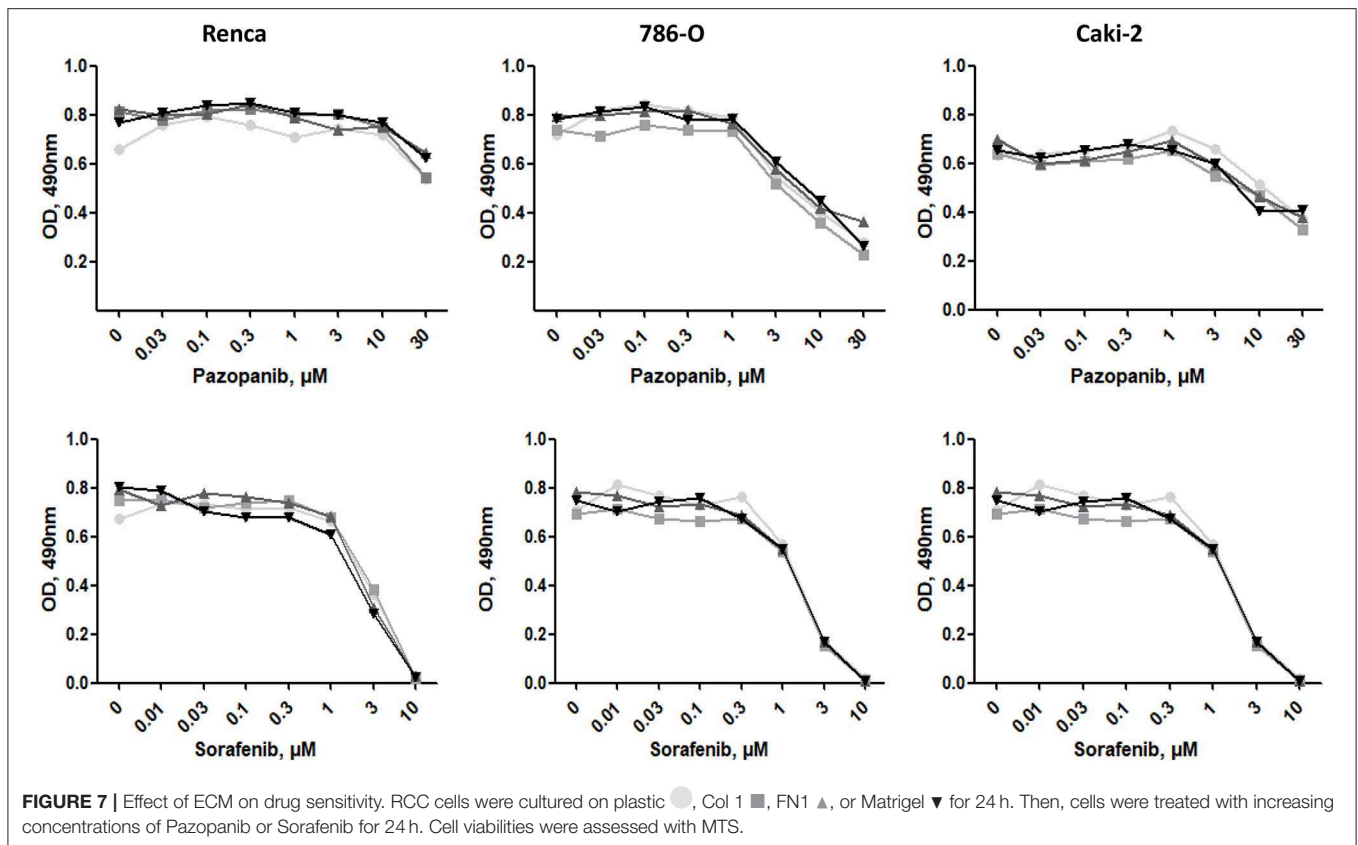
Col 1 binding to their membrane receptors can directly activate EMT. Col 1 can bind to at least two types of receptors, integrins and the discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Integrins and DDRs are potent EMT inducers. Col 1 binding to integrins can activate AKT and GSK3 β and, in turn, directly EMT (36). DDRs exhibit tyrosine kinase activity and are implicated in cell proliferation, migration, invasion and EMT (37). Alternatively, as in lung cancer, the role of Col 1 in EMT is indirect and can be mediated via TGF β 3 expression (38). The role of DDRs in RCC development and EMT is under investigation.

High FN1 concentration correlated with poor survival in RCC patients. RCC cells exhibited increased adhesion on FN1 compare to plastic, suggesting that integrins such as α v β 3 or α 5 β 1 are implicated (39). However, we did not evidence an effect on RCC cell migration and MMP activity. Poor survival may be alternatively related to a role of FN1 in the tumor microenvironment. It is well-known that FN1 is an RGD-motif containing protein able to bind the α v β 3 integrins

present at the cell surface of endothelial cells and induces angiogenesis. Targeting angiogenesis by inhibiting FN1 binding to α v β 3 inhibits tumor angiogenesis and tumor growth in teratocarcinoma and in the ccRCC cell line 786-O (40).

With the exception of LN β 1 and glypican 1-3, 5, all the other basement membrane proteins found in RCC, e.g., LN α 1, γ 1, β 2, Col IV, entactin, syndecan, glypican 4, and 6 and perlecan, are good prognostic factors for ccRCC but bad prognostic factors for pRCC. Matrigel, a basement membrane matrix derived from a Engelbreth-Holms-Swarm sarcoma which contains LN, Col IV, entactin and HSPG, had no significant effect on the phenotype of 786-O and Caki-2 cells. In Renca cells, Matrigel stimulated slightly cell proliferation, as well as MMP-2 and Zeb1 mRNA expression but without interfering significantly with cell migration.

Heparanase, an enzyme implicated in the degradation of HSPG is found upregulated in many cancers (23) such as in advanced-stage RCC (2, 41). Little is known about heparanase's transcription regulation, only estrogen receptor activity or inflammatory mediators TNF α or IFN α were found to increase heparanase mRNA (42). In our study, Col 1, FN1 or other



main components of the basement membranes, were unable to modulate heparanase expression.

It is well-known that the ECM is able to modulate the sensitivity of cells to anti-cancer drugs and that density and stiffness can inhibit accessibility of drugs to the tumor. This was particularly well-studied in breast cancers (43) but little is known in RCC. *In vitro* experiments did not reveal an effect of ECM components on the sensitivity to Pazopanib and Sorafenib, two TKI commonly used in clinic. In breast cancers, ECM stiffness creates a protective barrier that reduces the accessibility to TKI (43). In our experiments, low ECM concentrations were used, which results in insufficient stiffness to create a barrier to drug accessibility.

Tumor cells adhered differently on the ECMs, indicating that different RCC cell lines do not express the same integrins. Renca cell adhesion to Col 1 is low, suggesting that $\alpha 1, 2, 10, \text{ or } 11/\beta 1$ are expressed at low level. On the contrary, 786-O and Caki-2 are likely to express high level of these integrins. All RCC cells adhered to FN1 suggesting a strong expression of FN1-specific integrins, such as $\alpha \nu \beta 5$. Only Renca cells adhere well to Matrigel, which is in favor of high expression of LN-specific integrins such as $\alpha 6 \beta 1$ (39).

Taken together, we show in this study that the effect of ECM components on various RCC cell lines is heterogeneous varying according to RCC cell type and matrix with Col 1 being the main enhancer of tumor cell invasion, of MMP-2 and 9 activity and consequently to metastasis.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SM, SC, and WS contributed to data acquisition and statistical analysis. SM prepared the manuscript. AB and PA drafted this manuscript. PA supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from Inserm and Bordeaux University and from La Ligue Contre Le Cancer, region Aquitaine et Charentes to PA and grants from The Plan Cancer (Inserm) to AB. SM was supported by Région Nouvelle Aquitaine and by Fondation Groupama.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00625/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Effect of the different ECM components on the phenotype of Renca cells. Cells were cultured for 24 h on uncoated (Plastic) or Col

1, FN1, or Matrigel glass coverslips, fixed and stained with β -catenin antibody or with phalloidin (filamentous actin). Bar: 20 μ m. $N = 3$.

Supplementary Figure 2 | Effect of the different ECM components on the phenotype of 786-O cells. Cells were cultured for 24 h on uncoated (Plastic) or Col 1, FN1, or Matrigel glass coverslips, fixed and stained with β -catenin antibody or with phalloidin (filamentous actin). Bar: 20 μ m. $N = 3$.

Supplementary Figure 3 | Effect of the different ECM components on the phenotype of Caki-2 cells. Cells were cultured for 24 h on uncoated (Plastic) or Col 1, FN1, or Matrigel glass coverslips, fixed and stained with β -catenin antibody or with phalloidin (filamentous actin). Bar: 20 μ m. $N = 3$.

Supplementary Figure 4 | Effect of the different ECM components on heparanase mRNA expression. Relative mRNA levels for heparanase were

assessed by RT-qPCR after 24 h of RCC cells cultured on plastic, Col 1, FN1, or Matrigel. No heparanase mRNA were detected in Renca cells. $N = 4$.

Supplementary Figure 5 | Effect of the different ECM components on the expression of Zeb1 and 2, two transcription factors implicated in EMT. Relative mRNA levels for Zeb1 (A) and Zeb2 (B) were assessed by RT-qPCR after 24 h of RCC cells cultured on plastic, Col 1, FN1, or Matrigel. 786-O cells: $N = 4$. Caki-2 cells: $N = 5$.

Supplementary Figure 6 | Effect of the different ECM components on the expression of Snail 1 and 2, two transcription factors implicated in EMT. Relative mRNA levels for Snail 1 (A) and Snail 2 (B) were assessed by RT-qPCR after 24 h of RCC cells cultured on plastic, Col 1, FN1 or Matrigel. Renca cells, $N = 7$. 786-O cells: $N = 4$.

REFERENCES

- Mancini V, Battaglia M, Dittono P, Palazzo S, Lastilla G, Montironi R, et al. Current insights in renal cell cancer pathology. *Urol Oncol.* (2008) 26:225–38. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.05.017
- 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) 66:481–90. doi: 10.1111/pin.12433
- Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras.* (2015) 48:166–74. doi: 10.1590/0100-3984.2013.1927
- Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol.* (2009) 16:432–43. doi: 10.1111/j.1442-2042.2009.02302.x
- Meléndez-Rodríguez F, Roche O, Sanchez-Prieto R, Aragones J. Hypoxia-inducible factor 2-dependent pathways driving von hippel-lindau-deficient renal cancer. *Front Oncol.* (2018) 8:214. doi: 10.3389/fonc.2018.00214
- Kim JS, Song KS, Yu IJ. Multiwall carbon nanotube-induced DNA damage and cytotoxicity in male human peripheral blood lymphocytes. *Int J Toxicol.* (2015) 35:27–37. doi: 10.1177/1091581815598749
- Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol.* (1997) 10:537–44.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* (1982) 6:655–63. doi: 10.1097/0000478-198210000-00007
- Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Coulange C. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer.* (1995) 76:2543–9. doi: 10.1002/1097-0142(19951215)76:12<2543::AID-CNCR2820761221>3.0.CO;2-S
- Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Samarantunga H. Grading of renal cell carcinoma. *Histopathology.* (2019) 74:4–17. doi: 10.1111/his.13735
- Bæk Møller N, Budolfson C, Grimm D, Krüger M, Infanger M, Wehland M, et al. Drug-induced hypertension caused by multikinase inhibitors (Sorafenib, Sunitinib, Lenvatinib and Axitinib) in renal cell carcinoma treatment. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:4712. doi: 10.3390/ijms20194712
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* (2011) 144:646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:840. doi: 10.3390/ijms20040840
- Lohi J, Leivo I, Oivula J, Lehto VP, Virtanen I. Extracellular matrix in renal cell carcinomas. *Histol Histopathol.* (1998) 13:785–96.
- Droz D, Patey N, Paraf F, Chrétien Y, Gogusev J. Composition of extracellular matrix and distribution of cell adhesion molecules in renal cell tumors. *Lab Invest.* (1994) 71:710–8.
- Boguslawska J, Kedzierska H, Poplawski P, Rybicka B, Tanski Z, Piekliko-Witkowska A. Expression of genes involved in cellular adhesion and extracellular matrix remodeling correlates with poor survival of patients with renal cancer. *J Urol.* (2016) 195:1892–902. doi: 10.1016/j.juro.2015.11.050
- Best SL, Liu Y, Keikhosravi A, Drifka CR, Woo KM, Mehta GS, et al. Collagen organization of renal cell carcinoma differs between low and high grade tumors. *BMC Cancer.* (2019) 19:490. doi: 10.1186/s12885-019-5708-z
- Ou YC, Li JR, Wang JD, Chang CY, Wu CC, Chen WY, et al. Fibronectin promotes cell growth and migration in human renal cell carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:2792. doi: 10.3390/ijms20112792
- Bakhtyar N, Wong N, Kapoor A, Cutz JC, Hill B, Gherl M, et al. Clear cell renal cell carcinoma induces fibroblast-mediated production of stromal periostin. *Eur J Cancer.* (2013) 49:3537–46. doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.032
- Lohi J, Korhonen M, Leivo I, Kangas L, Tani T, Kalluri R, et al. Expression of type IV collagen $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$ polypeptides in normal and developing human kidney and in renal cell carcinomas and oncocytomas. *Int J Cancer.* (1997) 72:43–9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970703)72:1<43::AID-IJC6>3.0.CO;2-4
- Lohi J, Tani T, Leivo I, Linnala A, Kangas L, Burgeson RE, et al. Expression of laminin in renal-cell carcinomas, renal-cell carcinoma cell lines and xenografts in nude mice. *Int J Cancer.* (1996) 68:364–71. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19961104)68:3<364::AID-IJC15>3.0.CO;2-8
- Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes. *Mol Cancer Ther.* (2018) 17:1147–55. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0646
- Masola V, Zaza G, Gambaro G, Franchi M, Onisto M. Role of heparanase in tumor progression: molecular aspects and therapeutic options. *Semin Cancer Biol.* (2019) 62:86–98. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.014
- Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science.* (2017) 357:660. doi: 10.1126/science.aan2507
- Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med.* (1995) 1:822–6. doi: 10.1038/nm0895-822
- Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 α expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 α . *Carcinogenesis.* (2007) 28:529–36. doi: 10.1093/carcin/bgl143
- Brodaczewska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer.* (2016) 15:83. doi: 10.1186/s12943-016-0565-8
- Schokrpur S, Hu J, Moughon DL, Liu P, Lin LC, Hermann K, et al. CRISPR-mediated VHL knockout generates an improved model for metastatic renal cell carcinoma. *Sci Rep.* (2016) 6:29032. doi: 10.1038/srep29032
- Croissant C, Tuurihionoa A, Bacou M, Souleyreau W, Sala M, Henriet E, et al. DDR1 and DDR2 physical interaction leads to signaling interconnection but with possible distinct functions. *Cell Adh Migr.* (2018) 12:324–34. doi: 10.1080/19336918.2018.1460012
- Bachmann M, Kukkurainen S, Hytönen VP, Wehrle-Haller B. Cell Adhesion by Integrins. *Physiol Rev.* (2019) 99:1655–99. doi: 10.1152/physrev.00036.2018
- Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* (2003) 308:386–95. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01405-0

32. Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, et al. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* (2000) 275:12080–9. doi: 10.1074/jbc.275.16.12080
33. Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med.* (2019) 17:309. doi: 10.1186/s12967-019-2058-1
34. Wolfenson H, Yang B, Sheetz MP. Steps in mechanotransduction pathways that control cell morphology. In: Nelson MT, Walsh K, editors. *Annual Review of Physiology*, Vol. 81. Palo Alto, CA: Annual Reviews (2019). p. 585–605. doi: 10.1146/annurev-physiol-021317-121245
35. Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis. *Trends Cell Biol.* (2019) 29:212–26. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001
36. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15:178–96. doi: 10.1038/nrm3758
37. Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* (2012) 31:295–321. doi: 10.1007/s10555-012-9346-z
38. Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2008) 38:95–104. doi: 10.1165/rcmb.2007-0071OC
39. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* (2006) 119:3901–3. doi: 10.1242/jcs.03098
40. Eikesdal HP, Sugimoto H, Birrane G, Maeshima Y, Cooke VG, Kieran M, et al. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2008) 105:15040–5. doi: 10.1073/pnas.0807055105
41. Mikami S, Oya M, Shimoda M, Mizuno R, Ishida M, Kosaka T, et al. Expression of heparanase in renal cell carcinomas: implications for tumor invasion and prognosis. *Clin Cancer Res.* (2008) 14:6055–61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0750
42. Ilan N, Elkin M, Vlodaysky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* (2006) 38:2018–39. doi: 10.1016/j.biocel.2006.06.004
43. Fleming JM, Yeyeodu ST, McLaughlin A, Schuman D, Taylor DK. *In situ* drug delivery to breast cancer-associated extracellular matrix. *ACS Chem Biol.* (2018) 13:2825–40. doi: 10.1021/acscchembio.8b00396

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Majo, Courtois, Souleyreau, Bikfalvi and Auguste. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Implication des collagènes et de leur récepteur à domaine discoïdine DDR1 dans le développement des cancers du rein adultes et pédiatriques

Chez l'adulte, les cancers du rein ou carcinomes rénaux (RCC) comptent parmi les 20 cancers les plus diagnostiqués. Chez les enfants, les cancers du rein (constitués à 90% par des tumeurs de Wilms (WT)) constituent la 3^{ème} tumeur solide diagnostiquée. En l'absence de métastases le taux global de guérison est bon. Malgré cela, l'arsenal thérapeutique des RCC ou des WT est confronté à l'augmentation des résistances, à un manque d'efficacité ou provoque de lourds effets indésirables impactant la qualité de vie des patients (cancers secondaires, pathologies cardiaques etc.). L'absence de biomarqueurs dans ces cancers retarde et complique le diagnostic de ces tumeurs. Le développement et la progression tumorale dépendent des interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement. Ce dernier est constitué d'un élément non cellulaire, la matrice extracellulaire (MEC) et d'éléments cellulaires (fibroblastes, cellules immunitaires, adipocytes etc.) détournés au profit de la tumeur et favorisant sa progression. Mon projet de thèse s'est porté sur l'effet de la MEC et de ses récepteurs cellulaires sur le développement des cancers du rein adultes et pédiatriques. Le 1^{er} projet a consisté à évaluer l'impact de composants de la MEC (Collagène I, Fibronectine 1 et Matrigel) sur les caractéristiques phénotypiques de 3 lignées cellulaires de RCC (Renca, 786-O, Caki-2). Cette étude a permis de mettre en évidence que le collagène I est le principal modulateur du devenir des cellules de RCC favorisant la migration et l'invasion cellulaire, importantes pour la dissémination métastatique. Par la suite, l'utilisation des lignées Renca et 786-O a permis d'étudier le rôle du récepteur aux collagènes, DDR1, dans le développement des RCC. Ces cellules ont été modifiées d'une part pour surexprimer le récepteur (DDR1) ou une forme dominante négative (DDR1DN) et d'autre part pour inactiver son expression (DDR1 KO). L'utilisation de techniques 2D et 3D (sphéroïdes) a révélé un rôle antitumoral de DDR1, inhibant le développement tumoral *in vitro* et *in vivo* lorsqu'il est surexprimé. Étonnamment, l'inactivation du récepteur n'a aucun effet *in vitro* mais induit une forte inhibition du développement tumoral *in vivo* suggérant des modifications d'interactions entre la tumeur et son microenvironnement. Le 2^{ème} projet s'est intéressé au rôle de DDR1 dans le développement des WT. Une étude protéomique à partir des contingents pré-tumoraux et tumoraux a mis en évidence une forte dérégulation de l'expression des collagènes dans les tumeurs ainsi que des modifications de la signalisation intracellulaire liée aux intégrines et aux autres récepteurs de la MEC. La lignée tumorale pédiatrique WT-CLS1 a été modifiée pour surexprimer différents niveaux de DDR1 (DDR1-1 et DDR1-2) ou pour inactiver son expression (DDR1 KO). L'utilisation de sphéroïdes révèle que la surexpression de DDR1 induit un effet antitumoral *in vitro* en réduisant la croissance/le développement et la migration des sphéroïdes en présence de collagène I. En revanche, l'inactivation du récepteur *in vitro* ne diminuera que la migration cellulaire suggérant la présence d'autres acteurs (comme les intégrines) pouvant contrôler ces mécanismes en l'absence de DDR1. Ces résultats montrent que, dans les cellules tumorales des cancers du rein adultes et pédiatriques, la signalisation induite par le collagène I via son récepteur DDR1 doit être finement régulée afin de permettre un développement tumoral optimal. Ces deux projets apportent une meilleure compréhension des mécanismes de progression tumorale dans les cancers du rein et permettent l'identification de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés : Carcinomes Rénaux, Tumeurs de Wilms, Matrice extracellulaire, DDR1, Collagène, Sphéroïdes.

Involvement of collagens and their DDR1 discoidin domain receptor in the development of adult and pediatric kidney cancers

In adults, kidney cancer or renal cell carcinoma (RCC) is one of the 20 most diagnosed cancers. In children, Wilms' tumors (WT) represent 90% of kidney cancers and is the third solid tumors diagnosed. In the absence of metastasis the overall cure rate is good. Despite this, the therapeutic arsenal of RCCs or WTs is faced with increased resistance, a lack of efficacy or causes serious undesirable effects impacting the quality of life of patients (secondary cancers, cardiac pathologies, etc.). The lack of biomarkers in these cancers delays and complicates the diagnosis of these tumors. Tumor development and progression depend on interactions between cancer cells and their microenvironment. The latter consists of a non-cellular element, the extracellular matrix (ECM) and cellular elements (fibroblasts, immune cells, adipocytes, etc.) diverted for the benefit of the tumor and promoting its progression. My thesis project focused on the effect of ECM and its cell receptors on the development of adult and pediatric kidney cancers. The 1st project consisted of evaluating the impact of ECM components (Collagen I, Fibronectin 1 and Matrigel) on the phenotypic characteristics of 3 RCC cell lines (Renca, 786-O, Caki-2). This study demonstrates that collagen I is the main modulator of the fate of RCC cells, promoting cell migration and invasion, which are important for metastatic dissemination. Subsequently, the use of the Renca and 786-O lines made it possible to study the role of the collagen receptor DDR1, in the development of RCCs. These cells were modified on one hand to overexpress the receptor (DDR1) or a dominant negative form (DDR1DN) and on the other hand to inactivate its expression (DDR1 KO). The use of 2D and 3D techniques (spheroids) has revealed an anti-tumor role of DDR1, inhibiting tumor development *in vitro* and *in vivo* when overexpressed. Surprisingly, the inactivation of the receptor has no effect *in vitro* but induces a strong inhibition of tumor development *in vivo* suggesting modifications of the interactions between the tumor and its micro-environment. The 2nd project looked at the role of DDR1 in the development of WTs. A preliminary proteomic study using pretumor and tumor contingents revealed strong deregulation of collagen expression in tumors as well as changes in intracellular signaling linked to integrins and other ECM receptors. The pediatric tumor cell line WT-CLS1 has been modified to overexpress different levels of DDR1 (DDR1-1 and DDR1-2) or to inactivate its expression (DDR1 KO). The use of spheroids reveals that overexpression of DDR1 induces an antitumor effect *in vitro* by reducing the growth / development and migration of spheroids in the presence of collagen I. Inactivation of the receptor *in vitro* will only decrease migration suggesting the presence of other actors (such as integrins) that can control these mechanisms in the absence of DDR1. These results show that in adult and pediatric kidney cancers tumor cell, signaling induced by collagen I via its DDR1 receptor must be finely regulated in order to allow optimal tumor development. These two projects provide a better understanding of the mechanisms of tumor progression in kidney cancers and allow the identification of new biomarkers and new therapeutic strategies.

Keywords: Renal carcinomas, Wilms tumor, Extracellular matrix, DDR1, Collagen, Spheroids.