



Cancer du rein métastatique : Etude mécanistique d'une thérapie ciblée combinatoire et développement d'avatars pour la médecine personnalisée

Irinka Seraudie

► To cite this version:

Irinka Seraudie. Cancer du rein métastatique : Etude mécanistique d'une thérapie ciblée combinatoire et développement d'avatars pour la médecine personnalisée. Biologie du développement. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV009 . tel-04469807

HAL Id: tel-04469807

<https://theses.hal.science/tel-04469807>

Submitted on 21 Feb 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie du développement - Oncogenèse

Unité de recherche : Biologie et Biotechnologie pour la Santé

Cancer du rein métastatique : Etude mécanistique d'une thérapie ciblée combinatoire et développement d'avatars pour la médecine personnalisée.

Metastatic kidney cancer: Mechanistic study of a targeted combinational therapy and avatars development for personalized medicine.

Présentée par :

Irinka SERAUDIE

Direction de thèse :

Odile FILHOL-COCHET
INSERM

Directrice de thèse

Rapporteurs :

Gilles PAGES
DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM
Thierry MASSFELDER
DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM

Thèse soutenue publiquement le **20 février 2023**, devant le jury composé de :

Odile FILHOL-COCHET
CHARGE DE RECHERCHE, INSERM

Directrice de thèse

Gilles PAGES
DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM

Rapporteur

Thierry MASSFELDER
DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM

Rapporteur

Eva FAUROBERT
CHARGE DE RECHERCHE, CNRS

Examinateuse

Manuel THERY
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA

Examinateur

Catherine GHEZZI
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Présidente

Invités :

Claude Cochet
DIRECTEUR DE RECHERCHE EMERITE, Université Grenoble Alpes

Résumé

Le carcinome rénal à cellules claires (CRCC) est le cancer du rein le plus fréquent, souvent asymptomatique et de ce fait découvert à l'état métastatique (mCRCC) pour plus de 30% des patients. Les traitements actuels des mCRCC consistent en des thérapies kinases (TKI) et des immunothérapies, seules ou en combinaison, mais leur efficacité reste limitée. En particulier à cause de la résistance aux traitements mais aussi car les TKI ciblent majoritairement les mêmes protéines, limitant les options en cas de rechute. Par ailleurs, ces traitements ont été développés grâce à des modèles cellulaires peu représentatifs de l'hétérogénéité tumorale et de l'évolution clonale caractéristique des tumeurs métastatiques. Pour remédier à ce problème, plusieurs travaux récents ont décrit l'établissement et la caractérisation de tumoroïdes de CRCC dérivés de patients et il est établi que ces modèles récapitulent plus précisément les caractéristiques des tumeurs, en faisant un excellent avatar pour de futurs criblages et un modèle prédictif pour la médecine personnalisée. Sachant cela, nous avons produit un nouveau modèle de tumoroïde de CRCC à partir de tumeurs de souris et de patients, avec une méthode « scaffold-free » jamais utilisée dans le cadre de ce cancer. Nous avons démontré que nos tumoroïdes étaient représentatifs de l'hétérogénéité inter et intra-tumorale, et qu'ils reprenaient les caractéristiques majeures des tumeurs dont ils sont issus. En parallèle, nous avons développé une nouvelle combinaison de thérapie basée sur la létalité synthétique, ciblant de nouvelles protéines kinases jamais étudiées dans le cadre du CRCC. Un criblage haut débit nous a permis d'identifier les kinases CK2 et ATM comme cibles thérapeutiques. Nous avons constaté que leur inhibition combinée induisait une létalité synthétique sur des sphéroïdes de lignées de CRCC, sur des tumoroïdes, sur des coupes de tumeur de patients et *in vivo* sur des xénogreffes de cancer rénal chez la souris. De plus, les études mécanistiques ont révélé que la combinaison d'inhibiteurs induisait l'apoptose de manière HIF-2 α (Facteur inducible de l'hypoxie-2 α) et ROS (Espèces réactives de l'oxygène) dépendante, donnant une nouvelle option thérapeutique pour les patients atteint d'un mCRCC. Pour aller plus loin, nous avons décidé de concevoir un dispositif médical dans le but de prédire la réponse au traitement et le potentiel métastatique des tumeurs de patients. Une niche tumorale a été conçue contenant un hydrogel dans lequel nous plaçons nos modèles tumoraux de complexité variable (sphéroïdes, tumoroïdes, coupes de tumeur). Nous avons montré que cet hydrogel semble adapté pour discriminer les tumeurs selon leur potentiel invasif. D'autre part, nous avons développé différentes niches métastatiques afin d'évaluer le tropisme des cellules cancéreuses pour un organe en particulier, et nous nous concentrons aujourd'hui sur la conception d'une niche osseuse. A terme, ces deux niches seront regroupées dans une puce microfluidique afin d'étudier la capacité des cellules tumorales à envahir leur environnement et à aller coloniser un nouvel organe. D'autre part, notre objectif est d'utiliser ce dispositif afin d'évaluer la capacité anti-métastatique de nos inhibiteurs ainsi que d'autres traitements cliniques et expérimentaux.

Abstract

Clear cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC) is the most common kidney cancer, often asymptomatic and therefore discovered at the metastatic state (mRCC) in over 30% of patients. Current treatments for mRCC consist of kinase-targeted therapies (TKIs) and immunotherapies, alone or in combination, but their effectiveness remains limited. This is particularly true due to treatment resistance and because TKIs mostly target the same proteins, limiting the options in case of relapse. Furthermore, these treatments have been developed using cell-based models that are not representative of the tumor heterogeneity and clonal evolution characteristic of metastatic tumors. To address this problem, several recent works have described the generation and characterization of patient-derived ccRCC tumoroids and it is established that these models more accurately recapitulate tumor characteristics, making them an excellent avatar for screening and as predictive model for personalized medicine. We further decided to generate a new CRCC tumoroid model from mouse and patient tumors, with a scaffold-free method that was never used for this cancer. We demonstrated that our tumoroids were representative of inter- and intra-tumor heterogeneity, and that they reproduced the major characteristics of the tumors from which they were derived. In parallel, we developed a novel combinational kinase targeted therapy based on synthetic lethality, targeting novel proteins never studied in ccRCC. A high-throughput screen allowed us to identify the kinases CK2 and ATM as therapeutic targets. We found that their combined inhibition induced synthetic lethality in spheroids of ccRCC cell lines, in tumoroids, in patient tumor tissue slices and *in vivo* in mouse renal cancer xenografts. Furthermore, mechanistic studies revealed that the combination induced apoptosis in a HIF-2 α (Hypoxia Inducible Factor-2 α) and ROS (Reactive Oxygen Species) dependent manner, giving a new therapeutic option for patients with mRCC. To go further, we decided to design a medical device with the aim of predicting the treatment response and metastatic potential of patients' tumors. A tumor niche was designed containing a hydrogel in which we place our tumor models of varying complexity (spheroids, tumoroids, tissue slices). We have shown that this hydrogel seems to be adapted to discriminate tumors according to their invasive potential. On the other hand, we have developed different metastatic niches in order to evaluate the tropism of cancer cells for a particular organ, and we are now focusing on the design of a bone niche. Ultimately, these two niches will be combined in a microfluidic chip to study the ability of tumor cells to invade their environment and colonize a new organ. Furthermore, our goal is to use this device to evaluate the anti-metastatic capacity of our inhibitors as well as other clinical and experimental treatments.

Cette thèse est pour toi...



... Pour toujours et à jamais

When I couldn't, you always saw the best in me
Right or wrong, you were always on my side
But I'm scared of what life without you is like
And I saw the way I looked into your eyes

So how do I say goodbye
To someone who's been with me for my whole damn life?
You gave me my name and the color of your eyes
I see your face when I look at mine
So how do I, how do I, how do I say goodbye?

And there's no way you could ever let me down
Gonna steal some time and start again
You'll always be my closest friend
And someday we are gonna make it out
Just hold the light, just hold the light

Maman

Petite, tu m'aidais à construire mes cabanes, un refuge, une sécurité, dans un monde que j'entrevoyais déjà bien trop torturé. Refuge que tu trouvais aussi, dans ta pièce préférée, le grenier, ou tu peignais, sous la mélodie de Moby, résonnant ta créativité au travers des pièces de la maison. Forte d'ingéniosité tu as su trouver les subterfuges pour me faire déjeuner, jouer, parler et explorer.

Plus tard tu m'as montré la science. Tube à essai, portoir, eau, sel... Non NaCl soyons précises... à cela ajoutons du temps, de l'évaporation... Des cristaux étaient apparus. Tel une vraie scientifique je notais toutes mes expériences dans un petit cahier. La chercheuse était née.

Grâce à toi, comme toi, pour toi.

Mais ton métier, je ne le comprenais pas encore... Jusqu'à tard, tu buvais le café. C'était ça ton métier.

Au fil des ans tu continuas à explorer, la peinture ne suffisait plus. Je me souviens de cet après-midi-là, munie d'un chalumeau et de quelques morceaux de verre... Une nouvelle passion était née. Tu poursuivis cette nouvelle passion, si bien, tel l'artiste que tu étais, améliorant tes techniques et y mêlant sensibilité et créativité. Plats, bijoux, bulles... Tu es dans chaque œuvre représentée.

Plus tard, tu m'as appris à coudre, et aujourd'hui tu étais fière et impressionnée par ce que tu m'as donné. D'aiguille en aiguille j'assemble les pièces et je prends un peu de ton âme d'artiste.

En grandissant j'ai compris et tu m'as transmis. Chimie, physique, mathématique. J'ai exploré à tes côtés. Tu aimais la linéarité des formules, Silice, Cuivre, Graphène, je préférerais les multiples chemins que peut prendre une cellule, Oxygène, Hydrogène, Azote.

Maman, moi aussi je bois le café maintenant.

Grâce à toi, comme toi et avec toi.

Les samedis ensemble me manque terriblement : Nos conversations passionnées sur la vie, nos débats, enfin si on peut appeler ça comme ça quand on est toujours d'accord, tes conseils et ton soutien sur les combats intérieurs et extérieurs que je mène... Et tous tes conseils et nos échanges sur le métier de chercheuse.

Et en te lisant aujourd'hui je te vois, je te vois en moi et je me vois en toi... J'aurais aimé être autant là pour toi que tu l'as été pour moi, j'aurais aimé te donner la force d'y croire encore, et de te battre un peu plus.

Tu étais et resteras une femme d'une intelligence incroyable, contestataire et féministe, une experte scientifique et artiste de talent, et j'espère un jour devenir au moins la moitié de ce que tu étais.

Ma douleur est immense et irréductible.

Tu fais et feras toujours partie de moi.

Cette thèse elle est pour toi, j'espère que tu es heureuse ou tu es, apaisée des souffrances de la vie, que je comprends si bien. J'espère que tu es fière de moi.

Merci, d'avoir été la mère que tu as été, de m'avoir tant transmis et tout donné.

Je t'aimais, je t'aime et je t'aimerais... A jamais, Maman...

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les rapporteurs de ce jury de thèse, Dr. Thierry Massfelder et Dr. Gilles Pagès pour l'évaluation de ce manuscrit ainsi que les autres membres du jury : Dr. Manuel Théry, Dr. Eva Faurobert et Pr. Catherine Ghezzi. Merci pour votre présence lors de ma soutenance et merci à tous d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Merci à ma directrice de thèse, Dr. Odile Filhol, de m'avoir donné ma chance. Merci pour ces 4 années où tu m'as fait confiance et pour l'autonomie que tu m'as accordée. Tu m'as laissé faire mes propres choix de recherche, non sans débats d'opinions et désaccords, mais je crois que c'est ce qui permet de se construire un raisonnement et des opinions scientifiques fortes et justes. Merci pour ce que tu m'as appris, pour tes critiques constructives, tes suggestions et tes encouragements. Enfin, je te remercie de m'avoir fait devenir une vraie chercheuse ce qui me permet aujourd'hui de prendre mon envol.

Dr. Claude Cochet, tu m'as impressionné par ta constance, ton savoir, ta curiosité et toute la passion que tu mets dans tes lectures et tes manips. Merci d'avoir partagé tout ça avec moi, même si je ne serais certainement jamais à la hauteur de toutes tes lectures et de ta capacité à voir le beau dans toute chose. Je retiendrais tes « Journal Club » d'exception et ta capacité merveilleuse à nous embarquer avec toi dans des histoires scientifiques passionnantes. Merci aussi pour ton aide précieuse dans l'écriture de mon papier, les mots prennent toujours une dimension supérieure sous ta plume. Enfin, je te remercie de m'avoir fait ressentir à quel point tu étais fier de moi, en particulier en cette fin de thèse.

Cathy, une collègue, une coloc et une amie. Merci de m'avoir transmis ton savoir et tes compétences et pour tous ces moments partagés, qu'ils soient scientifiques ou personnels. Tu es une personne merveilleuse, compétente et pleine d'idées, si gentille et à l'écoute. Merci de m'avoir écoutée me plaindre parfois, de m'avoir rassurée sur mes compétences et d'avoir été là pour moi dans ce qui sera certainement le moment le plus difficile de ma vie. Et aussi pour tous les moments de joies que nous avons partagés, tous les jours au travail et lors de nos nombreux voyages à Lyon, Paris, Bordeaux, où on s'est souvent régalé, tant en rires et en partages, qu'en brunchs et autres diners. Merci tout simplement d'avoir été toi, et surtout d'être devenue mon amie, de m'avoir encouragée et accompagnée pendant ces 4 années. Tu vas beaucoup me manquer, et on se retrouvera c'est sûr, probablement autour d'un bon canelé !

Merci à la Team Pause-Café. Aux anciens Nicolas C, Nicolas L et Constance, le cœur avec qui tout a commencé, et à tous ceux qui s'y sont ajoutés, Caroline, Pauline, Bea, Margaux, Morgane, Kevin, Martial, Estelle, Fred (dans tes moments sociables et salaces), Christine (quand il fait assez chaud ou

pour parler couture), et tous ceux qui ont un jour participé et avec qui j'ai passé de super moments. Le café n'aura plus jamais la même saveur sans vous.

Nico C, c'est avec toi que tout a commencé, post-covid, avec des déjeuners en tête à tête à la cantine, où nous avons beaucoup partagé et où j'ai souvent pu bénéficier de tes bons conseils. Merci pour ta sensibilité, ta bonne humeur permanente et ta légèreté, tu es une bouffée d'air frais lorsque tu es au CEA, et on t'attend toujours avec impatience, car sans toi, il y a toujours un vide dans la team. Merci pour nos discussions et échanges dans les moments difficiles, et pour tous les apéros et diners où on s'est tant amusé. J'espère que tu auras ton bateau un jour, et qu'on arrosera ça avec un bon vin du Médoc, que je te ramènerai pour l'occasion. Tu vas beaucoup me manquer, mon collègue et ami !

Nico L, toi et moi on sait ce que c'est que d'être un accro du café, pendant lesquels on a souvent beaucoup partagé. Bon, moi je ne le boirai quand même pas froid, je crois donc que tu me bats !! Tu es d'une grande gentillesse, prêt à donner de ta personne pour les gens auxquels tu tiens, et à toujours rendre service ou partager ton savoir, même si tu es toujours débordé. Car oui, un talent comme toi est de toute part sollicité, et je suis impressionnée par ta capacité à être toujours disponible et à tout gérer. Merci aussi pour nos apéros et nos moments de joies partagées, merci de m'avoir écoutée me plaindre et partager mes petites galères, et enfin merci, cher collègue et ami, tu me manqueras beaucoup !

Constance, nous avons fait nos débuts ensemble, et nous n'étions peut-être pas parties sur le meilleur pied, mais je crois que beaucoup d'amitiés naissent comme ça. Discrète et humble, je t'ai vue t'ouvrir et t'épanouir au fil des ans et prendre de plus en plus confiance en toi, même si tu n'y crois pas toujours. Tu es devenue experte et scientifiquement éclairée, sur un sujet et dans un environnement pas toujours facile à vivre. Tu as aussi été une excellente collègue et amie, avec qui j'ai pu partager des cafés, des soirées (avec de la bière pour te sustenter de préférence), pendant lesquels nous discutions de la vie et nous plaignions du système, de l'avenir incertain, de la place de la femme ou encore de nos petits soucis. J'espère que tu trouveras la voie que tu veux emprunter, et je suis sûre que tu réussiras. Merci encore, tu me manqueras beaucoup !

Caro, tu as laissé un vide derrière toi, ma grande sœur du labo. « Merci de m'avoir appris à faire de super western blots » haha, et de m'avoir testée sur l'anode et la cathode, quelle prof assidue (j'espère avoir fait une variante au classique 😊). Et pour toutes les fois où tu m'as apportée ton aide et partagé tes connaissances. Merci aussi pour nos échanges, autour d'un pulco, sur la complexité des relations amoureuses et pour tes conseils pour arriver à mieux gérer mes relations interpersonnelles parfois difficiles. Tu m'as manqué en cette fin de thèse et je suis sûre que tes nouveaux collègues en diraient autant si tu t'en allais. A bientôt dans le private world !

Pauline, arrivée en cours de route tu as été une superbe découverte. Sociable, gentille et enthousiaste, tu nous égaies quand tu es là par ton rire si jovial. Femme impliquée et très compétente, tu as su relever les défis de la recherche publique, pas toujours aussi organisée qu'on le souhaiterait. Merci pour ton amitié, nos discussions et sorties au resto et au bar, ainsi que tous les moments d'échange au travail, tu me manqueras !

Bea, tu as été une étudiante d'exception, apprenant vite et bien, à l'écoute, impliquée et je pense avec un grand cœur, et je suis si heureuse de t'avoir transmis le flambeau. Je n'aurais pas pu rêver meilleure successeur, tu es vive, intelligente, honnête et toujours toi-même, et je suis persuadée que tu relèveras le défi de la thèse avec un grand succès. Merci pour nos moments de confidence et de partage, tu es toujours de bons conseils (même si normalement, c'est sensé être dans l'autre sens, c'est moi la vieille maintenant). Ne lâche jamais tes idées et tes envies, si tu as besoin, je serai toujours disponible pour échanger, je te souhaite le meilleur et te dis à bientôt !!

Claire, je n'aurais pas pu envisager meilleure collègue de bureau pendant ces 4 ans ou nous avons si souvent discuté. Tu es une femme géniale, certainement une super enseignante, si gentille, à l'écoute et tu sembles si discrète au départ. Mais j'ai découvert la combattante que tu es, tu m'as souvent impressionnée par la justesse et le cri du cœur que tu mets dans tes mots quand tu défends les situations d'injustice. Je suis très fière de t'avoir connue et je te souhaite le meilleure, tant pour ta petite famille que pour tes futures recherches.

A vous tous, vous m'avez redonné foi en moi, en l'humanité et en l'amitié, j'ai eu l'impression de pouvoir être moi-même pour la première fois, et ça, ça n'a pas de prix.

Enfin, merci à tous les autres collègues et interlocuteurs avec qui j'ai interagi pendant ces 4 années, en particulier à toute l'équipe IMAC, d'avoir contribué d'une manière ou d'une autre à la réussite de cette thèse.

A Angy, mon partenaire et homme de ma vie. Merci de m'avoir supportée et encouragée dans mes moments de doute, merci de m'avoir écoutée répéter mes oraux en boucle, pour certains tant de fois que tu aurais pu les refaire à ma place. Merci tout simplement d'être toi et de m'aimer comme tu le fais, de croire en moi, et de me suivre à l'autre bout de la France pour mon travail. Tu m'inspires chaque jour par la confiance que tu mets dans tes opinions et en tes choix ainsi que ton assurance à prendre des décisions importantes, même si tu es un peu tête parfois haha. Comme tu le dirais sûrement, ce n'est pas la fin de quelque chose mais le commencement de la vie (sans stress... ou pas), que j'espère toujours partager avec toi, afin de construire ensemble notre puzzle sans fin. Je t'aime mon amour.

Pour finir, merci à tous mes amis et à ma famille, Papa, Aéalle, Mélanie, Pauline, et à tous les autres, pour avoir toujours cru en moi.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	5
TABLE DES ABREVIATIONS	9

INTRODUCTION GENERALE : LE REIN ET LE CANCER..... 11

1. LE REIN : UN ORGANE AUX FONCTIONS ESSENTIELLES.....	12
1.1. Anatomie et Physiologie du rein	12
1.2. Fonctions du rein	14
2. LES CARCINOMES A CELLULES RENALES.....	15
2.1. Épidémiologie.....	15
2.2. Causes et facteurs de risques	16
2.2.1. Facteurs non génétiques.....	16
2.2.2. Facteurs génétiques	17
2.3. Les types de carcinomes rénaux	18
3. LE CARCINOME RENAL A CELLULE CLAIRE.....	19
3.1. Histopathologie et fréquence	20
3.2. Altérations génétiques sporadiques	21
3.3. Grade, Stade et Pronostic.....	25
3.4. Les traitements.....	28
3.4.1. Les cancers localisés	28
3.4.2. Les cancers métastatiques	28
3.5. Résistance thérapeutique et rechute	33
3.5.1. La résistance intrinsèque ou primaire	33
3.5.2. La résistance acquise ou secondaire	33

CHAPITRE I : ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE NOUVELLES COMBINAISONS

D'INHIBITEURS DE PROTEINES KINASES	41
------------------------------------------	----

INTRODUCTION.....	42
1. PRINCIPE DES THERAPIES COMBINATOIRES	42
2. ATM.....	43
2.1. Structure d'ATM	43
2.2. Fonction d'ATM	46
2.2.1. Voie canonique : réparation des dommages à l'ADN	46
2.2.2. Les autres voies de signalisation d'ATM	48
2.3. Rôle dans le cancer	52
2.4. Inhibiteurs et clinique	53

3 . CK2	55
3 . 1 . Structure.....	55
3 . 2 . Fonctions de CK2	57
3 . 2 . 1 . Implication de CK2 dans tous les « hallmarks » du cancer.....	57
3 . 2 . 2 . Implication de CK2 dans le CRCC.....	60
3 . 3 . Inhibiteurs et clinique.....	61
RESULTATS	64
1 . CONTEXTE DU TRAVAIL	64
2 . COOPERATIVE BLOCKADE OF CK2 AND ATM KINASES DRIVES APOPTOSIS IN VHL-DEFICIENT RENAL CARCINOMA CELLS THROUGH ROS OVERPRODUCTION	66
3 . DONNEES SUPPLEMENTAIRES ASSOCIEES A L'ARTICLE	88
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	100

**CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN NOUVEAU MODELE DE
TUMOROÏDE DE CARCINOME RENAL POUR L'ETUDE DU POTENTIEL METASTATIQUE
DES TUMEURS DE PATIENTS.** **104**

INTRODUCTION.....	105
1 . UNE TUMEUR, UN SYSTEME COMPLEXE ET HETEROGENE	105
1 . 1 . L'hétérogénéité tumorale	105
1 . 1 . 1 . L'hétérogénéité inter-tumorale.....	105
1 . 1 . 2 . L'hétérogénéité intra-tumorale	106
1 . 2 . Les cellules qui composent une tumeur et leur rôle	109
1 . 2 . 1 . Les Fibroblastes associés au cancer : CAF.....	109
1 . 2 . 2 . Les cellules du système vasculaire	112
1 . 2 . 3 . Les cellules immunitaires.....	114
1 . 3 . La matrice extracellulaire	121
1 . 3 . 1 . Composition & Rôle.....	122
1 . 3 . 1 . Modifications dans le cancer	136
2 . LE PROCESSUS METASTATIQUE.....	140
2 . 1 . Les grandes étapes	140
2 . 2 . Modes de migration, d'invasion et mécanismes	143
2 . 2 . 1 . La Migration Mésenchymateuse	144
2 . 2 . 2 . La Migration Amibioïde.....	149
2 . 3 . Angiogenèse	153
2 . 4 . Intravasation	157
2 . 5 . La survie dans la circulation.....	159

2 . 6 . <i>Extravasation</i>	160
2 . 7 . <i>Les niches métastatiques</i>	163
3 . DE LA CULTURE EN 2D A LA MODELISATION TUMORALE COMPLEXE.....	171
3 . 1 . <i>Histoire de la culture cellulaire</i>	171
3 . 2 . <i>La culture cellulaire 3D</i>	173
3 . 2 . 1 . <i>Les sphéroïdes</i>	173
3 . 2 . 2 . <i>Les organoïdes et tumoroïdes</i>	175
3 . 2 . 3 . <i>Les méthodes de production</i>	178
3 . 2 . 4 . <i>Comparaison des différents modèles</i>	183
3 . 3 . <i>La culture organotypique</i>	185
3 . 4 . <i>Les systèmes fluidiques : Organes sur puce</i>	188
OBJECTIFS DU PROJET ONCOTRAP	193
MATERIEL ET METHODES	196
1 . TESTS CELLULAIRES	196
1 . 1 . <i>Prolifération</i>	196
1 . 2 . <i>Migration</i>	196
1 . 3 . <i>Invasion</i>	196
2 . CONCEPTION DES NICHES METASTATIQUES	197
2 . 1 . <i>Production des BMS de foie et de poumon</i>	197
2 . 2 . <i>Co-culture 786-O et périostes</i>	198
RESULTATS	199
1 . DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE DE TUMOROÏDE DE CARCINOME RENAL POUR LA PREDICTION DE REPONSE AU TRAITEMENT ET L'EVALUATION DU POTENTIEL METASTATIQUE DES PATIENTS.....	199
1 . 1 . <i>Contexte</i>	199
1 . 2 . <i>Establishment of a new scaffold-free tumoroid model to investigate invasion and drug response in Renal Cell Carcinoma.....</i>	200
1 . 3 . <i>Résultats supplémentaires : Les tumoroïdes et organoïdes humains</i>	216
1 . 3 . 1 . <i>Culture des tumoroïdes dérivés de tumeurs humaines</i>	216
1 . 3 . 2 . <i>Caractérisation phénotypique des tumoroïdes</i>	218
1 . 3 . 3 . <i>Culture et caractérisation d'organoïdes</i>	220
1 . 4 . <i>Discussion et conclusion</i>	222
2 . ETUDE DE L'INVASION POUR LA PREDICTION DU POTENTIEL METASTATIQUE	224
2 . 1 . <i>Le modèle sphéroïde : établissement des conditions favorables à l'invasion</i>	224
2 . 1 . 1 . <i>Sélection de lignées cellulaires d'agressivité variable</i>	224
2 . 1 . 2 . <i>Sélection de l'hydrogel récapitulant les propriétés invasives</i>	226

2 . 2 . <i>Evaluation de la capacité invasive des tumoroides humains</i>	228
2 . 3 . <i>La culture organotypique comme outil prédictif.....</i>	230
2 . 3 . 1 . <i>Normalisation des échantillons</i>	230
2 . 3 . 2 . <i>Etude de l'invasion en hydrogel.....</i>	231
2 . 3 . 3 . <i>Identification des populations invasives.....</i>	236
2 . 4 . <i>Discussion et conclusion.....</i>	237
3 . DEVELOPPEMENT DE NICHE METASTATIQUES	242
3 . 1 . <i>Les poudres de poumon et de foie.....</i>	242
3 . 2 . <i>Les coupes de tissus frais</i>	244
3 . 3 . <i>La co-culture avec des périostes.....</i>	246
3 . 4 . <i>Discussion et conclusion.....</i>	247
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	249
CONCLUSION GENERALE.....	252
ANNEXE : RÔLE DU COLLAGENE VII DANS LA PROGRESSION TUMORALE	253
BIBLIOGRAPHIE.....	274

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Anatomie d'une coupe transversale de rein	13
Figure 2 : L'unité fonctionnelle du rein, le Néphron	14
Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer du rein dans le monde en 2020	15
Tableau 1 : Sous-types de Carcinome à Cellules Rénale les plus fréquents - Epidémiologie, Histologie et Caractéristiques principales	19
Figure 4 : Photo d'un Carcinome rénal à cellules claires et de coupes histologiques	20
Figure 5 : Evolutions génétiques sporadiques au cours de la vie d'une personne amenant à terme au développement d'un CRCC.	21
Figure 6 : Voie signalisation VHL-HIF en condition de normoxie et d'hypoxie	22
Figure 7 : Rôle de PBRM1, BAP1 et SETD2 dans le remodelage de la chromatine	23
Tableau 2 : Classification TNM : grades et stades.....	25
Figure 8 : Grades de Fuhrman.....	26
Tableau 3 : Score SSIGN pour un RCC localisé.	27
Figure 9 : Voies de signalisations et cibles thérapeutiques des inhibiteurs de kinases et de l'immunothérapie pour le traitement du mCRCC.....	31
Figure 10 : Recommandations cliniques de l'ESMO pour le traitement de première et seconde ligne du mCRCC.	32
Figure 11 : Mécanisme de résistance lysosomale des inhibiteurs de tyrosine kinase	34
Figure 12 : Voies de signalisation intracellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance	35
Figure 13 : Le microenvironnement tumorale et son rôle dans l'agressivité tumorale et la résistance au traitement.....	37
Figure 14 : Carte des domaines des protéines de la famille PIKK	43
Figure 15 : Carte de la protéine humaine ATM.....	44
Figure 16 : Structure tertiaire homodimérique et monomérique de la kinase ATM	45
Figure 17 : Etapes de la réparation de l'ADN après cassure double brin par recombinaison homologue.....	47
Figure 18 : Voie de signalisation et cibles d'ATM dans le cadre d'une cassure double brin d'ADN.	48
Figure 19 : Implication d'ATM dans les voies de signalisation de l'homéostasie cellulaire	49
Figure 20 : Métabolisme des ROS	49
Figure 21 : Les ROS induisent, par l'intermédiaire d'ATM, la localisation nucléaire de SOD1.....	51
Figure 22 : Les rôles d'ATM dans le cancer.	52
Tableau 4 : Les inhibiteurs d'ATM et leurs propriétés.	53
Figure 23 : Structure de l'holoenzyme CK2	55

Figure 24 : Implication de CK2 dans la stimulation et l'inhibition de protéines impliquées dans la carcinogénèse.....	58
Tableau 5 : Dérégulation de CK2 dans 11 types de cancers	59
Tableau 6 : Exemple d'inhibiteurs de CK2 et leurs propriétés.....	62
Figure 25 : Résumé graphique de l'étude de la co-inhibition de CK2 et ATM dans un modèle 3D de CRCC et sur de la culture organotypique.....	65
Figure 26 : Hétérogénéité intra-tumorale spatiale et temporelle.....	107
Figure 27 : Profil génétique et phylogénie d'un CRCC humain	108
Figure 28 : Les sources cellulaires des CAFs.....	110
Figure 29 : Voies de signalisation croisées entre les CAFs, les cellules cancéreuses, endothéliales et immunitaires.....	111
Figure 30 : Motif de formation des néo-vaisseaux dans le CRCC.....	113
Figure 31 : Rôle anti-tumorale des Lymphocytes B activés.	115
Figure 32 : Rôle pro-tumorale des Lymphocytes B régulateurs.....	116
Figure 33 : La matrice extracellulaire d'un épithélium sain.	121
Figure 34 : Assemblage des fibres de collagènes fibrillaires et exemple d'incorporations d'autres types de collagènes qui stabilisent la structure.	123
Tableau 7 : Description et localisation de la famille des collagènes.....	124
Figure 35 : Assemblage de la lame basale.....	125
Figure 36 : Structure de la fibronectine	126
Figure 37 : Structure des laminines et leur interaction avec les intégrines.....	128
Figure 38 : Assemblage des fibres élastiques constitué d'élastine et de micro-fibrilles de fibrilline. 129	129
Figure 39 : Structure des protéoglycans	130
Figure 40 : Cibles et structure des enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire	133
Figure 41 : Structure, signalisation et classification des intégrines et leurs ligands.....	135
Figure 42 : Remodelage de la matrice extracellulaire dans le cancer.....	137
Figure 43 : La cascade métastatique	141
Figure 44 : Modes de migration empruntés par les cellules cancéreuses	143
Figure 45 : Les étapes de la migration cellulaire dans une MEC en 3D	145
Figure 46 : Configurations cellulaires pendant la migration amibioïde.....	149
Tableau 8 : Différences cellulaires et moléculaires entre les migrations mésenchymateuses et amibioïdes.	151
Figure 47 : Les étapes de l'angiogenèse tumorale.....	154
Figure 48 : Organisation des vaisseaux dans les tissus normaux, tumoraux et après une normalisation par traitement anti-angiogénique	155

Figure 49 : Mécanismes et acteurs impliqués dans l'invasion et l'intravasation des cellules cancéreuses.	157
Figure 50 : Etapes de l'extravasation et les principaux acteurs.	161
Figure 51 : Les étapes de l'angiopellose.	162
Figure 52 : Etapes de la préparation des niches pré-métastatiques jusqu'à la formation de métastases.	164
Figure 53 : Interaction des cellules cancéreuses avec les cellules de l'os, du foie et des poumons. ..	168
Figure 54 : Biologie et organisation d'un sphéroïde en culture.	174
Figure 55 : Méthodes de culture 3D "scaffold-based".	179
Figure 56 : Méthodes de culture 3D « scaffold-free ».	180
Tableau 9 : Description, avantages et inconvénients des différentes techniques de culture cellulaire 3D.	182
Tableau 10 : Comparaison des modèles de culture cellulaire 2D et 3D au modèle PDX.	183
Figure 57 : Etapes de la culture organotypique (A) et la composition des coupes conservant l'hétérogénéité tumorale (B).	185
Figure 58 : Méthode de fabrication des puces microfluidiques en PDMS.	188
Figure 59 : Exemple d'organes sur puce développés.	189
Figure 60 : Exemples de dispositifs microfluidiques mimant les étapes de la cascade métastatique.	190
Figure 61 : Tumoroïdes dérivés de tumeurs humaines après maturation en culture	216
Figure 62 : Caractérisation phénotypique des tumoroïdes humains	218
Figure 63 : Culture et caractérisation phénotypique des organoïdes YB109S.	220
Figure 64 : Capacité de prolifération, de migration et d'invasion des lignées cellulaires 786-O, Caki-1 et ACHN.	224
Figure 65 : Capacité invasive des lignées dans différents hydrogels et milieux de culture	227
Figure 66 : Evaluation de la capacité invasive des tumoroïdes humains dans du TissueSpec Kidney. ..	229
Figure 67 : Culture organotypique classique et normalisée sous forme de punchs	230
Figure 68 : Evaluation de la capacité invasive de punchs dérivés de tumeurs de souris.	232
Figure 69 : Evaluation de la capacité invasive des punchs ACHN dans différents milieux de culture. ..	233
Figure 70 : Evaluation de la capacité invasive de punchs dérivés de tumeurs humaines.	235
Figure 71 : Caractérisation des cellules invasives d'une tumeur de souris.	237
Figure 72 : Expression ARN de certaines MMPs dans les lignées cellulaires.	238
Figure 73 : Développement des poudres d'organes décellularisés pour induire la formation de métastases.	243
Figure 74 : Culture de cellules tumorales sur des coupes de poumons de souris.	245

Figure 75 : Co-culture de cellules tumorales et de cellules osseuses 246

Figure 76 : Oncotrap : Puce microfluidique pour l'étude du potentiel métastatique 250

TABLE DES ABREVIATIONS

2D : 2 dimensions	EAT : Transition épithélio-amibioïde
3D : 3 dimensions	ELP : Elastin-like Protein
ADAMs : A Desintegrin And Metalloproteinases	EV : Vésicules Extracellulaires
ADAMT : ADAMs ayant un motif thrombospondine	FAP : Fibroblast Activation Protein
ADN : Acide desoxyribonucléique	FGF/FGFR : Fibroblast Growth Factor/Receptor
AMP-PNP : ATP analogue adenosine 5h-[β , γ -imido]triphosphate non hydrolysable	GAGs : Glycosaminoglycans
ARN : Acide ribonucléique	GP s : Glycoprotéines
AT : Ataxie Telangiectasie	GTP : Guanosine Triphosphate
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase	HIF : Hypoxia Inducible Factor
ATP : Adenosine TriPhosphate	IFN : Interferon
BAP1 : BRCA1-associated protein 1	IL : Interleukine
BMDC : Bone Marrow Derived Cell	iPSC : induced Pluripotent Stem Cell
BMS : Biomaterial scaffold	ISUP : International Society of Urological Pathology
CAF : Cancer Associated Fibroblast	IT : Immunothérapie
CAF s : Fibroblastes associés au cancer	JENH : Jonction des extrémités non-homologues
CCR : Carcinome à Cellules Rénale	LOX : Lysyl-Oxydase
CDB : cassures doubles brins	Ly : Lymphocyte
CK2 : Protéine kinase CK2	LyT/B : Lymphocytes T ou B
c-Met/MET/HGFR : Facteur de transition épithélio-mésenchymateux / Hepatocyte Growth Factor Receptor	MAT : Transition mesenchymo-amibioïde
Col1 : Hydrogel de Collagène I	MB : Membrane basale
CRCC : Carcinome Rénal à Cellules Claires	mCRCC : Carcinome rénal a cellules claires métastatique
CSCs : Cellules souches cancéreuses	MDC1 : Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
CTCs : Cellules tumorales circulantes	MDSC : Myeloid-derived suppressor cell
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte antigen 4	MEC : Matrice Extracellulaire
CXCL : CXC-motif ligand	MI : Matrice Interstitielle
CXCR : CXC-motif chemokine receptor	MMP : Matrix Metalloproteases
DCs : Cellules Dendritiques	MSC : Cellules Souches Mésenchymateuses

MT-MMP : Membrane Type Matrix Metalloproteases	RRH : Réparation par Recombinaison Homologue
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin	SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor 1
NAFs : Fibroblastes activés normaux	SETD2 : SET domain containing 2
NC : Néphrectomie Cytoréductive	SI : Système Immunitaire
NEC : Cellules endothéliales normales	TAM : Tumor Associated Macrophages
NK : Natural Killer	TC : Tube collecteur commun
NOX : NADPH oxydase	TCD : Tube contourné distal
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell	TCP : Tube contourné proximal
PBRM1 : protéine polybromo-1	TEC : Cellules endothéliales tumorales
PD1/PD-L1 : Programmed cell Death 1 / Ligand 1	TEM : Transition Epithelio-Mesenchymateuse
PDGF/PDGFR : Platelet-derived Growth Factor /Receptor	TEndM : Transition Endothélio-Mésenchymateuse
PDMS : Poly Dimethylsiloxane	TGF- β : Tumoral Growth Factor β
PDX : Patient-Derived Xenograft	TKI : Inhibiteur de Tyrosine Kinases
PEG : Polyéthylène glycol	TME : Transition Mesenchymo-Epithéliale
PGs : Protéoglycanes	Tspec : TissueSpec Kinney matrix
PI3K : phosphoinositide 3-kinase	VEGF/VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor / Receptor
PKC : Protéine kinase C	VHL : Von Hippel Lindau
PTEN : Phosphatase and tensin homolog	α-SMA : α -actine musculaire lisse
ROS : Reactive oxygen species	

INTRODUCTION GENERALE : LE REIN ET LE CANCER

1. Le rein : un organe aux fonctions essentielles

1.1. Anatomie et Physiologie du rein

Les reins sont deux glandes bilatérales en forme de haricot. Ils sont placés en arrière du péritoine, de part et d'autre de la colonne vertébrale. Chaque rein est enfoui et protégé par une masse graisseuse appelée capsule adipeuse ou loge rénale.

D'un point de vue macroscopique, le rein se compose de quatre parties distinctes (Figure 1): La capsule rénale, le cortex rénal, la médulla et le pelvis aussi appelé bassinet. La capsule est la membrane servant à maintenir tous les autres éléments fonctionnels du rein en place et à isoler l'organe vis-à-vis de la cavité péritonéale. Le cortex est une zone pâle, granuleuse, située sous la capsule rénale. Encore plus en profondeur, la médulla, correspondant à des masses de tissus coniques appelées pyramides de Malpighi. Chaque pyramide constitue avec le tissu cortical qui l'entoure un lobe rénal, qui sont au nombre de 8 à 18 par rein. Ces pyramides sont séparées par des colonnes de Bertin, parcourues de rayures, presque entièrement formées de faisceaux et tubules microscopiques parallèles. C'est à la limite entre le cortex et la médulla que les capillaires sanguins s'organisent pour rentrer en contact avec l'unité fonctionnelle du rein : le néphron. Les néphrons sont les unités permettant de fabriquer l'urine (Fonction du rein) et sont présents en multiples quantités dans chaque lobe rénal. La pointe de chaque pyramide, appelée papille rénale, est orientée vers l'intérieur et prend fin dans le calice. Le calice pourrait être affilié à un petit puis gros tube collecteur amenant l'urine dans le pelvis rénal/bassinet, lui-même joignant l'uretère, qui connecte le rein à la vessie pour le transport d'urine [1], [2].

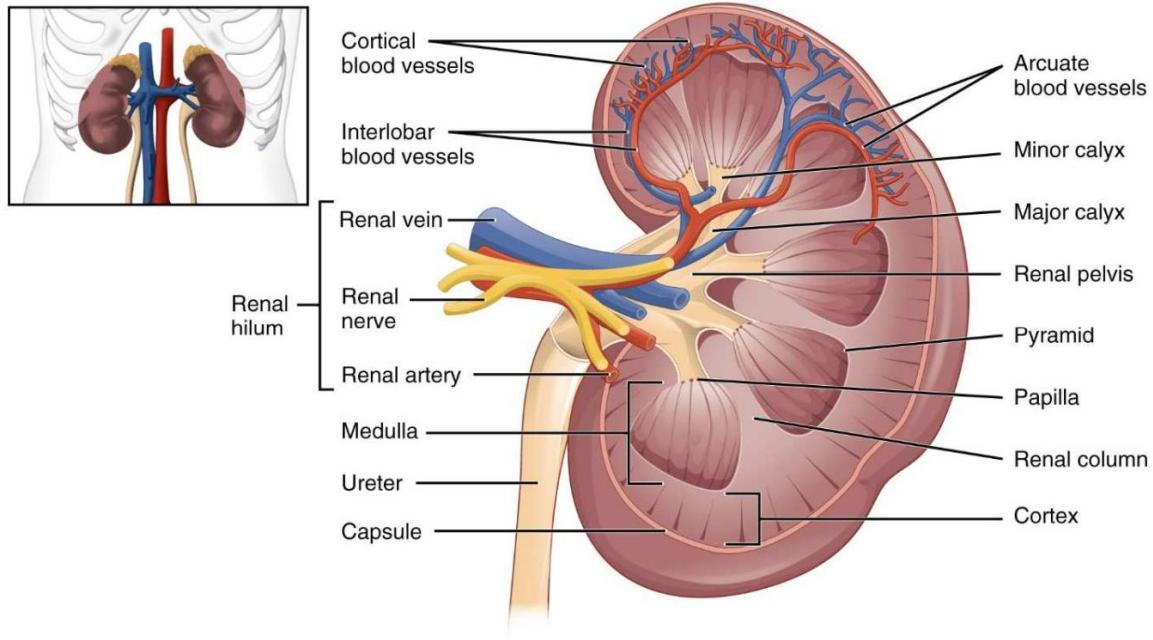
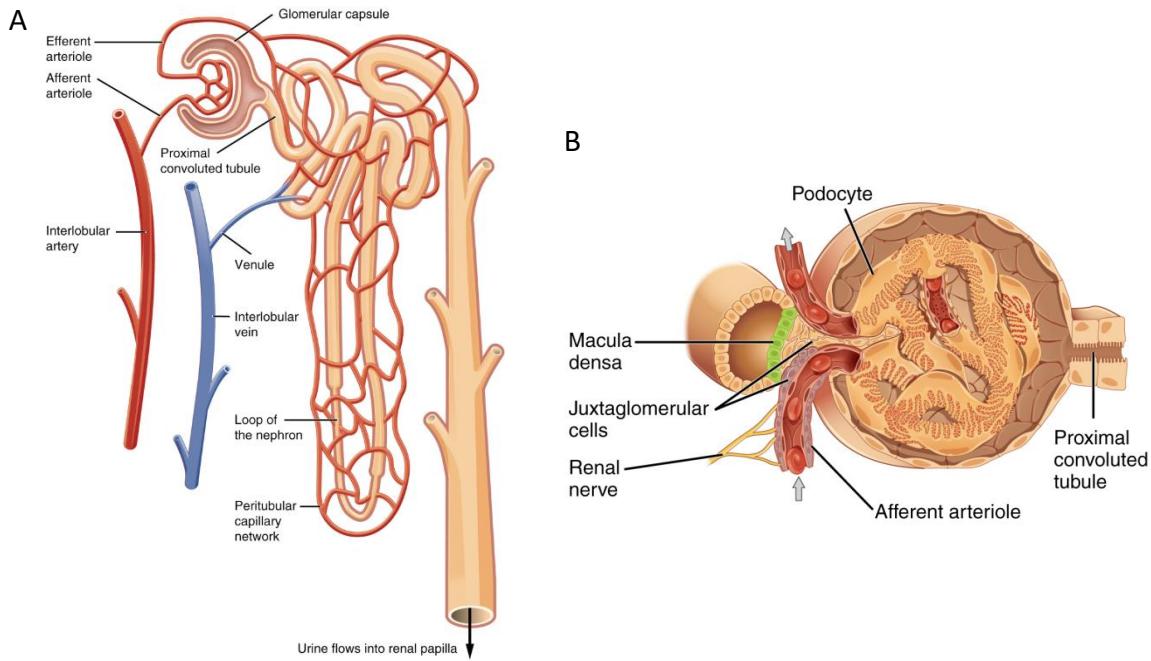


Figure 1 : Anatomie d'une coupe transversale de rein. [1]

D'un point de vue microscopique, le rein est composé de vaisseaux artériels et veineux et bien sûr de néphrons, l'unité fonctionnelle du rein, à raison d'un million par rein. Comme le montre la Figure 2, le néphron pourrait être décrit comme un long tube entremêlé de vaisseaux sanguins, comme en contact intime avec la circulation sanguine. C'est une unité morphofonctionnelle formée de deux parties : Le corpuscule de Malpighi, composé du glomérule et de la capsule de Bowman, et dont émerge les tubules urinaires. Plus précisément, le glomérule est un réseau de capillaires. Une artéiole afférente pénètre dans le corpuscule et se divise en 4 à 6 branches, puis en ressort via l'artéiole efférente qui s'entremêlera ensuite avec les tubules urinaires. Quant à la capsule de Bowman, elle entoure le glomérule et est formée d'un épithélium pavimenteux. La face interne de la capsule qui est en contact avec le glomérule, est formée de podocytes et nommée feuillet viscéral. La partie externe quant à elle correspond au feuillet pariétal, elle englobe l'ensemble du corpuscule et se prolonge pour former la chambre glomérulaire qui s'ouvre ensuite sur les tubules urinaires. Le corpuscule de Malpighi s'ouvre donc sur le tubule urinaire, lui-même partitionné en régions successives : Le tube contourné proximal (TCP), l'anse de Henlé, le tube contourné distal (TCD) puis le tube collecteur commun (TC) dans lequel l'urine fabriqué par plusieurs néphrons se déverse et nous verrons cela plus en détail dans la partie suivante ([Fonction du rein](#)).



1.2. Fonctions du rein

Vous l'avez probablement compris, le rein a pour fonction principale de fabriquer notre urine. C'est sa fonction exocrine. Le rein reçoit un flux sanguin de 1,05 L/min. C'est au niveau du Corpuscule de Malpighi que le sang est filtré à raison de 110 mL/min, amenant à la formation d'urine primitive. Le contact privilégié de l'artéole efférente avec les tubules rénaux va permettre une maturation de cette urine grâce à divers processus de réabsorption (H_2O , glucose, acides aminés...) et la sécrétion et donc l'élimination de certains éléments (NH_3 , urée...) qui sont les déchets du métabolisme. Finalement, c'est en moyenne 1,3 L d'urine qui est émis par jour. Ces réabsorptions et excréptions successives permettent un maintien de la pression osmotique (osmolarité) des fluides corporels ainsi que la régulation du pH via la réabsorption du bicarbonate par exemple. [3]

De manière complémentaire, le rein a une fonction endocrine [4][5]. Il produit :

- L'érythropoïétine : pour la maturation des globules rouges.
- La vitamine D3 : qui participe à l'absorption du phosphore et du calcium intestinal et qui intervient dans la minéralisation osseuse.

- La rénine : Transformée ensuite en angiotensine 1 par l'action de l'angiotensinogène qui est une globuline plasmatique produite par le foie et les cellules du TCP. L'angiotensine 1 est ensuite convertie en angiotensine 2 par l'enzyme de conversion (ECA). L'angiotensine 2 régule la pression artérielle, la libération d'aldostérone par la surrénale et le taux de réabsorption du sodium et de l'eau.

Pour finir, le rein est capable de gluconéogenèse en cas de jeûne. La glutamine et d'autres acides aminés sont convertis en glucose par transamination. L'ammoniaque produit, résultat de cette transformation, sera excrété dans l'urine et une partie pourra être réutilisée pour la production de protéines.

2 . Les Carcinomes à Cellules Rénale

2 . 1 . Epidémiologie

Le Carcinome à Cellules Rénale (CCR) est le 6^e cancer le plus fréquent chez les hommes et le 10^e chez les femmes. En Europe en 2020, l'incidence des cancers du rein était estimée à 138 611 nouveaux cas, ce qui représentait 2.2% des cancers nouvellement diagnostiqués. Cette incidence est plus forte chez les hommes avec 6,1% des cancers contre 3,2% chez les femmes. Parmi les décès par cancer, le cancer du rein représente 1,8% dans le monde soit 179 368 personnes. Encore une fois, la mortalité est plus importante chez les hommes (271 249 morts dans le monde) que chez les femmes (160 039) [6][7]. Le sexe est donc clairement associé aux risques comme le montre la Figure 3 issue du Globocan 2020.

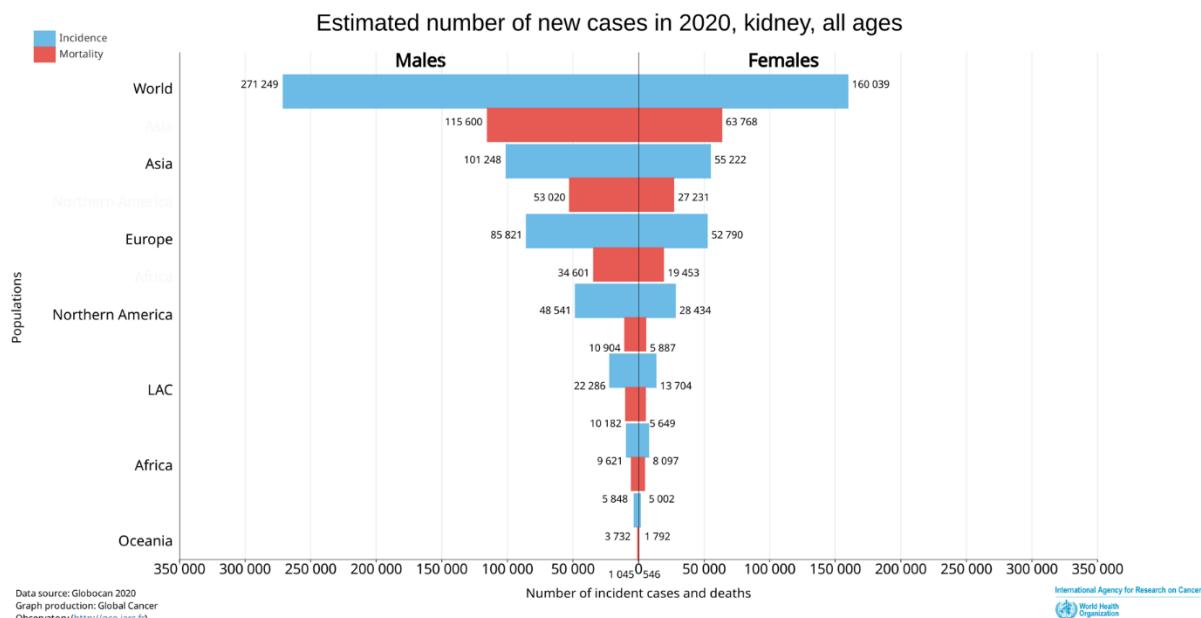


Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer du rein dans le monde en 2020.

L'étude épidémiologique de Znaor en 2015 montre par ailleurs qu'il y aurait une augmentation de l'incidence des CCR depuis 10 ans alors qu'au contraire la mortalité diminue. Ce phénomène peut être largement attribué au perfectionnement des techniques d'imagerie médicale permettant la détection de petites masses rénales. Cela contribue à augmenter de 50% l'incidence du CCR. Par ailleurs, les nouvelles thérapies ciblées et personnalisées contribuent à diminuer la mortalité dans les pays occidentaux [8], [9]. Pour finir, les cancers du rein sont en majorité une maladie qui touche les personnes âgées : 0,2% et 0,1% de risque d'être atteint avant 49 ans pour les hommes et les femmes, respectivement, contre 1,3% (homme) et 0,7% (femme) de risque après 70 ans [6].

2 . 2 . Causes et facteurs de risques

2 . 2 . 1 . *Facteurs non génétiques*

Tabac

La cigarette est considérée comme facteur de risque dans tous les CCR par l'Agence Internationale pour la Recherche contre le Cancer (IARC). Il a été démontré que la possibilité d'avoir un CCR augmentait de 50% chez les hommes et de 20% chez les femmes lorsque ces derniers fument [8], [10]. Certaines recherches suggèrent néanmoins que l'arrêt de la cigarette après 10 ans réduisait le risque à celui d'une personne non fumeuse [11], [10]. Le tabagisme augmenterait le risque due à l'hypoxie chronique provoquée par l'inhalation de monoxyde de carbone, ce qui cause des perturbations métaboliques et oxydatives. En effet, nous le reverrons par la suite, l'hypoxie joue un rôle prédominant dans la survenue des CCR, via l'implication de la voie de réponse à l'hypoxie, impliquant HIF (Facteur Inductible de l'Hypoxie) et VHL (von Hippel Lindau), souvent dérégulés et mutés dans ce cancer [12]. Pour finir, les substances carcinogènes présentes dans les cigarettes induisent inévitablement des dommages à l'ADN, conduisant à des risques plus élevés de développer un cancer de manière générale.

Obésité et Nutrition

Plusieurs travaux ont à ce jour validé le lien entre surpoids et risque de cancers. Il a été démontré grâce à des méta-analyses, qu'une augmentation de 5 kg/m² de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) était associée à une augmentation de l'incidence des CCR de 24% chez les

hommes et de 34% chez les femmes [8], [13]. Ljungberg et son équipe pensent que le taux d'exposition aux hormones œstrogène et androgène serait impliqué dans un des mécanismes expliquant cette différence [11]. De plus, l'origine ethnique des personnes en surpoids a une influence sur le risque de développer un CCR. En effet, le groupe Asiatique-Pacifique à une incidence de CCR plus élevée (31%) que les Nord-Américains (24%) et les Européens-Australiens (21%) [13].

Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents sont encore peu étudiés mais diverses explications sont proposées pour expliquer ce risque accru. Parmi lesquels, le dysfonctionnement du tissu adipeux, qui est le plus décrit et le plus accepté. Cette théorie comprend plusieurs mécanismes : le stress oxydatif et l'hypoxie chronique tissulaire, la peroxydation des lipides, l'insulino-résistance, l'augmentation de la synthèse de certaines adipokines, l'inflammation chronique causée par la synthèse de certaines cytokines ou encore l'augmentation de la synthèse des stéroïdes sexuels. L'influence du microbiote sur l'obésité et sur le risque de développer un cancer est aussi à ce jour un sujet émergent et très discuté. [14], [15]. Pour finir, plusieurs études ont démontré que la consommation de fruits et légumes, en particulier les crucifères, était associée à une réduction du risque de CCR.

Autres

En plus de la cigarette et l'obésité, le seul facteur de risque établi et validé est l'hypertension artérielle qui montre une association positive avec le CCR. Les autres facteurs suspectés corrélés avec le CCR sont : le diabète de type 2, le nombre de parturitions chez la femme avec dose-réponse en fonction du nombre de naissances et l'exposition au Trichloroéthylène, un dégraissant carcinogène. Au contraire, l'activité physique et la consommation d'alcool seraient inversement associées au développement d'un CCR. [8], [11], [15]

2.2.2. *Facteurs génétiques*

La maladie de Von Hippel-Lindau (VHL) est la plus commune des causes héréditaires de CCR. Un défaut de VHL, un gène suppresseur de tumeur (chromosome 3p25-26), conduit au développement de multiples lésions chez ces patients : Carcinome Rénal à Cellules Claires (CRCC) bilatéraux, Angiomes de la rétine, Hémangioblastomes ou encore Phéochromocytomes. 50% des patients développeront un CCR au cours de leur vie, qui est d'ailleurs la cause majeure de décès dans le cadre de ce syndrome.

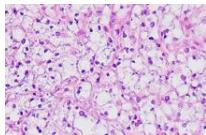
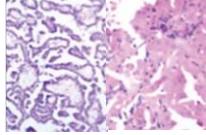
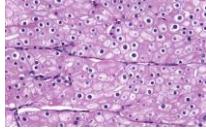
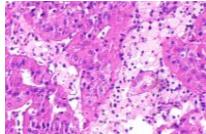
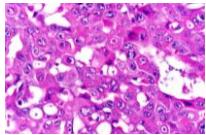
Beaucoup d'autres CCR sont d'origines génétique et héréditaire, mais très peu fréquents. Par exemple le CCR Papillaire Héréditaire est due à une activation constitutive du proto-oncogène c-Met (7q31). Il apparaît chez des patients jeunes et est moins agressif que son homologue sporadique. Au contraire, les personnes atteintes de Léiomyomatose héréditaire familiale due à un défaut de la fumarate hydratase (1q42-43) développeront un CCR Papillaire très agressif. Comme dernier exemple, un défaut de la Succinate Déshydrogénase (SDH) B ou D peut engendrer divers sous-types de CCR dont le CRCC, le CCR Chromophobe et le Papillaire.

Malgré cela, Les Carcinomes Rénaux héréditaires représentent seulement 4% de tous les CCR, le reste étant des cas sporadiques. [6]

2 . 3 . Les types de carcinomes rénaux

Vous avez déjà pris connaissance au fil du récit de certains sous-types de CCR et nous allons y revenir plus en détail dans cette partie. Leur classification est d'une importance majeure, leur pronostic et traitement étant différent. Il existe 6 grands sous-types dont leur description est synthétisée dans le Tableau 1 ci-dessous [9]. Il y a 3 sous-types supplémentaires très rares qui ne sont pas exposés dans ce tableau : Le Xp11-translocation, similaire au CCR Papillaire ou CRCC et touche les enfants ; le Tubulaire mucineux, qui atteint les néphrons distaux et les cellules tubulaires, touchant des patients ayant la quarantaine et enfin le CCR associé au neuroblastome, provenant des tubules proximaux et dont les patients sont adolescents (~ 13 ans). [9], [16]

Tableau 1 : Sous-types de Carcinome à Cellules Rénale les plus fréquents - Epidémiologie, Histologie et Caractéristiques principales. [Images prises sur webpathology.com]

Sous-type Histologie	Incidence	Origine	Age des patients	Comportement biologique	Associations Prédispositions
Cellules claires 	75%	Néphron proximal, épithélium tubulaire	> 50 ans	Agressif, fonction du stade, grade et de la transformation sarcomatoïde	Von-Hippel Lindau (25-45%) Sclérose Tubéreuse (2%)
Papillaire Type I Type II 	10%	Néphron distal, épithélium tubulaire	> 50 ans	Agressif, fonction du stade, grade et de la transformation sarcomatoïde	CCR Papillaire héréditaire
Chromophobe 	5%	Néphron distal, cellules intercalaires du tubule distal	> 50 ans	Très faible mortalité (10%)	Syndrome de Birt-Hogg-Dubé associé aux Oncocytomes
Solide Kystique 	1-4%	Similaire CRCC mais avec nodules solides	40-50 ans	Indolente, non métastatique	Prédominance chez les hommes
Carcinome de Bellini 	1%	Tube collecteur	> 50 ans	Très agressif, mortalité de 70% en 2 ans	Prédominance subtile chez les hommes
Médullaire 	1%	Néphron distal	20-30 ans	Extrêmement agressif	Associé à la drépanocytose

3 . Le Carcinome Rénal à Cellule Claire

3 . 1 . Histopathologie et fréquence

Le CRCC est le premier cancer urologique et représente 75% des tumeurs malignes du rein : 95% sont d'origine sporadique et les 5% restant sont associé à la maladie de Von-Hippel-Lindau [9]. Entre 20 à 30% des patients sont déjà à un stade métastatique au moment du diagnostic. Cela peut s'expliquer par le fait que 50% des patients seront diagnostiqués de manière fortuite, le CRCC ayant la caractéristique d'être asymptomatique. Malgré cela, la majorité des patients (60-70%) ont un cancer localisé. La survie à 5 ans est de 80-90% pour une tumeur localisée, et varie de 0 à 30% pour les tumeurs métastatiques en fonction de leur grade (Grade, Stade et Pronostic) [11], [17], [18]

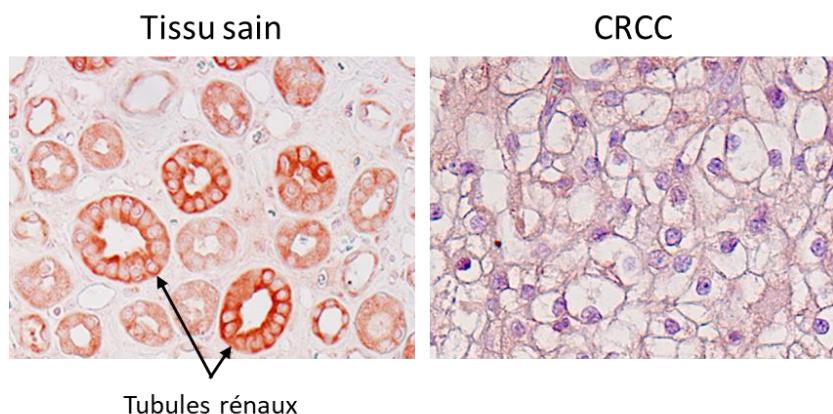
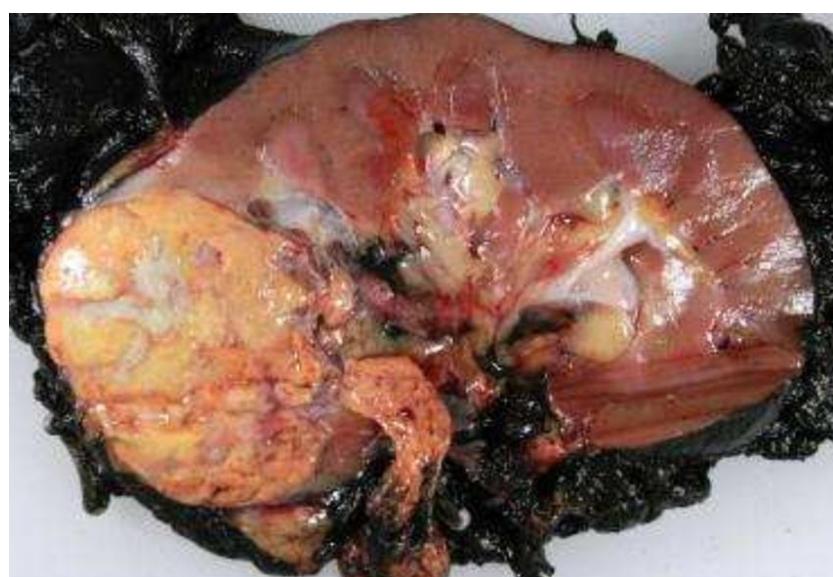


Figure 4 : Photo d'un Carcinome rénal à cellules claires et de coupes histologiques. La tumeur se situe sur la partie gauche du rein et est jaune due à sa composition riche en lipides. La coupe histologique « tissu sain » a été coloré avec le marqueur HIF1 α * et la coupe « CRCC » avec un marquage hématoxyline-éosine classique. *HIF1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α

Originellement, le CRCC a été défini de par son organisation histologique. Ce sont des tumeurs corticales de cellules épithéliales qui ont un cytoplasme plus large et blanc qui est presque dépourvu d'organelles. Le cytoplasme est en réalité rempli de lipides et de glycogène qui se dissolvent pendant le processus immunohistochimique, créant ce cytoplasme clair (Figure 4) [19].

3 . 2 . Altérations génétiques sporadiques

Le CRCC est caractérisé à 90% par une perte d'expression de von Hippel Lindau (VHL) [20]. Le gène VHL humain est encodé sur le bras court du chromosome 3 en position 3p25-26. Dans le cas d'un CRCC sporadique, des mutations ayant lieu dans le même type cellulaire induisent l'inactivation de VHL par délétion, mutation ou encore « silencing » épigénétique dans 70% ou plus des cas [19]. Récemment, Mitchell et al. ont séquencé 100 CRCC ce qui leur a permis de remonter les trajectoires mutationnelles évolutives aboutissant à la formation d'un CRCC. Ils ont réussi à prédire que la délétion d'un des chromosome 3p, au cours de l'adolescence, était l'initiateur de la maladie. La mutation du gène VHL restant arriverait donc dans les 5 à 20 années suivantes, et puisqu'il ne reste qu'une seule copie, cela accélèrera le développement du CRCC [21], [22] (Figure 5 [23]). Par ailleurs, les gènes présents sur la partie 3p tronquée, s'en voient aussi affectés et participent à l'évolution clonale et la progression tumorale [22].

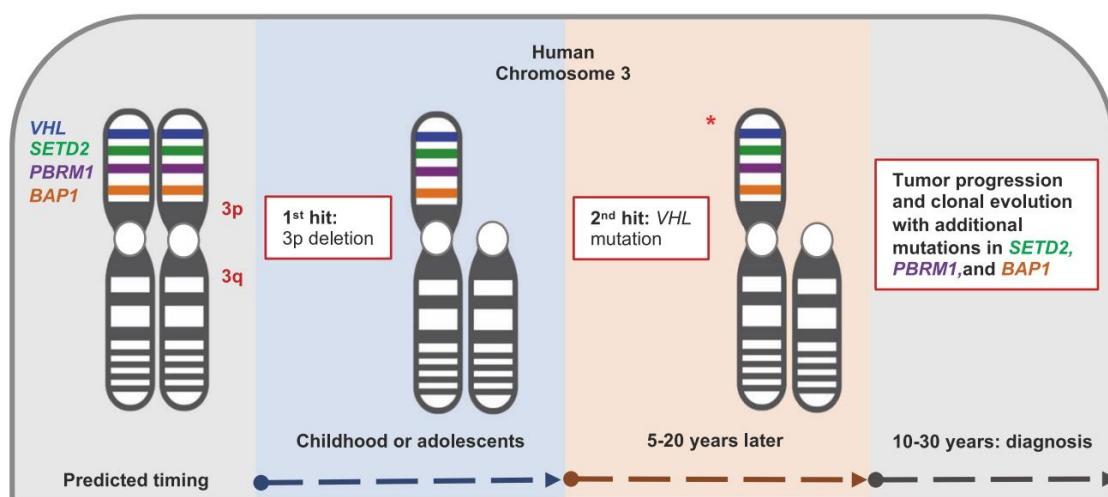


Figure 5 : Evolutions génétiques sporadiques au cours de la vie d'une personne amenant à terme au développement d'un CRCC.

Mutations de VHL

VHL fait partie du complexe E3-Ubiquitine ligase qui régule la stabilité du facteur inductible de l'hypoxie - α (HIF- α) qui est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'hypoxie. La voie de signalisation VHL-HIF est illustrée en Figure 6. En condition de normoxie, VHL poly-ubiquitine HIF- α préalablement hydroxylée sur deux prolines par une prolyl-hydroxylase. Cette ubiquitination conduit HIF- α à être dégradé par le protéasome. En condition d'hypoxie ou lorsqu'une mutation VHL l'a rendu non fonctionnelle, HIF- α est transloquée dans le noyau où il s'associe avec HIF- β , aussi appelé ARNT pour Aryl-hydrocarbon-receptor nuclear translocator. HIF- α va ainsi se lier à p300/CBP qui est un co-activateur transcriptionnel. S'en suit la transcription des facteurs de réponses à l'hypoxie que sont l'érythropoïétine, le récepteur du glucose Glut1, ou encore le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) [21]. Les mutations qui inactivent VHL participent donc au caractère agressif des CRCC en induisant une augmentation du métabolisme cellulaire, l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) impliquée dans le processus métastatique [24]–[26].

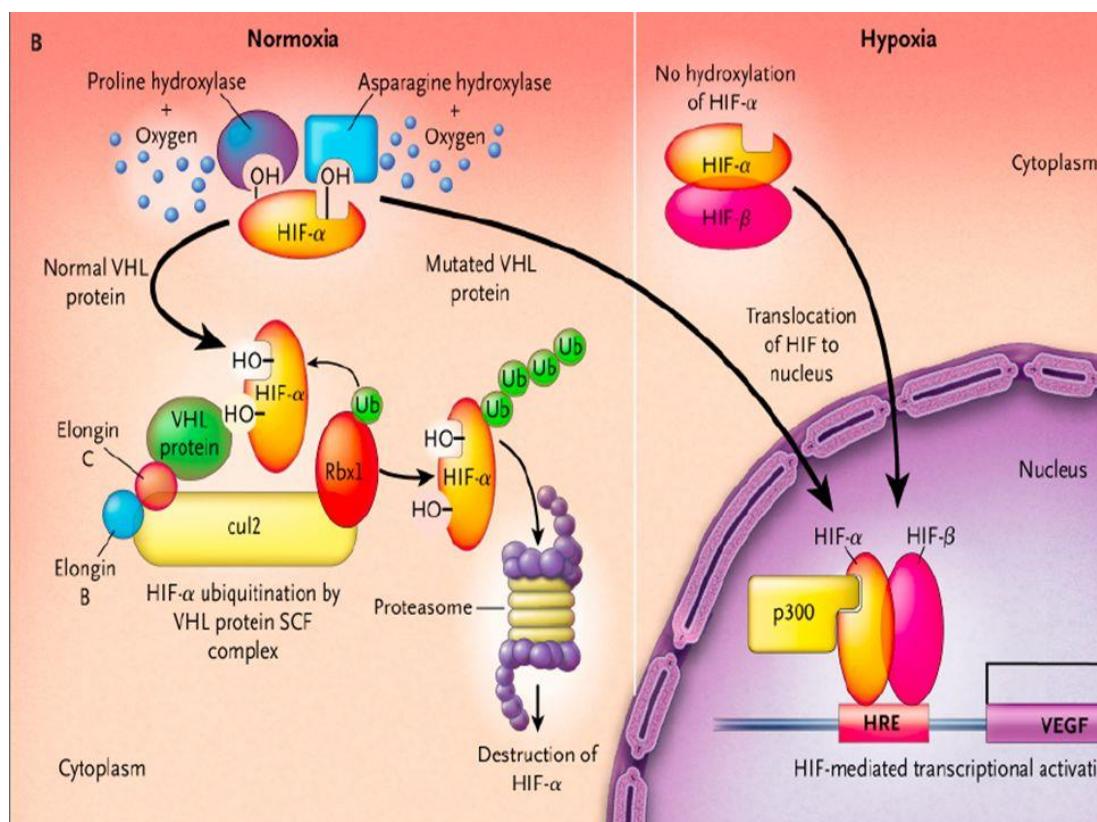


Figure 6 : Voie signalisation VHL-HIF en condition de normoxie et d'hypoxie.

[Image prise sur <https://slideplayer.fr/slide/10635965/>]

Mutations d'autres gènes

Comme observé dans la Figure 5, les mutations les plus fréquentes après VHL sont sur les gènes PBRM1, BAP1 ou encore SETD2 qui sont des suppresseurs de tumeur et tous les trois localisés comme VHL sur le chromosome 3p [23]. Ces trois gènes sont impliqués dans le remodelage de la chromatine par modification épigénétique d'histones comme le montre la Figure 7 [27].

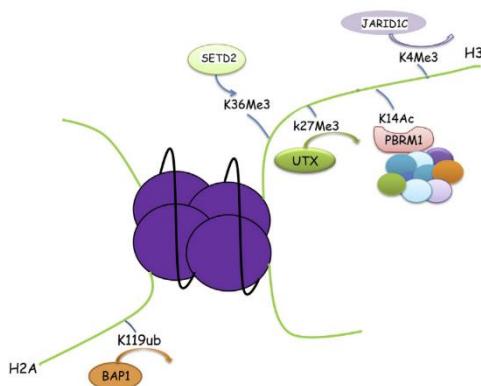


Figure 7 : Rôle de PBRM1, BAP1 et SETD2 dans le remodelage de la chromatine. [24]

Plus précisément, PBRM1 code pour la protéine polybromo-1 et est mutée dans 45% des CRCC [28]. Une délétion des deux gènes VHL et PBRM1 chez la souris induit la formation de tumeurs dans 50% des cas et elles exhibent les caractéristiques classiques des CRCC dont un cytoplasme clair et une accumulation de HIF- α [23][29]. L'absence de PBRM1 induit une altération de la cohésion cellulaire et donc un impact sur la mobilité [30]. Une mutation PBRM1 est donc un facteur d'agressivité et de potentiel métastatique élevé chez les patients.

BAP1 pour BRCA1-associated protein 1 est une histone deubiquitinase impliquée dans le remodelage de la chromatine et la réparation de l'ADN [27]. Une mutation ou délétion de ce gène a été identifiée dans 10 à 15% des CRCC. Ces mutations sont associées à des tumeurs de haut grade et des risques de rechute très importants post-chirurgie [23], [31]. En effet, le remodelage de la chromatine est essentiel à la cellule pour moduler l'expression de ses gènes. L'absence de BAP1 peut engendrer des augmentations/diminutions d'expression de gènes et empêcher les réparations sur l'ADN en cas d'erreurs lors de la réplication cellulaire par exemple. Cela peut conduire à une cascade mutationnelle et donc à une augmentation du nombre de clones augmentant à son tour l'agressivité tumorale.

SETD2 pour SET domain containing 2 est une histone lysine tri-méthylase, mutée dans 10 à 15 % des CRCC. L'impact exact de sa mutation sur la formation d'un CRCC reste flou car elle joue beaucoup de rôles : notamment, la répression transcriptionnelle, la réparation de l'ADN, l'accessibilité à l'ADN, les recombinaisons homologues ou encore l'activation de p53. Néanmoins, il a été démontré que les mutations SETD2 étaient plus fréquentes en combinaison avec une mutation PBRM1, ce qui suggère une coopération [23], [32], [33].

3 . 3 . Grade, Stade et Pronostic

La méthode utilisée pour évaluer le stade d'une tumeur est la classification TNM prenant en compte le grade de la tumeur primaire (pT, de 1 à 4), l'envahissement des ganglions lymphatiques (pN « nodes », de 0 à 2) et des métastases distantes (cM, de 0 à 1 et pM). La combinaison de ces 3 grades indique le stade tumoral allant de I à IV. La classification de ces grades est présentée dans le Tableau 2 ci-dessous [17].

Tableau 2 : Classification TNM : grades et stades.

Grade	Définition		
Tumeur primaire (T)			
Tx	La tumeur primaire ne peut être évaluée		
T0	Pas de tumeur primaire		
T1	T1a	Tumeur \leq 7 cm, limitée au rein	
	T1b	Tumeur \leq 4 cm	
		Tumeur $>$ 4 cm et \leq 7 cm	
T2	T2a	Tumeur $>$ 7 cm, limitée au rein	
	T2b	Tumeur $>$ 7 cm et \leq 10 cm	
		Tumeur $>$ 10 cm, limitée au rein	
T3	T3a	Tumeur qui s'étend dans les veines majeures ou les tissus périphériques mais pas dans la glande surrénale ipsilatérale et non au-delà du fascia de Gerota	
	T3b	Tumeur qui s'étend dans la veine rénale ou une branche segmentaire, ou qui envahie la graisse péri-rénale ou sinusale mais pas au-delà du fascia de Gerota	
	T3c	Tumeur qui s'étend dans la veine cave en dessous du diaphragme	
		Tumeur qui s'étend dans la veine cave au-dessus du diaphragme ou qui envahit les paroies de la veine cave	
T4		Tumeur qui envahit au-delà du fascia de Gerota, incluant des extensions contiguës à la glande surrénale ipsilatérale	
Ganglions lymphatiques (N)			
Nx	Les ganglions lymphatiques ne peuvent pas être évalués		
N0	Pas de métastases dans les ganglions régionaux		
N1	Métastases dans un ganglion régional		
N2	Plus d'un ganglion métastasé		
Métastases (M)			
cM0	Pas de métastases distantes cliniques		
cM1	Présence de métastases distantes cliniques		
pM1	Métastases distantes identifiées par biopsie		
Stade	T	N	M
Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M0
Stade III	T1-2	N1	M0
	T3	N0,1,2	M0
Stade IV	T4	N0,1,2	M0
	T1,2,3,4	N0,1,2	M1

Le grade tumoral est aussi évalué par les pathologistes grâce au système de Fuhrman qui se base sur la morphologie du noyau : diamètre, forme et proéminence des nucléoles (Figure 8 [32]). Ce système est très proche des grades ISUP pour « International Society of Urological Pathology » qui se basent sur la morphologie nucléaire et la proéminence des nucléoles. Ces systèmes de grade vont de 1 à 4 et comme on peut le voir dans la Figure 8D, le grade 4 est un CRCC presque méconnaissable avec un pléomorphisme nucléaire extrême et des cellules atypiques géantes [16], [34].

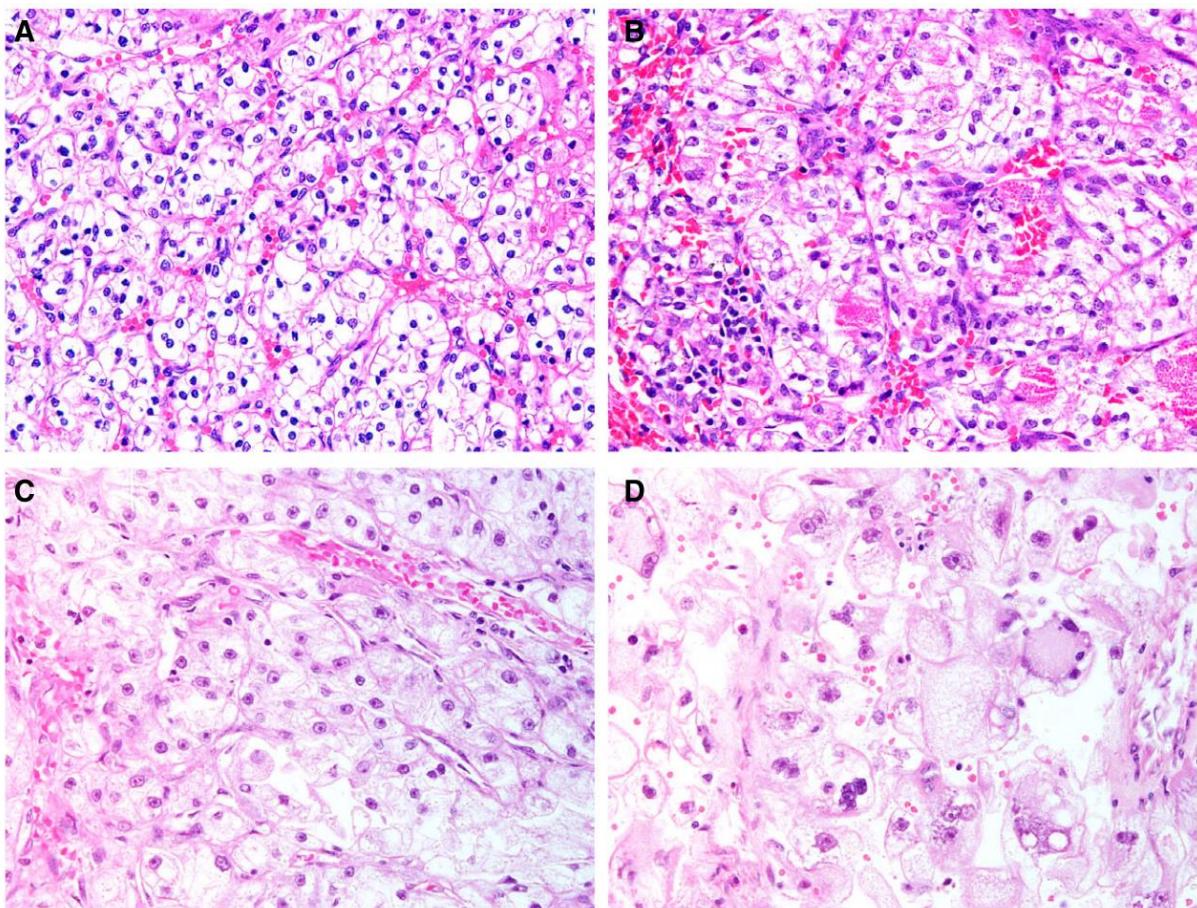


Figure 8 : Grades de Fuhrman.

A : Grade 1. B : Grade 2. C : Grade 3. D : Grade 4.

D'autres systèmes de gradations ont été développés ces dernières années, notamment le score SSIGN pour « Stage, Size, Grade and Necrosis » (Tableau 3). Il se base sur le TNM, la taille de la tumeur, le grade nucléaire ainsi que la présence de nécrose sur les coupes histologiques, donnant lieu à des scores de risques [35]. Aussi, le UISS pour « UCLA Integrated Staging System » qui prend en compte le grade de Fuhrman, le statut ECOG et le stade TNM. Le statut ECOG pour « Eastern Cooperative Oncology Group » correspond aux capacités physiques du

patient avec 0 pour complètement actif et jusqu'à 4 pour un patient complètement inactif, confiné dans un lit. Cette classification sépare les patients ayant une tumeur localisée ou métastatique et attribue un score de risque en fonction des 3 critères précédemment cités [20], [34]. Ces nouveaux systèmes de gradation complexes regroupant plusieurs paramètres permettent donc de lier stade, grade et données de survie et d'évaluer le pronostique du patient. Par exemple pour le score SSIGN, le risque est bas de 0 à 2, modéré de 3 à 5 et élevé au-dessus de 6 [36]. Le pronostic permet donc aux cliniciens de décider du parcours clinique le plus adapté au patient.

Tableau 3 : Score SSIGN pour un RCC localisé.

Paramètre	Score
Grade pathologique T de la tumeur primaire	
pT1a	0
pT1b	2
pT2	3
pT3a & pT4	4
Grade pathologique N des ganglions lymphatiques	
pNx & pN0	0
pN1 & pN2	2
Taille de la tumeur	
< 10 cm	0
10 cm ou plus	1
Grade de Fuhrman ou ISUP	
1 & 2	0
3	1
4	3
Nécrose tumorale à l'histologie	
Non	0
Oui	1

Score	Groupe	Survie sans métastases à 5 ans
0-2	Risque bas	97 %
3-5	Risque intermédiaire	74 %
6 ou plus	Haut risque	31 %

3 . 4 . Les traitements

3 . 4 . 1 . *Les cancers localisés*

Le traitement de première intention est la néphrectomie, partielle ou totale. Elle reste à ce jour le seul traitement curatif. Néanmoins, elle n'est indiquée qu'en cas de cancer localisé n'allant pas au-delà d'un thrombus de la veine cave inférieure [37]. Plus précisément, la néphrectomie partielle est indiquée jusqu'au grade T1a de tumeurs exophytiques, c'est-à-dire qui bourgeonne vers l'extérieur, ce qui préserve grandement la fonction rénale. La néphrectomie totale est indiquée au grade T1a si la tumeur est endophytique, c'est-à-dire qui bourgeonne vers l'intérieur et est plus envahissante, et du grade T1b à T4. Malgré cela, 30% des patients rechuteront après 10 ans, même après avoir été considéré comme en rémission. Aucun traitement adjuvant n'est à ce jour indiqué ou bénéfique, le seul moyen d'éviter une rechute trop grave est d'augmenter la surveillance pour pouvoir prendre la rechute à temps [17], [35], [38]. La néphrectomie partielle est aujourd'hui pratiquée par laparoscopie robotisée dans la majeure partie des cas. Le recours à cette technique chirurgicale est passé de 16 à 54% en 7 ans [39]. Il a d'ailleurs été démontré que cette nouvelle technologie de pointe réduisait grandement les saignements et les risques post-opératoires tels que les maladies chroniques rénales. La chirurgie ouverte reste la plus indiquée en cas de néphrectomie totale pour laquelle la taille de la tumeur à retirer est trop grande [40].

3 . 4 . 2 . *Les cancers métastatiques*

La chirurgie

Il est important de rappeler que 30% des patients sont diagnostiqués à un stade métastatique (mCRCC) puisque la maladie est asymptomatique. Pour ces patients la chirurgie de première intention est généralement exclue car il a été démontré que l'exérèse de la tumeur primaire renforçait l'angiogenèse et la prolifération des cellules des sites métastatiques [41]. Néanmoins, pendant plusieurs années, une néphrectomie cytoréductive (NC) était recommandée en première intention. En effet, la chimiothérapie et la radiothérapie étaient très peu efficaces sur le mCRCC et étaient utilisées en combinaison avec la NC. Depuis les années 2000, d'autres traitements ont été développés et deux études cliniques récentes, SURTIME et CARMENA, ont démontré que l'efficacité de la NC était très dépendante d'un patient à l'autre. Certains patients ont un réel bénéfice à faire une NC immédiate, pour

d'autres, c'est le traitement systémique ou encore un traitement puis une NC différée [17], [42], [43]. Le choix thérapeutique de recours à une NC doit donc être étudiée par une équipe clinique. Pour finir, il est possible d'avoir recours au traitement local des métastases via une métastasectomie. La première a été conduite en 1939 et des études plus récentes tendent à dire que la métastasectomie aurait un effet bénéfique lorsqu'elle est effectuée sur des patients ayant la tumeur primaire sous contrôle. Néanmoins, ces études sont à interpréter avec précaution car elles ont souvent été effectuées sans groupe contrôle et avec des patients ayant uniquement des métastases pulmonaires [44], [45], [46].

La chimiothérapie

La chimiothérapie a été introduite dans le traitement des mCRCC en 1980 avec l'utilisation de l'interféron alpha (IFN- α) et l'interleukine-2 (IL-2). Ces cytokines sont des médiateurs de l'immunité permettant la stimulation de cette dernière [47]. L'IFN- α est une glycoprotéine qui interfère avec la prolifération et l'angiogenèse ainsi qu'en activant le système immunitaire du patient. L'IL-2 quant à elle est un facteur de croissance des lymphocytes T qui promeut la maturation des lymphocytes T cytotoxiques [48].

Les Inhibiteurs de Kinase

La faible efficacité et la toxicité de la chimiothérapie a conduit la recherche à développer de nouveaux traitements efficaces. Depuis 2006, les inhibiteurs de tyrosine kinases (TKI) sont utilisés en clinique. Parmi les TKI, 8 sont actuellement autorisés en clinique (Figure 9). Le premier est le sunitinib, qui est depuis plus de 10 ans le traitement de référence, suivi par le pazopanib, l'axitinib et le sorafenib qui ciblent les récepteurs de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et le récepteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) [49], [50]. Le Temsirolimus et l'Everolimus agissent tous deux sur la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) [51]. Depuis 2015, de nouveaux traitements ciblant d'autres kinases et ayant des sites d'action multiples ont été approuvés. Ce sont le Lenvatinib et le Cabozantinib. Le Lenvatinib cible VEGFR et PDGFR mais aussi le récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR). Le Cabozantinib a une activité inhibitrice sur une dizaine de cibles dont en particulier VEGFR, le facteur de transition épithéial mésenchymateux c-Met (ou MET), aussi connu sous le nom de récepteur de facteurs de croissance des hépatocytes (HGFR), et le récepteur tyrosine kinase AXL [49], [52], [53]. On

constate qu'il y a beaucoup d'inhibiteurs de VEGFR ce qui est plutôt logique puisque les CRCC ont la particularité d'exprimer beaucoup de VEGF à cause de leur mutation VHL. Par ailleurs, de nombreuses études cliniques ont démontré que l'administration de ces TKI produisait une réponse immunitaire, favorisant l'infiltration des lymphocytes T effecteurs. Malgré cela, une augmentation de l'expression du Ligand de mort programmé PD-L1 et donc l'échappement immunitaire modère grandement son action [54].

L'Immunothérapie

En 2008, la recherche a fondé un grand espoir sur la première immunothérapie (IT) approuvée en clinique : Le bevacizumab. C'est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF à visée anti-angiogénique. Les CRCC ayant VHL muté expriment un taux très élevé de VEGF et le Bevacizumab a montré un bénéfice sur ces tumeurs en association avec l'IFN- α . Il est aussi actuellement en phase III d'essai clinique en association avec le l'atezolizumab et montre une meilleure survie sans progression que le sunitinib [55], [56]. L'atezolizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le ligand de mort programmé 1 (PD-L1), exprimé par les cellules cancéreuses pour échapper aux lymphocytes T (LyT), et a démontré une bonne activité pour certains patients avec un mCRCC avancé [56]. Le nivolumab (2015) et très récemment le pembrolizumab (2021) sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur du ligand PD-L1, appelé PD1, exprimé par les LyT. Le nivolumab a longtemps été indiqué pour les mCRCC avancés en seconde intention après avoir reçu un traitement anti-angiogénique de type sunitinib [57], car comme nous l'avons vu, ils ont tendance à induire une augmentation de l'expression de PD-L1, faisant du nivolumab le médicament le plus indiqué. Le pembrolizumab a quant à lui montré une augmentation de la survie sans rechute pour des patients ayant subi une néphrectomie et ayant un haut risque de rechute [58]. Pour finir, l'ipilimumab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène des lymphocytes T Cytotoxiques (CTLA-4). Il a longtemps été indiqué en seconde intention pour les mCRCC agressifs et a fait l'objet d'un essai clinique de phase III en association avec le nivolumab montrant des résultats très prometteurs [57]. Les cibles de ces immunothérapies sont illustrées dans le Figure 9 [47].

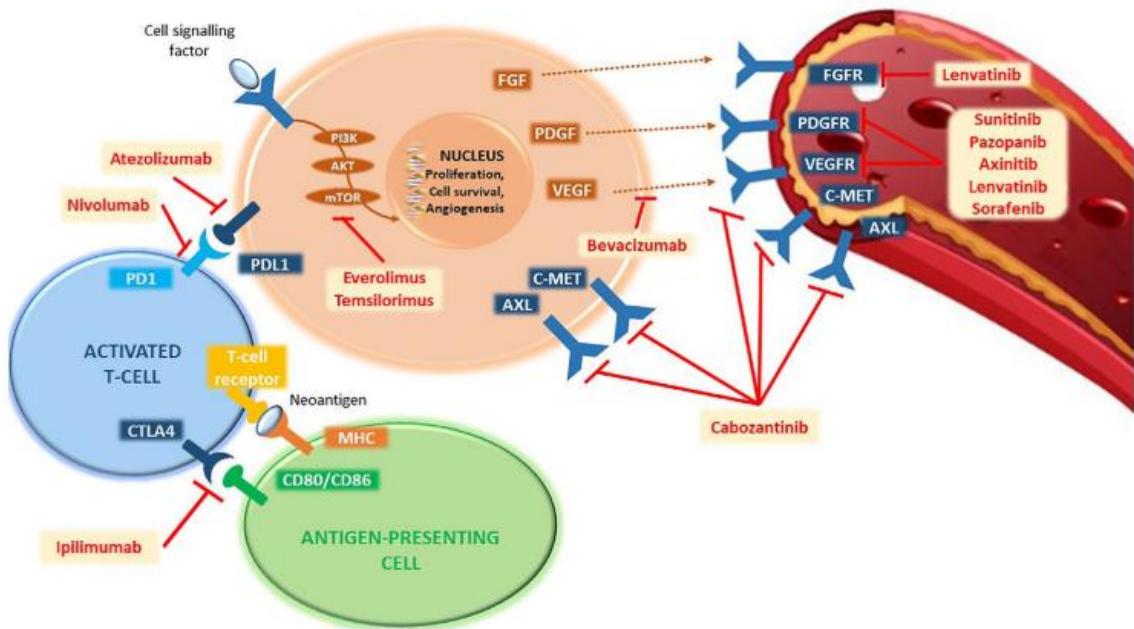


Figure 9 : Voies de signalisations et cibles thérapeutiques des inhibiteurs de kinases et de l'immunothérapie pour le traitement du mCRCC. [47]

Application clinique : Les recommandations actuelles

Le sunitinib fut pendant près de 10 ans le traitement de référence pour le mCRCC [17]. Néanmoins, de nombreux essais cliniques mettant en lumière l'efficacité des thérapies combinatoires comparé au sunitinib, ont induit un tournant majeur aux recommandations cliniques pour traiter un mCRCC. Le principe des thérapies combinatoires est détaillé dans l'introduction du chapitre 1 ([Principe des thérapies combinatoires](#)). Ces combinaisons sont soit des TKI-IT soit IT-IT comme par exemple les essais de phase III Keynote-426 [59] et CheckMate 214 [60] qui évaluent l'efficacité du pembrolizumab plus l'axitinib et du nivolumab plus ipilimumab, respectivement. Tout d'abord, concernant les patients dont la tumeur est opérable, le pembrolizumab peut être donné de façon optionnelle aux patients ayant un haut risque de rechute. En cas de rechute au bout d'un an, le traitement de première intention est une des combinaisons contenant un anti-PD-1. Une métastasectomie reste aussi une alternative mais elle requiert une décision patient-dépendante par une équipe de cliniciens pluridisciplinaires. Néanmoins, toute résection incomplète est fortement proscrite [58]. Le traitement de première ligne pour les patients non opérables dépend du risque associé au patient. Les patients ayant un risque favorable d'une part et ceux ayant un risque intermédiaire voir mauvais de l'autre. Tous les traitements recommandés à ce jour sont des combinaisons TKI-IT ou IT-IT. Le traitement de seconde intention quant à lui reste identique

aux deux groupes, ce sont soit des TKI soit des IT en monothérapie, excepté la combinaison Lenvatinib-Everolimus.

Les recommandations de traitements sont exposés dans la Figure 10, provenant des recommandations de la société européenne pour l'oncologie médicale (ESMO) [58]. Dans le cas d'une IT indisponible ou d'une contre-indication pour un patient, le traitement de première ligne est le Sunitinib pour les patients à risque favorable et le Cabozantinib pour les patients à risque intermédiaire et élevé [49].

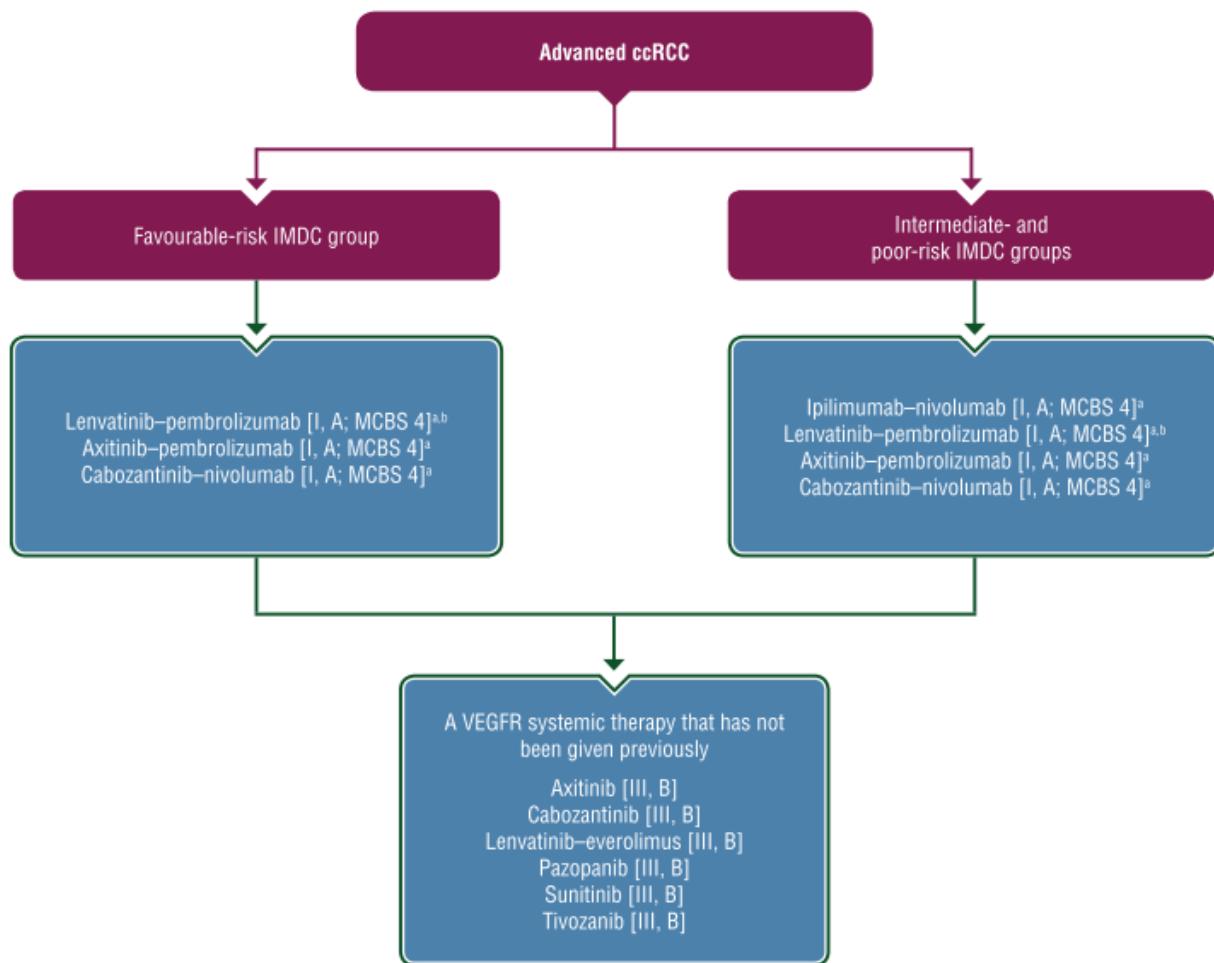


Figure 10 : Recommandations cliniques de l'ESMO pour le traitement de première et seconde ligne du mCRCC.

3 . 5 . Résistance thérapeutique et rechute

La survie à 5 ans pour un cancer du rein métastatique est passé de 8 à 14% ces dernières années, en particulier grâce au développement des thérapies combinatoires. Une des causes majeures de ce chiffre, qui reste faible, est la résistance thérapeutique induisant les rechutes. La résistance peut être primaire intrinsèque ou secondaire acquise [61].

3 . 5 . 1 . *La résistance intrinsèque ou primaire*

La résistance intrinsèque correspond à une caractéristique propre à la tumeur de départ [50]. Par exemple, l'absence de la cible PD-1 ou PD-L1 dans le cadre d'une immunothérapie les ciblant rends le traitement moins efficace. Certaines dérégulations des voies de signalisation spécifiques au CRCC peuvent aussi être responsables d'une résistance primaire. Par exemple, l'augmentation de l'expression de la kinase Polo-like 1 (Plk1), impliquée dans l'initiation de la mitose et dont la transcription est régulée par HIF-2, engendre des tumeurs résistantes au Sunitinib. Les tumeurs ayant un VHL muté et exprimant fortement HIF-2 sont hautement susceptibles d'être résistantes de façon intrinsèque. Un haut niveau d'expression de Plk1 pour les CRCC est d'ailleurs corrélé avec une diminution de la survie [62]. De plus, une étude utilisant le Sunitinib en traitement de première ligne entre 2008 et 2012 a montré que 25% des patients présentaient une résistance primaire au traitement [63]. Pour finir, une mutation de la cible peut être une des causes de la résistance au traitement, comme cela a été démontré pour mTOR dans le cas d'un traitement par le Temsirolimus [64].

3 . 5 . 2 . *La résistance acquise ou secondaire*

La résistance acquise se caractérise par une croissance tumorale après une régression constatée suite à un traitement [61]. Les mécanismes de résistance mis en jeu par les cellules cancéreuses sont très complexes et variés. Plusieurs études ont fait la preuve de différents mécanismes de résistance comme l'adaptation métabolique avec un transfert de la glycolyse vers la lipolyse [65], l'aide apportée par le microenvironnement tumoral [66] ou encore la reprogrammation des cellules pour initier une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [67]. Les mécanismes de résistance majeurs sont détaillés ci-après.

La séquestration Lysosomale

L'influence de l'activité lysosomale sur l'efficacité des TKI a été démontrée dans le cadre de plusieurs thérapies et plusieurs cancers [68]. La plupart des TKI étant perméables, ils rentrent

facilement dans les cellules en traversant directement la membrane plasmique [61]. Autrement, ils rentrent via des transporteurs membranaires comme le transporteur de solutés SLC [68]. La résistance par séquestration lysosomale est majoritaire au cœur de la tumeur, car il est vascularisé de façon anarchique et donc reçoit des concentrations sous optimales de TKI. A ces concentrations, il a été montré que le Sunitinib s'accumulait dans les lysosomes en suivant le mécanisme exposé dans la Figure 11 [68]. En effet, le Sunitinib, hormis son action sur sa cible, stimule l'expression des transporteurs d'efflux comme par exemple ABCB1 (pour « ATP-Binding cassette, sub-family B, member 1 »). Cela favorise la séquestration lysosomale et la protonation du TKI ainsi que l'éjection de la molécule par la cellule via ces mêmes transporteurs placés à la membrane plasmique [68], [69]. De plus, Gotink et al. ont démontré que la résistance lysosomale acquise par traitement au Sunitinib générait une résistance croisée pour le Pazopanib (VEGFR-TKI), l'Erlotinib (EGFR-TKI) ou encore le Lapatinib (EGFR-TKI) mais pas pour l'Everolimus (mTOR-TKI). Ils ont aussi noté une réversibilité de la résistance lorsque le traitement est administré de manière séquentiel [70]. Ces études sont clés pour l'administration en clinique et pour décider du schéma thérapeutique des TKI. En partie sur la potentialité d'une administration médicamenteuse séquentielle pour éviter les mécanismes de résistance.

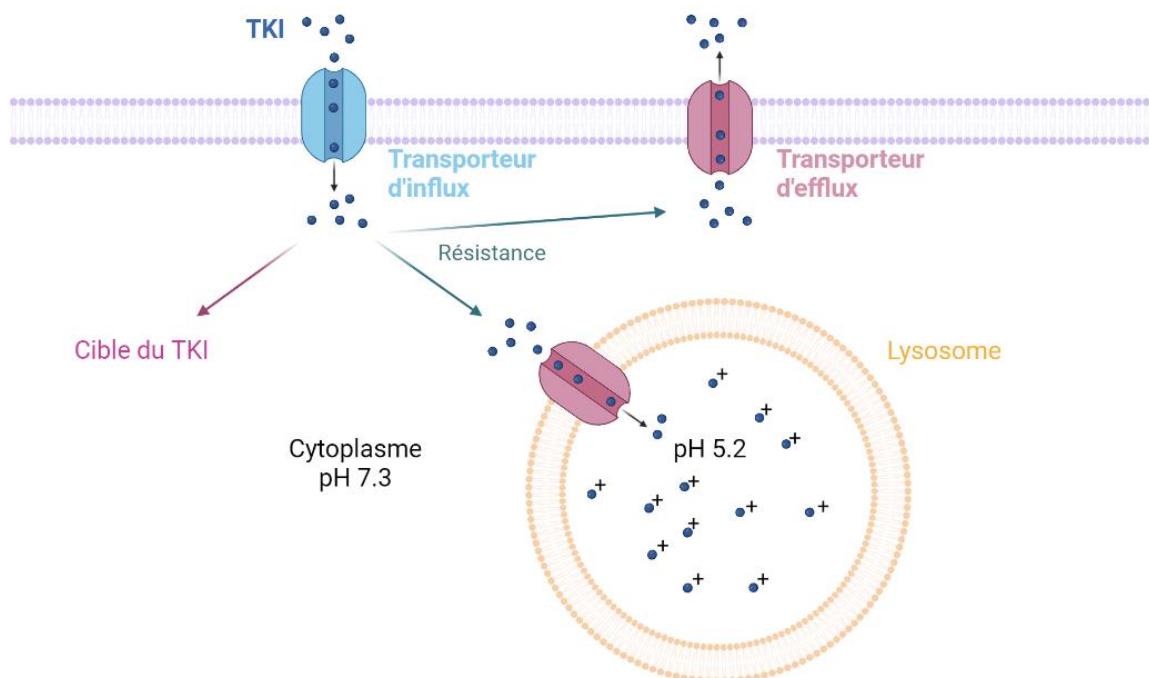


Figure 11 : Mécanisme de résistance lysosomale des inhibiteurs de tyrosine kinase. Les TKI entrent dans la cellule via les transporteurs de solutés d'influx pour agir sur leur cible. La résistance lysosomale se fait par transport des TKI dans les lysosomes où ils sont protonés (+) et rendus afonctionnels ou par expulsion de la cellule. Ces deux phénomènes impliquent les transporteurs de solutés d'efflux.

Activation de voies de signalisation alternative : Bypass

Les TKI agissent sur les récepteurs de facteurs de croissances EGFR, VEGFR, FGFR, MET etc. Tous ces récepteurs ont leur voie de signalisation intracellulaire commune dont la principale est la voie PI3K/Akt/mTOR [71]. Il existe néanmoins des voies alternatives comme la voie Ras/Raf/MEK [72] ainsi que la voie STAT3 [73]. Toutes trois sont responsables de la prolifération cellulaire, la survie, l'angiogenèse et la migration/invasion cellulaire. Ces voies de signalisation sont souvent dérégulées voire mutées, et ce sont ces voies, en particulier la voie PI3K/Akt/mTOR, qui sont indirectement ciblées dans le cadre d'un traitement par TKI. Pour une meilleure visualisation, les voies de signalisation sont décrites dans la Figure 12.

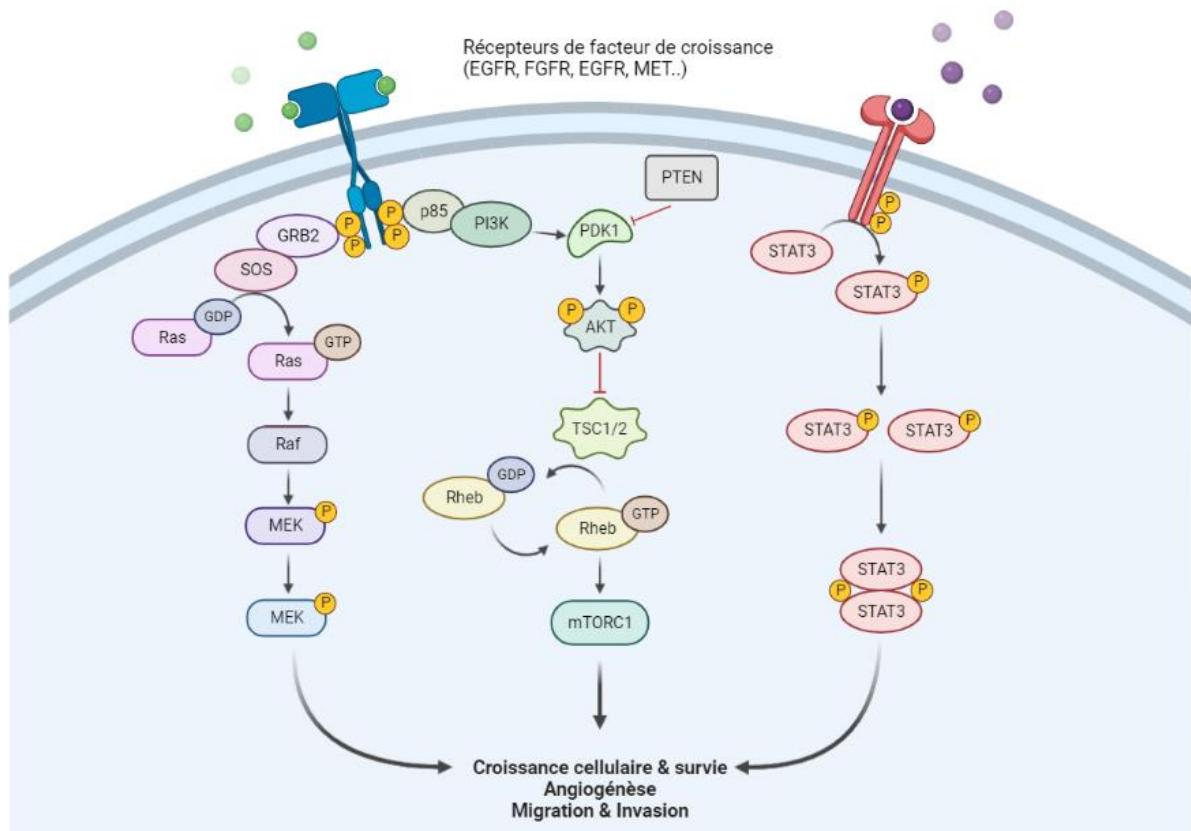


Figure 12 : Voies de signalisation intracellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance.
Fait sur BioRender

Les cellules peuvent donc résister aux TKI en changeant de voie de signalisation intracellulaire en passant de la voie PI3K à la voie Ras par exemple. Une augmentation de l'expression du récepteur MET a aussi été observée en cas de traitement par TKI-EGFR, ce qui affaiblit l'action du TKI. En effet, la voie Ras/Raf/MEK est activée via le récepteur MET, ce qui compense l'inhibition de l'EGFR [71]. Sachant cela, il serait intéressant d'étudier l'efficacité d'un TKI-EGFR en combinaison avec le Cabozantinib, puisqu'il cible le récepteur MET, afin de contourner ce

mécanisme de résistance. De plus, les CRCC ont la particularité d'avoir souvent un niveau de PTEN (phosphatase and tensin homolog) bas, mais sans mutation particulière. PTEN est un suppresseur de tumeur inhibant la voie PI3K. Il a été démontré qu'une forte expression de PTEN était associée à une meilleure réponse au traitement par TKI. Pour finir, le CRCC étant un cancer lipogénique, certaines études montrent qu'un taux de cholestérol élevé induit une résistance au sunitinib [61]. Vous l'aurez compris, ce bypass « intelligent » effectué par les cellules est une des raisons pour laquelle les thérapies combinatoires rencontrent plus de succès en clinique.

Le microenvironnement et l'hétérogénéité tumorale

Une tumeur est un environnement complexe composé de cellules tumorales, de matrice extracellulaire (MEC), de molécules de signalisation, et de cellules stromales comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les péricytes ou encore les cellules immunitaires (Figure 13) [61]. Le rôle du microenvironnement tumoral et sa composition sera détaillé dans l'introduction du chapitre 2 (cf. [Les cellules qui composent une tumeur](#) & [La matrice extracellulaire](#)). Absolument tous ces acteurs sont impliqués dans l'agressivité tumorale, la réponse et la résistance au traitement. De plus cet environnement est très hétérogène induisant un challenge thérapeutique gigantesque [74]. Il a d'ailleurs été montré que l'hétérogénéité augmentait après un traitement systémique compliquant une tâche déjà ardue en cas de rechute [61]. Le microenvironnement peut affecter la délivrance du médicament aux cellules tumorales simplement par la pression interstitielle exercée, empêchant les molécules d'accéder au site [67]. Cela peut s'expliquer par un réseau cellulaire et une matrice extracellulaire denses.

Les Fibroblastes associés au cancers (CAFs) sont la population majoritaire après les cellules cancéreuses. Ils protègent les cellules tumorales en relarguant des cytokines protectrices et en inhibant le processus d'apoptose induit par la thérapie. De plus, les CAFs recrutent de nouvelles cellules souches endothéliales en sécrétant du CXCL12, qui est une cytokine de la famille CXC surexprimée dans les cancer rénaux [75], et contrent donc l'action des TKI-VEGFR [61], [67], [76], [77].

Les cellules endothéliales contribuent aussi à la résistance au traitement anti-angiogénique en sécrétant des facteurs de croissance non conventionnels tel que des lysyl-oxydases (LOX) [78].

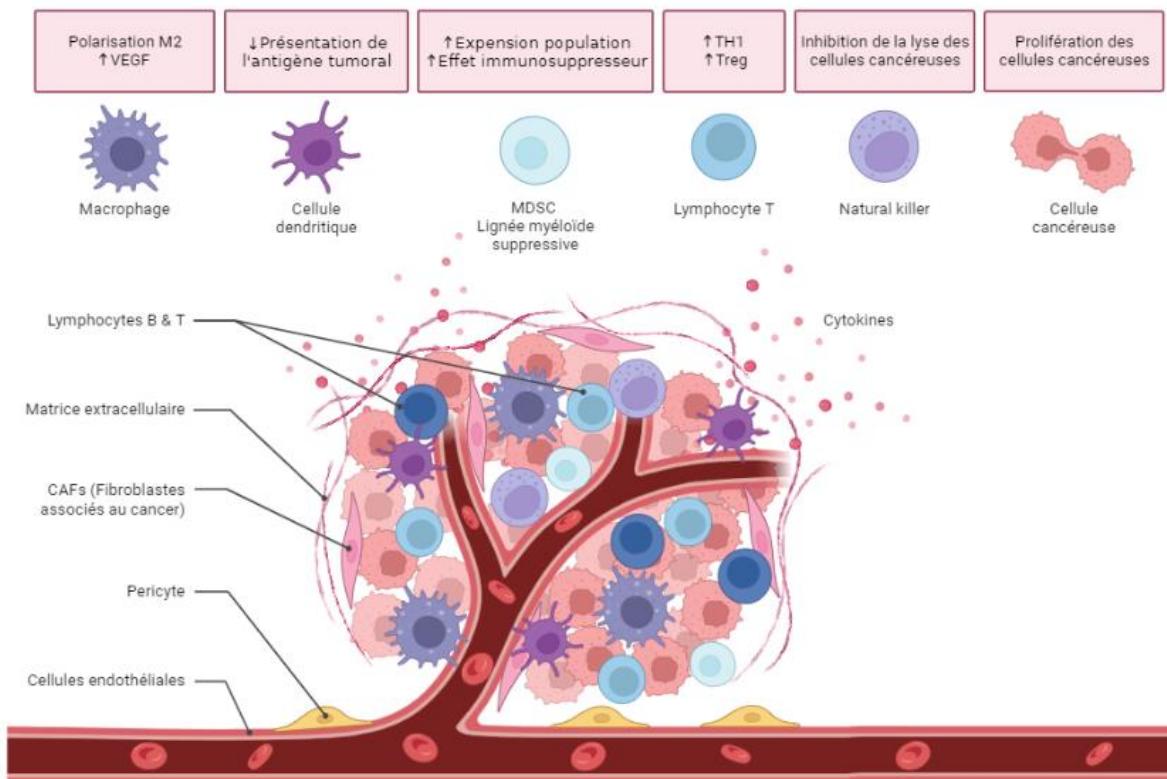


Figure 13 : Le microenvironnement tumoral et son rôle dans l'agressivité tumorale et la résistance au traitement. Fait sur BioRender

Une augmentation de l'expression des LOX est d'ailleurs associée à la croissance tumorale, à la présence de métastases et à la résistance thérapeutique dans plusieurs cancers [79], [80]. LOX est une enzyme qui catalyse la réticulation du collagène et de l'élastine de la MEC induisant des modifications de la rigidité tissulaire et des forces de tensions [79]. Cela peut conduire les cellules cancéreuses à échapper à l'environnement puisque LOX stimule la TEM en induisant la transcription de Twist, qui est un acteur majeur de l'initiation de la TEM. De plus, la présence de LOX active le proto-oncogène Src, qui est une kinase effectrice de l'EGFR, et qui est connue pour être impliquée dans l'invasion et la résistance au traitement [79]–[81].

De la même manière, les macrophages associés à la tumeur (TAM) ayant un phénotype M2 stimulent l'angiogenèse en sécrétant des facteurs de croissance placentaire (PIGF). C'est un homologue au VEGF qui peut se lier au récepteur VEGFR. Les macrophages M2 sont aussi impliqués dans la résistance et la promotion tumorale via la réparation tissulaire et le remodelage de la matrice. Les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde appelés MDSCs ont aussi une capacité remarquable à supprimer la réponse lymphocytaire T ainsi qu'à promouvoir l'angiogenèse [82] ce qui renforce la résistance au traitement. Une étude transcriptomique récente conduite par Bi et al. compare les tumeurs de patients avant et

après traitement combinatoire TKI-IT. Ils ont montré qu'il y avait une augmentation des LyT régulateurs et que certaines populations de cellules cancéreuses exprimaient des gènes immunsupresseurs post-traitement [83]. Une autre étude multi-omique a montré qu'il semblerait que l'efficacité du Nivolumab dépend du type de LyT déjà infiltré dans la tumeur. Le Nivolumab agirait donc sur le maintien et l'expansion de la population de LyT apte à une réponse immunitaire. La résistance serait due au fait que les LyT ciblés par le Nivolumab soient incompétents pour induire une répression tumorale [84]. Pour finir, il a été démontré que les TKI-VEGF induisaient une augmentation des infiltrats LyT PD-L1 positifs ainsi qu'une augmentation de l'expression de PD-1 par la tumeur [85]. Ces différentes évidences montrent l'intérêt d'utiliser de plus en plus de combinaisons en clinique comme le pembrolizumab-lenvatinib afin de réduire la résistance au traitement en ciblant deux voies d'actions complémentaires.

Les cellules souches cancéreuses

Une des clés de voute de la résistance tumorale réside dans la présence de cellules souches cancéreuses (CSCs) au cœur de la tumeur. Les CSCs sont une sous-population qui est intrinsèquement résistante aux traitements en particulier grâce à leur état quiescent. Il a d'ailleurs été observé que les CSC sont souvent responsables de la dissémination métastatique car elles rentrent souvent et plus facilement en TEM [66]. Les CSCs ont une capacité remarquable pour initier une tumeur, s'auto-renouveler et se différencier en lignages multiples donnant lieu à des tumeurs très hétérogènes. Et puisqu'elles ne sont quasiment jamais atteintes par les thérapies, ce sont elles qui créent généralement une rechute chez les patients ayant a priori répondu au traitement [86]. Les CSCs sont caractérisées par l'expression de marqueurs de surface tels que les clusters de différenciation CD105 et CD44, le récepteur de cytokine CXCR4 ainsi qu'une forte expression de l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) [87]. Il a d'ailleurs été montré que certaines lignées de CRCC cultivées en 3D étaient capables d'acquérir des propriétés de CSCs, notamment via l'expression de CD44 et CD105. Plusieurs études démontrent que l'expression de ces deux marqueurs induit une résistance au Sunitinib [87], [88]. Pour finir Pan et al. ont effectué un séquençage à cellule unique sur des CCR et montrent que les CSCs expriment très peu le VEGF ainsi que les récepteurs VEGFR et PDGFR ciblés par la plupart des TKI, d'où la résistance au traitement. Néanmoins, ces populations expriment fortement la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), le PIGF et le FGFR faisant de ces

derniers de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le CRCC [89] et expliquant la sensibilité des mCRCC au lenvatinib ciblant conjointement le VEGFR et le FGFR.

L'hypoxie

Les CRCC sont généralement vascularisés de façon anarchique rendant le cœur tumoral hypoxique. Il a été montré que le cœur de la tumeur recevait des concentrations sous optimales de principe actif participant à la résistance lysosomale détaillée plus haut [69]. Il a aussi été démontré que les zones tumorales hypoxiques exprimaient fortement la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui est une enzyme de la voie de synthèse des prostaglandines. Elle est impliquée dans l'inflammation, l'invasion ou encore l'inhibition de l'apoptose. Wang et al ont démontré que le cœur hypoxique exprimant COX-2 d'une tumeur implantée chez la souris était résistante au Sunitinib. L'ajout d'un inhibiteur de COX-2 en combinaison a montré une diminution du volume tumoral très important [90]. Cela met en exergue le fait que l'hypoxie joue un rôle dans la résistance tumorale via l'induction d'une hétérogénéité d'expression de gènes. L'hypoxie favorise aussi la résistance thérapeutique aux immunothérapies en sélectionnant les CSCs. En effet, l'hypoxie semble favoriser les CSCs en promouvant leur capacité d'auto-renouvellement et en inhibant leur différenciation, les rendant très agressives [86], [91]. De plus, l'hypoxie induit l'expression de PD-L1 sur les MDSCs qui deviennent immunsuppressives à cause de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui induit l'inactivation des lymphocytes T et promeut la progression tumorale [92].

Pour conclure, la résistance au traitement est un sujet complexe et chaque patient, chaque traitement rencontrera une résistance propre et unique en particulier due à l'hétérogénéité tumorale. Un espoir semble naître des thérapies combinatoires afin d'essayer au maximum de contrer les mécanismes de résistance induits par les traitements. Néanmoins, ces thérapies sont très lourdes pour les patients, car qui dit deux médicaments dit doubles effets secondaires, en particulier pour l'immunothérapie qui reste aujourd'hui un traitement lourd pour les patients. La thérapie ciblée personnalisée, après séquençage ou tests spécifiques, est un objectif à atteindre. Il nous faudra encore un peu de développement technologique, humain et de gros moyens financiers pour tendre à cela.

Le Chapitre 2 devrait vous donner espoir...

Patience, nous devons d'abord passer par le Chapitre 1...

CHAPITRE I : ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE NOUVELLES COMBINAISONS D'INHIBITEURS DE PROTEINES KINASES

INTRODUCTION

1 . Principe des thérapies combinatoires

Dans l'introduction générale, j'ai beaucoup parlé de thérapies combinatoires, qui ont été très récemment incluses dans les protocoles cliniques. Il est clair qu'une des raisons pour lesquels ces combinaisons sont utilisées, est pour contourner les mécanismes de résistances et ainsi obtenir une meilleure réponse au traitement. Les combinaisons viennent en réalité du concept de létalité synthétique, décrit pour la première fois en 1922 sur la drosophile. Le concept vient de l'observation que l'inactivation d'un gène individuel n'a pas ou peu d'effet sur la viabilité alors que la perte de fonction de deux gènes induit la mort cellulaire [93]. Hartwell et al. ont ensuite proposé d'appliquer ce concept dans le cadre du traitement du cancer en 1997 [94]. La découverte de ces combinaisons de gènes a longtemps été triviale dû au manque de techniques d'altérations génétiques, mais s'est révélée très accessible avec les nouvelles techniques d'ARN interférence (ARNi) et plus récemment CRISPR. La découverte de combinaisons se fait en générant des lignées cellulaires pour lesquelles un gène a été éteint par ARNi ou CRISPR et en les traitant avec des inhibiteurs de kinases [93]. Concernant le CRCC, c'est en 2008 qu'un screening de létalité synthétique a été effectué pour la première fois. Celui-ci consistait à évaluer la dépendance du CRCC à certaines kinases en cas de VHL inactivé. Ils ont montré que l'inhibition des kinases CDK4/6, MET et MEK induisait une mortalité bien supérieure dans les cellules VHL- comparé aux cellules ayant un VHL fonctionnel [95]. La létalité synthétique a donc d'abord été utilisée en exploitant des mutations spécifiques des cancers en appliquant un traitement unique. Puis très récemment, Nicholson et al. ont montré que l'inhibition de CDK4/6 était synergique à l'inhibition d'HIF-2 α dans le cadre d'un CRCC VHL- HIF-2 α dépendant [96] montrant que la létalité synthétique est propre aux caractéristiques intrinsèques de la tumeur. Notre équipe a aussi démontré en 2018 que la co-inhibition des kinases PI3K et Src, comparé à l'inhibition seule, avait un effet synergique sur la mortalité cellulaire sur des coupes de tumeurs et que la croissance tumorale était très significativement réduite chez la souris [81]. Cela démontre la potentialité d'utiliser des thérapies combinatoires en clinique.

Dans ce même objectif notre équipe a réalisé un criblage chimio-génomique visant à trouver d'autres thérapies synthétiques. La co-inhibition des kinases ATM et CK2 est ressortie grande

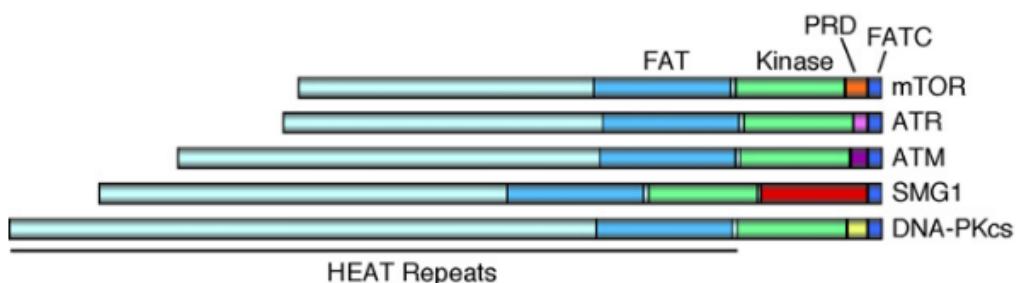
gagnante de ce criblage. Je vais détailler le rôle et la fonction de ces kinases ci-après et je détaillerai le contexte de ce criblage dans la partie résultats ([Contexte du travail](#)).

2 . ATM

La kinase ATM pour « Ataxia Telangiectasia Mutated » est une sérine-thréonine kinase et a été nommée en rapport avec la maladie héréditaire rare dont elle est responsable : l'ataxie télangiectasie, maladie neurodégénérative avec une sensibilité accrue aux radiations. C'est en 1988 que Gatti et al. ont découvert que le gène responsable de la maladie était sur le chromosome 11q [97]. Il a fallu attendre 1995 pour que Savitsky et al. identifient le gène ATM [98]. La structure n'a quant-à-elle pu être découverte que récemment en 2016 [99]. Au fil des ans, ATM a été étudiée dans divers contextes et il a été démontré qu'elle intervenait dans de multiples processus cellulaires comme la réparation de l'ADN, le métabolisme, l'homéostasie oxydative ou encore l'intégrité génomique, qui sont tous des mécanismes importants dans le cancer [100]. Dans ce chapitre, nous aborderons tout d'abord la structure d'ATM puis nous détaillerons ses fonctions en mettant un accent particulier sur son rôle dans le cancer. Nous terminerons avec les applications cliniques relatives à ATM.

2 . 1 . Structure d'ATM

Le gène ATM est composé de 66 exons localisés sur le chromosome 11q entre les locus 22 et 23 (11q22-23) [98], [100]. La forme active d'ATM est un monomère de 370 kDa composé de 3056 acides aminés. ATM fait partie de la famille des PI3K kinases (PIKK) et possède d'ailleurs beaucoup d'homologies de structure avec la PI3K comme on peut le voir dans la Figure 14 [101].



En fait, la famille PIKK contient un domaine C-terminal très conservé en terme de structure. Elle est composée du domaine FAT, pour FRAP (FK506-binding protein 12-rampamycin-associated protein), ATM et TRRAP (Transcription domain-associated protein) ; d'un domaine à activité kinase ; et enfin du motif très conservé FATC (FAT C-terminus domain) [101], [102], [103]. Le rôle précis des domaines FAT et FATC reste peu clair. Néanmoins, FATC semble indispensable à l'activité du domaine kinase et il a été suggéré que ces deux domaines participaient à la régulation de l'activité kinase en interagissant avec les substrats d'ATM [101]. La partie N-terminale incluant le domaine FAT est composée de répétitions d'hélices HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A et TOR1) [101] propre à chaque kinase. Comme on peut le voir sur la carte protéique d'ATM (Figure 15 [100]), le domaine HEAT est composé de 49 motifs. Le domaine HEAT sert de support pour les interactions d'ATM avec d'autres protéines ainsi qu'avec l'ADN. Il a même été démontré que le domaine HEAT était nécessaire au recrutement des partenaires d'ATM ainsi que pour sa dimérisation. C'est d'ailleurs ce qu'on peut observer sur la carte protéique d'ATM, avec la présence de séquences lui permettant d'interagir avec la chromatine, ou encore des protéines partenaires spécifiques comme Nbs1 dont nous reparlerons par la suite et qui sont liées à la fonction d'ATM ([Fonction d'ATM](#)). ATM contient aussi plusieurs sites d'auto-phosphorylation et il a d'ailleurs été démontré que la phosphorylation des séries 367, 1893 et 1981 était importante pour son activation [100].

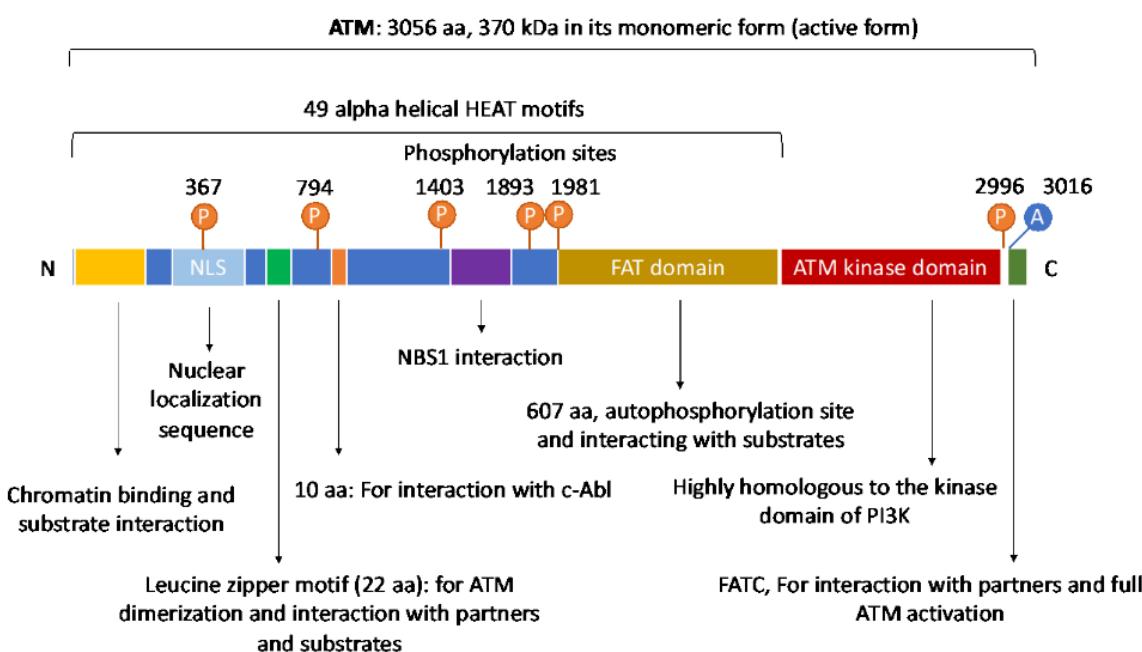


Figure 15 : Carte de la protéine humaine ATM.

Ce n'est que depuis 2016 que nous connaissons la structure tertiaire d'ATM. Wang et al. ont obtenus la structure homodimérique d'ATM ainsi que l'organisation des domaines par cryo-microscopie électronique (Figure 16 [99]). Ils ont montré que, sous forme de dimère (Figure 16 A), les monomères étaient en contact direct via les domaines FAT et kinase. Le domaine HEAT étant quant-à-lui replié contre ces derniers. Sous forme dimérique, les sites kinases et FAT étant inaccessibles, cela empêcherait donc aux cibles de se lier et d'être phosphorylées par ATM. Comme nous pouvons le voir dans la Figure 16 B sous forme monomérique, le domaine FAT s'enroule autour du domaine kinase (lobe N et C) formant un cœur catalytique comme c'est le cas pour mTOR. Cela appuie la thèse selon laquelle FAT régule l'activité et l'accès aux substrats d'ATM. Quant au domaine HEAT, il forme des bras repliés entourant le cœur catalytique et en limitant l'accès comme c'est le cas pour toutes les protéines de la famille PIKK [99].

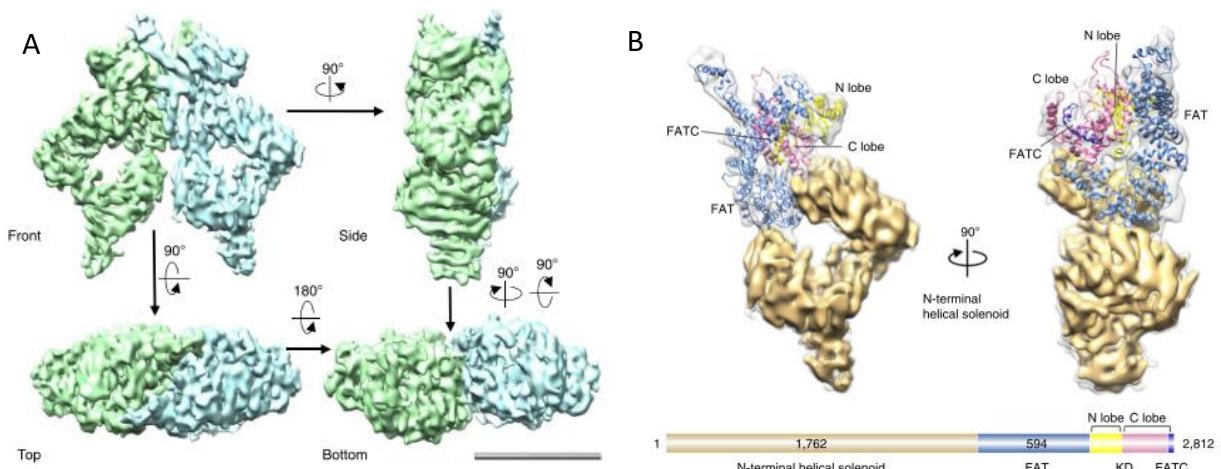


Figure 16 : Structure tertiaire homodimérique et monomérique de la kinase ATM. A : Homodimère ATM où chaque couleur correspond à un monomère, Barre d'échelle = 100 Å. B : Monomère d'ATM et sa carte protéique correspondante où chaque couleur représente un domaine.

2.2. Fonction d'ATM

2.2.1. *Voie canonique : réparation des dommages à l'ADN*

Les cassures doubles brins (CDB) de l'ADN peuvent être causées par des actions exogènes comme le rayonnement ultraviolet, les radiations ionisantes ou les agents génotoxiques comme le cisplatine. Elles peuvent aussi être engendrées de manière endogène par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), produits du métabolisme, ou des endonucléases. Il est aussi possible d'observer des CDB lors d'erreurs de réPLICATION [104].

Afin de réparer ces cassures, la cellule peut procéder soit à une réparation par recombinaison homologue (RRH) soit à la jonction des extrémités non-homologues (JENH). Brièvement, la JENH est prédominante en phase de mitose et répare l'ADN en liant directement deux extrémités qui ne sont pas sensées pouvoir être ligaturées. Elle est donc efficace mais sujette aux erreurs car si les extrémités comportent des lésions, alors elles seront incluses dans l'ADN menant à des mutations et donc potentiellement une transformation maligne de la cellule [104], [105]. La RRH est souvent référée au mécanisme de réparation sans erreur. En effet, elle utilise une séquence homologue, c'est-à-dire une chromatide sœur ou un chromosome homologue, comme modèle pour la réparation. La RRH est prédominante en phase S/G2. Le défaut principal de cette méthode est que la synthèse *de novo* du brin cassé peut induire une perte d'hétérozygotie puisqu'elle copie la séquence sur la chromatide sœur [105].

ATM est un acteur essentiel de la RRH et nous allons décrire ici le mécanisme de réparation de l'ADN correspondant.

Pour plus de clarté, les explications qui suivent sont illustrées dans la Figure 17 (modifiée depuis [106]). En cas de CDB, c'est le complexe Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) qui va en premier repérer et se fixer à la cassure afin de stabiliser les extrémités libres d'ADN. Le complexe MRN va ensuite initier l'activation d'ATM, présent sous forme de dimère inactif, en monomère actif. L'ubiquitination de Nbs1 va promouvoir le recrutement d'ATM, via son site spécifique présent sur l'hélice HEAT, comme nous l'avons vu plus haut. ATM va s'activer par autophosphorylation sur les séries 367, Ser1893, Ser1981 et Ser2996 ainsi que par l'acétylation de Lys3016 par l'histone acétyltransferase Tip60 [19], [100], [107]. En retour, ATM active le complexe MRN et en particulier Rad50 qui, avec son activité ATPase, va délivrer l'ADN permettant à la nucléase Mre11 d'effectuer la résection de la branche 5' pour générer un surplomb d'ADN 3'

monocaténaire [105], [107], [108]. La branche d'ADN monocaténaire va ensuite recruter les protéines RPA pour couvrir le brin réséqué. RPA recrute à son tour la protéine RAD51 qui va permettre de chercher et d'aller envahir la fourche d'une séquence homologue sur une chromatide sœur pour initier la réplication homologue. Parallèlement, les protéines BRCA1 et BRCA2 sont recrutées par ATM sur site afin de servir de protéines de structure initiant la réplication. La recombinaison s'effectue alors grâce à l'ADN polymérase qui « remplit » le vide laissé par la CDB d'origine [105], [106].

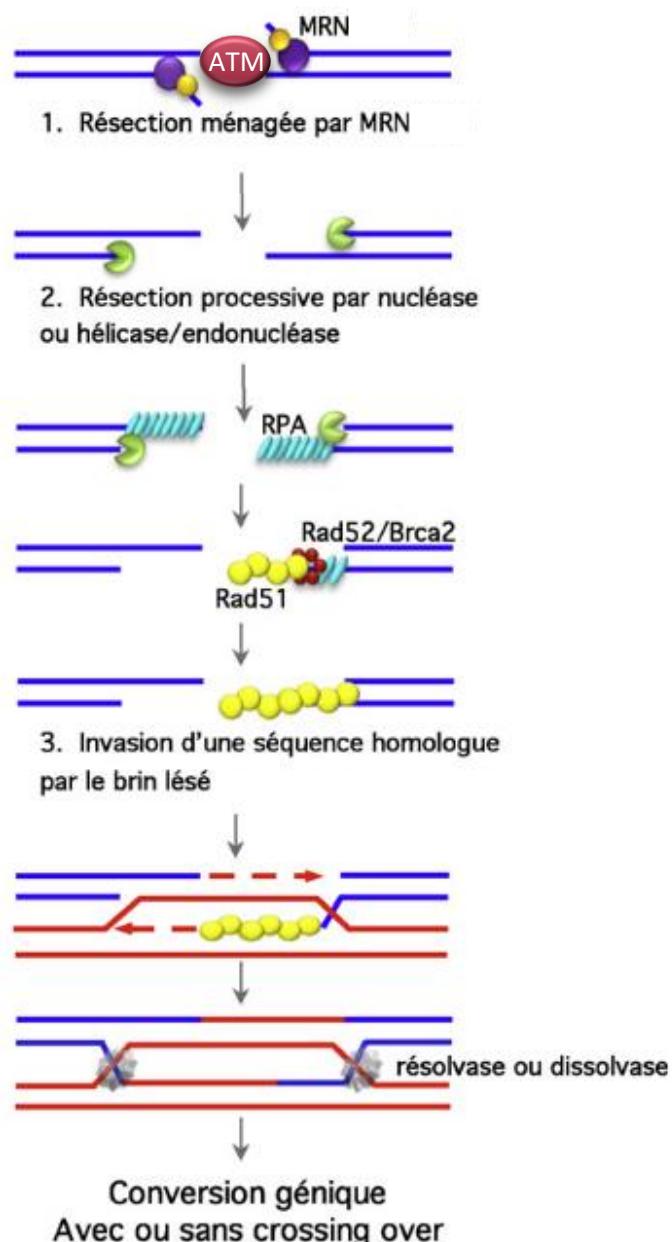


Figure 17 : Etapes de la réparation de l'ADN après cassure double brin par recombinaison homologue.

Comme vous l'aurez compris, ATM initie la RRH en partenariat avec le complexe MRN. Néanmoins, si la cellule subissait des dommages trop importants, elle serait aussi capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. En fait, au début du processus de recombinaison homologue, ATM va en parallèle phosphoryler ses autres cibles. Dans un premier temps, elle phosphoryle l'histone γ H2AX ainsi que le médiateur des dommages à l'ADN, MDC1. MDC1 va se lier directement sur γ H2AX et recruter de nouveaux complexes MRN afin d'amplifier le signal, de coordonner l'activation d'autres protéines impliquées, d'induire la réparation ou le cas échéant, l'apoptose [107], [109], [110]. De la même manière ATM phosphoryle 53BP1 et BRCA1 toutes deux impliquées dans la réparation de l'ADN. En revanche, si la cellule se trouve en trop mauvaise posture, ATM phosphoryle ChK2 ou p53 induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Figure 18 [111]).

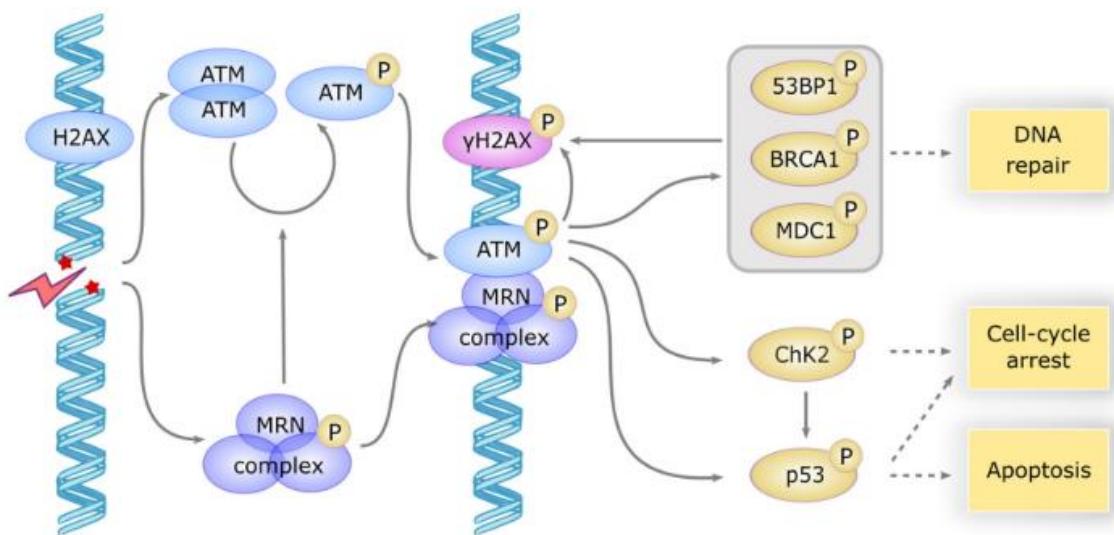


Figure 18 : Voie de signalisation et cibles d'ATM dans le cadre d'une cassure double brin d'ADN.

2.2.2. Les autres voies de signalisation d'ATM

Nous venons de décrire ensemble la voie canonique d'ATM dans le noyau et son rôle le plus connu : la réparation de l'ADN. Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence qu'ATM a plusieurs autres rôles dans des voies dites non-canoniques et qu'elle entreprend ces actions tant au niveau cytoplasmique que nucléaire. ATM est impliquée dans des voies de signalisation régulant l'homéostasie cellulaire, comme la régulation des gènes, la synthèse de protéines, le transport du glucose, l'hypoxie ou encore la balance oxydative. Il est important de préciser

que l'activation d'ATM dans ces voies non-canoniques ne requiert ni NBS1, ni la monomérisation d'ATM [112]. Le rôle d'ATM dans ces voies est illustré dans la Figure 19 [110]. Ci-dessous nous allons détailler deux voies dans lesquelles ATM est impliquée et qui sont importantes pour comprendre les résultats de ma thèse : le stress oxydatif et l'hypoxie [100], [110].

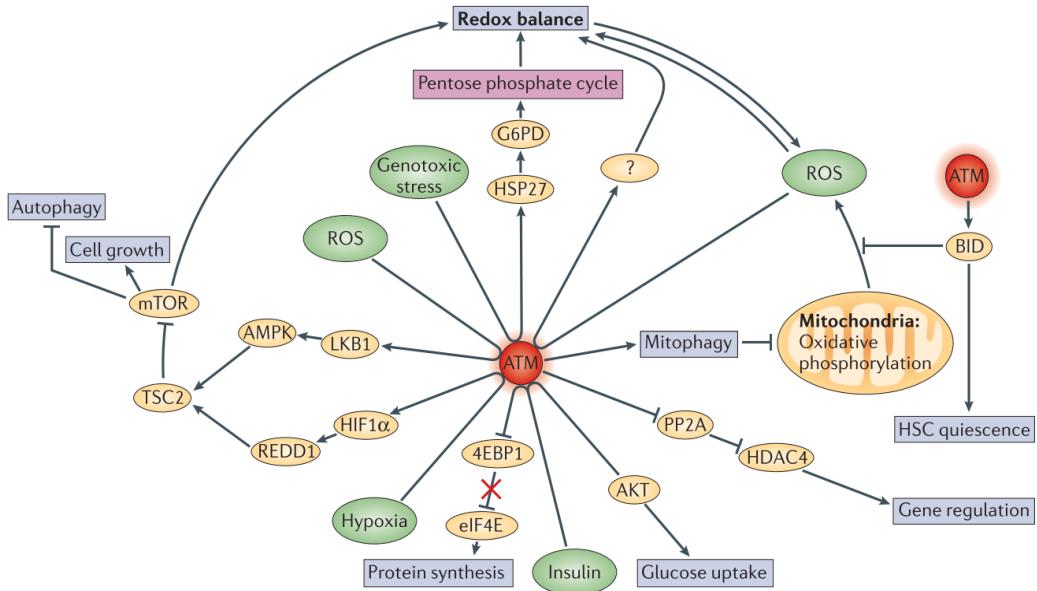


Figure 19 : Implication d'ATM dans les voies de signalisation de l'homéostasie cellulaire.

Le stress oxydatif

Le stress oxydatif réfère à un surplus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule. Les ROS sont des radicaux libres dérivés de l'oxygène, qui sont des déchets du métabolisme. Le métabolisme des ROS et les enzymes associées sont présentés dans la Figure 20 [113], [114].

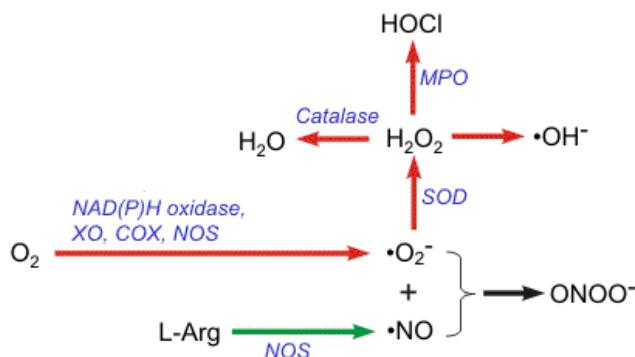


Figure 20 : Métabolisme des ROS. L' O_2 est transformé en $O_2^{\bullet-}$ par la NADPH oxydase, puis en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) puis détoxifié en H_2O par les catalases.

L'implication d'ATM dans la balance redox a d'abord été remarquée dans le cadre des malades atteint d'ataxie télangiectasie (AT). En effet, plusieurs études ont noté que les cellules déficientes en ATM possédaient une réponse anti-oxydative réduite. Des souris déficientes en ATM montraient par ailleurs des signes de stress oxydatif au niveau cérébral, qui est le premier site de déficience chez les patients souffrant d'AT. Des expériences *in vitro* ont démontré que l' H_2O_2 (un ROS) oxydait ATM, établissant des ponts di-sulfures entre les monomères ATM, induisant l'activation du dimère ATM [100], [112], [115]. Plus précisément, c'est le résidu Cystéine 2991 sur le domaine FATC qui semble critique pour activer ATM par oxydation [112]. En bref, ATM est activé par les ROS et a une action anti-oxydante pour la cellule.

Je vais présenter ici trois voies anti-oxydantes dans lesquelles ATM est impliqué.

Premièrement, le dimère ATM va activer le complexe tubéreux 2 (TSC2) en phosphorylant la kinase du foie B1 (LKB1) et l'AMP Kinase, ce qui va inhiber mTOR et donc réduire la production de ROS dans la cellule (Figure 19) [100], [110].

Deuxièmement, il a été démontré, au niveau cérébral, qu'ATM inhibait l'activité de la NADPH oxydase 4 (NOX4). NOX4 est une enzyme membranaire ubiquitaire qui transfère des électrons du NADPH aux molécules d'oxygène, générant des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Ces anions superoxydes sont des ROS très réactifs mais qui ont une courte demi-vie. Ils sont des précurseurs du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), principal responsable des dommages à l'ADN. En effet, l' H_2O_2 ayant un temps de demi-vie plus longue, il peut atteindre le noyau. Dans le cas où il y aurait trop de ROS intracellulaire et trop de dommages, NOX4 et ATM peuvent aussi induire la sénescence de la cellule. Vous l'aurez compris, ATM a donc un rôle inhibiteur de ROS via son action sur NOX4 et via l'induction de la sénescence le cas échéant [116], [117].

Pour finir, à cause des effets délétères des ROS sur la cellule, en particulier les dommages à l'ADN, la cellule a mis en place un système pour détoxifier les ROS, comme nous l'avons vu dans la Figure 20. Pour enlever les ROS, la cellule utilise plus particulièrement la superoxyde dismutase 1 (SOD1), qui est une enzyme soluble cytosolique. Son rôle classique est de transformer l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Tsang et al. ont démontré que de façon surprenante, SOD1 avait aussi un rôle de facteur de transcription et qu'il induisait l'expression de gènes antioxydants et de réparation de l'ADN. En fait, en réponse à l' H_2O_2 cytoplasmique, ATM va activer son effecteur Dun1 qui va phosphoryler SOD1 et induire sa translocation nucléaire. Une fois dans

le noyau, SOD1 va induire la transcription de diverses molécules anti-oxydantes, ainsi que des effecteurs de la réparation de l'ADN et de la résistance au stress (Figure 21) [114][118].

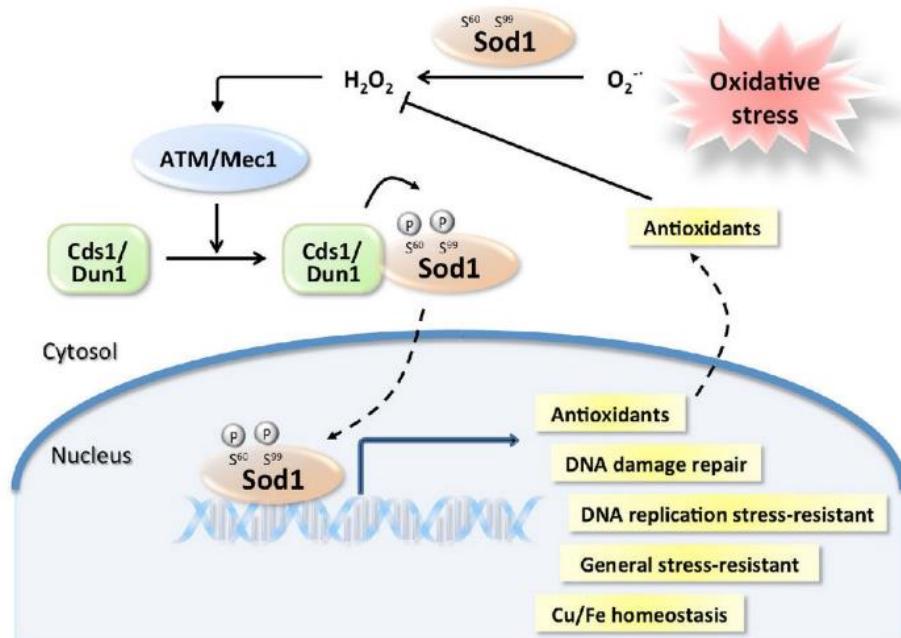


Figure 21 : Les ROS induisent, par l'intermédiaire d'ATM, la localisation nucléaire de SOD1.

Pour conclure, ATM participe donc à la détoxification des ROS et à la régulation du stress oxydatif cellulaire. Une inhibition ou une mutation d'ATM est donc associée à des risques de stress oxydant et de sénescence cellulaire précoce.

L'hypoxie

L'hypoxie est un acteur majeur de toutes les tumeurs solides et en particulier dans le CRCC auquel s'ajoute souvent les mutations VHL. Il a été démontré qu'ATM était activée par l'hypoxie au niveau nucléaire de façon MRN-indépendante. En condition d'hypoxie, ATM phosphoryle HIF1- α , ce qui promeut la survie cellulaire en condition hypoxique [112]. Plus précisément, Razaeian et al. ont montré qu'ATM stabilisait HIF1- α par l'intermédiaire de l'histone γ H2Ax qu'elle phosphoryle. La stabilisation d'HIF1- α dans le noyau permet de prévenir sa dégradation ainsi que son export nucléaire. L'activité de transcription d'HIF1- α devient donc indépendante de VHL. En conclusion, ATM promeut la tumorigénèse, la glycolyse et la dissémination métastatique via son action sur HIF1- α [100], [119].

2 . 3 . Rôle dans le cancer

ATM est un suppresseur de tumeur impliqué dans la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la résistance au stress oxydatif. Par conséquent, les cellules cancéreuses utilisent différents mécanismes pour réguler à la baisse ATM. Par exemple, les cellules du cancer du sein expriment le micro ARN mir-18a pour réduire l'expression d'ATM [120]. Son activité peut aussi être inhibée à l'aide de phosphatases dans certains cancers, empêchant son action sur P53 et donc inhibant l'apoptose [121]. De façon opposée, certains cancers surexpriment ATM. Il est possible que ces cancers aient développé des mécanismes de contournement pour échapper à l'apoptose induite par ATM. Parallèlement, cette surexpression serait un avantage pour les cellules cancéreuses, les rendant plus résistantes à la chimiothérapie ou aux rayons [122].

En 2016, la base de donnée COMICS a permis de quantifier les mutations d'ATM dans une trentaine de cancers. Ce sont 167 mutations distinctes qui ont été recensées. Ce sont les cancers hématologiques pour lesquels les mutations sont les plus présentes, avec 45% des patients ayant une mutation somatique d'ATM. Concernant les cancers du rein, l'étude a rapporté 1 à 5% de mutations somatiques d'ATM. Beaucoup de ces mutations ont d'ailleurs été associées à une faible survie sans progression [123]. Une étude clinique récente a mis en évidence que les CRCC ayant une faible expression d'ATM avaient un pronostic de survie inférieur, montrant l'intérêt de cette protéine comme biomarqueur ou cible thérapeutique [124].

Dans le cadre du cancer, ATM est donc impliquée dans la résistance aux radiations, la survie cellulaire, le processus métastatique et à la prolifération cellulaire (Figure 22) [100].

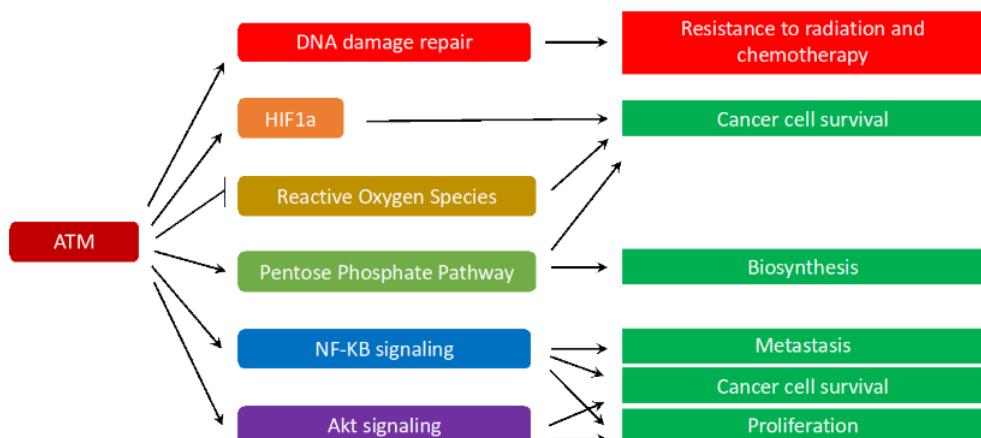


Figure 22 : Les rôles d'ATM dans le cancer.

2 . 4 . Inhibiteurs et clinique

ATM permet aux cellules cancéreuses de résister aux traitements comme l'irradiation et la chimiothérapie, ou encore d'induire la prolifération et la formation de métastases. L'idée d'inhiber ATM servirait en quelque sorte à reproduire la radiosensibilité des patients souffrant d'ataxie télangiectasie, pour lesquels un simple scanner peut induire des dommages irréversibles à l'ADN. En effet, comme nous l'avons évoqué plus tôt, certains cancers surexpriment ATM en faisant une cible thérapeutique de choix. Ce faisant, depuis 2004, de nombreux inhibiteurs d'ATM ont été développés : KU-55933, KU-60019, KU-59403, CP-466722, AZ31/32, AZD0156 et enfin AZD1390. Ce sont tous des inhibiteurs compétitifs de l'ATP [125]. Leur mode d'administration, l'IC50 et les propriétés de ces inhibiteurs sont présentés dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Les inhibiteurs d'ATM et leurs propriétés.

Inhibiteur	Administration	IC50 (nM)	Propriétés	Structure	Ref.
KU-55933	Pas recommandée	13	Premier inhibiteur sélectif d'ATM Après exposition IR, KU-55933 affecte significativement la RRH		[126], [127]
KU-60019	Intra-Péritonéal (IP) ou oral	6.3	Analogue du KU-55933 avec une biodisponibilité et pharmacocinétique supérieure Efficace sur cellules déficientes en PTEN combiné au cisplatin, et sur mutants TP53 combiné IR Inhibe migration et invasion		[128], [129]
KU-59403	IP	3	Pas d'effet anti-tumoral seul Augmente la toxicité de l'étoposide et la doxorubicine de façon P53 indépendante		[130]
CP-466722	Oral	410	Inhibiteur réversible Pas d'off-target dans la famille PIKK Inhibition temporaire rendant sensible IR Inhibe la TEM		[131], [132]
AZ31/AZ32	Oral	46/6.2	Faible pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BHE)		[133], [134]
AZD0156	Oral	0.58	Premier inhibiteur bio-disponible et puissant Doses <i>in vivo</i> faibles Parfait pour les études <i>in vivo</i>		[134], [135]
AZD1390	Oral	0.78	Inhibiteur le plus sélectif Pénétration de la BHE excellente <i>In vivo</i> : réduit la croissance tumorale en association avec l'IR		[136]

Ces inhibiteurs ont été testés dans plusieurs cancers solides. Par exemple, KU-59403 a été testé sur des cellules d'ostéosarcome et de cancer du sein [130]. L'inhibiteur KU-60019 a quant à lui été testé *in vivo* chez des souris ayant des greffes orthotopiques de cellules de glioblastome. KU-60019, serait donc, comme l'AZD1390 capable de passer la BHE, et donc indiqué dans le cadre d'un glioblastome afin de le rendre sensible aux rayons [128]. Il n'y a actuellement pas d'inhibiteur d'ATM indiqué en clinique. Néanmoins, deux études cliniques de phase I ont été menées. La première concerne l'inhibiteur AZD0156 sur des tumeurs solides avancées et dont la phase I vient de se terminer en juillet 2022 (NCT02588105). La seconde concerne l'AZD1390 qui a commencée en 2018, et qui teste l'inhibiteur sur des glioblastomes multiformes (NCT03423628). Pour finir, nous effectuons nous même un essai pré-clinique toujours en cours appelé COMBOREIN (NCT03571438). Nous regardons l'efficacité du KU-60019 en combinaison avec un inhibiteur de CK2 (CX-4945) dans le cadre du CRCC, sur des coupes de tumeurs après résection chirurgicale. Le projet COMBOREIN sera exposé plus précisément dans la partie résultats de ce chapitre ([Contexte du travail](#)).

Comme vous l'aurez compris, ATM est une cible de choix dans plusieurs cancers et des efforts sont mis afin de trouver de nouvelles molécules efficaces, en particulier dans le traitement du glioblastome qui est presque incurable entre autre de par son inaccessibilité.

Comme je l'ai évoqué, nous essayons de potentialiser son action avec un inhibiteur de CK2 dans le cadre du traitement du CRCC, et nous allons donc à présent présenter la protéine kinase CK2.

3 . CK2

La protéine kinase CK2 anciennement Caséine Kinase 2 est une tyrosine sérine thréonine kinase très conservée, exprimée de façon ubiquitaire et constitutivement active. Elle a été découverte en 1954 par Burnett et Kennedy [137]. Elle est impliquée dans toutes les voies de signalisations cellulaire avec 500 substrats à son actif, ce qui représente environ 10% du phospho-protéome humain. Elle est impliquée dans tous les « hallmarks » du cancer que nous allons détailler ici ainsi que sa structure et son potentiel clinique [138].

3 . 1 . Structure

CK2 est une holoenzyme composée de deux sous unités catalytiques CK2 α (42 kDa) et/ou α' (38 kDa) et de deux sous-unités régulatrices CK2 β (28 kDa) qui peut prendre les formes suivantes : $\alpha\beta\beta$, $\alpha\alpha'\beta\beta$ et $\alpha'\alpha'\beta\beta$. La sous-unité α est codée par le gène CSNK2A1 sur le chromosome 20p13 et est composée de 14 exons [139]. La sous-unité α' est codée par le gène CSNK2A2 sur le chromosome 16q21 et est composée de 13 exons [140]. Enfin, la sous-unité β est codée par le gène CSNK2B sur le chromosome 6p21.33 et est composée de 7 exons [141]. La première caractérisation structurelle des sous unités catalytiques a été effectuée en 1987 mais elle a entièrement été caractérisée en 2001 grâce à l'essor des nouvelles technologies de cristallographie à rayon X [137], [142], [143]. La structure de l'holoenzyme CK2 est présentée dans la Figure 23 [144].

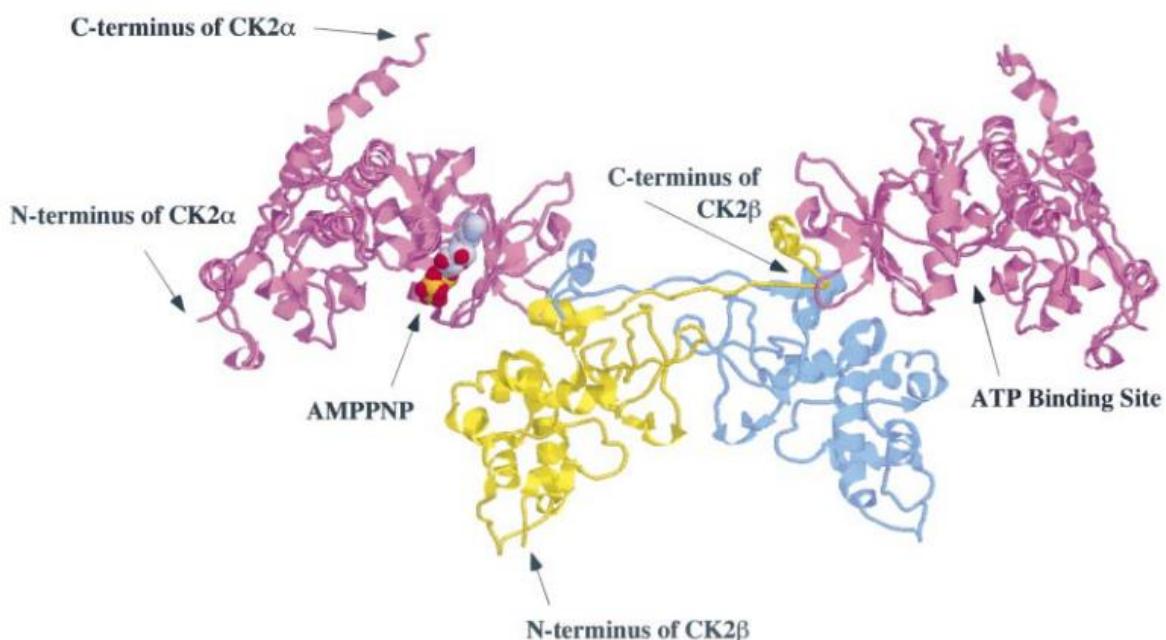


Figure 23 : Structure de l'holoenzyme CK2.

ATP : Adenosine Triphosphate, AMP-PNP : ATP analogue adenosine 5h-[β , γ -imido]triphosphate non hydrolysable

Les sous-unités catalytiques α et α' ayant 90% d'homologie, il a été montré qu'elles avaient des actions similaires. Comme on peut le voir dans la Figure 23 la sous-unité α possède une poche catalytique liant l'ATP. La structure de cette poche a été résolue grâce à sa stabilisation par l'AMP-PNP, un analogue de l'ATP non hydrolysable [144]. C'est grâce à cette interaction que CK2 va phosphoryler ses cibles. De plus, CK2 peut utiliser indifféremment l'ATP et le GTP car la structure du site catalytique est largement accessible, ce qui n'est presque jamais le cas pour les autres kinases [145].

CK2 β est la sous-unité régulatrice, placée au centre du complexe tétramérique, sous forme de dimère. Sa dimérisation repose à la fois sur des interactions hydrophobes et à la présence d'un motif en doigt de zinc. Elle lie CK2 α via son extrémité C-Terminale. CK2 β n'a pas d'activité kinase et n'est pas absolument nécessaire à l'activité catalytique de CK2 α , puisqu'elle reste constitutivement active quel que soit le statut de CK2 β [144], [146]. Néanmoins, il a été montré que CK2 β régule la phosphorylation de certaines cibles de CK2 α , qui ne seraient sans elle, que peu ou pas phosphorylées. Enfin, il a été démontré que CK2 β interagit avec d'autres partenaires et pas seulement avec CK2 α . Via son extrémité C-terminale, elle est capable d'interagir avec les kinases A-Raf et PKC. Elle forme aussi des complexes avec des protéines membranaires, cytoplasmiques et nucléaires telles que P53 ou le FGF [145].

Les différentes formes et interactions de CK2 lui permettent d'avoir de multiples fonctions cellulaires et en particulier dans le cancer dont nous allons parler ci-dessous.

3 . 2 . Fonctions de CK2

3 . 2 . 1 . *Implication de CK2 dans tous les « hallmarks » du cancer*

Comme nous l'avons déjà mentionné, CK2 est impliquée dans tous les « hallmarks » du cancer (Figure 24 [138]) et participe à [138], [147] :

- La croissance et la prolifération, via la modulation des voies de signalisation cellulaire et la modulation de la transcription.
- L'instabilité du génome et les mutations via son implication dans les voies de réparation de l'ADN.
- La survie cellulaire via son implication dans la réponse au stress et l'inhibition de l'apoptose via la protéolyse des caspases ou encore l'inhibition de P53.
- L'angiogenèse et la vascularisation en particulier via HIF dont nous reparlerons par la suite (Implication de CK2 dans le CRCC).
- L'échappement de la surveillance immunitaire via l'inhibition des macrophages et des lymphocytes Natural Killer (NK).
- La régulation du métabolisme via son implication dans l'effet Warburg, c'est-à-dire le passage de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse aérobie comme source d'énergie, source favorisée par tous les cancers solides.
- L'invasion et la formation de métastases en promouvant l'expression de marqueurs mésenchymateux tel que la N-cadhérine et en inhibant les marqueurs épithéliaux tel que la E-cadhérine.
- Le remodelage du microenvironnement via la sécrétion de métallo-protéases et de fibronectine par exemple.

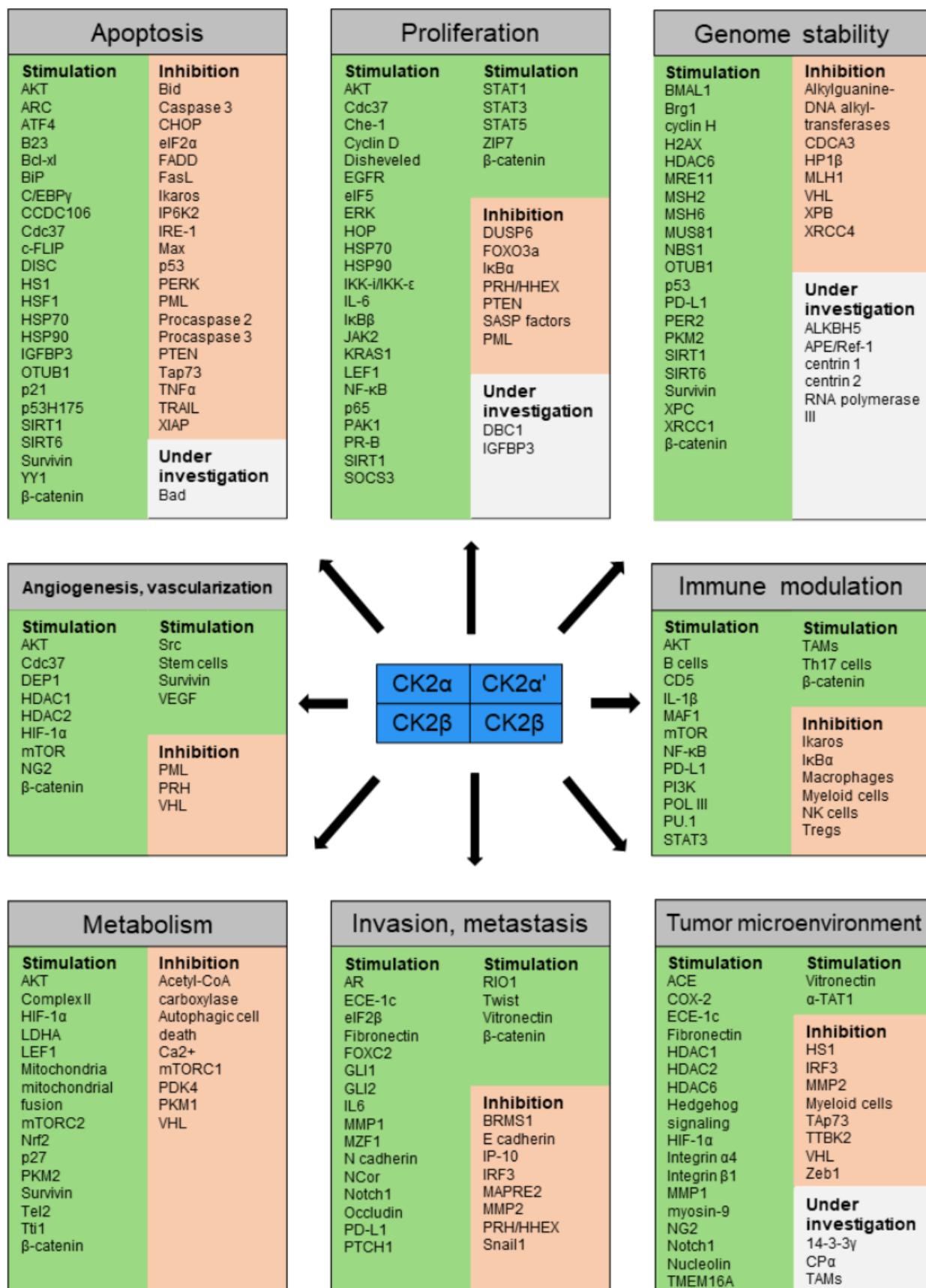


Figure 24 : Implication de CK2 dans la stimulation et l'inhibition de protéines impliquées dans la carcinogénèse.

CK2 est donc impliquée dans beaucoup de processus biologiques, en particulier tous les processus de la carcinogenèse. Son expression est d'ailleurs dérégulée dans beaucoup de cancers, tant en surexpression qu'en sous-expression comme le montre le Tableau 5 ci-dessous, (*adapté de [148], [149], [150]*) provenant d'analyses des transcrits de CK2.

Tableau 5 : Dérégulation de CK2 dans 11 types de cancers.

Rouge = surexprimé, Bleu = Sous-exprimé

Cancer	Sous-type de cancer	Expression ARN de CK2		
		CK2 α	CK2 α'	CK2 β
Cancer du poumon	Carcinome à cellules squameuses	■	■	
	Adénocarcinome	■	■	■
	Carcinome à cellules larges	■		■
	Cancer du poumon à petites cellules	■		
	Carcinoïde pulmonaire			■
Cancer du sein	Carcinome canalaire	■	■	■
	Carcinome canalaire invasif	■	■	■
	Carcinome lobulaire		■	
	Carcinome lobulaire invasif		■	■
	Carcinome mucineux	■		
	Carcinome mucineux invasif			■
	Carcinome du sein		■	■
	Carcinome du sein invasif	■	■	
	Carcinome stromal invasif	■		■
	Carcinome médullaire invasif			■
Cancer de l'œsophage	Œsophage de Barrett	■	■	■
	Adénocarcinome	■	■	■
	Carcinome			■
Cancer ovarien	Adénocarcinome séreux	■	■	■
	Carcinome	■	■	
	Cystadénocarcinome ovarien	■		
	Adénocarcinome de l'endomètre			■
	Adénocarcinome mucineux		■	
Cancer du colon	Carcinome	■	■	■
	Adénocarcinome rectal	■	■	■
	Adénocarcinome caecal	■	■	■
Cancer de la prostate	Néoplasie intraépithéliale prostatique		■	
	Adénocarcinome	■		
	Carcinome	■		■
Cancer de la vessie	Carcinome invasif	■	■	■
Cancer du pancréas	Adénocarcinome	■		■
	Adénocarcinome canalaire	■	■	■
Cancer du foie	Carcinome hépatocellulaire	■		
	Carcinome Chromophobe	■	■	■
Cancer du rein	Carcinome rénal à cellules claires	■	■	■
	Sarcome à cellules claires	■		
	Carcinome Papillaire	■		
	Oncocytome	■	■	■
	Carcinome urothélial du bassin rénal	■		■
	Tumeur de Wilms	■		■
Cancer de la peau	Nævus mélanocytaire bénin	■	■	■
	Carcinome basocellulaire	■		
	Carcinome des cellules squameuses	■		
	Mélanome	■	■	■

Une surexpression de CK2 α est d'ailleurs associée à un phénotype agressif et un facteur de mauvais pronostic pour certains cancers avec une diminution de la survie [148]. Plus précisément, la surexpression de CK2 α est associée à l'activation de voies conduisant à la TEM dans le cancer du sein [151]. De façon opposée, l'agressivité et la TEM sont aussi associées à une diminution de l'expression de CK2 β dans le CRCC [150], [152]. Par ailleurs, d'après la base de donnée GEPIA, la surexpression de CK2 α et CK2 β est corrélée avec une survie plus longue dans le CRCC, de façon opposé à d'autres cancers tel que les sarcomes pour lesquels la surexpression est corrélée avec une diminution de la survie.

En bref, il semble que ce soit la balance entre sous-unités catalytique et régulatrice qui définit finement les actions de CK2, favorisant soit un phénotype sain, soit tumoral à cause d'un déséquilibre dans la régulation des voies de signalisation. Nous allons maintenant parler plus précisément de certaines voies dérégulées par CK2 dans le CRCC.

3.2.2. Implication de CK2 dans le CRCC

La surexpression de CK2 α et la sous expression de CK2 β sont des facteurs de mauvais pronostic dans le CRCC. En effet, Chua et al. ont montré que la surexpression de CK2 α diminuait de 4 ans la survie des patients [149]. De manière surprenante, notre équipe a démontré que l'expression ARN des sous unités de CK2 était diminuée dans une cohorte de 15 patients ayant un CRCC. Néanmoins, ce résultat est nuancé par l'augmentation de l'expression protéique de CK2. L'hypothèse émise est que l'ARN serait instable contrairement à la protéine, en faisant un meilleur marqueur prédictif [150]. Quoi qu'il en soit, il semble que CK2 soit de manière générale surexprimée dans le CRCC. Nous allons donner ici quelques exemples du rôle de CK2 dans l'agressivité des CRCC de façon plus mécanistique.

Premièrement, CK2 induit une augmentation indirecte de HIF-1. En effet, CK2 phosphoryle VHL, amenant à sa dégradation, contribuant de ce fait à une augmentation de l'activité de HIF-1. HIF va être transloquée dans le noyau et va activer les voies de prolifération et d'angiogenèse dont elle est responsable [153], [154], [155]. CK2, via la voie VHL-HIF, caractéristique des CRCC, est donc impliquée dans la carcinogenèse et la progression tumorale.

Deuxièmement, il a été démontré que CK2 était un modulateur des NOX, en particulier dans le cadre des ischémies cérébrales [156]. Plus particulièrement, NOX4, très exprimé dans le

rein, est responsable de l'invasion et de la croissance tumorale des CRCC en induisant la translocation nucléaire d'HIF-2 [157]. J'ai moi-même contribué à montrer que CK2 avait une action inhibitrice sur NOX4 et que l'inhibition de CK2 induisait une augmentation de la production de ROS par NOX4 [158]. CK2 promeut donc la carcinogenèse via la modulation du stress oxydatif et l'induction de la translocation de HIF-1 et HIF-2.

Pour finir, il a été montré que CK2 neutralisait PTEN. Pour rappel, PTEN est un inhibiteur de la voie PI3K, responsable de la prolifération et la survie cellulaire. Il a été montré qu'un faible niveau de PTEN dans les CRCC était un marqueur de mauvais pronostic. Par conséquent, CK2 promeut la survie des cellules cancéreuses via l'inhibition de PTEN [146].

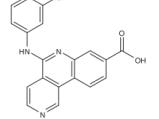
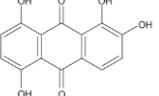
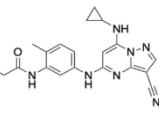
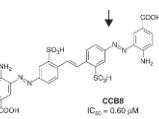
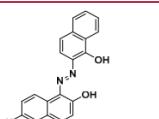
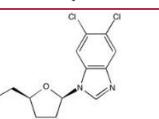
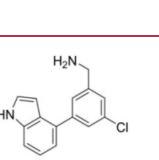
Toutes ces évidences mettent en exergue l'intérêt clinique de l'inhibition de CK2 qui est un oncogène ubiquitaire avéré et surexprimé dans un très grand nombre de cancers. Nous allons donc maintenant décrire les inhibiteurs existants et leur utilisation potentielle en clinique.

3 . 3 . Inhibiteurs et clinique

Le premier brevet concernant un inhibiteur de CK2 n'a été déposé que 50 ans après sa découverte, soit en 2004. De nombreuses approches ont été explorées afin d'inhiber CK2, allant de petites molécules inhibitrices, à l'utilisation de peptides ou d'ARN interférents [147]. Ici, nous allons nous concentrer sur les molécules inhibitrices.

Ces dernières années, de nombreux inhibiteurs ont été développés. Au début, ce fut principalement des analogues de l'ATP afin de bloquer la poche catalytique de CK2 α par compétition. Ces inhibiteurs sont dits ortho-stériques car ils se fixent à la place du ligand de CK2, qui est l'ATP. Néanmoins, ils ont le défaut d'avoir beaucoup d'autres cibles et par conséquent une faible spécificité et donc des effets secondaires importants. Les recherches récentes tentent de développer des inhibiteurs allostériques, c'est-à-dire non-ATP compétitifs, se fixant sur un autre site que la poche catalytique. Ces inhibiteurs sont plus sélectifs et ont une toxicité réduite [147], [159], [160]. Notre laboratoire travaille d'ailleurs à l'élaboration d'un inhibiteur empêchant l'interaction entre CK2 α et CK2 β . Le Tableau 6 ci-après fait état de quelques inhibiteurs de CK2 ainsi que leur spécificité.

Tableau 6 : Exemple d'inhibiteurs de CK2 et leurs propriétés.

Catégorie	Inhibiteur	IC50 μM	Propriétés	Structure	Ref.
ATP Compétitif (Orthostérique)	CX-4945 / Silmitasertib	0.002	7 off-targets mais IC50 bien supérieure (17 nM) Formation de vacuoles intracellulaires <i>in vitro</i> Diminue la taille des tumeurs chez la souris Bonne tolérance <i>in vivo</i> , phase II essai clinique		[19], [160], [161]
	Quinalizarin	0.15	Très sélectif de CK2 Testé dans le cancer de la prostate Effet anti-angiogénique avéré dans le traitement de l'endométriose		[159], [162]
	SGC-CK2-1	0.016-0.036	2 Off-targets avec une IC50 inférieure N'inhibe pas la prolifération dans les lignées de CRCC 786-O, ACHN et Caki-1 mais inhibe les A498		[163]
ATP non compétitif (Allostérique)	CCB8	0.6	Induit l'apoptose sur des cellules de cancer du poumon (A549)		[159], [164]
	Diazo	0.4	Change la conformation de CK2α pour rendre la poche catalytique inaccessible à l'ATP Pas d'off-target connu Diminution du volume tumoral de 83% dans le traitement de glioblastome chez la souris		[160], [165]
Inhibiteur d'interaction des sous-unités α et β	DRB	4-10	3 off-targets dans la même IC50 Induit l'apoptose P53 dépendante dans l'adénocarcinome du colon Inhibe la prolifération et la migration		[159], [166]
	Peptide Pc et ses dérivés	3	Empêche l'interaction entre les sous-unités Empêche l'holoenzyme de se former La substitution I192F dans le peptide Pc augmente la force d'interaction, inhibe la prolifération et promeut l'apoptose dans des cellules cancéreuses du foie		[167], [168]
	CAM187	44	Synthétisé en 2018 Inhibe l'interface entre les sous-unités Grande sélectivité		[169], [170]

Malgré tous les efforts de recherche d'inhibiteurs, seule une molécule est entrée en essai clinique. Il s'agit du Silmitasertib ou CX-4945. Les essais de phase 1 ont été un succès, tant sur des patients atteint de Cholangiocarcinome (NCT02128282) que sur des enfants atteint de Médulloblastome (NCT03904862). Ces essais ont démontré des effets de toxicité mineurs, bien tolérés, induisant diarrhée et hypokaliémie chez 15% des patients. De plus, la croissance tumorale est restée stable pendant 6 mois. Les essais de phase 2 sont actuellement en cours pour ces deux cancers [147], [171]. En parallèle, il y a notre propre essai COMBOREIN que j'ai mentionné plus tôt qui évalue le CX-4945 avec l'inhibiteur d'ATM KU-60019.

Pour conclure, ATM et CK2 sont des cibles thérapeutiques de choix, et nous avons travaillé à inhiber ces deux kinases dans le cadre du traitement du CRCC. Les résultats ci-après décrivent la découverte de cette combinaison ainsi que de sa caractérisation.

RESULTATS

1 . Contexte du travail

L'histoire commence en 2012, l'équipe « CK2 » (Claude Cochet et Odile Filhol) souhaite découvrir de nouveaux traitements prometteurs pour le CRCC, de manière à contourner les mécanismes de résistance. L'équipe décide d'effectuer un criblage chimio-génomique, dans le cadre de la thèse de Sofia Giacosa [19], afin de trouver une thérapie combinatoire. Pour cela, la lignée 786-O VHL/- a été utilisée, puisqu'elle est représentative des CRCC. Pour effectuer le criblage, 36 lignées ont été générées, chacune avec un gène inhibé par shARN. Par exemple 786-O shTP53, shATM, shNOX4, etc (cf [Données supplémentaires](#)). Les gènes cibles ont été choisis pour inclure des kinases qui sont impliquées dans la croissance, la viabilité, la prolifération et le processus métastatique des CRCC. Ces 36 lignées ont ensuite été croisées avec 80 inhibiteurs, faisant un total de 2880 combinaisons testées, chacune à 3 concentrations, faisant un total de 8640 tests. Parmi toutes ces combinaisons se trouvait la lignée 786-O shCK2 α en combinaison avec l'inhibiteur d'ATM, KU-60019 (KU), qui réduisait la viabilité cellulaire. L'équipe, qui est experte de la protéine CK2, a choisi cette combinaison pour une évaluation plus poussée. La lignée shCK2 a été remplacée par l'inhibiteur CX-4945 (CX) et la combinaison KU-CX a été brevetée en 2015 [172].

Entre 2012 et 2018, ce sont Catherine Pillet et Sofia Giacosa qui ont principalement travaillé sur le projet. C'est elles qui ont effectué le criblage, les tests de concentration, d'inhibition et de migration (*Figure 1 et 2 de l'article*). Elles ont aussi étudié l'impact de la présence de VHL et de HIF2 α dans la lignée 786-O (*Figure 4*). Enfin, elles ont testé la combinaison sur des explants tumoraux générés chez la souris (*Figure 6*).

Depuis 2018, l'équipe a mis en place une forte collaboration avec l'hôpital de Grenoble et nous menons conjointement une étude préclinique appelée COMBOREIN (NCT03571438). Le but de cette étude est de comparer l'efficacité de combinaisons de traitements découvertes dans notre équipe aux molécules actuellement utilisées en clinique. Brièvement, nous récupérons des morceaux tumoraux à l'hôpital juste après résection chirurgicale d'un cancer rénal. Ces morceaux sont ensuite coupés en tranches de 300 μm d'épaisseur au laboratoire afin de procéder à de la culture organotypique. Les coupes de tissus sont mises pendant 48h au contact de 5 traitements différents dont 3 sont des inhibiteurs utilisés en clinique (Sunitinib,

Tensirolimus, Pazopanib) et 2 sont des combinaisons expérimentales (KU-CX et GDC-SRC qui cible la PI3K et la Src kinase). Après 48h de culture, nous regardons la viabilité cellulaire des coupes. Toute l'équipe est impliquée dans l'essai préclinique afin de récupérer et procéder aux tests sur les tumeurs, qui sont en parallèle caractérisées par immunohistochimie et RNA-seq. Comme vous le verrez dans l'article, nous présentons les résultats de viabilité de cet essai pour 6 patients dont les tumeurs ont été traitées avec la combinaison KU-CX (Figure 7).

Arrivée au laboratoire en 2019 dans le cadre de mon stage de master 2, je participe depuis 4 ans à l'essai clinique Comborein. Pendant mon stage ainsi que ma première année de thèse, j'ai travaillé à détailler le mécanisme d'action de la combinaison KU-CX sur des sphéroïdes de 786-O. J'ai déterminé que la combinaison induisait l'apoptose de façon ROS dépendante et j'ai réussi à définir l'implication des protéines NOX4 et MDC1 dans l'apoptose induite par la combinaison (Figure 3 et 5). Grâce à ce travail, j'ai pu proposer un mécanisme d'action induit par la combinaison KU-CX (Figure 6).

Le résumé de ce travail est illustré dans la Figure 25 ci-dessous et est présenté en détail dans l'article qui suit, intitulé « Cooperative blockade of CK2 and ATM kinases drives apoptosis in VHL-deficient renal carcinoma cells through ROS overproduction » que nous avons publié en tant que co-premières autrices, Sofia, Catherine et moi.

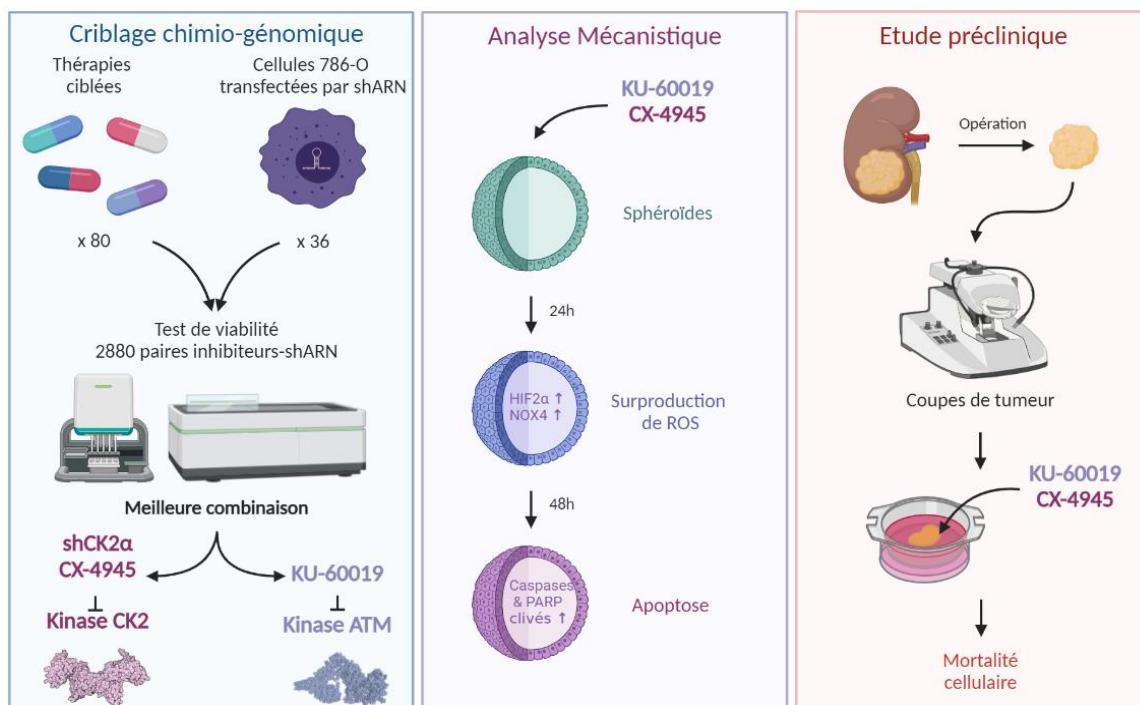


Figure 25 : Résumé graphique de l'étude de la co-inhibition de CK2 et ATM dans un modèle 3D de CRCC et sur de la culture organotypique.

2 . Cooperative blockade of CK2 and ATM kinases drives apoptosis in VHL-deficient renal carcinoma cells through ROS overproduction



Article

Cooperative Blockade of CK2 and ATM Kinases Drives Apoptosis in VHL-Deficient Renal Carcinoma Cells through ROS Overproduction

Sofia Giacosa ^{1,†}, Catherine Pillet ^{1,†}, Irinka Séraudie ^{1,†}, Laurent Guyon ¹ , Yann Wallez ^{1,2}, Caroline Roelants ³, Christophe Battail ¹ , Bertrand Evrard ⁴, Frédéric Chalmel ⁴ , Caroline Barette ¹ , Emmanuelle Soleilhac ¹, Marie-Odile Fauvarque ¹ , Quentin Franquet ^{1,5}, Clément Sarrazin ^{1,5}, Nicolas Peilleron ^{1,5}, Gaëlle Fiard ^{5,6} , Jean-Alexandre Long ^{5,6} , Jean-Luc Descotes ^{5,6}, Claude Cochet ¹ and Odile Filhol ^{1,*}

¹ Interdisciplinary Research Institute of Grenoble, IRIG-Biosanté, University Grenoble Alpes, CEA, UMR 1292, F-38000 Grenoble, France; sofia.giacosa@ext.erytech.com (S.G.); catherine.pillet@cea.fr (C.P.); irinka.seraudie2@cea.fr (I.S.); laurent.guyon@cea.fr (L.G.); yann.wallez@astrazeneca.com (Y.W.); christophe.battail@cea.fr (C.B.); caroline.barette@cea.fr (C.B.); emmanuelle.soleilhac@cea.fr (E.S.); marie-odile.fauvarque@cea.fr (M.-O.F.); qfranquet@chu-grenoble.fr (Q.F.); csarrazin1@chu-grenoble.fr (C.S.); nicolas.peilleron@gmail.com (N.P.); claude.cochet@cea.fr (C.C.)

² Bioscience, Early Oncology R&D, AstraZeneca, Cambridge CB2 1TN, UK

³ Inovarion, F-75005 Paris, France; caroline.roelants@inovarion.com

⁴ Inserm, EHESP, Iset (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail), University Rennes, UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France; bertrand.evrard@univ-rennes1.fr (B.E.); frederic.chalmel@univ-rennes1.fr (F.C.)

⁵ Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, CS 10217, CEDEX 9, F-38043 Grenoble, France; gfiard@chu-grenoble.fr (G.F.); JALong@chu-grenoble.fr (J.-A.L.); jldescotes@chu-grenoble.fr (J.-L.D.)

⁶ TIMC-IMAG, Grenoble Institut National Polytechnique, CNRS, University Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France

* Correspondence: odile.filhol-cochet@cea.fr; Tel.: +33-(0)4-38785645; Fax: +33-(0)4-38785058

† These authors contribute equally to this work.



Citation: Giacosa, S.; Pillet, C.; Séraudie, I.; Guyon, L.; Wallez, Y.; Roelants, C.; Battail, C.; Evrard, B.; Chalmel, F.; Barette, C.; et al.

Cooperative Blockade of CK2 and ATM Kinases Drives Apoptosis in VHL-Deficient Renal Carcinoma Cells through ROS Overproduction.

Cancers **2021**, *13*, 576. <https://doi.org/10.3390/cancers13030576>

Academic Editor: Cristina

Rodriguez-Antona

Received: 14 January 2021

Accepted: 26 January 2021

Published: 2 February 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/>).

Simple Summary: Renal cell carcinoma (RCC) is the eighth leading malignancy in the world, accounting for 4% of all cancers with poor outcome when metastatic. Protein kinases are highly druggable proteins, which are often aberrantly activated in cancers. The aim of our study was to identify candidate targets for metastatic clear cell renal cell carcinoma therapy, using chemogenomic-based high-throughput screening. We found that the combined inhibition of the CK2 and ATM kinases in renal tumor cells and patient-derived tumor samples induces synthetic lethality. Mechanistic investigations unveil that this drug combination triggers apoptosis through HIF-2 α (Hypoxic inducible factor HIF-2 α) dependent reactive oxygen species (ROS) overproduction, giving a new option for patient care in metastatic RCC.

Abstract: Kinase-targeted agents demonstrate antitumor activity in advanced metastatic clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), which remains largely incurable. Integration of genomic approaches through small-molecules and genetically based high-throughput screening holds the promise of improved discovery of candidate targets for cancer therapy. The 786-O cell line represents a model for most ccRCC that have a loss of functional pVHL (von Hippel-Lindau). A multiplexed assay was used to study the cellular fitness of a panel of engineered ccRCC isogenic 786-O VHL $^{-}$ cell lines in response to a collection of targeted cancer therapeutics including kinase inhibitors, allowing the interrogation of over 2880 drug–gene pairs. Among diverse patterns of drug sensitivities, investigation of the mechanistic effect of one selected drug combination on tumor spheroids and ex vivo renal tumor slice cultures showed that VHL-defective ccRCC cells were more vulnerable to the combined inhibition of the CK2 and ATM kinases than wild-type VHL cells. Importantly, we found that HIF-2 α acts as a key mediator that potentiates the response to combined CK2/ATM inhibition by triggering ROS-dependent apoptosis. Importantly, our findings reveal a selective killing of VHL-deficient renal carcinoma cells and provide a rationale for a mechanism-based use of combined CK2/ATM inhibitors for improved patient care in metastatic VHL-ccRCC.

Keywords: ccRCC; ATM; CK2; kinase inhibitor; HIF-2 α ; ROS pathway; NOX4; apoptosis; tumor tissue slices

1. Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the eighth leading malignancy in the world, accounting for 4% of all cancers. RCC patients do not show obvious pathognomonic symptoms but approximately 30% of them present with metastatic disease at the time of diagnosis and nearly half of the remainder will subsequently develop metastasis (mRCC) [1]. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCCs) is the most common form of kidney cancer, accounting for 70–90% of all cases [2]. The poor outcome of ccRCCs is due to the heterogeneous and aggressive nature of the disease, coupled with the lack of actionable biomarkers that can be used to direct therapy [3,4]. Therapeutic response in patients with clinically comparable tumors may differ significantly. Consequently, one of the key challenges in ccRCC is to define tangible means for patient stratification and to delineate targeted approaches to treatment. Most ccRCC have somatic mutations of both alleles of pVHL (von Hippel-Lindau), a component of an E3 ubiquitin ligase complex, which targets the hypoxia-inducible factors (HIF), HIF-1 α and HIF-2 α , for degradation [5]. Inactivation of pVHL in ccRCC leads to the accumulation of HIF-2 α [6], and reintroduction of a pVHL protein in VHL-deficient ccRCC cells downregulates HIF-2 α and suppresses their ability to form tumors [7]. The frequency of HIF accumulation is a critical oncogenic feature representing a potentially relevant event for treatment stratification [5,7–11]. Under normoxic conditions, the oxygen-sensitive α subunit of HIF-1 and HIF-2 are hydroxylated on two proline residues by the oxygen-dependent HIF α -specific prolyl hydroxylases and degraded by VHL-mediated ubiquitination. However, under hypoxic conditions, HIF α degradation is suppressed, leading to enhanced nuclear localization of HIF α and transcription of various target genes, including the angiogenic factor gene for vascular endothelial growth factor (VEGF) and other genes involved in tumor progression and metastasis [12].

Protein kinases—a highly druggable class of proteins—are often aberrantly activated in cancers and participate in the development of resistance to current treatments [13]. Consequently, a mainstay of therapy is the antiangiogenic small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) targeting the VEGF and platelet-derived growth factor β (PDGF β) signaling pathways such as sunitinib, sorafenib, pazopanib and axitinib [14–17], the VEGF-targeted antibody bevacizumab [18] and the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors temsirolimus and everolimus [19]. Although these targeted agents demonstrate antitumor activity and prolonged progression-free survival (PFS), to date, metastatic RCC remains largely incurable [20]. Thus, the lack of long-term efficacy of current treatments reveals the urgent need for exploring mechanism-based therapies focusing on the different pathways involved in this devastating disease. Genomic analyses have recently identified the molecular mechanisms such as DNA damage response, intracellular signaling and immune engagement that may influence the response to cancer therapy [21]. Integration of genomic approaches with small-molecule and genetically based high-throughput screening holds the promise of improved discovery of candidate targets for cancer therapy [22,23]. To evaluate the functional assessment of drug–gene interactions, we developed a novel in-house multiplexed assay to study the cellular fitness of a panel of engineered ccRCC isogenic 786-O VHL $^{-}$ cell lines in response to a collection of targeted cancer therapeutics including kinase inhibitors, allowing the interrogation of 2880 drug–gene pairs. This screening strategy revealed that renal cancer cells deficient in VHL were more vulnerable to the dual inhibition of the CK2 (casein kinase 2) and ATM (Ataxia telangiectasia mutated) kinases than cells with wild-type VHL, establishing a lethal situation wherein both drug treatment and VHL deficiency led to lethality. ATM is a master controller of signaling networks, including DNA damage response (DDR), chromatin remodeling, cell growth, oxidative stress and senescence [24–28]. In addition, ATM signaling is involved in cancer,

particularly in resistance to radio- and chemo-therapeutic treatment [29–32]. CK2 is a multifunctional protein kinase associated with a wide repertoire of substrates [33,34], which operates as a cancer driver by creating the cellular environment favorable to neoplasia [35]. Consequently, CK2 has emerged as a relevant therapeutic target being dysregulated in various cancers [36–40], including renal cancers [41,42].

Here, we demonstrated that inhibiting CK2 with the clinically relevant inhibitor CX-4945 in VHL-deficient renal cancer cells triggered a strong activation of phospho-ATM (Ser1982), suggesting that the benefit resulting from the combination of CK2 and ATM inhibition may be synergistic. Mechanistic investigations showed that the ATM inhibitor KU-60019 in combination with CX-4945 induced a strong inhibition of tumor cell proliferation, reduction of cell migration and reactive oxygen species (ROS)-dependent apoptosis in HIF-2 α -expressing VHL-deficient cells. Using both monolayer cell cultures, tumor cells grown as spheroids as well as organotypic short-term cultures of renal tumor tissue slices, our findings reveal a selective killing of VHL-deficient renal carcinoma cells and provide a rationale for the use of ATM inhibitors in combination with CX-4945 in ccRCC.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Lentiviral particles generated from the PLKO1 vector Hpgk-puro-cMV-tGFP containing different shRNA sequences targeting different genes were provided by Sigma-Aldrich (see Supplementary Table S1). The pGFP-C-shLenti containing ShNOX4 (NADPH Oxidase 4) from Origene was packaged in lentiviral particles.

All compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 10 mM. CX-4945 was synthesized at the Plateau Synthèse Organique, Département de Chimie Moléculaire, UJF, Grenoble, according to the method described in Reference [43]. The chemical library was composed of two commercial libraries, one from ENZO (screen-well kinases inhibitors) and the other from Selleckchem (Tyrosine kinase inhibitors), that were complemented with other inhibitors (see Supplementary Table S2). Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone (Z-VAD FMK) was from AdooQ biosciences, Propidium Iodide (PI), DMSO, poly(2-hydroxyethyl methacrylate), Tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid) and Polybrene were from Sigma-Aldrich (Lyon, France), D-Luciferin Potassium salt was from Perkin Elmer (Every, France), Caspase 3/7 fluorescent reagent was from Essen Bioscience (Royston Hertfordshire, UK) and MitoSOX indicator and PrestoBlueTM Cell Viability Reagent were from Thermo Fisher Scientific (Villebon sur Yvette, France).

2.2. Cell Culture

ccRCC cell lines 786-O and Caki-2 as well as normal renal proximal tubular epithelial cell line RPTEC (renal proximal tubular epithelial cell) were obtained from ATCC and Evercyte, respectively. The R305 cell line was a generous gift from Dr Arlot-Bonnemains. The 786-O cell lines were grown in 10 cm diameter plates in a humidified incubator (37 °C, 5% CO₂) with RPMI 1640 medium (Gibco) containing 10% of fetal bovine calf serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). RPTEC were cultured in ProXup (Evercyte). McCoy's medium containing 10% of fetal bovine calf serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) was used for the Caki-2 cell line. 786-O and RPTEC cells were passed every 2–3 days and only once a week, respectively.

The parental VHL null cell line was used to generate its derivative lines containing either the empty expression vector HA-pBABE or a functional VHL construct HA-VHL (VHL⁺ cells). Stable transfectants were maintained in medium supplemented with 2 µg/mL puromycin.

2.3. Transduction in 786-O Cells

For infection, 786-O cells were plated into 6-well plates (8 × 10⁵) in 2 mL of serum-supplemented RPMI 1640 medium. The day after, adherent cells were incubated with

lentiviral particles (1–5 MOI (multiplicity of infection)) diluted in 1 mL of serum-supplemented medium containing 8 μ g/mL of polybrene. After 4 h, 1 mL of medium were added to cultures and transduction was maintained for 16 h before washing cells and changing the medium. For stable transduction, puromycin selection started 36 h post-infection (at the concentration of 2 μ g/mL) and was maintained during all cell culture.

2.4. Fully Automated, High-Throughput Screening Assay

Control (Ctrl)- or targeted-shRNA expressing 786-O cells (90 μ L, 55.5×10^3 cells/mL) were seeded in 96-well plates and incubated overnight at 37 °C in a 5% CO₂-humidified atmosphere. Then, 10 μ L of each compound was added at the indicated concentrations (1, 5 or 20 μ M final concentration) using the (Criblage pour des Molécules BioActives) CMBA's robotic screening platform. DMSO was used as a negative control and 20 μ M CX-4945 as a positive control. Plates were further cultured for 48 h. Cells were labeled with vital Hoechst (33342) together with Prestoblue and the fluorescence reading was made through the Tecan's Infinite M100 reader. See the flow chart in Supplementary Figure S1.

2.5. Data Processing and Hit Selection

Primary and secondary high-throughput screening assays were evaluated and validated using a simple statistical parameter, the Z'-factor [44].

Raw data were first imported into the database of the homemade analysis software TAMIS, used for analysis. For each test plate and assay type (PrestoBlue or vital Hoechst), mean of the eight DMSO negative control values was considered as 0% activity and mean of the eight CX-4945 positive control values was considered as 100% activity. Then, each compound X-related raw value was translated in percent activity, compared to DMSO (0%) and CX-4945 (100%). Finally, for each compound X/targeted-shRNA Y pair and assay, the percentage of activity obtained with the compound X/Ctrl-shRNA was taken from the compound X/targeted-shRNA Y activity percentage in order to identify compound X/targeted-shRNA Y pairs showing additive, or even synergistic, effect compared to compound X/Ctrl-shRNA pairs.

2.6. Guide RNA Design and Cloning

Briefly, the single-guide RNA (sg#1, sg#2 designed with <https://zlab.bio/guide-design-resources/> and sgCTL) were cloned into the expression vector lentiCRISPRv2 backbone (addgene #52961) digested with BsmBI: A pair of 20 nt oligos containing the appropriate overhang was then ligated into the vector (Supplementary Table S3). After sequencing, lentiviral particles were produced to transduce 786-O cells according to Reference [45].

2.7. Two-Dimension (2D) Viability Assay

Cytotoxicity was measured using PrestoBlue® assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cell lines were seeded in a 96-well plate at a concentration of 5×10^4 cells/mL. Cells were allowed to attach for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were exposed to the negative control DMSO or positive drug CX-4945 at 20 μ M for 48 h or the other molecules at indicated concentrations.

2.8. Western Blot Analysis

Cells were lysed for 15 min in RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) buffer (Tris HCl pH 7.4 10 mM, NaCl 150 mM, SDS (Sodium dodecyl sulfate) 0.1%, Na Deoxycholate 0.5%, EDTA (Ethylene diamine tetra acetic) 1 mM, Triton X100 1%, a protease inhibitor cocktail (Sigma P8340) and phosphatase inhibitor cocktails 1 and 2 (Sigma P2850, P5726)). Cells were subsequently clarified at 16,000 g for 15 min. Homogenate protein content was quantified using the BCA (bicinchoninic acid) protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). SDS-PAGE (Poly acrylamide gel electrophoresis) was performed using pre-cast 4–12% gradient gel NuPAGE (Life technologies) and MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)

running buffer at 150 volts for 75 min. Separated proteins (20 μ g/lane) were transferred to PVDF membranes (60 min at 100 volts). Blotted membranes were blocked during 1 h at room temperature with saturation buffer (1% BSA in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20), and then incubated with primary antibody diluted in saturation buffer for 16 h. Secondary antibodies were added for 1 h. Detection was performed by using Luminata Forte Western HRP (horse radish peroxidase) substrate (Millipore) and Fusion FX acquisition systems. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) or HSP90 (heat shock protein) were used to check for equal protein loading. Western blotting was performed using antibodies against human P-ATM Ser1981 #Ab81292, Glut1 #Ab15309, MDC1 #Ab11169, NOX4 #Ab109225 (Abcam, Paris, France), P-AKT Ser129 #AP3020a (Interchim, Montluçon France), GAPDH#AM4300 (Ambion, Villebon sur Yvette, France), HIF-2 α #NB100122 (NovusBio, Cambridge, UK), ATM #2873, AKT #9272, PARP #9542, HSP90 #4874, purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Cyr-L’École, France).

2.9. Three-Dimension (3D) Assay

Cells were seeded into U-bottom 96-well plates coated with 20 mg/mL poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma-Aldrich) at the density of 1500 cells per well and centrifuged at 400 g for 5 min. Three-day pre-formed spheroids were treated with the different drugs at indicated concentrations during 48 h. After that, Hoechst (200 ng/mL) and PI (0.5 μ g/mL) were added as markers of cell nuclei and cell death, respectively. Images of PI (BGRFR_549_15 filter) and Hoechst (BGRFR_386_23 filter) fluorescence were acquired with a 5 \times objective on the ArrayScanVTI HCS microscope (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) at the CMBA platform. The HCS Studio Morphology Explorer bio-application was used to automatically perform High Content image Analysis and extract parameters such as spheroid area measurement, fluorescent intensity measurement of each staining and count of the dead cells number.

2.10. Bulk RNA Barcoding (BRB)-Seq Library Preparation and Sequencing

Total RNA was extracted from MCTS using the MirVana PARIS kit (Thermofisher). The 3' Bulk RNA Barcoding and sequencing (BRB-seq) experiments were performed at the Research Institute for Environmental and Occupational Health (Irset, Rennes, France) according to the published protocol [46]. Briefly, the reverse transcription and the template switching reactions were performed using 4 μ L total RNA at 2.5 ng/ μ L. RNA were first mixed with 1 μ L barcoded oligo-dT (10 μ M BU3 primers, Microsynth), 1 μ L dNTP (desoxyribonucleoside triphosphate) (0.2 mM) in a PCR (Polymerase Chain Reaction) plate, incubated at 65 °C for 5 min and then put on ice. The first-strand synthesis reactions were performed in 10 μ L total volume with 5 μ L of RT (Reverse transcription) Buffer and 0.125 μ L of Maxima H minus Reverse Transcriptase (Thermofisher Scientific, #EP0753) and 1 μ L of 10 μ M template switch oligo (TSO, IDT). The plates were then incubated at 42 °C for 90 min and then put on ice.

After reverse transcription (RT), decorated cDNA from multiple samples were pooled together and purified using the DNA Clean and concentrator-5 Kit (Zymo research, #D4014). After elution with 20 μ L of nuclease-free water, the samples were incubated with 1 μ L Exonuclease I (NEB, #M0293) and 2 μ L of 10 \times reaction buffer at 37 °C for 30 min, followed by enzyme inactivation at 80 °C for 20 min.

Double-strand (ds) cDNAs were generated by PCR amplification in 50 μ L total reaction volume using the Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech, #639206). PCR reaction was performed using 20 μ L cDNA from the previous step, 5 μ L of 10 \times Advantage 2 PCR buffer, 1 μ L of dNTPs 50 \times , 1 μ L of 10 μ M LA-oligo (Microsynt), 1 μ L of Advantage 2 Polymerase and 22 μ L of nuclease-free water following the program (95 °C—1 min, 11 cycles: 95 °C—15 s, 65 °C—30 s, 68 °C—6 min, 72 °C—10 min). Full-length double-stranded cDNA was purified with 30 μ L of AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, #A63881), eluted in 12 μ L of nuclease-free water and quantified using the dsDNA QuantiFluor Dye System (Promega, #E2670).

The sequencing libraries were built by fragmentation using 50 ng of ds cDNA with the Illumina Nextera XT Kit (Illumina, #FC-131-1024) following the manufacturer's recommendations. The reaction was incubated for 5 min at 55 °C, immediately purified with DNA Clean and concentrator-5 Kit (Zymo research) and eluted with 21 µL of nuclease-free water. The fragmented library was PCR-amplified using 20 µL eluted cDNA, 2.5 µL of i7 Illumina Index, 2.5 µL of 5 µM P5-BRB primer (IDT) using the following program (72 °C—3 min, 98 °C—30 s, 13 cycles: 98 °C—10 s, 63 °C—30 s, 72 °C—5 min). The fragments ranging 300–800 base pairs (bp) were size-selected using SPRIselect (Beckman Coulter) (first round 0.65× beads, second 0.56×), with a final elution of 12 µL nuclease-free water. The resulting library was sequenced on an Illumina Hiseq 4000 sequencer as Paired-End 100 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.7 and bcl2fastq 2.17.1.14. Adapter dimer reads were removed using DimerRemover (<https://sourceforge.net/projects/dimerremover/>).

2.11. BRB-Seq Raw Data Preprocessing

The first read contains 16 bases that must have a quality score higher than 10. The first 6 bp correspond to a unique sample-specific barcode and the following 10 bp to a unique molecular identifier (UMI). The second reads were aligned to the human reference transcriptome from the UCSC website (release hg38, downloaded in August 2020) using BWA version 0.7.4.4 with the non-default parameter “-1 24”. Reads mapping to several positions in the genome were filtered out from the analysis. The pipeline is described in Reference [47]. After quality control and data preprocessing, a gene count matrix was generated by counting the number of unique UMIs associated with each gene (lines) for each sample (columns). The resulting UMI matrix was further normalized by using the rlog transformation implemented in the DeSeq2 package [48]. Raw and preprocessed data were deposited at the ArrayExpress repository under the accession number E-MTAB-9977.

2.12. Bioinformatics Analysis

Principal component analysis (PCA) was performed using Python package sklearn v0.22. Histograms were generated using Python package seaborn v0.9.0. Dataframe manipulation and bar plot visualization were carried out using Python packages numpy v1.17.3 and pandas v0.25.3. Biological pathway enrichments were performed by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (false discovery rate (FDR) < 0.25), using biological process (BP) and molecular function (MF) annotations from the GO.db_v3.10.0 (Bioconductor R3.6.3) database. ClusterProfiler v3.14.3 (Bioconductor R3.6.3) was used to execute GSEA and to generate visualizations using dotplot, emapplot and gsea plot functions.

2.13. 3D Cell Migration Assay

The cell migration assay was performed as described in Reference [49]. Briefly, 3-day-old round-bottom plate pre-formed spheroids were transferred to flat-bottom 96-well plates and treated with either DMSO, KU-60019 (10 µM), CX-4945 (7.5 µM) or a mix of both for 48 h. Upon adherence to the solid support, spheroids disassembled and released cells migrated away radially from their initial position. Cell spreading was followed over 7 days. Markers, Hoechst 33,342 (blue) and PI (red), were added to visualize cell spreading and dead cells, respectively. Quantification was made using Image J software.

2.14. ROS and Cell Death Measurements

Mitochondrial ROS production was measured with the MitoSOX indicator (5 µM), a fluorescent dye. Cell death was evaluated either with PI incorporation at 0.5 µg/mL or IncuCyte Caspase-3/7 reagents (5 µM). The IncuCyte® (Sartorius, France) real-time imager performed image acquisitions every hour for 24/48 h. Images were analyzed for fluorescent area quantification with IncuCyte Zoom® software (Royston Hertfordshire, UK).

2.15. Mice Orthotopic Tumor Xenograft Models

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. Renal orthotopic implantation was carried out by injection of 3×10^6 786-O luc cells into the left kidney of athymic nude mice as previously described [50]. Two patient derived xenograft (PDX) models, RCC43B and RCC-10-B, were generated by Xentech (Paris France). Briefly, tumor fragments (30 mm^3) were grafted in the inter-scapular subcutaneous tissue, one fragment per mouse. Tumors were obtained from the lymph node's metastatic sites of patients' ongoing clear cell/granular kidney carcinoma. The status of the VHL gene was determined as wild type (WT) and mutated (E160fs14aa (chr3-10191481-G->GA-frameshift insertion)) for RCC43B and RCC10B, respectively.

2.16. Patients and Clinical Samples

All human renal carcinoma samples were obtained from patients, with their informed consent, and all procedures were approved by the ethics committee (Patient Protection Committee No. 2017 A0070251). Patients were recruited under the clinical trial, Comborein (NCT03572438). Fresh renal tumor tissue was obtained from patients undergoing a partial or a total nephrectomy for cancer at the Urology Department, University Hospital Center of Grenoble, Alpes (CHUGA).

2.17. Fresh Tissue Sectioning

A Vibratome VT1200 (Leica Microsystems) was used to cut thin ($300 \text{ }\mu\text{m}$) slices from fresh tumor tissue. Samples were soaked in ice-cold sterile-balanced salt solution (HBSS), orientated, mounted and immobilized using cyanoacrylate glue. Slicing speed was optimized according to tissue density and type; in general, slower slicing speed was used on the softer tissues and vice versa (0.03–0.08 mm/neoplastic tissue, 0.01–0.08 mm/s normal tissue). Vibration amplitude was set at 2.95–3.0 mm.

2.18. Organotypic Tissue Cultures

Tissue slices were cultured on organotypic inserts for up to 120 h (one slice per insert; Millipore). Organotypic inserts are Teflon membranes with $0.4 \text{ }\mu\text{m}$ pores that allow preservation of 3D tissue structure in culture. Tissue culture was performed at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator using 2 mL of DMEM media supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (GIBCO), 100 U/mL penicillin + streptomycin (Invitrogen) and placed in a rotor agitator to allow gas and fluid exchanges with the medium. The 786-O luc tumor slices were harvested at baseline time (T0) and thereafter at 24 h intervals, and the slices were incubated with the drugs at the indicated concentrations and after 24 and 48 h and medium containing Luciferin was added and imaged using IVIS. Region of interest (ROI) levels allowed quantifying the efficacy of the drug treatment. The viability of PDX and human tumor slices was assayed as previously described [51].

2.19. Statistical Analysis

The statistical significance of differences between the means of two groups was evaluated by using GraphPad version 6. Tests are indicated below in each figure legend.

3. Results

3.1. An Integrated RNAi and Drug Screen Identifies CK2 and ATM as Drug Targets in VHL-Deficient Renal Carcinoma Cells

Promising drug combinations may be discovered with synthetic lethal screens using siRNA or shRNA libraries to identify targets for anticancer drugs [52,53]. We performed a 786-O cell line-based synergy screen using custom-designed shRNA focused on genes involved in multiple hallmarks of cancer, including rapid proliferation, growth, survival and metastasis. The 786-O cells display a VHL frameshift deletion and a consequent increased HIF-2 α and VEGF protein expression, making this cell line a workhorse for RCC

research [54]. The collection of cell-silenced genes was designed in particular to include kinases that are required for cancer cell fitness (defined as genes required for cell growth or viability). These genes were selected according to their roles in different oncogenic pathways. This yielded a list of 36 genes that have been linked to several cancers, including ccRCC (Supplementary Table S1). To uncover combinatorial lethal interactions, these isogenic cell lines were individually screened against a custom small-molecule library. Among the 80 different targeted agents tested, 22 were Food and Drug Administration (FDA)-approved and used in the clinic, maximizing the chance of identifying drug–gene interactions that could be easily translated in a clinical setting. In particular, the library comprised clinically relevant kinase inhibitors (Supplementary Table S2). The drug library was screened at three concentrations, yielding 8640 data points. After 48 h of treatment, cell viability was determined with Hoechst (33,342) fluorescence and Prestoblue reading (Supplementary Figure S1).

The outcome of our combination-screening program revealed diverse patterns of drug sensitivities. From this pool, we identified a promising new combination between CK2 α shRNA and the ATM kinase inhibitor KU-60019 that was prioritized for further evaluation (Figure 1A). Importantly, the potentiation of cell lethality was also observed when the cells were treated with a combination of KU-60019 and CX-4945, a specific CK2 inhibitor (Figure 1B). Since different VHL status in renal carcinoma cells have been shown to affect their drug sensitivity in hypoxic conditions [45,46], we stably reintroduced VHL into 786-O VHL-deficient cells and evaluated their sensitivity to the CK2 and ATM inhibitors under low oxygen concentration (1.5%) (Figure 1C1,C2). Under these conditions, both cell lines were weakly sensitive to each inhibitor alone. In contrast, we observed a strong inhibitory effect of their combination in the 786-O VHL $^{-}$ cells compared to 786-O VHL $^{+}$ cells. The combination led to a 37% cell death instead of a theoretical 10% cell death if considering a cumulative impact of the two inhibitors, suggesting a synergistic activity of this drug combination. Of note, this inhibitory effect was weaker in normoxic conditions, suggesting a role for the HIF signaling pathway in this response (Supplementary Figure S2). Western blot analysis was performed to visualize the targeted inhibition of ATM and CK2 in VHL $^{-}$ and VHL $^{+}$ 786-O cells under hypoxic conditions (Figure 1D). ATM was clearly inhibited by KU-60019, as evidenced by a reduction in the canonical ATM auto-phosphorylation at Ser1981 [55,56]. Likewise, CK2 was inhibited by CX-4945 as assessed by the reduction of P-AKT Ser 129 [57]. Both ATM and CK2 activities were strongly reduced by the combined drug treatment. Together, these observations demonstrate similar target engagement and biological activity in VHL $^{-}$ and VHL $^{+}$ 786-O cells. Surprisingly, CK2 inhibition led to a significant ATM activation, suggesting that combined inhibition of ATM and CK2 likely exerts its effect by affecting complementary signaling pathways that compromise cell viability. We next investigated whether the effect of this drug combination could also be observed in the Caki-2 cells, which express a mutated form of the VHL protein [58,59]. In hypoxic conditions, the viability of these cells was also altered by the drug combination (Figure 1E), whereas no significant effect was observed in RPTEC cells, which represent normal renal proximal tubule epithelial cells (Supplementary Figure S2C). Thus, our chemo-genetic screens revealed a vulnerability of VHL-deficient renal carcinoma cells to combined inhibition of CK2 and ATM kinases. Given the safety of CX-4945 in phase I clinical trials [60,61] and the lack of any reported connection between CK2 and ATM kinases, this drug combination was selected for further characterization and patented [62].

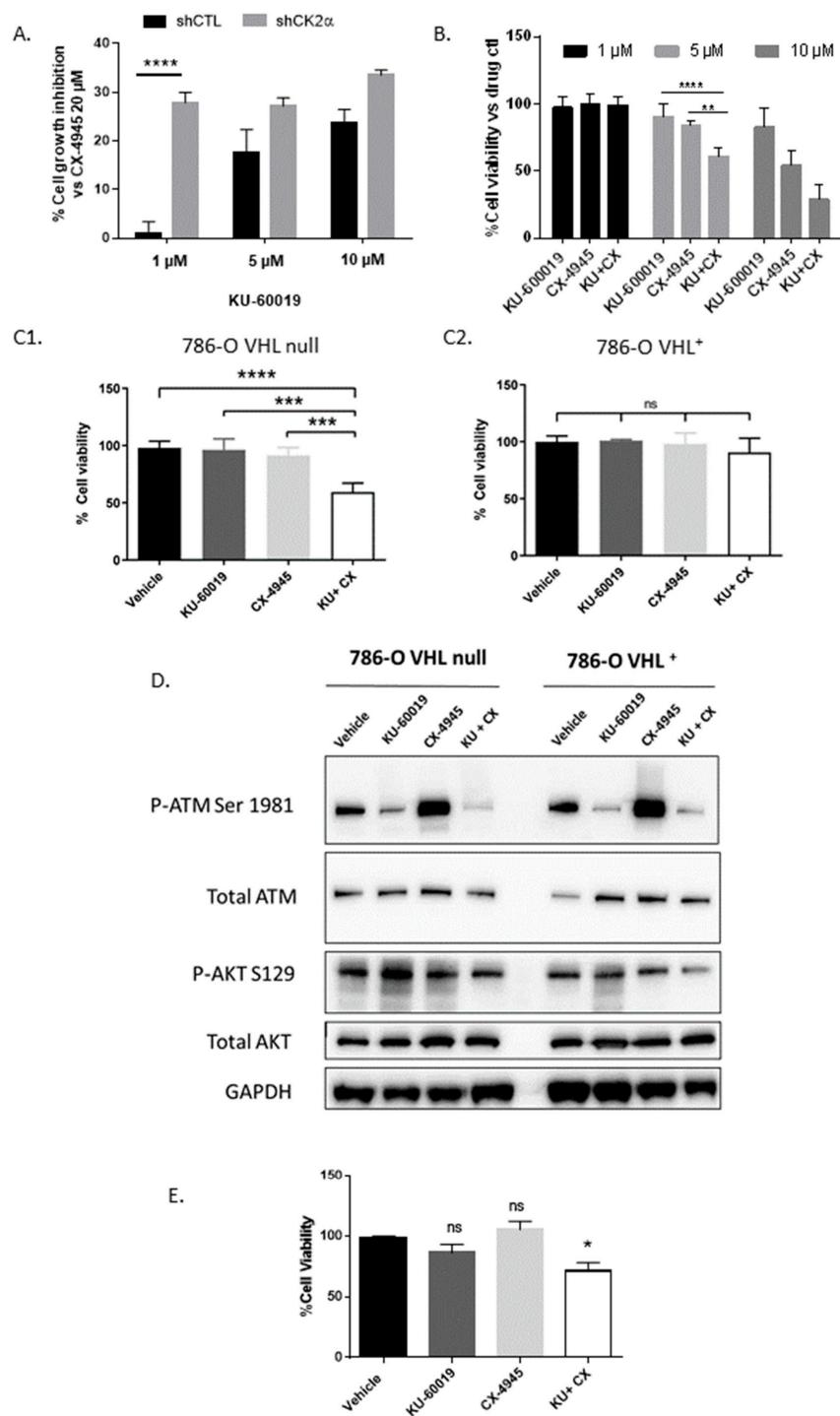


Figure 1. Co-Inhibition of CK2 α and ATM kinases induces enhanced cell toxicity in ccRCC cells. **(A)** shCTL and shCK2 α -transduced 786-O cells were treated with indicated concentrations of ATM inhibitor (KU-60019) for 48 h and cell viability was measured using Prestoblue[®] assay ($n = 4$). The 100% cell growth inhibition corresponds to cells treated with CX-4945 (20 μ M). **(B)** Relative sensitivity of 786-O cells to a dual drug inhibition of CK2 α (CX-4945) and ATM (KU-60019) kinases at different concentrations (1 μ M in black, 5 μ M in light grey and 10 μ M in dark grey) ($n = 6$). **(C)** Relative sensitivity of 786-O cells without VHL (C1, $n = 4$) or with re-introduced VHL (C2, $n = 4$) to single drugs (KU-60019, 5 μ M, or CX-4945, 2.5 μ M) or drug combination, in hypoxic conditions (1.5% O₂). **(D)** Western blot analysis showing expression level of ATM, P-ATM (Ser1981), AKT, P-AKT (Ser129) and GAPDH as a loading control. **(E)** Relative sensitivity of CAKI-2 ccRCC cell line ($n = 4$) to single drugs (KU-60019, 5 μ M, or CX-4945, 2.5 μ M) or drug combination in hypoxic conditions (1.5% O₂) compared to the Vehicle (DMSO). Two-way analysis of variance (ANOVA) and Mann–Whitney analysis were used for (A) and (B–E), respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns (not significant).

3.2. Combined Inhibition of CK2 and ATM Decreases Cell Migration and Promotes Apoptosis in Renal Multi-Cellular Tumor Spheroids

In order to better simulate the tumor environment, drug treatments were performed on multi-cellular tumor spheroids (MCTS), which are known to mimic micro-tumors more closely than cancer cell line monolayers. In addition, several studies reported that drug sensitivity testing performed on MCTS can efficiently predict the efficacy of new antitumor compounds [63,64]. Therefore, MCTS generated from shCK2 α -786-O or shATM-786-O cells were treated for 48 h with increasing concentrations of KU-60019 or CX-4945 respectively, and cell death was monitored by PI quantification. As shown in Figure 2A, B, significant cell death was specifically induced at the lowest concentrations (5 μ M) of KU-60019 or CX-4945 in shCK2 α - or shATM-786-O VHL-deficient cells, respectively. Furthermore, cell death induction was also observed in MCTS generated from parental VHL $^{-}$ 786-O cells treated with KU-60019, CX-4945 alone or in combination (Figure 2C). In contrast, VHL $^{+}$ 786-O MCTS were insensitive to the drug combination at any concentration. Similar results were observed with another ccRCC VHL $^{-}$ patient-derived cell line (R305) (Figure 2D) [65].

Migration is one of the first mechanisms that cancer cells use to escape from a primary tumor before metastatic colony formation in distant organs [65]. Cell spreading from MCTS might predict cell migration [49]. Thus, we determined the capacity of 786-O cells to migrate and escape from MCTS and to survive after 1 to 7 days of treatment with the drugs alone or in combination. As shown in Figure 2E,F, after 5 days of culture, there was a statistically significant decrease in cell spreading after CX-4945/KU-60019 combination regimen, as compared with single treatments, indicating a synergistic effect of this drug combination. Moreover, the viability of migrating cells was much more strongly affected by the combination than by the single drugs (Figure 2G).

To further evaluate whether the increase of PI staining observed after drug treatment was related to apoptosis, VHL-786-O MCTS were treated with KU-60019 or CX-4945 alone or in combination, in the absence or presence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD. After 48 h of treatment, cell death either induced by the drugs alone or by their combination was abrogated by the presence of Z-VAD, suggesting that the drug combination cooperatively induced apoptosis in 786-O MCTS (Figure 3A). In agreement with these results, enhanced poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage was observed in response to the drug combination (Figure 3B). Similarly, IncuCyte $^{\circledR}$ real-time imaging showed that the presence of Z-VAD completely thwarted the strong Caspase 3/7 activation observed in response to CX-4945/KU-60019 treatment (Figure 3C). Therefore, these results indicate that apoptosis induction by the CX-4945/KU-60019 combination strongly compromises the viability of 786-O cells inside the MCTS.

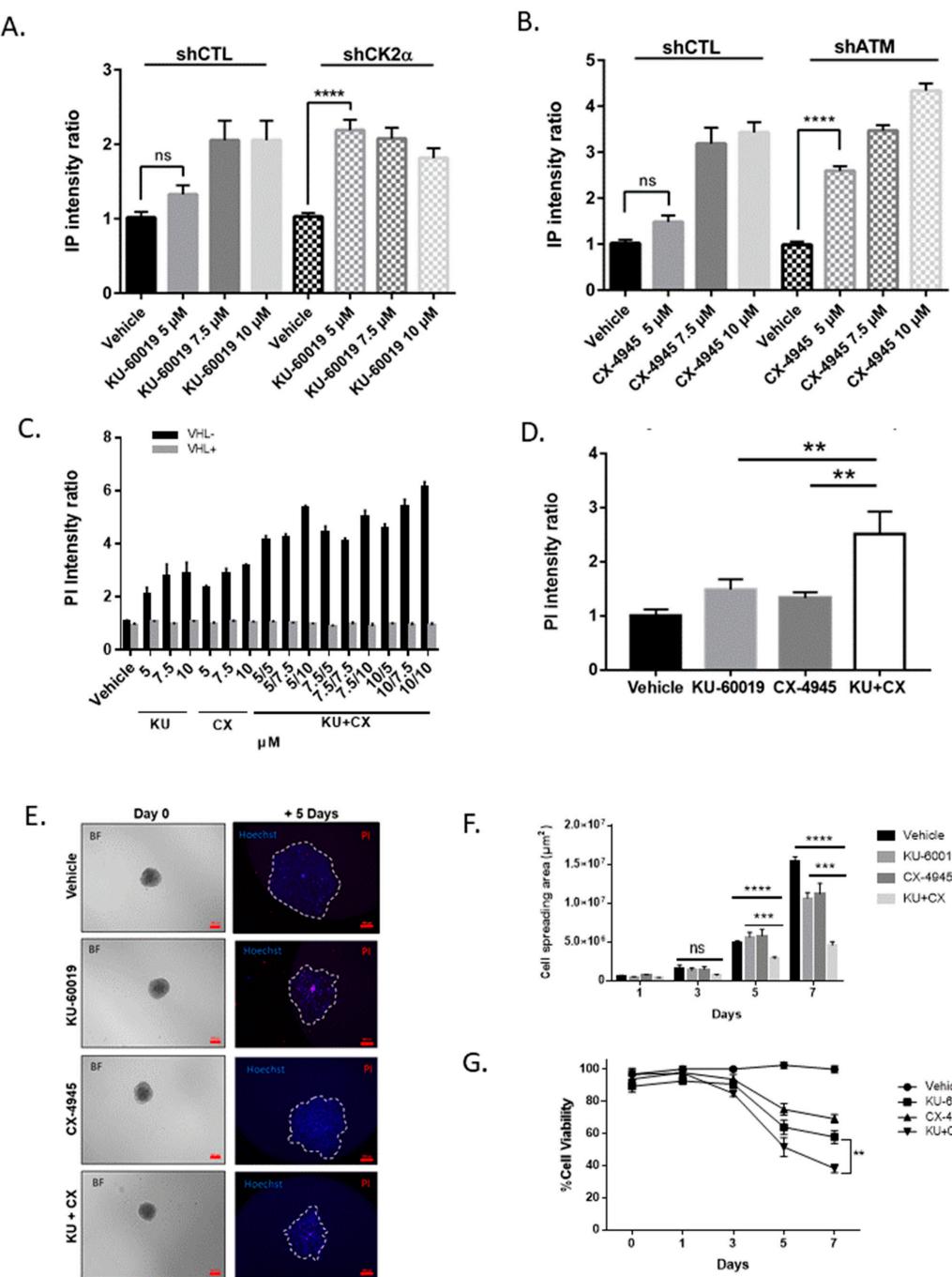


Figure 2. Cell death is induced in tumor environment conditions. (A,B) Multi cellular tumor spheroids (MCTS) were pre-formed for 3 days with indicated 786-O sh-transduced cell lines before treatment for 48 h with vehicle or increasing concentrations of KU-60019 or CX-4945 (5, 7.5 and 10 μ M). Cell death was monitored by PI quantification using the ArrayScan[®] VTI HCS Reader (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). A significant difference (**** $p \leq 0.0001$) was observed when comparing the treatment of either shCK2 α MCTS to Vehicle (DMSO) with 5 μ M KU-60019 (A) or shATM MCTS to vehicle with 5 μ M CX-4945 (B) (Kruskal–Wallis non-parametric test, $n = 20$). (C) MCTS of 786-O VHL[−] ($n = 19$, black bars) or 786-O VHL⁺ ($n = 12$, grey bars) cells were treated with increasing concentrations of KU-60019 and/or CX-4945 (5, 7.5 or 10 μ M each) or Vehicle (DMSO). PI (0.5 μ g/mL) incorporation was quantified at 48 h using the ArrayScan[®] VTI HCS Reader. (D) R305-derived MCTS were treated with either vehicle (DMSO), drugs alone (KU-60019 10 μ M; CX-4945 5 μ M) or in combination (KU + CX) for 48 h before cell death quantification (Kruskal–Wallis non-parametric test, $n > 12$). (E) Representative pictures of spheroids that were placed on plastic for migration assay after day 0 and day 5 of treatment (Scale bar at day 0:100 μ m, Scale bar at day 5:500 μ m). (F) Kinetic analysis of cell spreading. (G) Cell viability kinetics after 0, 1, 3, 5 and 7 days of cell spreading (Kruskal–Wallis test, $n = 15$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns (not significant).

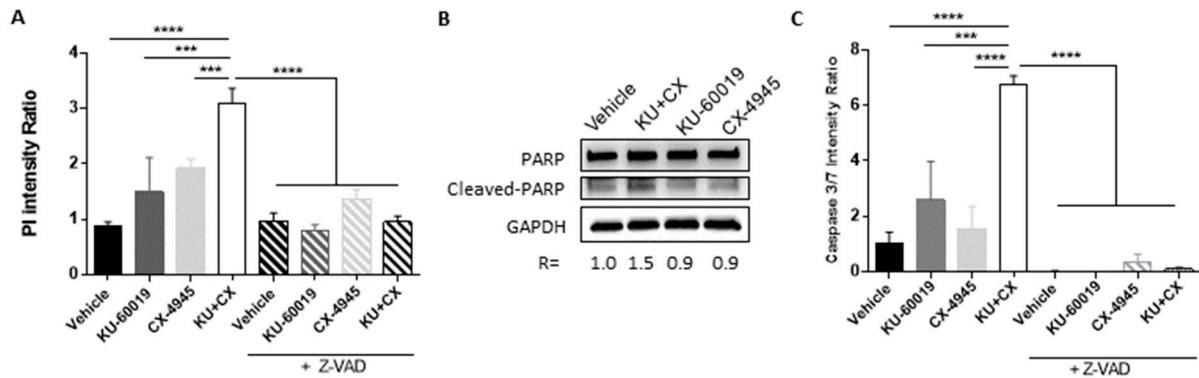


Figure 3. Combined CK2/ATM inhibition induces apoptosis in MCTS. (A) 786-O VHL[−] MCTS were incubated with PI (0.5 μ g/mL) and the following treatments: Vehicle (DMSO), KU-60019 (10 μ M) and/or CX-4945 (5 μ M) \pm Z-VAD (15 μ M). Cell mortality (PI incorporation) was assessed over 48 h using IncucyteZOOM. PI incorporation under treatments is represented at 48 h ($n = 10$). (B) Western blot analysis after a 24 h treatment showing expression level of PARP, cleaved-PARP and GAPDH as loading control. (C) 786-O VHL[−] MCTS were incubated with Caspase 3/7 Fluorescent reagent (5 μ M) with the indicated treatments as in (A). Apoptosis was assessed over 24 h using IncucyteZOOM. Cleaved-caspase detection is represented after 16 h of treatment ($n = 6$). One-way ANOVA statistical analysis was used, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.3. HIF-2 α Expression Enhances Vulnerability to Combined CK2 and ATM Inhibition

Since the 786-O VHL[−] cell line lacks wild-type HIF-1 α but expresses HIF-2 α [66], we investigated the effect of the drugs alone or in combination on HIF-2 α expression (Figure 4A). After 48 h of treatment, KU-60019 or CX-4945 alone or in combination led to significantly increased HIF-2 α expression. Conversely, we wondered whether the sensitivity of 786-O VHL[−] cells to combined CX-4945/KU-60019 treatment was affected by loss of HIF-2 α . For this, 786-O VHL[−] cells were transfected with Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CAS9 plasmids to generate HIF-2 α knockout cell lines in which HIF-2 α and its downstream target Glut-1 were downregulated (Figure 4B). MCTS generated from these cells were treated for 48 h with KU-60019 or CX-4945 alone or in combination and cell death was quantified by PI measurement. Strikingly, as shown in Figure 4C, the capacity of KU-60019 alone or in combination with CX-4945 to induce cell death in these MCTS was impeded in an on-target manner by CAS9-mediated loss of HIF-2 α , suggesting that the vulnerability to combined inhibition of ATM and CK2 in VHL-deficient ccRCC is positively correlated with HIF-2 α expression levels. Thus, HIF-2 α acts as a mediator that potentiates CK2 and ATM inhibition to induce cytotoxicity in VHL-deficient renal carcinoma cells. Therefore, the level of HIF-2 α expression may represent a potential efficacy biomarker for the CX-4945/KU-60019 treatment (a higher baseline pre-treatment level of HIF-2 α would be predictive of response for patients with ccRCC).

Phosphorylation of HIF-1 α and HIF-2 α subunits have been demonstrated to enhance transactivation of target genes by either disrupting HIF α interaction with VHL and thereby stabilizing HIF α , or by increasing the affinity of HIF α for transcriptional coactivators [67]. CK2 was described as a regulator of HIF-1 α transcriptional activity [68] and hypoxia-induced phosphorylation by CK2 has been demonstrated in the C-TAD domain at conserved threonine residues (Thr796 for HIF-1 α and Thr840 for HIF-2 α). Mutation of these residues decreased reporter activity [69–71]. In contrast, the involvement of CK2 in the regulation of HIF-2 α has not been established. To assess a potential link between CK2 and HIF-2 α , we first analyzed, by ion-exchange chromatography, cell extracts from HEK293T cells expressing HA-tagged HIF-2 α . Both CK2 activity assays and Western blot analysis of CK2 α / α' subunits revealed co-elution of CK2 with HIF-2 α (Supplementary Figure S3A). Fractions containing the highest CK2 α / α' levels (fractions 9–12) were incubated with [γ -³²P]-ATP/MgCl₂ in the absence (DMSO) or presence of CX-4945 and phosphorylated

proteins were resolved on SDS-PAGE and detected by autoradiography. A phosphorylated protein with the expected size of HIF-2 α (110 kDa) was co-eluting with CK2 α/α' and this phosphorylation was abolished in the presence of CX-4945 (Supplementary Figure S3B). Alternatively, HA-HIF-2 α was immunoprecipitated from transiently transfected HEK293T cells and the immune complexes were either incubated with [γ - 32 P]-ATP/MgCl₂ (Supplementary Figure S3C-a) or assayed for CK2 kinase activity (Supplementary Figure S3C-b). A co-immunoprecipitated kinase activity was able to phosphorylate a protein with the expected size of HIF-2 α and this phosphorylation was abrogated in the presence of CX-4945 (Supplementary Figure S3C-a). Likewise, HA-HIF-2 α immunoprecipitates were shown to contain a CX-4945-sensitive CK2 activity (Supplementary Figure S3C-b). Thus, HIF-2 α and CK2 co-purify as a stable complex throughout ion-exchange chromatography or after immunoprecipitation of HIF-2 α .

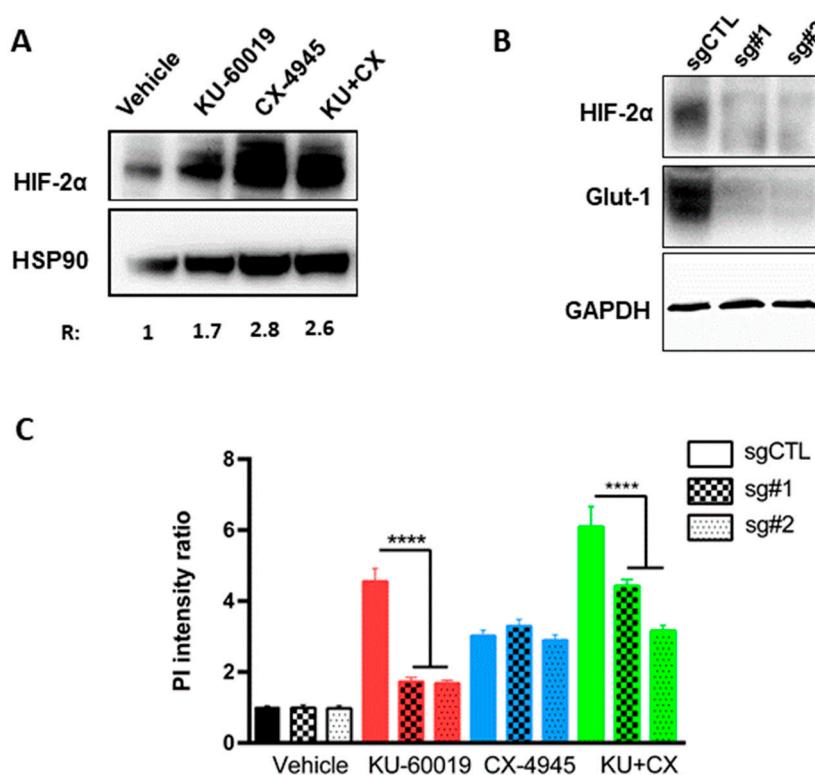


Figure 4. HIF-2 α expression enhances vulnerability to the CX-4945/KU-60019 combination. (A) 786-O VHL null MCTS were treated either with vehicle (DMSO), KU-60019 (10 μ M) and/or CX-4945 (5 μ M) for 48 h. Western blot analysis shows protein expression levels of HIF-2 α and HSP90 as loading control. (B) Protein extracts from HIF2- α CRISPR/CAS9 (sg#1 and sg#2) and CTL CRISPR/cas9 (sgCTL) 786-O cells culture in 2D were analyzed by Western blot. Shown are expression levels of HIF2- α , Glut-1 and GAPDH as a loading control. (C) MCTS, as described in (B), were treated either with vehicle (DMSO), KU-60019 (10 μ M) and/or CX-4945 (5 μ M) for 48 h. Cell death was quantified by PI measurement ($n = 9$). One-way ANOVA statistical analysis was used, **** $p < 0.0001$.

Collectively, these experiments suggest that HIF-2 α -dependent vulnerability to combined inhibition of ATM and CK2 in VHL-deficient renal carcinoma cells may rely on a functional CK2–HIF-2 α interaction.

3.4. Cell Death in Response to Combined CK2 and ATM Inhibition Is Dependent on ROS Overproduction

Oxidative stress, defined as a relative excess of ROS, has been implicated in many aspects of cancer biology. While ROS might be pro-tumorigenic, high ROS levels are cytotoxic [72]. Owing to their active metabolism and oncogenic stimulation, most cancer cells exhibit elevated levels of ROS [73] that make them more vulnerable than normal cells to additional oxidative stress [74–76]. Therefore, an emerging view is that such vulnerability can be exploited to selectively kill cancer cells [77]. As mitochondria are known to play a central role to elicit apoptosis in response to many stresses [78,79], we investigated whether mitochondria are involved in KU-60019/CX-4945-induced apoptosis. Mitochondrial ROS generation was analyzed using the MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator. We found that the KU-60019/CX-4945 combination triggers a much stronger and more sustained ROS generation than the drugs alone in VHL[−] 786-O MCTS. This effect was evident as early as 12 h post-treatment (Figure 5A and Supplementary Figure S4A,B). Results in Figure 5B showed that Tiron, a cell-permeable ROS scavenger, mitigated this robust ROS overproduction. To interrogate the causal relationship between ROS increase and cell death upon combined treatment, we hypothesized that counteracting ROS generation with Tiron would prevent apoptosis. Apoptosis was significantly detectable after 48 h. Tiron, by blunting ROS, was effective in preventing the apoptosis induced by the drug combination (Figure 5C). These results strongly suggest that mitochondrial ROS overproduction is critical in KU-60019/CX4945-induced apoptosis.

In hypoxic conditions, HIF-1 α is activated by ROS and regulates the redox status of cells [80]. As HIF-2 α expression enhances vulnerability to combined inhibition of ATM and CK2 (Figure 4C), we examined the mitochondrial ROS accumulation in HIF-2 α -depleted 786-O cells. We found that in both control- and drug-treated cells, ROS production was downregulated in the absence of HIF-2 α (Figure 5D). These results are in accordance with the reduced drug-induced apoptosis in HIF-2 α -depleted cells (Figure 4C).

ROS are highly active oxygen-containing molecules that can induce DNA double-strand breaks (DSBs) [81]. The cellular response to DSBs involves ATM, which phosphorylates essential components of a macromolecular complex, including the Mediator of DNA damage Checkpoint 1 (MDC1) [82,83]. To understand the link between ATM and the oxidative stress, we examined the effect of the drug treatment on the expression and localization of the MDC1 protein in 786-O MCTS. MDC1 expression was diminished and its localization in nuclear foci was lost upon MCTS drug treatments with either KU-60019 alone or in association with CX-64945 (Figure 5E,F). NADPH oxidases (NOXs) are essential membrane-bound enzyme complexes for ROS production [84] and high-level expression of the NOX4 isoform was observed in the kidney [85], where it plays a regulatory role in intracellular redox homeostasis [86]. Thus, the role of NOX4 in ROS generation was analyzed in 786-O cells upon exposure to the drug combination. As shown in Figure 5E, NOX4 expression level increased in response to the combination treatment. NOX4 was then knocked down in 786-O cells to evaluate its role in mitochondrial ROS production and cell death (Supplementary Figure S5). Indeed, ROS production was significantly decreased in shRNA-NOX4 cells upon KU-60019 or KU-60019/CX-4945 combination treatments as compared to shRNA-CTL cells (Figure 5G). Likewise, PI incorporation in response to drug treatments was strongly reduced in NOX4-knockdown 786-O cells treated with CX-4945 or the KU-60019/CX-4945 combination (Figure 5H).

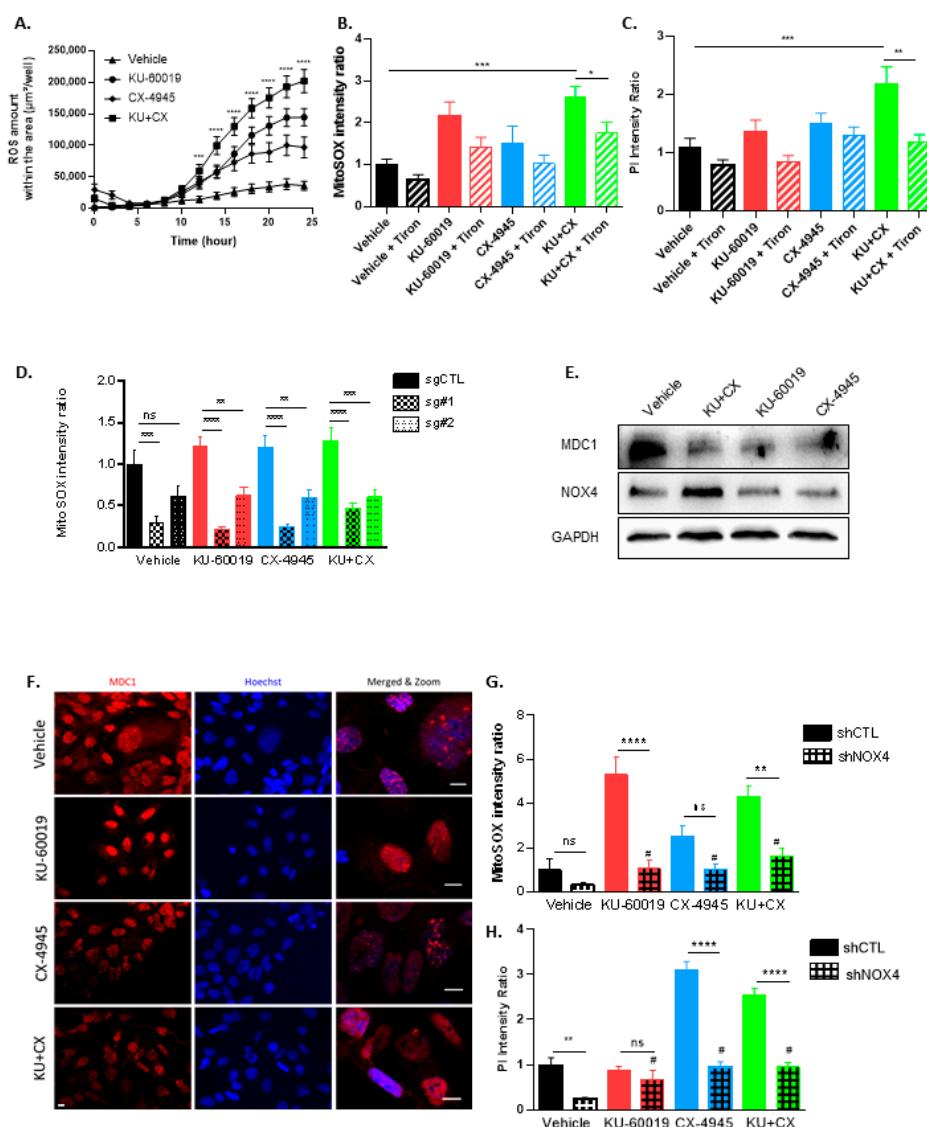


Figure 5. ROS-mediated apoptosis induced by CK2 and ATM co-inhibition. (A–C,E) MCTS of 786-O VHL[−] cells treated with Vehicle (DMSO, 0.1%), KU-60019 (10 μ M) and/or CX-4945 (5 μ M) \pm Tiron (400 μ M) for 24 h (A,B) or 48 h (C). (D) MCTS of 786-O HIF-2 α CRISPR/CAS9 (Sg#1 and Sg#2) and 786-O CTL CRISPR/CAS9 (sgCTL) were treated either with vehicle (DMSO) or KU-60019 (10 μ M) and/or CX-4945 (5 μ M) for 48 h. (F) Fluorescence images of 786-O VHL[−] cells stained with MDC1 and Hoechst after a 48 h treatment with DMSO (control, 0.1%), KU (5 μ M) and/or CX (2.5 μ M), scale bar = 20 μ m. (G,H) MCTS of 786-O VHL[−] shNOX4D and 786-O VHL[−] shCTL cells treated with Vehicle (DMSO, 0.1%), KU (10 μ M) and/or CX (5 μ M) for 24 h (G) or 48 h (H). (A,B,D,G) ROS production ($O_2\bullet^-$) was assessed over 24 h using the MitoSOX fluorescent reagent (5 μ M) in real-time using the IncucyteZOOM Imager. ROS production under treatments is represented over 24 h in (A) ($n = 36$), while (B) ($n = 12$), (D) ($n = 9$) and (G) ($n = 12$) represent the ROS production at 18 h. (C,H) MCTS were treated simultaneously with PI (0.5 μ g/mL) and drugs. Cell mortality (PI incorporation) was assessed over 48 h using IncucyteZOOM. PI incorporation under treatments is represented at 32 h (C, $n = 24$) and 48 h (H, $n = 24$). (E) 786-O VHL[−] MTS Western blot analysis showing protein expression levels of MDC1, NOX4 and GAPDH as loading control. Two-way ANOVA and one-way ANOVA were used for kinetics and plots, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns: not significant, #: not significant compare to Vehicle-shCTL.

Mechanistically, these results suggest that the combined inhibition of CK2 and ATM in renal cancer cells triggers an HIF-2 α /NOX4-dependent ROS overproduction, leading to cellular damages and ultimately to Caspase-mediated irreversible cell death (Figure 6).

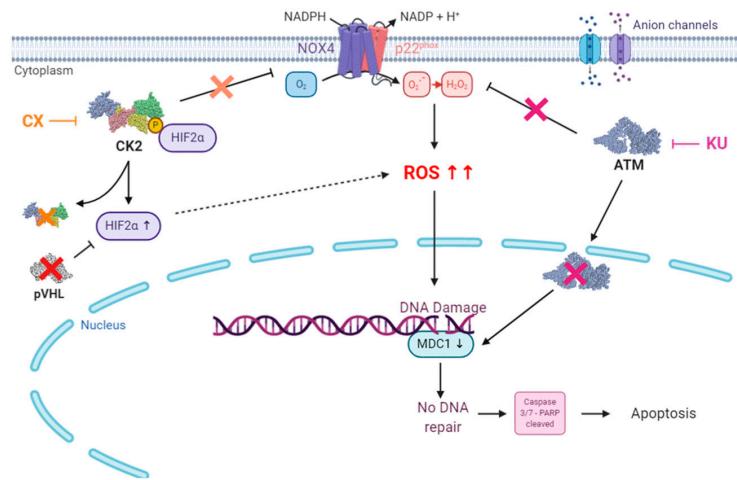


Figure 6. Proposed mechanistic model for the combinational drug therapy targeting CK2 and ATM: In renal cells, the NADPH oxidase 4 (NOX4) enzyme is responsible for ROS production. NOX4 activity is downregulated by CK2-dependent phosphorylation. Inhibition of CK2 by the CX-4945 inhibitor releases the CK2-dependent NOX4 inhibition, leading to ROS generation and HIF-2 α induction. ATM inhibition by KU-60019 also induces ROS generation. ROS induced DNA damages and ion channels expression alteration. Both ATM and CK2 are involved in DNA repair machinery. Therefore, their inhibition prevents ROS-induced DNA damages repair, leading to apoptotic cell death. Loss of functional VHL leads to HIF-2 α accumulation. HIF-2 α appears as a biomarker of which expression level is correlated with sensitivity to this combined CK2/ ATM inhibition (Direct link, full line; indirect link, dashed line).

3.5. KU-60019/CX-4945 Combination Leads to a Stronger Transcriptome Deregulation Than the Drugs Alone

Outcomes of excessive levels of ROS include altered cell signaling, impaired energy metabolism and cell transport mechanisms [87]. Gene expression-based pathway analysis confirmed the expected positive association between ROS overproduction and alteration of various ion channel functions [88]. To explore the overall impact of our drug combination on renal tumor cell biology, we performed transcriptome profiling of MCTS generated from 786-O cells treated with vehicle only (DMSO), KU-60019, CX-4945 or their combination. As we performed only one biological replicate per experimental condition for this first exploratory analysis, we focused on major changes in biological processes. Sequencing of the transcriptomes by BRB-seq and their filtering by removal of genes with null expression variance or quantified with a low number of reads allowed to estimate the expression of 5866 genes (Supplementary Table S3A). Classification of the transcriptomes by principal component analysis (PCA) showed that MCTS treated with CX-4945 or the KU-60019/CX-4945 combination were clearly separated from the control MCTS treated with DMSO (Supplementary Figure S6A). On the other hand, the transcriptome for the KU-60019 condition was much closer to the control, suggesting a weaker impact of KU-60019 on the overall deregulation of the MCTS transcriptome. Detection of genes deregulated for each treatment relative to the DMSO condition ($\text{Log}_2(\text{gene expression fold change}) > 0.3$) showed a greater number of deregulated genes for KU-60019/CX-4945 (271 genes) compared to KU-60019 (193 genes) or CX-4945 (254 genes) (Supplementary Figures S6B and S7A,B). Identification of significantly enriched ontological terms was carried out with the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) method and Gene Ontology (GO) resources (Supplementary Table S3). For this analysis, we used the Log_2 (gene expression fold change) calculated between treatments for each of the 5866 expressed genes. A greater number of biological processes (BP) and molecular functions (MF) were identified as significantly enriched following treatment with KU-60019/CX-4945, compared to CX-4945 alone. No ontological term was found enriched after KU treatment (Supplementary Figure S6C). Then, we generated an enrichment map to get a global view of BP terms found

significantly enriched by GSEA following KU-60019/CX-4945 treatment (Supplementary Figure S6D). This visualization, which clusters together sets of mutually overlapping genes, identified two major functional modules: one module, repressed by KU-60019/CX-4945, associated with mitochondrial energy production and metabolism, and another module, activated by the combination, associated with the cell cycle. Interestingly, the activated processes for this cell cycle-related module highlighted the negative regulation of nuclear division and chromosome segregation, suggesting a downregulation of the cell cycle by the over-expression of these sets of genes. The same analysis, using BP terms enriched following treatment with CX-4945 alone, showed the presence of the same two major functional modules (Supplementary Figure S8A). In agreement, CK2 inhibition has already been shown to affect the cell cycle, metabolism and mitochondrial functions [40,89–91]. Furthermore, a comparison of the levels of deregulation of the major biological processes, defined by the Normalized Enriched Score (NES), showed that they were overall more deregulated in the KU-60019/CX-4945 condition than with CX-4945 alone (Supplementary Figure S6E). Of note, the “apoptotic DNA fragmentation” process was found among the BP terms specifically enriched following combined treatment (Supplementary Figure S6F). Regarding the MF terms enriched by CSEA, we found that two major repressed functional modules were shared by KU-60019/CX-4945 and CX-4945 treatments: a module associated with oxidation-reduction and another module involved in ionic transport (Supplementary Figures S7C and S8B) [92]. Again, the deregulation levels of these shared MF terms showed that they tended to be more repressed by the KU-60019/CX-4945 combination than with CX-4945 alone (Supplementary Figure S7D). Therefore, this first cartography shows that the stronger transcriptome deregulation in response to KU-60019/CX-4945 compared to drugs alone may compromise cell viability in MCTS.

3.6. Cooperative Blockade of CK2 and ATM Induces Cell Death in Ex Vivo Human Renal Tumor Slice Cultures

Patient-derived tumor xenografts and tumor organoids have become important pre-clinical model systems for cancer research. However, appropriate stromal and competent immune environments are lacking in both model systems [93]. Monolayer cell cultures as well as MCTS also have inherent limitations in evaluating the role of the tumor microenvironment in the response to therapies and their actual efficacy in humans. Ex vivo tissue slices that maintain cellular architecture, while also preserving the integrity of the tumor–stroma interaction, are promising models [94]. This method, which takes advantage of the rapid sectioning of tumors immediately after harvesting, allows for the investigation of antitumor pharmacological properties in a system that preserves the original cancer microenvironment for up to 5 days ex vivo [95]. Our previous study established a proof of principle of tumor tissue slice cultures for the evaluation of molecularly targeted therapies in renal cancer [51]. We applied this methodology to three different models: (1) tissue slices generated from Luc-expressing 786-O tumor xenografts, (2) patient-derived tumor xenografts (PDX) and (3) human ccRCC tumors obtained immediately after surgical resection. As shown in Figure 7A, after 48 h treatment of tumor slices derived from 786-O-Luc xenografts, luciferase luminescence was barely affected by KU-60019 or CX-4945 alone, whereas the luminescence signal was significantly inhibited by the drug combination. Viability assays also revealed that the drug combination exhibited greater efficacy than a single agent to induce cell death in tumor tissue slices (Figure 7B(B.1)). Importantly, cell viability of normal tissue was essentially unaffected by the drug combination, indicating its low toxicity to normal tissue/cells of the xenograft slices (Figure 7B(B.2)). PDX models more accurately recapitulate the clinical trial situation and it has been shown that RCC tumors are well-suited for the development of tumor-graft models in which tumors derived from patients are implanted in mice [96]. Therefore, the effect of ATM and CK2 inhibition was evaluated on ex vivo tumor slice cultures derived from two VHL[−] and VHL⁺ ccRCC PDX models, respectively. As illustrated in Figure 7C.1,C.2, KU-60019 induced a significant cell death in both models, whereas the combination was only effective in the VHL[−] tumor samples (Figure 7C.2). To get even closer to a preclinical patient-relevant setting

for predicting patient response to drugs, the effect of the KU-60019/CX-4945 combination was compared to the current standard of care sunitinib treatment in tumor tissue slices derived from six ccRCC patients (Figure 7D). Although patient tissue slices responded to sunitinib with increased cell death, the KU-60019/CX-4945 combination was more efficient than sunitinib in all patient tissue slices except for patient D.

Altogether, these data illustrate the therapeutic predictive value of the tumor tissue slice models and demonstrate the significant therapeutic potential of the KU-60019/CX-4945 combination in patients with ccRCC.

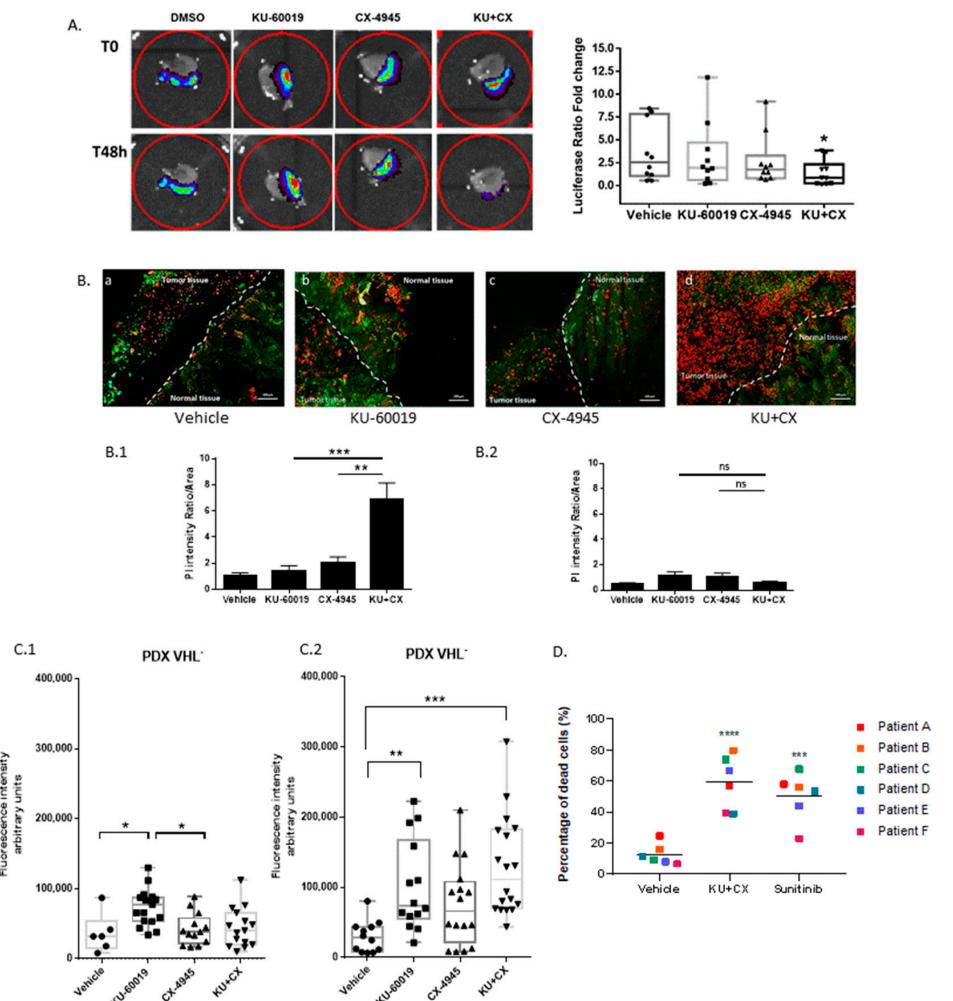


Figure 7. Ex vivo models as pre-clinical tests for drug combination efficacy. (A) Tissue slices derived from 786-O-Luc xenografts were imaged for Luciferase activity before treatment and 48 h after incubation with indicated molecules (dots: vehicle, square: 10 μ M ATM triangle: 10 μ M CX-4945, inverse triangle: 10 μ M ATM⁺ 10 μ M CX-4945). Right panel: Luciferase ratio fold changes (Treated versus Control) after 48 h of treatments (* $p < 0.05$). Mann–Whitney test, $n = 10$. (B) Tissue slice cultures carrying tumor and normal kidney tissue (indicated in the pictures) were labeled with Live and Dead Kit after 48 h of treatments with (a) Vehicle, (b) KU-60019 10 μ M, (c) CX-4945 10 μ M and (d) KU 10 μ M + CX 10 μ M. Intensity of PI (Red marker = dead cells) was measured in both normal and tumor areas. (B.1) Significant difference was observed between KU-60019 (** $p = 0.0005$), CX-4945 (** $p = 0.007$) alone and KU + CX, $n > 20$. (B.2) PI intensity in normal tissue shows no significant difference when comparing each drug alone versus drug combination. Scale bar 100 μ m (Mann–Whitney test for all describe conditions). (C) Tissue slice cultures of two PDX RCC (patient derives xenograft renal cell carcinoma) models either VHL-null (C.1) or VHL-positive (C.2) were treated and analyzed as in (B) (Nonparametric, one-way ANOVA test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n \geq 6$). (D) Tissue slice cultures of patients' tumors were recovered from the hospital (COMBOREIN Clinical Trial NCT03571438), treated for 48 h with sunitinib 10 μ M or as in (B) and stained with Live and Dead Kit. Significant difference observed between vehicle and treatments, one-way ANOVA, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, $n = 6$, ns not significant.

4. Discussion

The most common type of renal cell carcinoma (ccRCC) is characterized by inactivation of VHL leading to HIF stabilization and increased transcription of HIF target genes. Consequently, since 2005, nine agents targeting the VHL-HIF pathway have been approved by the FDA for the treatment of patients with advanced kidney cancer. For example, temsirolimus, which inhibits HIF through the targeting of mTOR, and antiangiogenic agents such as sunitinib or sorafenib have shown some effectiveness in the management of RCC [19]. However, the potential clinical benefits of these molecules are tempered because tumors ultimately progress regardless of these therapies and few patients are cured of this disease [97], thus calling for combined intervention on complementary pathways that can engender drug resistance to individual targeted drugs. In this vein, we previously showed that combined inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Src kinases exhibits synergistic therapeutic efficacy in clear-cell renal carcinoma [50].

Here, we combined genetic and chemical screens to systematically search for lethal interaction in VHL-deficient renal cancer cells. This multiplexed assay allowed the interrogation of thousands of gene–drug combinations with the potential to identify clinically relevant interactions that could lead to new patient-stratified treatment. Among the effective combinations identified from this screen, we found that a novel combination, pairing the CK2 inhibitor CX-4945 with the ATM inhibitor KU-60019, dramatically enhanced cell death in VHL-deficient renal carcinoma cells. CK2 has effects on a broad range of cellular functions participating to the (DDR) [98] and to the regulation of chromatin modifiers [99–103]. More specifically, its implication in tumor development and recurrence may be related to its double-edge functions in promoting cell growth and inhibiting apoptotic cell death [104] and in the development of multidrug resistance phenotypes [35,57]. Modest alterations in the levels of CK2 α are sufficient to induce dramatic effects on cell fate, resulting in potent induction of apoptosis [105]. We previously showed that CK2 α is overexpressed in renal cancers, suggesting its potential relevance as a therapeutic target [41]. Consequently, the association of aberrant CK2 α expression with decreased patient disease-free and overall patient survival in many cancers [37] make this enzyme a promising theranostic target for cancer therapy [106,107]. Indeed, CK2 inhibition combined with several targeted agents has already been shown to be effective in different types of cancers [108–112]. ATM is central to the repair of DSBs in DNA, thereby controlling genome stability, cell survival and resistance to radio- and chemo-therapeutic treatment [113–115]. Over recent years, a wealth of evidence has accumulated showing that ATM is also part of many other signaling networks, including chromatin remodeling, cell metabolism and growth, senescence and notably, oxidative stresses in response to ROS generation [27,29,116–119]. ROS contain unpaired electrons allowing them to interact with DNA and other biomolecules, causing irreversible cellular damages. They may affect cancer cells in a dual fashion. On one hand, ROS production can lead to carcinogenesis, either by activation of several oncogenic pathways or through oncogenic mutations in DNA [120–122]. On the other hand, excessive ROS generation has been found to be positively correlated with cell cycle arrest and apoptosis [123,124] and to suppress distant metastasis in metastatic human melanoma cells [125]. Over the last decades, the clinical relevance of oxidative stress/ROS as a target in human malignancies has greatly increased and several successful chemotherapeutic approaches have been designed with the aim of increasing intracellular ROS levels to trigger irreversible cellular damages and apoptosis in tumor cells (reviewed in Reference [126]). As an example, sorafenib was shown to disrupt the mitochondrial membrane potential in RCC, leading to increased ROS and thus breaking resistance to TNF (Tumor necrosis factor) -related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis [127].

Here, we describe that as a single agent, CX-4945 moderately induced cell death in VHL-deficient renal cancer cells but unexpectedly, triggered a strong ATM upregulation, providing a potential link between CK2 and ATM pro-survival pathways [38]. In contrast, dual targeting of CK2 and ATM exhibited efficacy to promote vulnerability of RCC cells, impeding cell migration and inducing ROS-dependent apoptosis in VHL-deficient

cells. Our drug combination demonstrated a greater anti-tumor activity than sunitinib and exhibited low toxicity in normal tissue/cells. The NOX4 isoform has been identified as a critical modulator of redox homeostasis in renal cells. We found that in response to ATM/CK2 blockade, both ROS production and cell apoptosis were significantly decreased in NOX4-knockout cells. Increasing evidence suggests that phosphorylation of various NOX proteins or their regulatory cofactors may play important roles in regulating the activity of these enzymes [128]. For instance, ATM inhibition was shown to increase NOX4 expression in normal fibroblasts [129]. Moreover, CK2 was described as a negative modulator of NOX4 [130]. Collectively, these data suggest that the ATM/CK2 kinases and NOX4-generated ROS might be functionally connected. ROS were also involved in the regulation of hypoxic and non-hypoxic induction of HIF-1 under various conditions [131,132]. Moreover, both ROS generation and NOX4 expression are essential for HIF-2 α transcriptional activity in VHL-deficient renal cell carcinoma [133], indicating that higher levels of ROS can contribute to HIF-2 α stabilization and are key to facilitate and sustain the aggressive phenotype of cancer cells [134]. We observed an enhanced HIF-2 α expression in VHL[−] 786-O MCTS upon treatment with each drug alone or in combination. Importantly, the sensitivity of 786-O VHL[−] MCTS was strongly affected by genetic disruption of HIF-2 α . Conversely, high HIF-2 α expression in these cells appears as a key determinant of their response to combined CK2/ATM pathway inhibition, suggesting a functional link between CK2/ATM kinases and HIF-2 α . This indicates that baseline level of HIF-2 α expression might represent a potential efficacy biomarker predictive of response to our drug combination. HIF-2 α drives the expression of multiple target genes with tumorigenic functions [5,8,12,135–137]. Recently, small molecules that directly inhibit HIF-2 α were shown to cause tumor regression in preclinical models of primary and metastatic VHL-defective ccRCC [10,11,138,139]. However, VHL-defective ccRCC cell lines display unexpectedly variable sensitivity to HIF-2 α -targeted therapies [11], which provide effective treatment for only a subset of patients [140]. Mechanistically, phosphorylation of HIF-1 α has been demonstrated to enhance transactivation of target genes by either disrupting its interaction with VHL and thereby stabilizing HIF-1 α , or by increasing the affinity of HIF-1 α for transcriptional coactivators [141]. We showed that CK2 associates with and retains its catalytic activity towards HIF-2 α , suggesting a functional link between them. Hypoxia-induced phosphorylation by CK2 has been reported in the c-TAD domain of HIF-2 α (Thr844) and mutation of this residue decreased reporter activity, possibly by increasing HIF affinity for an enzyme known as Factor Inhibiting HIF (FIH) [69,71]. Finally, transcriptome profiling of VHL[−] 786-O MCTS treated with our drug combination not only confirms our results but also opens perspectives to explore additional mechanisms driving apoptosis in VHL-deficient renal carcinoma cells upon cooperative blockade of CK2 and ATM kinases.

5. Conclusions

Genomic analyses have revealed relationships between synthetic lethal interactions and genetic lesions that may be exploited therapeutically [21]. Chemo-genetic screens revealed CK2 and ATM kinases as synthetic lethal targets in VHL-deficient renal carcinoma cells. This vulnerability was characterized using various models, including cells grown as monolayers, tumor spheroid cultures and tumor tissue slices from xenografts and clinical patient samples. Combined inhibition of CK2 and ATM eliminated VHL-deficient renal carcinoma cells by increasing NOX4-mediated ROS production. Importantly, HIF-2 α acts as a key determinant that potentiates this response. Overall, given the demonstrated safety of CX-4945 in initial human studies, these preclinical data may justify the implementation of clinical trials using CX-4945 in combination with ATM inhibitors in a subset of HIF-2 α -expressing VHL-defective ccRCC patients. Our findings have translational implications which are currently evaluated in the frame of the preclinical trial NCT03571438 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03571438>).

6. Patents

The data presented in this study forms a basis for a patent:

PCT/EP2016/072458 (US Patent): A SYNTHETIC LETHAL DRUG COMBINATION FOR TREATING RENAL CELL CARCINOMA. Filhol O., Cochet C., Giacosa S., Pillet C., Barette C., Soleilhac E.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/3/576/s1>, Figure S1: Flow chart of the screening, Figure S2: Cell viability of treated-786-O and RPTEC cells under normoxic and hypoxic conditions, Figure S3: Biochemical study of CK2–HIF-2 α interaction, Figure S4: Images of ROS detection in treated 786-O MCTS, Figure S5: Western blot of 4 shNOX4 expressing 786-O VHL $^{-}$ cells, Figures S6–S8: Analysis of treated spheroids transcriptomes, Table S1: Genes targeted by shRNA sequences, Table S2: Chemicals used in the screening, Table S3: Data produced by gene expression and gene ontology enrichment analyses of 786-O spheroids.

Author Contributions: Conceptualization, C.C. and O.F.; Investigation and Methodology, C.P., S.G., I.S., C.R., Y.W., C.B. (Caroline Barette), C.B. (Christophe Battail), E.S., Q.F., N.P., C.S. and O.F.; Validation, C.P., S.G., I.S., L.G., C.C. and O.F.; Formal Analysis, S.G., I.S., C.R., Q.F., L.G., C.B. (Christophe Battail), C.S. and O.F.; Software, C.B. (Christophe Battail), L.G., F.C., B.E. and C.S.; Resources, C.R., C.P., S.G., Q.F., N.P., C.S., O.F., G.F., J.-A.L. and J.-L.D.; Data Curation, L.G., C.B. (Christophe Battail), F.C., B.E. and O.F.; Visualization, S.G., C.P., I.S., C.R., C.B. (Christophe Battail), L.G. and O.F.; Writing—Review and Editing, S.G., I.S., C.B. (Christophe Battail), O.F. and C.C.; Supervision, M.-O.F., O.F., C.C. and J.-L.D.; Project administration and Funding Acquisition, C.C., O.F. and J.-L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by recurrent institutional funding from INSERM, CEA, Ligue Nationale contre le Cancer (accredited team 2010–2012) and Ligue Comité de l’Isère, University Grenoble Alpes, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble-Alpes (CHUGA), Groupement des Entreprises Françaises dans la LUTte contre le Cancer (GEFLUC), Grenoble Alliance for Integrated Structural & Cell Biology (GRAL) and Association Française d’Urologie (AFU). Part of this work was performed at the CMBA platform (a member of GIS-IBISA and ChemBioFrance infrastructure) supported by Labex GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the CEA Institutional Animal Care and Use Committee (CEtEA) (Protocols A13_012 and A18-102) and the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFIS#19407-2019022215255444) on 10 March 2019.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. All procedures were approved by the ethics committee (Patient Protection Committee No. 2017 A0070251).

Data Availability Statement: The RNA-sequencing datasets accessed for this manuscript are available in the publicly accessible repository, at the ArrayExpress repository under the accession number E-MTAB-9977 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-9977>).

Acknowledgments: We thank the animal unit staff (Jeannin I., Bama S. Magallon C., Chaumontel N. and Pointu H.) at Interdisciplinary Research Institute of Grenoble (IRIG) for animal husbandry; Yannick Arlot-Bonemains, for her generous gifts of the R305 cell line and for her advice; GenomEast Platform (Illkirch, France) for the sequencing and Thomas Darde (SciLicium) for preprocessing of the BRB-seq data.

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

References

1. McDermott, D.F.; Regan, M.M.; Clark, J.I.; Flaherty, L.E.; Weiss, G.R.; Logan, T.F.; Kirkwood, J.M.; Gordon, M.S.; Sosman, J.A.; Ernstoff, M.S.; et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 133–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Warren, A.Y.; Harrison, D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: Standards and controversies. *World J. Urol.* **2018**, *36*, 1913–1926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Figlin, R.; Sternberg, C.; Wood, C.G. Novel agents and approaches for advanced renal cell carcinoma. *J. Urol.* **2012**, *188*, 707–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gerlinger, M.; Santos, C.R.; Spencer-Dene, B.; Martinez, P.; Endesfelder, D.; Burrell, R.A.; Vetter, M.; Jiang, M.; Saunders, R.E.; Kelly, G.; et al. Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *J. Pathol.* **2012**, *227*, 146–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kondo, K.; Kim, W.Y.; Lechpammer, M.; Kaelin, W.G., Jr. Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol.* **2003**, *1*, E83. [[CrossRef](#)]
6. Kaelin, W.G., Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 673–682. [[CrossRef](#)]
7. Ricketts, C.J.; Crooks, D.R.; Linehan, W.M. Targeting HIF2alpha in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 515–517. [[CrossRef](#)]
8. Kondo, K.; Klco, J.; Nakamura, E.; Lechpammer, M.; Kaelin, W.G., Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 237–246. [[CrossRef](#)]
9. Roberts, A.M.; Ohh, M. Beyond the hypoxia-inducible factor-centric tumour suppressor model of von Hippel-Lindau. *Curr. Opin. Oncol.* **2008**, *20*, 83–89. [[CrossRef](#)]
10. Chen, W.; Hill, H.; Christie, A.; Kim, M.S.; Holloman, E.; Pavia-Jimenez, A.; Homayoun, F.; Ma, Y.; Patel, N.; Yell, P.; et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* **2016**, *539*, 112–117. [[CrossRef](#)]
11. Cho, H.; Du, X.; Rizzi, J.P.; Liberzon, E.; Chakraborty, A.A.; Gao, W.; Carvo, I.; Signoretti, S.; Bruick, R.K.; Josey, J.A.; et al. On-target efficacy of a HIF-2alpha antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature* **2016**, *539*, 107–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kaelin, W.G., Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 865–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gross, S.; Rahal, R.; Stransky, N.; Lengauer, C.; Hoefflich, K.P. Targeting cancer with kinase inhibitors. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 1780–1789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Escudier, B.; Eisen, T.; Stadler, W.M.; Szczylik, C.; Oudard, S.; Siebels, M.; Negrier, S.; Chevreau, C.; Solska, E.; Desai, A.A.; et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 125–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Motzer, R.J.; Hutson, T.E.; Tomczak, P.; Michaelson, M.D.; Bukowski, R.M.; Rixe, O.; Oudard, S.; Negrier, S.; Szczylik, C.; Kim, S.T.; et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 115–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sternberg, C.N.; Davis, I.D.; Mardiak, J.; Szczylik, C.; Lee, E.; Wagstaff, J.; Barrios, C.H.; Salman, P.; Gladkov, O.A.; Kavina, A.; et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase III trial. *J. Clin. Oncol* **2010**, *28*, 1061–1068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rini, B.I.; Escudier, B.; Tomczak, P.; Kaprin, A.; Szczylik, C.; Hutson, T.E.; Michaelson, M.D.; Gorbunova, V.A.; Gore, M.E.; Rusakov, I.G.; et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): A randomised phase 3 trial. *Lancet* **2011**, *378*, 1931–1939. [[CrossRef](#)]
18. Escudier, B.; Bellmunt, J.; Negrier, S.; Bajetta, E.; Melichar, B.; Bracarda, S.; Ravaud, A.; Golding, S.; Jethwa, S.; Sneller, V. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): Final analysis of overall survival. *J. Clin. Oncol* **2010**, *28*, 2144–2150. [[CrossRef](#)]
19. Maj-Hes, A.; Medioni, J.; Scotte, F.; Schmidinger, M.; Kramer, G.; Combe, P.; Gornadha, Y.; Elaidi, R.; Oudard, S. Rechallenge with mTOR inhibitors in metastatic renal cell carcinoma patients who progressed on previous mTOR inhibitor therapy. *Oncology* **2013**, *85*, 8–13. [[CrossRef](#)]
20. Posadas, E.M.; Limvorasak, S.; Figlin, R.A. Targeted therapies for renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Nephrol* **2017**, *13*, 496–511. [[CrossRef](#)]
21. Wheeler, D.A.; Takebe, N.; Hinoue, T.; Hoadley, K.A.; Cardenas, M.F.; Hamilton, A.M.; Laird, P.W.; Wang, L.; Johnson, A.; Dewal, N.; et al. Molecular Features of Cancers Exhibiting Exceptional Responses to Treatment. *Cancer Cell* **2021**, *39*, 38–53.e37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lehar, J.; Stockwell, B.R.; Giaever, G.; Nislow, C. Combination chemical genetics. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 674–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Muellner, M.K.; Uras, I.Z.; Gapp, B.V.; Kerzendorfer, C.; Smida, M.; Lechtermann, H.; Craig-Mueller, N.; Colinge, J.; Duernberger, G.; Nijman, S.M. A chemical-genetic screen reveals a mechanism of resistance to PI3K inhibitors in cancer. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 787–793. [[CrossRef](#)]
24. Blackford, A.N.; Jackson, S.P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 801–817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Burgess, R.C.; Burman, B.; Kruhlak, M.J.; Misteli, T. Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 1703–1717. [[CrossRef](#)]
26. Tang, S.; Yang, L.; Tang, X.; Liu, M. The role of oxidized ATM in the regulation of oxidative stress-induced energy metabolism reprogramming of CAFs. *Cancer Lett* **2014**, *353*, 133–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kang, H.T.; Park, J.T.; Choi, K.; Kim, Y.; Choi, H.J.C.; Jung, C.W.; Lee, Y.S.; Park, S.C. Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 616–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Strzyz, P. Cell Senescence: A new role for ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 277. [[CrossRef](#)]
29. Cremona, C.A.; Behrens, A. ATM signalling and cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 3351–3360. [[CrossRef](#)]

30. Matt, S.; Hofmann, T.G. The DNA damage-induced cell death response: A roadmap to kill cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2016**, *73*, 2829–2850. [\[CrossRef\]](#)
31. Mirzayans, R.; Andrais, B.; Scott, A.; Murray, D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 170325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Lin, Z.; Luo, G.; Du, W.; Kong, T.; Liu, C.; Liu, Z. Recent Advances in Microfluidic Platforms Applied in Cancer Metastasis: Circulating Tumor Cells’ (CTCs) Isolation and Tumor-On-A-Chip. *Small* **2020**, *16*, e1903899. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Duncan, J.S.; Litchfield, D.W. Too much of a good thing: The role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 33–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Litchfield, D.W. Protein kinase CK2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ruzzene, M.; Pinna, L.A. Addiction to protein kinase CK2: A common denominator of diverse cancer cells? *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 499–504. [\[CrossRef\]](#)
36. Trembley, J.H.; Wang, G.; Unger, G.; Slaton, J.; Ahmed, K. Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: A key player in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2009**, *66*, 1858–1867. [\[CrossRef\]](#)
37. Ortega, C.E.; Seidner, Y.; Dominguez, I. Mining CK2 in cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115609. [\[CrossRef\]](#)
38. Rabalski, A.J.; Gyenis, L.; Litchfield, D.W. Molecular Pathways: Emergence of Protein Kinase CK2 (CSNK2) as a Potential Target to Inhibit Survival and DNA Damage Response and Repair Pathways in Cancer Cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2840–2847. [\[CrossRef\]](#)
39. Chua, M.M.; Ortega, C.E.; Sheikh, A.; Lee, M.; Abdul-Rassoul, H.; Hartshorn, K.L.; Dominguez, I. CK2 in Cancer: Cellular and Biochemical Mechanisms and Potential Therapeutic Target. *Pharmaceutics* **2017**, *10*, 18. [\[CrossRef\]](#)
40. Silva-Pavez, E.; Tapia, J.C. Protein Kinase CK2 in Cancer Energetics. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 893. [\[CrossRef\]](#)
41. Roelants, C.; Giacosa, S.; Duchemin-Pelletier, E.; McLeer-Florin, A.; Tisseyre, C.; Aubert, C.; Champelovier, P.; Boutonnat, J.; Descotes, J.-L.; Rambeaud, J.-J. *Dysregulated Expression of Protein Kinase CK2 in Renal Cancer; Advances in Biochemistry in Health*; Khalil Ahmed, O.-G.I., Szyszka, R., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015.
42. Vilardell, J.; Alcaraz, E.; Sarro, E.; Trilla, E.; Cuadros, T.; de Torres, I.; Plana, M.; Ramon, Y.C.S.; Pinna, L.A.; Ruzzene, M.; et al. Under-expression of CK2beta subunit in ccRCC represents a complementary biomarker of p-STAT3 Ser727 that correlates with patient survival. *Oncotarget* **2018**, *9*, 5736–5751. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Pierre, F.; Chua, P.C.; O’Brien, S.E.; Siddiqui-Jain, A.; Bourbon, P.; Haddach, M.; Michaux, J.; Nagasawa, J.; Schwaebe, M.K.; Stefan, E.; et al. Discovery and SAR of 5-(3-Chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 635–654. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Zhang, J.H.; Chung, T.D.; Oldenburg, K.R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen* **1999**, *4*, 67–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Sanjana, N.E.; Shalem, O.; Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 783–784. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Alpern, D.; Gardeux, V.; Russeil, J.; Mangeat, B.; Meireles-Filho, A.C.A.; Breysse, R.; Hacker, D.; Deplancke, B. BRB-seq: Ultra-affordable high-throughput transcriptomics enabled by bulk RNA barcoding and sequencing. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Draskau, M.K.; Lardenois, A.; Evrard, B.; Boberg, J.; Chalmel, F.; Svingen, T. Transcriptome analysis of fetal rat testis following intrauterine exposure to the azole fungicides triticonazole and flusilazole reveals subtle changes despite adverse endocrine effects. *Chemosphere* **2020**, *264*, 128468. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [\[CrossRef\]](#)
49. Gunther, W.; Pawlak, E.; Damasceno, R.; Arnold, H.; Terzis, A.J. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 463–469. [\[CrossRef\]](#)
50. Roelants, C.; Giacosa, S.; Pillet, C.; Bussat, R.; Champelovier, P.; Bastien, O.; Guyon, L.; Arnoux, V.; Cochet, C.; Filhol, O. Combined inhibition of PI3K and Src kinases demonstrates synergistic therapeutic efficacy in clear-cell renal carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 30066–30078. [\[CrossRef\]](#)
51. Roelants, C.; Pillet, C.; Franquet, Q.; Sarrazin, C.; Peilleron, N.; Giacosa, S.; Guyon, L.; Fontanell, A.; Fiard, G.; Long, J.A.; et al. Ex-Vivo Treatment of Tumor Tissue Slices as a Predictive Preclinical Method to Evaluate Targeted Therapies for Patients with Renal Carcinoma. *Cancers* **2020**, *12*, 232. [\[CrossRef\]](#)
52. Astsaturov, I.; Ratushny, V.; Sukhanova, A.; Einarson, M.B.; Bagnyukova, T.; Zhou, Y.; Devarajan, K.; Silverman, J.S.; Tikhmyanova, N.; Skobeleva, N.; et al. Synthetic lethal screen of an EGFR-centered network to improve targeted therapies. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, ra67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Mathews Griner, L.A.; Guha, R.; Shinn, P.; Young, R.M.; Keller, J.M.; Liu, D.; Goldlust, I.S.; Yasgar, A.; McKnight, C.; Boxer, M.B.; et al. High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2349–2354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Tate, J.G.; Bamford, S.; Jubb, H.C.; Sondka, Z.; Beare, D.M.; Bindal, N.; Boutselakis, H.; Cole, C.G.; Creatore, C.; Dawson, E.; et al. COSMIC: The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D941–D947. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

55. Kurose, A.; Tanaka, T.; Huang, X.; Halicka, H.D.; Traganos, F.; Dai, W.; Darzynkiewicz, Z. Assessment of ATM phosphorylation on Ser-1981 induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in relation to Ser-139-histone H2AX phosphorylation, cell cycle phase, and apoptosis. *Cytom. A* **2005**, *68*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. So, S.; Davis, A.J.; Chen, D.J. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *J. Cell Biol.* **2009**, *187*, 977–990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Borgo, C.; Ruzzene, M. Role of protein kinase CK2 in antitumor drug resistance. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2019**, *38*, 287. [\[CrossRef\]](#)
58. Kucejova, B.; Pena-Llopis, S.; Yamasaki, T.; Sivanand, S.; Tran, T.A.; Alexander, S.; Wolff, N.C.; Lotan, Y.; Xie, X.J.; Kabbani, W.; et al. Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Res. MCR* **2011**, *9*, 1255–1265. [\[CrossRef\]](#)
59. Ashida, S.; Nishimori, I.; Tanimura, M.; Onishi, S.; Shuin, T. Effects of von Hippel-Lindau gene mutation and methylation status on expression of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2002**, *128*, 561–568. [\[CrossRef\]](#)
60. Martins, L.R.; Lucio, P.; Melao, A.; Antunes, I.; Cardoso, B.A.; Stansfield, R.; Bertilaccio, M.T.; Ghia, P.; Drygin, D.; Silva, M.G.; et al. Activity of the clinical-stage CK2-specific inhibitor CX-4945 against chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2014**, *28*, 179–182. [\[CrossRef\]](#)
61. Marschke, R.F.; Borad, M.J.; McFarland, R.W.; Alvarez, R.H.; Lim, J.K.; Padgett, C.S.; von Hoff, D.D.; O'Brien, S.E.; Northfelt, D.W. Findings from the phase I clinical trials of CX-4945, an orally available inhibitor of CK2. *ASCO Meet. Abstr.* **2011**, *29*, 3087. [\[CrossRef\]](#)
62. Giacosa, S.; Pillet, C.; Cochet, C.; Filhol, O.; Barette, C.; Soleilhac, E. A Synthetic Lethal Drug Combination for Treating Renal Cell Carcinoma. *Google Patents* WO2017050842A1, 13 September 2018.
63. Dubessy, C.; Merlin, J.M.; Marchal, C.; Guillemin, F. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2000**, *36*, 179–192. [\[CrossRef\]](#)
64. Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L.A. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **2010**, *148*, 3–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Chesnel, F.; Hascoet, P.; Gagne, J.P.; Couturier, A.; Jouan, F.; Poirier, G.G.; Le Goff, C.; Vigneau, C.; Danger, Y.; Verite, F.; et al. The von Hippel-Lindau tumour suppressor gene: Uncovering the expression of the pVHL172 isoform. *Br. J. Cancer* **2015**, *113*, 336–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Shen, C.; Beroukhim, R.; Schumacher, S.E.; Zhou, J.; Chang, M.; Signoretti, S.; Kaelin, W.G., Jr. Genetic and functional studies implicate HIF1alpha as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov.* **2011**, *1*, 222–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Richard, D.E.; Berra, E.; Gothie, E.; Roux, D.; Pouyssegur, J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32631–32637. [\[CrossRef\]](#)
68. Mottet, D.; Ruys, S.P.; Demazy, C.; Raes, M.; Michiels, C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int. J. Cancer* **2005**, *117*, 764–774. [\[CrossRef\]](#)
69. Gradin, K.; Takasaki, C.; Fujii-Kuriyama, Y.; Sogawa, K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 23508–23514. [\[CrossRef\]](#)
70. Lancaster, D.E.; McNeill, L.A.; McDonough, M.A.; Aplin, R.T.; Hewitson, K.S.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J.; Schofield, C.J. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem. J.* **2004**, *383*, 429–437. [\[CrossRef\]](#)
71. Dengler, V.L.; Galbraith, M.; Espinosa, J.M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
72. Hayes, J.D.; Dinkova-Kostova, A.T.; Tew, K.D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 167–197. [\[CrossRef\]](#)
73. Szatrowski, T.P.; Nathan, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 794–798. [\[PubMed\]](#)
74. Panieri, E.; Santoro, M.M. ROS homeostasis and metabolism: A dangerous liaison in cancer cells. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2253. [\[CrossRef\]](#)
75. Sabharwal, S.S.; Schumacker, P.T. Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 709–721. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Schumacker, P.T. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 175–176. [\[CrossRef\]](#)
77. Reczek, C.R.; Chandel, N.S. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**, *1*, 79–98. [\[CrossRef\]](#)
78. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2922–2933.
79. Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863*, 2977–2992. [\[CrossRef\]](#)
80. Marinho, H.S.; Real, C.; Cyrene, L.; Soares, H.; Antunes, F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 535–562. [\[CrossRef\]](#)

81. Srinivas, U.S.; Tan, B.W.Q.; Vellayappan, B.A.; Jeyasekharan, A.D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* **2019**, *25*, 101084. [\[CrossRef\]](#)
82. Watanabe, S.; Iimori, M.; Chan, D.V.; Hara, E.; Kitao, H.; Maehara, Y. MDC1 methylation mediated by lysine methyltransferases EHMT1 and EHMT2 regulates active ATM accumulation flanking DNA damage sites. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10888. [\[CrossRef\]](#)
83. Jungmichel, S.; Clapperton, J.A.; Lloyd, J.; Hari, F.J.; Spycher, C.; Pavic, L.; Li, J.; Haire, L.F.; Bonalli, M.; Larsen, D.H.; et al. The molecular basis of ATM-dependent dimerization of the Mdc1 DNA damage checkpoint mediator. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 3913–3928. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Lambeth, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 181–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Geiszt, M.; Kopp, J.B.; Varnai, P.; Leto, T.L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8010–8014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Gregg, J.L.; Turner, R.M., 2nd; Chang, G.; Joshi, D.; Zhan, Y.; Chen, L.; Maranchie, J.K. NADPH oxidase NOX4 supports renal tumorigenesis by promoting the expression and nuclear accumulation of HIF2alpha. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3501–3511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Newsholme, P.; Cruzat, V.F.; Keane, K.N.; Carlessi, R.; de Bittencourt, P.I., Jr. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 4527–4550. [\[CrossRef\]](#)
88. Kiselyov, K.; Mualllem, S. ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium* **2016**, *60*, 108–114. [\[CrossRef\]](#)
89. Yde, C.W.; Olsen, B.B.; Meek, D.; Watanabe, N.; Guerra, B. The regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the onset of mitosis. *Oncogene* **2008**, *27*, 4986–4997. [\[CrossRef\]](#)
90. Guerra, B.; Issinger, O.G. Role of Protein Kinase CK2 in Aberrant Lipid Metabolism in Cancer. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 292. [\[CrossRef\]](#)
91. Qaiser, F.; Trembley, J.H.; Kren, B.T.; Wu, J.J.; Naveed, A.K.; Ahmed, K. Protein kinase CK2 inhibition induces cell death via early impact on mitochondrial function. *J. Cell. Biochem.* **2014**, *115*, 2103–2115. [\[CrossRef\]](#)
92. Montenarh, M.; Gotz, C. Protein kinase CK2 and ion channels (Review). *Biomed. Rep.* **2020**, *13*, 55. [\[CrossRef\]](#)
93. Bleijs, M.; van de Wetering, M.; Clevers, H.; Drost, J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* **2019**, *38*, e101654. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Schmeichel, K.L.; Bissell, M.J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2377–2388. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Vaira, V.; Fedele, G.; Pyne, S.; Fasoli, E.; Zadra, G.; Bailey, D.; Snyder, E.; Favarsani, A.; Coggi, G.; Flavin, R.; et al. Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 8352–8356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. Sivanand, S.; Pena-Llopis, S.; Zhao, H.; Kucejova, B.; Spence, P.; Pavia-Jimenez, A.; Yamasaki, T.; McBride, D.J.; Gillen, J.; Wolff, N.C.; et al. A validated tumorgraft model reveals activity of dovitinib against renal cell carcinoma. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 137ra175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Rini, B.I.; Atkins, M.B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 992–1000. [\[CrossRef\]](#)
98. Pearl, L.H.; Schierz, A.C.; Ward, S.E.; Al-Lazikani, B.; Pearl, F.M. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 166–180. [\[CrossRef\]](#)
99. Assrir, N.; Filhol, O.; Galisson, F.; Lipinski, M. HIRIP3 is a nuclear phosphoprotein interacting with and phosphorylated by the serine-threonine kinase CK2. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 391–398. [\[CrossRef\]](#)
100. Kappes, F.; Damoc, C.; Knippers, R.; Przybylski, M.; Pinna, L.A.; Gruss, C. Phosphorylation by protein kinase CK2 changes the DNA binding properties of the human chromatin protein DEK. *Mol. Cell Biol.* **2004**, *24*, 6011–6020. [\[CrossRef\]](#)
101. Wise, C.A.; Chiang, L.C.; Paznekas, W.A.; Sharma, M.; Musy, M.M.; Ashley, J.A.; Lovett, M.; Jabs, E.W. TCOF1 gene encodes a putative nucleolar phosphoprotein that exhibits mutations in Treacher Collins Syndrome throughout its coding region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3110–3115. [\[CrossRef\]](#)
102. Ciccia, A.; Huang, J.W.; Izhar, L.; Sowa, M.E.; Harper, J.W.; Elledge, S.J. Treacher Collins syndrome TCOF1 protein cooperates with NBS1 in the DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 18631–18636. [\[CrossRef\]](#)
103. Buljan, M.; Ciuffa, R.; van Drogen, A.; Vichalkovski, A.; Mehnert, M.; Rosenberger, G.; Lee, S.; Varjosalo, M.; Pernas, L.E.; Spegg, V.; et al. Kinase Interaction Network Expands Functional and Disease Roles of Human Kinases. *Mol. Cell* **2020**, *79*, 504–520.e9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Pinna, L.A. Protein kinase CK2: A challenge to canons. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3873–3878. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Slaton, J.W.; Unger, G.M.; Sloper, D.T.; Davis, A.T.; Ahmed, K. Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol. Cancer Res. MCR* **2004**, *2*, 712–721.
106. Cozza, G.; Pinna, L.A. Casein kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 319–340. [\[CrossRef\]](#)
107. Behan, F.M.; Iorio, F.; Picco, G.; Goncalves, E.; Beaver, C.M.; Migliardi, G.; Santos, R.; Rao, Y.; Sassi, F.; Pinnelli, M.; et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature* **2019**, *568*, 511–516. [\[CrossRef\]](#)
108. Siddiqui-Jain, A.; Bliesath, J.; Macalino, D.; Omori, M.; Huser, N.; Streiner, N.; Ho, C.B.; Anderes, K.; Proffitt, C.; O'Brien, S.E.; et al. CK2 inhibitor CX-4945 suppresses DNA repair response triggered by DNA-targeted anticancer drugs and augments efficacy: Mechanistic rationale for drug combination therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 994–1005. [\[CrossRef\]](#)

109. Bliesath, J.; Huser, N.; Omori, M.; Bunag, D.; Proffitt, C.; Streiner, N.; Ho, C.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.E.; Lim, J.K.; et al. Combined inhibition of EGFR and CK2 augments the attenuation of PI3K-Akt-mTOR signaling and the killing of cancer cells. *Cancer Lett.* **2012**, *322*, 113–118. [\[CrossRef\]](#)
110. Parker, R.; Clifton-Bligh, R.; Molloy, M.P. Phosphoproteomics of MAPK inhibition in BRAF-mutated cells and a role for the lethal synergism of dual BRAF and CK2 inhibition. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 1894–1906. [\[CrossRef\]](#)
111. Song, C.; Ge, Z.; Ding, Y.; Tan, B.H.; Desai, D.; Gowda, K.; Amin, S.; Gowda, R.; Robertson, G.P.; Yue, F.; et al. IKAROS and CK2 regulate expression of BCL-XL and chemosensitivity in high-risk B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2020**, *136*, 1520–1534. [\[CrossRef\]](#)
112. Bian, Y.; Han, J.; Kannabiran, V.; Mohan, S.; Cheng, H.; Friedman, J.; Zhang, L.; VanWaes, C.; Chen, Z. MEK Inhibitor PD-0325901 Overcomes Resistance to CK2 Inhibitor CX-4945 and Exhibits Anti-Tumor Activity in Head and Neck Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2015**, *11*, 411–422. [\[CrossRef\]](#)
113. Khalil, H.S.; Tummala, H.; Hupp, T.R.; Zhelev, N. Pharmacological inhibition of ATM by KU55933 stimulates ATM transcription. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2012**, *237*, 622–634. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Weber, A.M.; Ryan, A.J. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *149*, 124–138. [\[CrossRef\]](#)
115. Shiloh, Y. ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 155–168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Price, B.D.; D'Andrea, A.D. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* **2013**, *152*, 1344–1354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. Shoelson, S.E. Banking on ATM as a new target in metabolic syndrome. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 337–338. [\[CrossRef\]](#)
118. Barascu, A.; Le Chalony, C.; Pennarun, G.; Genet, D.; Imam, N.; Lopez, B.; Bertrand, P. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1080–1094. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
119. Guo, Z.; Deshpande, R.; Paull, T.T. ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 4805–4811. [\[CrossRef\]](#)
120. Weinberg, F.; Hamanaka, R.; Wheaton, W.W.; Weinberg, S.; Joseph, J.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B.; Mutlu, G.M.; Budinger, G.R.; Chandel, N.S. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 8788–8793. [\[CrossRef\]](#)
121. Woo, D.K.; Green, P.D.; Santos, J.H.; D'Souza, A.D.; Walther, Z.; Martin, W.D.; Christian, B.E.; Chandel, N.S.; Shadel, G.S. Mitochondrial genome instability and ROS enhance intestinal tumorigenesis in APC(Min+) mice. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 24–31. [\[CrossRef\]](#)
122. Liou, G.Y.; Doppler, H.; DelGiorno, K.E.; Zhang, L.; Leitges, M.; Crawford, H.C.; Murphy, M.P.; Storz, P. Mutant KRas-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Acinar Cells Upregulates EGFR Signaling to Drive Formation of Pancreatic Precancerous Lesions. *Cell Rep.* **2016**, *14*, 2325–2336. [\[CrossRef\]](#)
123. Teppo, H.R.; Soini, Y.; Karihtala, P. Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1485283. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Ichijo, H.; Nishida, E.; Irie, K.; ten Dijke, P.; Saitoh, M.; Moriguchi, T.; Takagi, M.; Matsumoto, K.; Miyazono, K.; Gotoh, Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **1997**, *275*, 90–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
125. Piskounova, E.; Agathocleous, M.; Murphy, M.M.; Hu, Z.; Huddlestun, S.E.; Zhao, Z.; Leitch, A.M.; Johnson, T.M.; DeBerardinis, R.J.; Morrison, S.J. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* **2015**, *527*, 186–191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
126. Kirtonia, A.; Sethi, G.; Garg, M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2020**, *77*, 4459–4483. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
127. Gillissen, B.; Richter, A.; Richter, A.; Preissner, R.; Schulze-Osthoff, K.; Essmann, F.; Daniel, P.T. Bax/Bak-independent mitochondrial depolarization and reactive oxygen species induction by sorafenib overcome resistance to apoptosis in renal cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 6478–6492. [\[CrossRef\]](#)
128. Bokoch, G.M.; Diebold, B.; Kim, J.S.; Gianni, D. Emerging evidence for the importance of phosphorylation in the regulation of NADPH oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2429–2441. [\[CrossRef\]](#)
129. Weyemi, U.; Redon, C.E.; Aziz, T.; Choudhuri, R.; Maeda, D.; Parekh, P.R.; Bonner, M.Y.; Arbiser, J.L.; Bonner, W.M. NADPH oxidase 4 is a critical mediator in Ataxia telangiectasia disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 2121–2126. [\[CrossRef\]](#)
130. Zhou, J.; Zhang, Y.H.; Song, H.Z.; Ji, H.; Wang, X.L.; Wang, L.; Qian, J.; Ling, J.J.; Ping, F.F. 5d, a novel analogue of 3-n-butylphthalide, decreases NADPH oxidase activity through the positive regulation of CK2 after ischemia/reperfusion injury. *Oncotarget* **2016**, *7*, 39444–39457. [\[CrossRef\]](#)
131. Jung, S.N.; Yang, W.K.; Kim, J.; Kim, H.S.; Kim, E.J.; Yun, H.; Park, H.; Kim, S.S.; Choe, W.; Kang, I.; et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 713–721. [\[CrossRef\]](#)
132. Movafagh, S.; Crook, S.; Vo, K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: New developments in an old debate. *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 696–703. [\[CrossRef\]](#)
133. Maranchie, J.K.; Zhan, Y. Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9190–9193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp. Cell Res.* **2017**, *356*, 116–121. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

135. Staller, P.; Sulitkova, J.; Lisztwan, J.; Moch, H.; Oakeley, E.J.; Krek, W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **2003**, *425*, 307–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Muller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M.E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S.N.; et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **2001**, *410*, 50–56. [[CrossRef](#)]
137. Vanharanta, S.; Massague, J. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 410–421. [[CrossRef](#)]
138. Wallace, E.M.; Rizzi, J.P.; Han, G.; Wehn, P.M.; Cao, Z.; Du, X.; Cheng, T.; Czerwinski, R.M.; Dixon, D.D.; Goggin, B.S.; et al. A Small-Molecule Antagonist of HIF2alpha Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 5491–5500. [[CrossRef](#)]
139. Bertout, J.A.; Majmundar, A.J.; Gordan, J.D.; Lam, J.C.; Ditsworth, D.; Keith, B.; Brown, E.J.; Nathanson, K.L.; Simon, M.C. HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14391–14396. [[CrossRef](#)]
140. Choueiri, T.K.; Kaelin, W.G., Jr. Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1519–1530. [[CrossRef](#)]
141. Diao, S.; Zheng, Q.; Gao, J.; Yao, Y.; Ren, S.; Liu, Y.; Xu, Y. Trefoil factor 3 contributes to the malignancy of glioma via regulating HIF-1alpha. *Oncotarget* **2017**, *8*, 76770–76782. [[CrossRef](#)]

3. Données supplémentaires associées à l'article

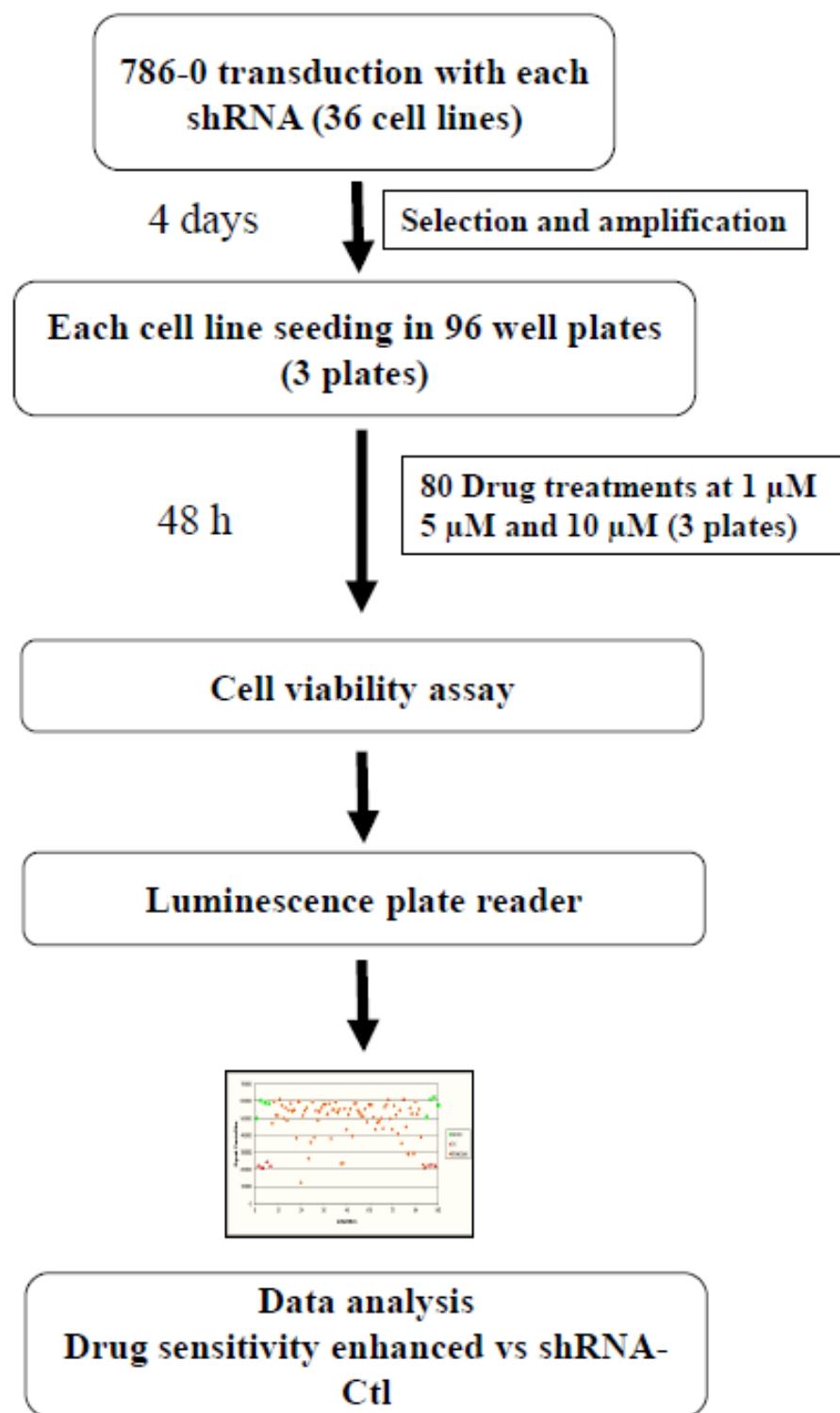


Figure S1: Flow Chart of the screening

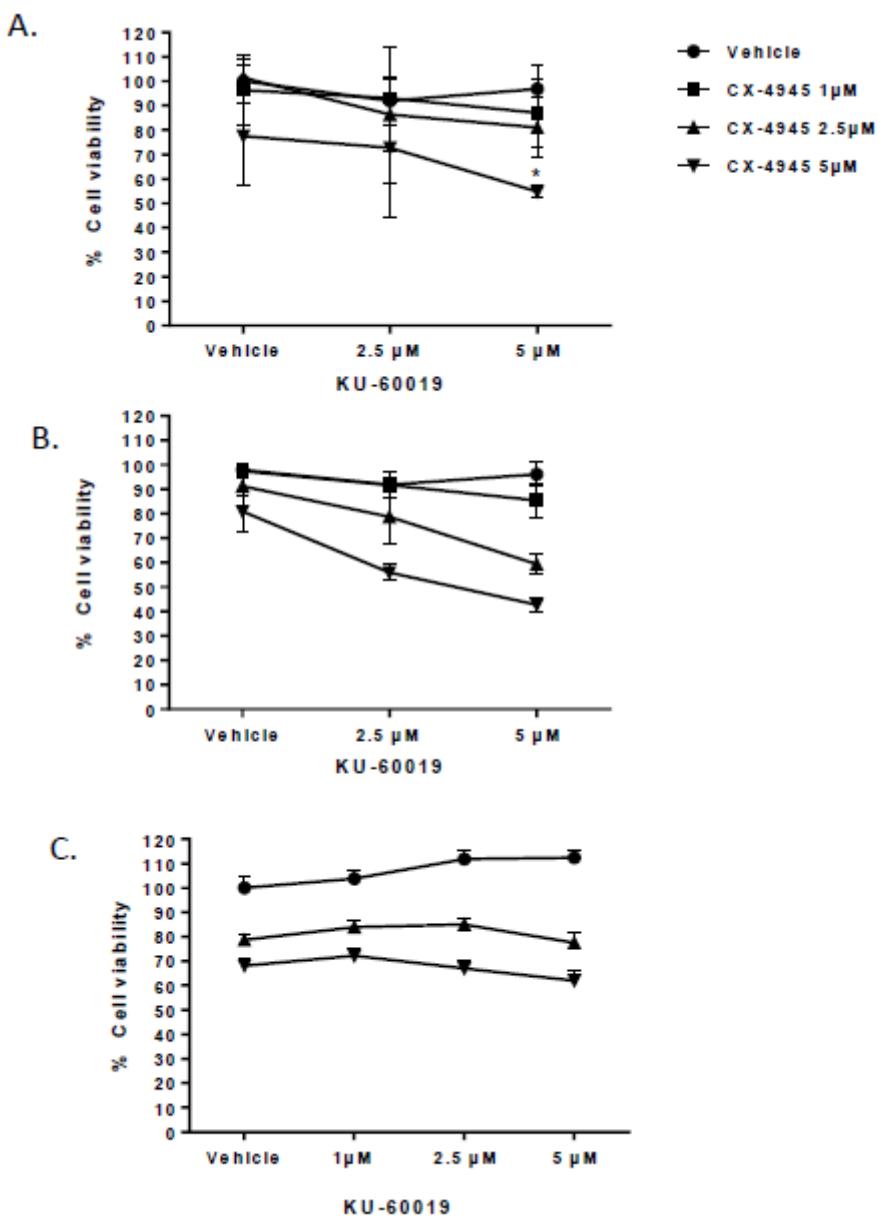


Figure S2: 786-O (A,B) or RPTEC (C) cells were culture under 20 % O₂ (normoxia, A) or 1.5 % O₂ (hypoxia, B,C) and treated with either vehicle, 2.5 μM or 5 μM of KU-60019 in combination with either vehicle or increasing concentrations of CX-4945, Vehicle (●), 1 μM (■), 2.5 μM (□) or 5 μM (▽). Cell viability was measured and represented as a percentage compared to DMSO taken as 100 %.

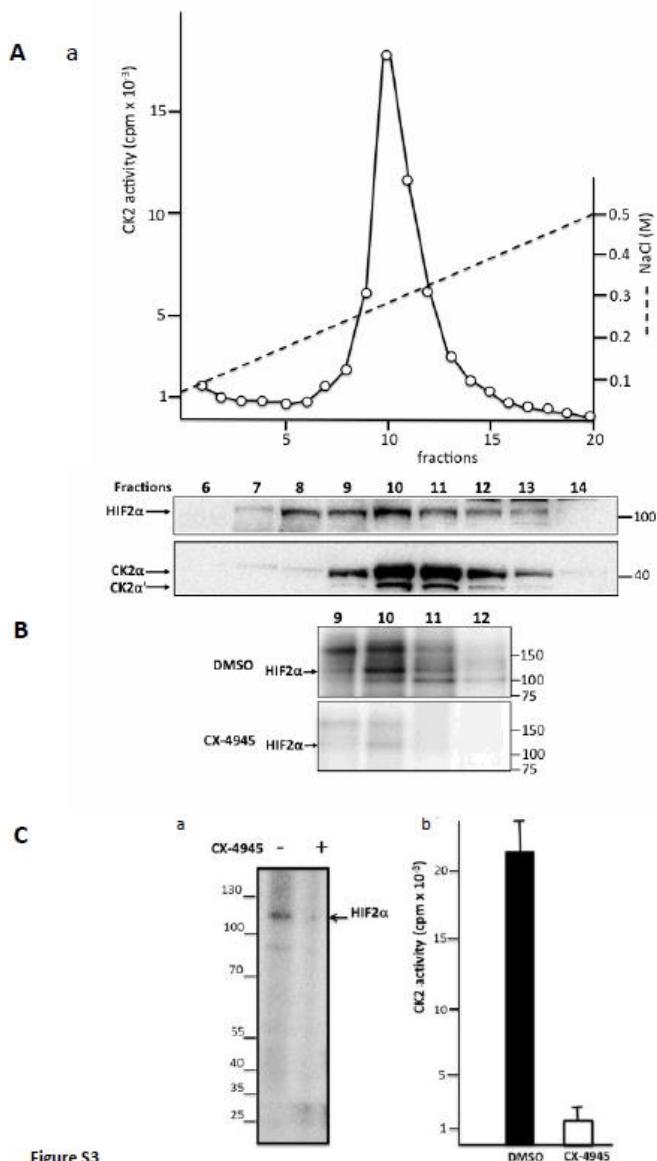


Figure S3

Figure S3: A: A cell extract from HEK293T cells expressing HA-tagged HIF-2 α was applied on a DEAE-chromatography column that was subjected to a NaCl gradient. CK2 activity was quantified in elution fractions that were further analyzed by western blot to detect both CK2 catalytic subunits and HIF-2 α . B: Fractions 9-12 were incubated with [γ -32P]-ATP/MgCl₂ in the absence (DMSO) or presence of CX-4945 and phosphorylated proteins were resolved on SDS-PAGE and detected by autoradiography. C: HIF-2 α was immunoprecipitated from transiently transfected HEK293T cells. a) Beads were then resuspended in 20 μ l of kinase buffer in the absence or presence of CX-4945. Kinase reactions were initiated by addition of 10 μ Ci [γ -32P]-ATP for 10 min at 20°C. Phosphorylated proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. b) CK2 activity was assayed in HIF-2 α immunoprecipitates, in the absence or presence of CX-4945, using the specific CK2 peptide substrate RRREDEESDDEE.

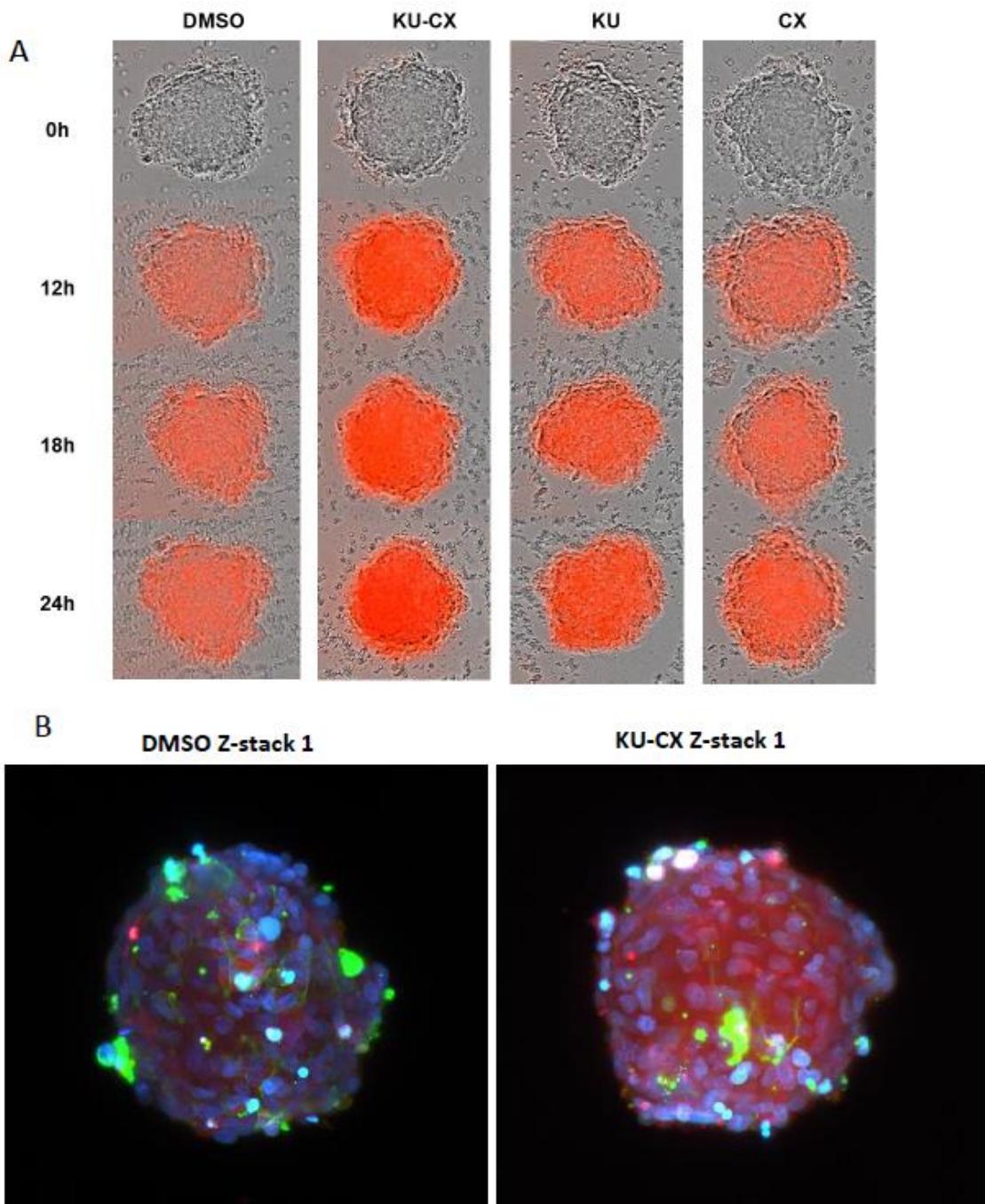
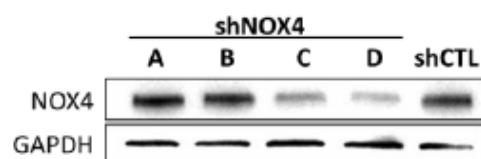


Figure S4: A: 786-O MCTS were treated for 24 h with either vehicle (DMSO, 0.15%), 5 μ M of CX-4945 or 10 μ M of KU-60019, or both, in the presence of MitoSOX (5 μ M). ROS production was monitored using an Essen IncuCyte Zoom live-cell microscope. Images taken automatically every 1 h for 24 h, Bright field and fluorescent overlayed images show 786-O spheroids at times (0 h, 12 h, 18 h and 24 h). Scale bar 50 μ m. B: Spheroids treated with KU-CX or DMSO were fixed and stained at 24 h and mounted in an agarose syringe for LSFM imaging. 3D views of spheroids treated for 24 h with DMSO (0.15 %) or KU-CX (10 μ M and 5 μ M respectively). Bleu = Hoechst ; Green = Phalloidin ; Red = MitoSox. Scale bar 450 μ m.

A



B

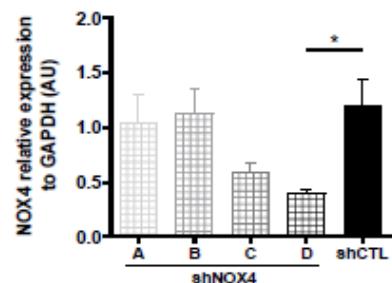


Figure S5: **A:** Western blot of 4 shNOX4 expressing 786-O VHL- cells showing expression of NOX4 and GAPDH as loading control. **B:** Quantification of NOX4 expression relative to GAPDH ($n=3$).

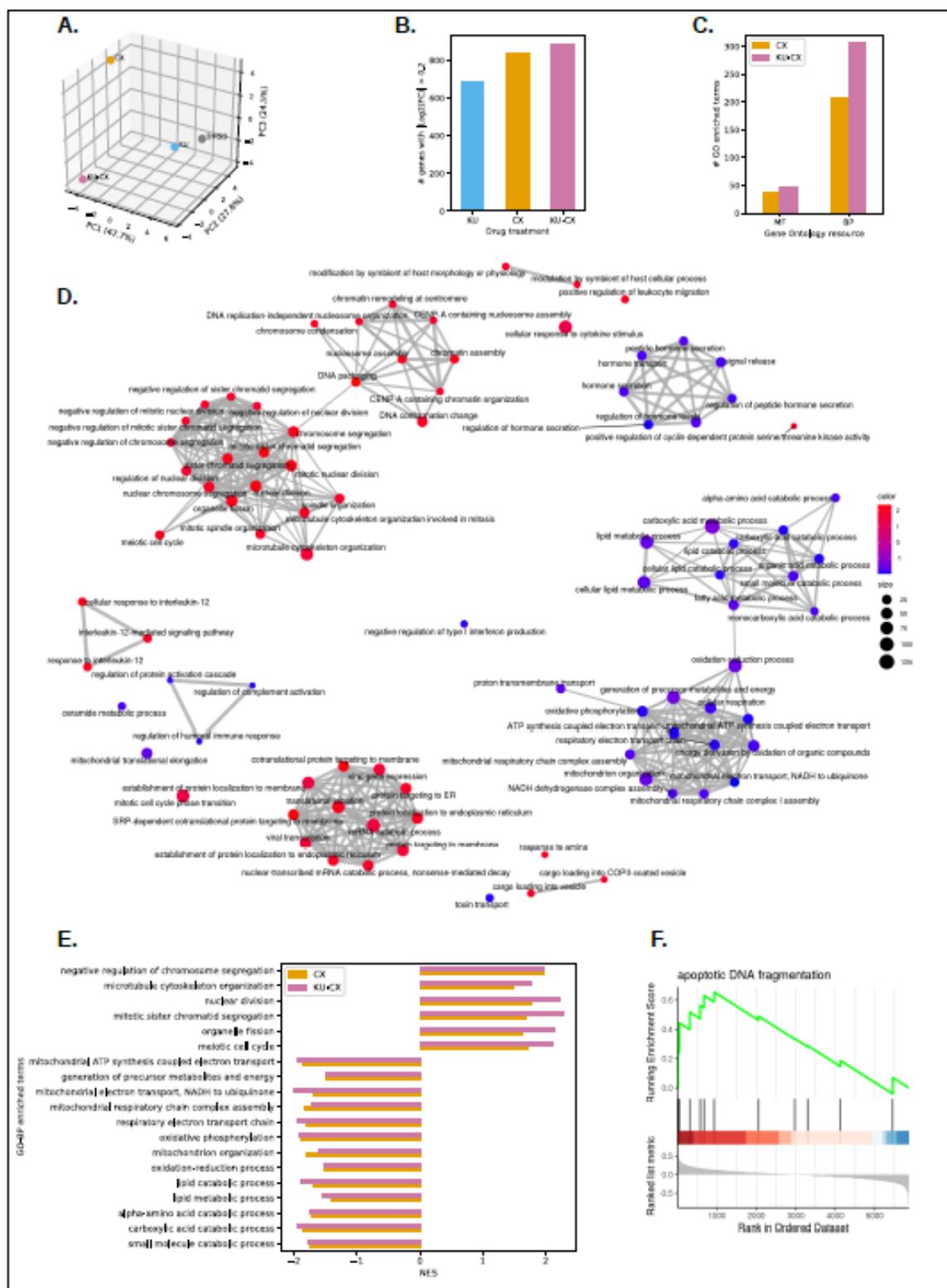


Figure S6: A: Principal Component analysis (PCA) of transcriptomes quantified from spheroids of tumor cell line 786-O. The spheroids were treated with either a vehicle (DMSO: gray point), drugs alone (KU-60019: blue point; CX-4945: orange point) or in combination (KU + CX: purple point). **B:** Bar plot of the number of deregulated genes from the transcriptomes of spheroids

treated with drugs alone (KU-60019: blue bar; CX-4945: orange bar) or in combination (KU + CX: purple bar). The genes were considered to be deregulated if the absolute value of their Log2 expression fold change, relative to their treatment by the vehicle (DMSO), is greater than 0.3. **C:** Bar plot of the number of significantly enriched Gene Ontology (GO) terms found by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) from deregulated genes in spheroids treated with CX-4945 drug alone (orange bar) or in combination (KU + CX: purple bar). No significantly enriched GO term was identified from genes deregulated in expression by the KU-60019 treatment. Two different GO resources were used to perform the statistical enrichment in terms: molecular functions (MF) and biological processes (BP). **D:** Enrichment map of GO BP terms found significantly enriched by GSEA from deregulated genes in spheroids treated with the drug combination KU + CX compared to DMSO. Terms are organized in a network with edges connecting overlapping gene sets. Thus, mutually overlapping gene sets tend to cluster together into functional module. The color gradient corresponds to the Normalized Enriched Score (NES) calculated by GSEA for each BP term enriched. A positive NES (red circle) indicates that the BP term is activated (ie enriched in genes overexpressed by the KU + CX combination), while a negative NES (blue circle) indicates that the BP term is repressed (ie enriched in genes under expressed by KU + CX). The size of the circle indicates the number of genes annotated in the BP term. **E:** Bar plot of some core enriched BP terms shared by the spheroids treated by the CX-4945 drug alone or by the KU + CX combination. The NES of each shared BP term is colored according to the treatment: CX-4945 alone (orange bar) or KU + CX (purple bar). A positive NES indicates that the BP term is activated by the treatment, while a negative NES indicate its repression. **F:** GSEA enrichment plot of the BP term named apoptotic DNA fragmentation found specifically enriched in spheroids treated with the combination KU + CX. The top portion shows the running enrichment score (ES) for the gene set as the analysis walks down the ranked gene list. The score at the peak of the plot is the ES for the gene set. A positive ES indicates gene set enrichment at the top of the ranked gene list (i.e. genes over-expressed by KU + CX). The middle portion shows where the members of the gene set appear in the ranked list of genes. The bottom portion shows the value as the logarithm of the fold change, between expression levels in spheroids treated by KU + CX versus the vehicle (DMSO), used as gene ranking metrics.

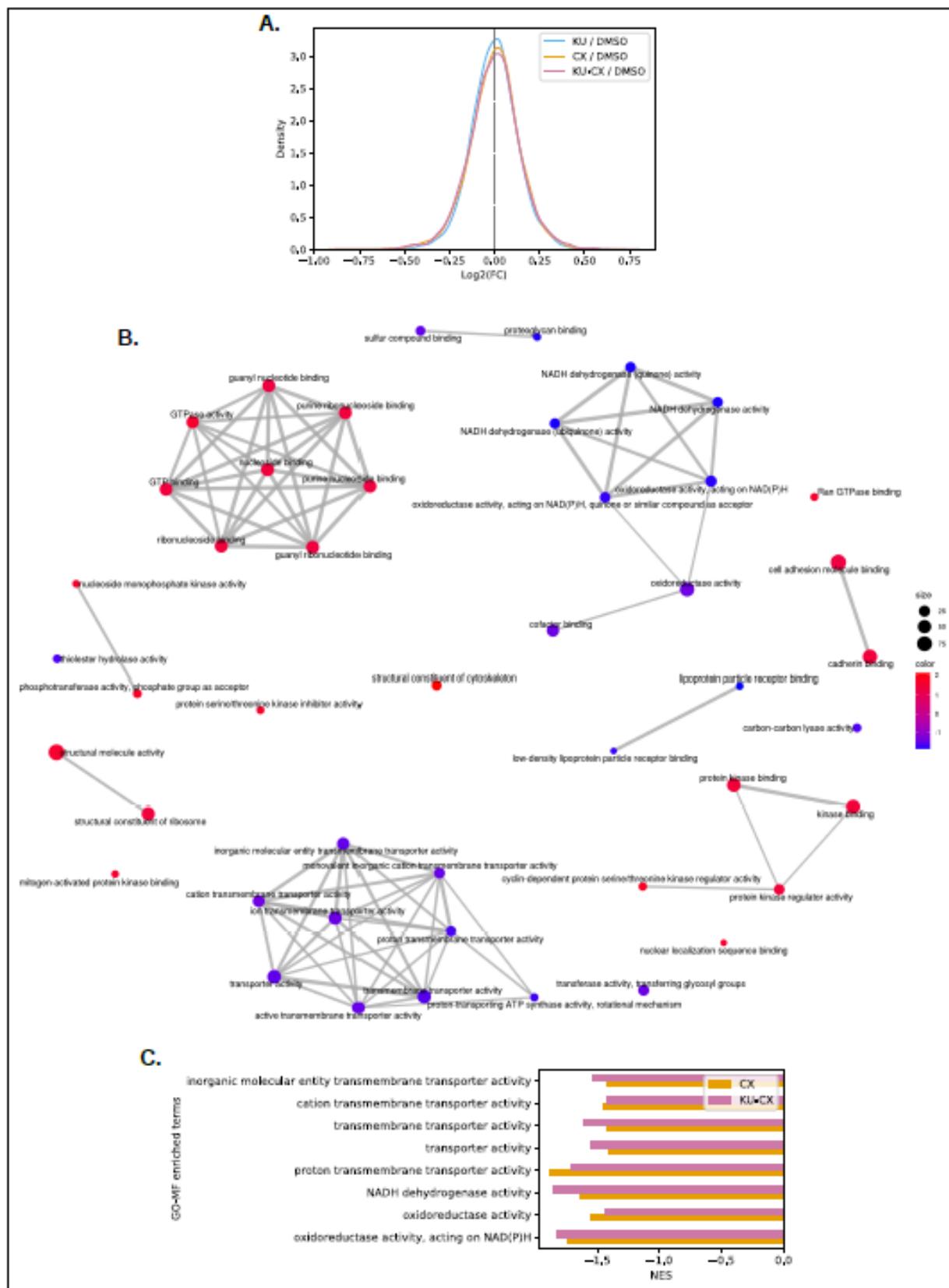


Figure S7: A: Distribution of the Log2 gene expression fold change for spheroids treated with drugs alone (KU-60019: blue line; CX-4945: orange line) or in combination (KU + CX: purple line), relative to the treatment by the vehicle (DMSO). The density plot was generated using

Kernel Density Estimation (KDE). **B:** Fold change plot showing deregulated gene number by the different treatments according to fold change, relative to the control treatment (DMSO). **C:** Enrichment map of GO MF (Molecular Function) terms found significantly enriched by GSEA from deregulated genes in spheroids treated with the drug combination KU + CX. Terms are organized in a network with edges connecting overlapping gene sets. Thus, mutually overlapping gene sets tend to cluster together into functional module. The color gradient corresponds to the Normalized Enriched Score (NES) calculated by GSEA for each MF term enriched. A positive NES (red circle) indicates that the MF term is activated (ie enriched in genes overexpressed by the KU + CX combination), while a negative NES (blue circle) indicates that the MF term is repressed (ie enriched in genes underexpressed by KU + CX). The size of the circle indicates the number of genes annotated in the MF term. **D:** Bar plot of some core enriched MF terms shared by the spheroids treated by the CX-4945 drug alone or by the KU + CX combination. The NES of each shared MF term is colored according to the treatment: CX-4945 alone (orange bar) or KU + CX (purple bar). A negative NES indicates that the MF term is repressed by the treatment.

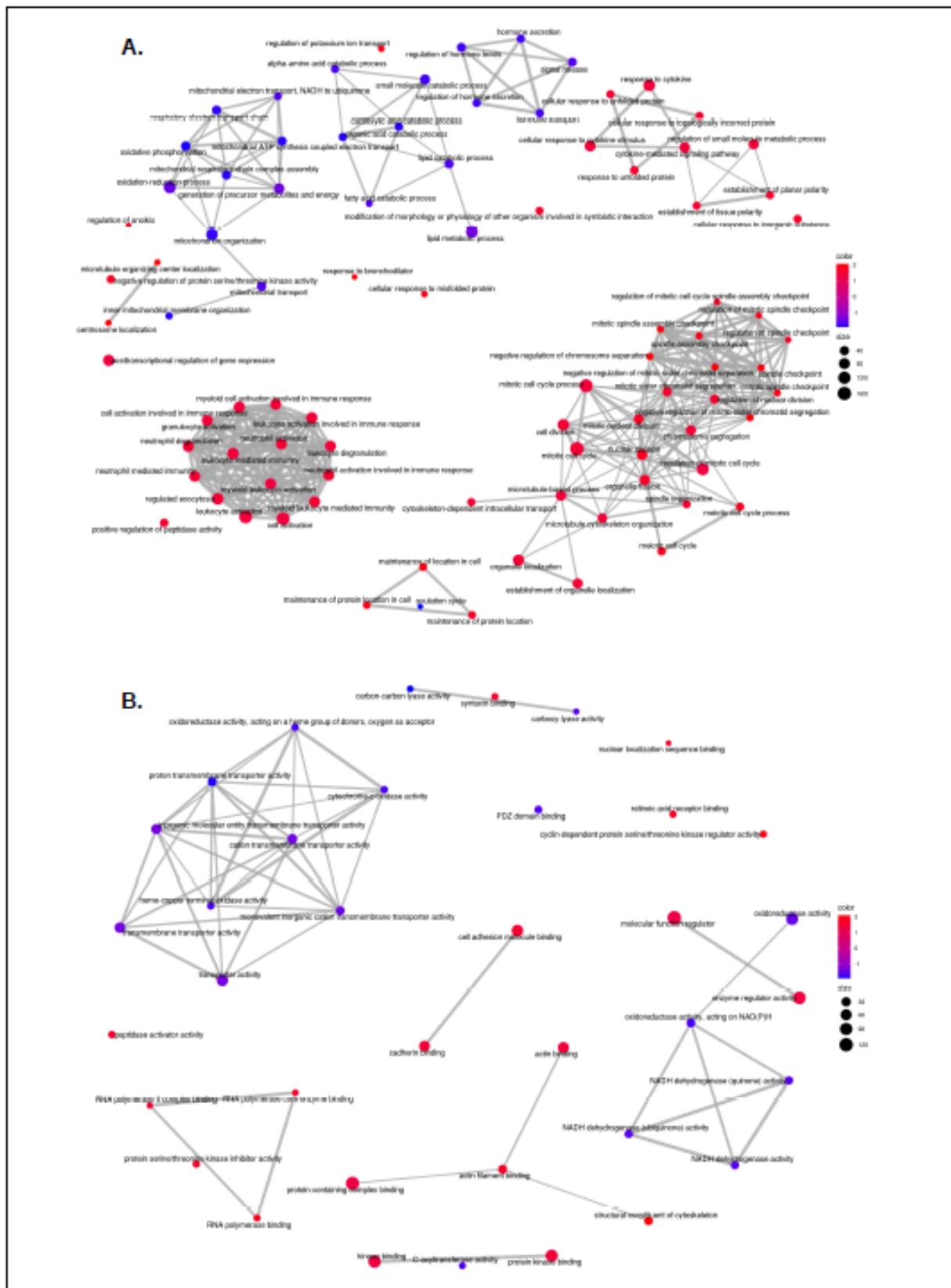


Figure S8: A: Enrichment map of GO BP terms found significantly enriched by GSEA from deregulated genes in spheroids treated with the drug CX-4945 alone. The color gradient corresponds to the NES calculated by GSEA for each BP term enriched. A positive NES (red)

circle) indicates that the BP term is activated (ie enriched in genes overexpressed by CX), while a negative NES (blue circle) indicates that the BP term is repressed (ie enriched in genes underexpressed by CX). The size of the circle indicates the number of genes annotated in the BP term. **B:** Enrichment map of GO MF terms found significantly enriched by GSEA from deregulated genes in spheroids treated with the drug CX-4945 alone.

Table S1 : Genes targeted by shRNA sequences cloned in the pLKO1 vector Hpgk-puro-cMV-tGFP. Lentiviral particles were provided by Merck Sigma-Aldrich.

Gene	Accession Number	Gene	Accession Number
PDK1	NM_002610	BCL2A1	NM_004049
PLK2	NM_006622	TP53	NM_000546
PNCK	NM_198452	ATM	NM_000051
HCK	NM_002110	ATR	NM_001184
NEK6	NM_014397	CHEK1	NM_001274
TRIB3	NM_021158	CHEK2	NM_007194
PCTK3 / CDK18	NM_002596	MAPK14	NM_001315
MET	NM_000245	CDK6	NM_001259
MELK	NM_014791	PTK2	NM_005607
AURKB	NM_004217	SRC	NM_198291
KIT	NM_000222	PAX2	NM_000278
PRKCD	NM_006254	CSF1R	NM_005211
PXK	NM_017771	FGFR1	NM_015850
PDGFRL	NM_006207	CA9	NM_001216
LCK	NM_005356	AURORA	NM_003600
PIM2	NM_006875	FLT1	NM_002019
MAPK1	NM_138957	CSNK2A1	NM_001895
AURKB	NM_004217	CSNK2B	NM_001320
NOX4	NM_001143837.2		

Table S2 : Chemicals

Molecule	Target	Molecule	Target	Molecule	Target	Molecule	Target
U0126	MEK	PHA665752	MET	CHIR 99021	GSK3 β	Lapatinib	EGFR
AG370	PDGF R	AT9283	Aurora A/B	Tyrphostin 25	EGFR	TSU 68	TGF β R/ FGFR1
SP600125	JUNK	TIE 2	ANGR	ML-7	MLCK	CP 690550	JAK3
Gefitinib	EGFR	GDC0941	PI3K	Rapamycin	mTOR	STF 62247	autophagy inducer
Sunitinib	VEGFR	Roxolitinib	JAK/STAT	OSI 930	cKIT	Barasertib	Aurora B
Apatinib	VEGFR	RG1462	EGFR	KRN633	VEGFR	AG 490	JAK2
Doxorubicin	Topoiso-merase	H89	PKA	GSK 1838705	IGFR	SU 4312	FLK1
Vemurafenib	ERK	Kempolonne	GSK3 β	TGF β R inhib	TGF β R	Bosutinib	ABL
SB203580	P38 MAPK	SU11274	MET	KU-60019	ATM	Pazopanib	VEGFR
LY294002	PI3K	AG490	EGFR	Piceatannol	SYK	AZ 960	JAK
Indirubin	GSK3 β	PF562271	FAK	Roscovitine	CDK	CX-4945	CK2
PF2341066	MET	Olaparib	PARP	Axitinib	VEGFR & PDGFR	Temsirolimus	mTOR
SXG523	MET	Enzastaurin	PKC	Imatinib	ABL	Aurora inhibitor	Aurora A
WP1130	DUB/ABL	Tyrphostin 1	CTRL inactif	INCB018424	JAK/STAT	AG 126	IRAK
Fasentin	GLUT1	KN62	CamK	Crenolanib	PDGFR α	GW 5074	cRAF
YM155	Survivin	BML257	AKT	Saracatinib	SRC	Dasatinib	ABL
Lavendustin	EGFR	NVP-ADW742	IGF1R	GSK1120212	MEK	Sorafenib	VEGFR
Hypericin	PKC	MK1775	WEE1	PP1	SRC	Cyt 387	JAK
Y27632	ROCK	KX2-391	SRC	ZM 336372	cRAF	5FU	DNA
Paclitaxel	Tubulin	Perifosine	AKT	AZD 0530	SRC/ABL	Tozasertib	Aurora A

All compounds were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mM. CX-4945 was synthesized at the Plateau Synthèse Organique, Département de Chimie Moléculaire, Université Grenoble Alpes. The chemical library was composed of two commercial libraries, one from Selleckchem (Tyrosine kinase inhibitors) and one from Enzo (Screen-well kinase inhibitors that were complemented with other inhibitors Paclitaxel, 5FU, doxorubicin). FDA-approved drugs are in red.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Nous avons démontré que la co-inhibition d'ATM et CK2 dans le cadre du traitement du CRCC avait une potentialité thérapeutique à exploiter. En effet, comme déjà mentionné, ATM et CK2 sont souvent dérégulés dans le cancer et majoritairement surexprimés, en faisant des cibles de choix. Plus précisément, notre équipe a démontré que CK2 était surexprimée dans le CRCC [150]. Pour ATM, la surexpression est moins claire, mais son inhibition potentialise l'inhibition de CK2 et inversement, amenant les cellules à la mort par apoptose.

D'un point de vue mécanistique, nous avons découvert que la combinaison induisait l'apoptose par l'intermédiaire d'une surproduction de ROS intracellulaire en partie grâce à NOX4. C'est un mécanisme très peu décrit dans le cadre des thérapies ciblées. Néanmoins, en 2021, Xie et al. ont identifié que l'axitinib (VEGFR-TKI), provoquait une surproduction de ROS suivi d'autophagie dans des cellules du cancer du poumon [173]. De la même manière, Giuliano et al. ont montré que le sunitinib induisait une augmentation des ROS et de l'autophagie dans des cellules de CRCC [174]. Notre combinaison induit d'ailleurs la production de vacuoles intracellulaires sur les cultures de cellules en 2D (*non montré dans le papier*) que nous avons essayé de caractérisé sans succès.

Un point important de ces résultats est que le traitement KU-CX n'est efficace que sur les cellules n'exprimant pas VHL ou ayant un VHL afunctionnel. Ce résultat est extrêmement encourageant puisque, pour rappel, 80% des patients atteint de CRCC ont une mutation VHL, qui peut être un facteur de mauvais pronostique lorsqu'il est associé à une augmentation de l'expression de VEGF [24], [175], [176]. De plus nous avons noté que la combinaison nécessite la présence d'HIF-2 α pour être efficace et induire la mort cellulaire. Dans le rein normal, c'est HIF1 α qui est majoritaire, et HIF-2 α est généralement indétectable même en cas d'ischémie. En fait, il s'opère souvent un switch d'expression entre HIF-1 α et HIF-2 α dans le CRCC. Plusieurs études ont noté qu'HIF-2 α n'a pas les mêmes fonctions qu'HIF-1 α et a été identifiée comme un promoteur de tumeur [21], [177], [178]. D'ailleurs, l'inhibition d'HIF-2 α est suffisante pour supprimer la formation de tumeurs VHL- chez la souris [179]. En conclusion, notre combinaison a un potentiel clinique élevé puisque son efficacité est dépendante de la présence de mutations sur VHL et de l'augmentation de l'expression d'HIF-2 α , retrouvé chez la majorité des patients atteint de CRCC.

Ces différents éléments, ainsi que l'étude COMBOREIN dans laquelle nous traitons des tumeurs humaines avec KU-CX, pourra nous permettre à terme de définir un profil patient auquel administrer ce traitement. En effet, dans le cadre de COMBOREIN, nous regardons la présence de VHL ainsi que le ratio HIF-1 α /HIF-2 α ce qui va à terme nous permettre de corrélérer expression de gènes et sensibilité au traitement. Nous voyons d'ailleurs déjà que KU-CX a une efficacité variable entre chaque patient (*Figure 7D de l'article*). Cela peut être dû à VHL et HIF-2 α mais aussi à l'hétérogénéité inter-tumorale globale très caractéristique du CRCC. L'hétérogénéité tumorale est un facteur majeur dans la prise en charge du patient, et nous en reparlerons dans le chapitre suivant intitulé « Développement et validation d'un nouveau modèle de tumoroïdes de carcinome rénal pour l'étude du potentiel métastatique des tumeurs de patients ».

Les perspectives de ce travail sont, premièrement, de continuer l'étude préclinique COMBOREIN afin d'en tirer un profil patient répondeur dans le cadre de la médecine personnalisée. Dans le chapitre suivant, nous verrons aussi que nous avons effectué l'étude *in vivo* chez la souris de la combinaison KU-CX face au Sunitinib. De plus, comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe aujourd'hui d'autres inhibiteurs d'ATM et CK2. Par exemple, il serait envisageable de remplacer KU-60019 par AZD1390 (Tableau 4) qui a une meilleure IC50 et est plus sélectif [136]. En effet, comme on le sait les inhibiteurs de kinases peuvent causer de gros effets secondaires. Réduire la dose et les rendre plus sélectifs participeraient à l'amélioration du confort patient. Pour CK2, les inhibiteurs d'interaction entre les sous unités α et β seraient aussi une option. Néanmoins, il semble que malgré de longues années de développement, seul le CX-4945 ait eu le potentiel de rentrer en clinique et son indication dans le traitement du CRCC pourrait être facilitée par les études cliniques déjà en cours.

En conclusion, cette étude a démontré la potentialité d'utiliser la létalité synthétique et en particulier la combinaison KU-CX dans le cadre du traitement du CRCC. Nous sommes d'ailleurs en phase avec les recommandations cliniques actuelles qui utilisent les thérapies combinatoires en première intention [58]. Néanmoins, nous sommes conscients que l'efficacité est très dépendante du patient et des caractéristiques intrinsèques de sa tumeur. C'est pourquoi nous allons à présent décrire notre projet nommé ONCOTRAP, qui vise à développer des avatars de tumeurs de patients ainsi qu'un dispositif médical prédictif de la réponse au traitement et du potentiel métastatique des patients pour une médecine personnalisée.

Et si vos cellules atterrissaient dans mon laboratoire...

... Et qu'on prédisait leur avenir...

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN NOUVEAU MODELE DE TUMOROÏDE DE CARCINOME RENAL POUR L'ETUDE DU POTENTIEL METASTATIQUE DES TUMEURS DE PATIENTS

INTRODUCTION

1. Une tumeur, un système complexe et hétérogène

1.1. L'hétérogénéité tumorale

L'hétérogénéité tumorale a été décrite pour la première fois dans les années 1800 par Rudolf Virchow [180]. L'hétérogénéité repose sur l'observation de différences dans la morphologie, l'histologie, la composition en marqueurs de surfaces, la vitesse de croissance, la réponse aux thérapies ainsi que les anomalies génétiques de différentes tumeurs [181]. A la base cette observation a été faite sur différents types de tumeurs, dont le postulat était que l'origine tissulaire et cellulaire de la tumeur induisait l'hétérogénéité tumorale [182]. Il nous paraît bien sur évident aujourd'hui que des cancers du sein, du poumon ou du rein sont très différents les uns des autres. C'est en 1976 que Peter Nowell a énoncé sa théorie sur l'évolution clonale des populations cellulaires. Il postula que chaque population cellulaire était capable, suite à une sélection naturelle, de se différencier en populations cellulaires distinctes, donnant lieu à de nombreuses possibilités d'évolution [183]. En fait, ces évolutions mutationnelles sont ce qu'on appelle aujourd'hui les sous-types de cancers. L'hétérogénéité tumorale a donc largement été décrite pour le diagnostic pour classer les patients en de nombreux sous-types de plus en plus précis. Exemple, les cancers du sein sont classés en fonction de leur expression des récepteurs aux hormones, qui est une évolution clonale des cellules d'origine [182]. Néanmoins, l'hétérogénéité tumorale va plus loin que ces sous-types et diverses études ont montré qu'il existait une hétérogénéité inter et intra-tumorale.

1.1.1. L'hétérogénéité inter-tumorale

L'hétérogénéité inter-tumorale est définie comme l'hétérogénéité existante entre deux tumeurs appartenant au même sous-type histologique. Elle résulte de facteurs spécifiques au patient, provenant de variations génétiques, de profil mutationnel divergent ou encore de facteurs environnementaux [184].

Pour exemple, la prévalence des mutations est une forme d'hétérogénéité inter-tumorale. On peut par exemple classer les patients dans différents groupes selon qu'ils portent ou non une mutation VHL, PBRM1 ou encore SETD2. Dans deux études, ces gènes ont été retrouvés mutés dans 64%, 36% et 20% des tumeurs, respectivement [185], [186]. Les patients ne portant pas les mêmes mutations ont donc des tumeurs dites hétérogènes malgré leur sous-type

histologique commun. De plus, il a été montré que la prévalence de ces mutations augmentait en cas de tumeur métastatique, induisant une hétérogénéité inter-tumorale encore plus forte [185]. En bref, cette hétérogénéité génétique est un facteur clé dans l'évolution de la maladie, en particulier quand on sait que la prévalence des mutations augmente en cas de métastases. Elle a été identifiée comme un des points clés de la résistance thérapeutique ainsi qu'un des objectifs majeurs de la thérapie personnalisée [187].

Hormis les mutations, d'autres facteurs sont responsables de l'hétérogénéité inter-tumorale dans le CRCC. Jiang et al. ont récemment démontré que la pyroptose, une mort cellulaire programmée très inflammatoire, et la quantité d'infiltrat immunitaire, étaient des indicateurs de la sensibilité au traitement. En effet, les patients ayant une tumeur avec beaucoup de pyroptose et d'infiltrat immunitaire répondraient mieux au Sunitinib. Néanmoins, ces patients auraient aussi un moins bon pronostic [188]. Coté immunité, la présence du marqueur d'échappement immunitaire PD-1 est aussi une marque d'hétérogénéité inter-tumorale et de mauvais pronostic [189]. En fait, plus largement, la composition du microenvironnement tumoral (cf. [Les cellules qui composent une tumeur](#) & [La matrice extracellulaire](#)) participe à renforcer l'hétérogénéité inter-tumorale. De plus, c'est cette hétérogénéité qui est une des causes de la résistance thérapeutique dont nous avons parlé plus tôt (cf. [Le microenvironnement et l'hétérogénéité tumoral](#)) [190].

Pour conclure, la classification en sous-types histologiques ne semble plus suffisante pour définir le plan de traitement des patients, dû à cette hétérogénéité inter-tumorale affectant fortement la réponse au traitement. Ceci renvoie à l'urgence de développer des techniques de médecine personnalisée, comme la détection de marqueurs plus spécifiques pour le diagnostic et le choix de la stratégie thérapeutique. Une des causes de l'hétérogénéité inter-tumorale provient aussi de l'évolution clonale responsable de l'hétérogénéité intra-tumorale, en particulier dans le CRCC, dont nous allons parler ci-dessous.

1.1.2. L'hétérogénéité intra-tumorale

L'hétérogénéité intra-tumorale correspond à l'hétérogénéité présente dans la tumeur d'un seul patient (Figure 26 [184]). Celle-ci peut être spatiale, c'est-à-dire que différentes populations sont présentes à différentes localisations au sein de la tumeur, ou dans d'autres sites comme les métastases qui ont souvent un profil mutationnel très différent de la tumeur d'origine. Elle peut aussi être temporelle, c'est-à-dire l'évolution d'une population cellulaire

au cours du temps [184]. Cette évolution temporelle est généralement due à l'administration de thérapies, qui éradiquent certaines populations au profit d'autres possédant des mutations leur conférant une résistance et induisant la rechute du patient [191], [192].

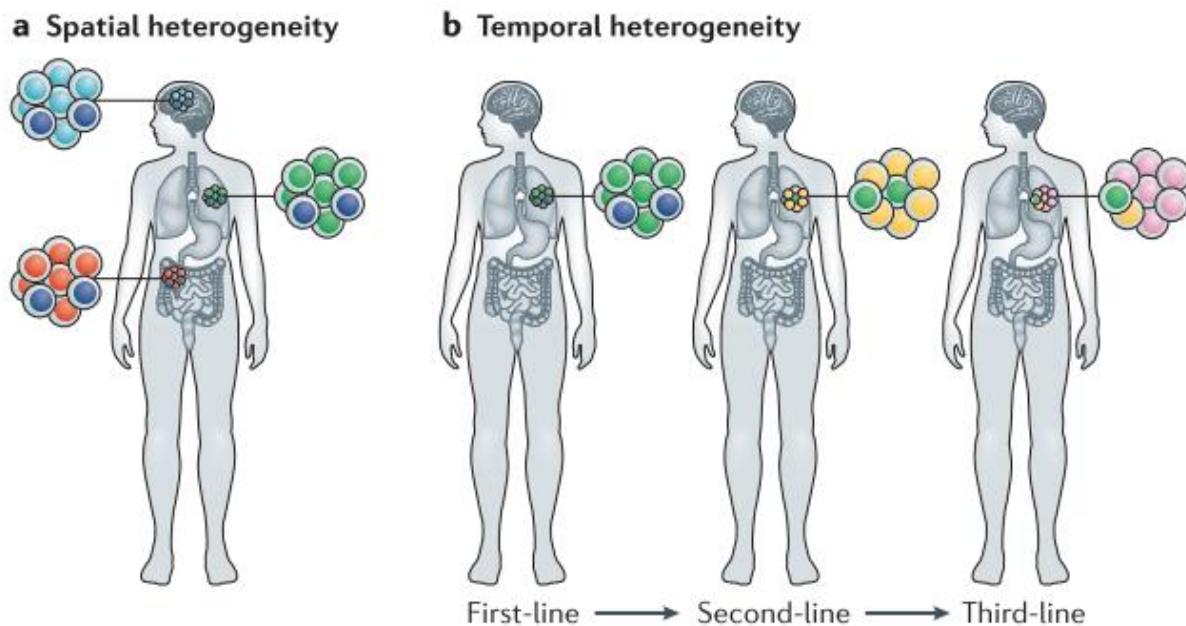


Figure 26 : Hétérogénéité intra-tumorale spatiale et temporelle.

Un exemple d'hétérogénéité spatiale découvert par Liu et al. est l'augmentation de l'expression des gènes IL6, CASP3 ou encore ACTB, impliqués dans la TEM, dans les métastases pulmonaires de patients ayant un mCRCC [193]. La migration et le déplacement des cellules tumorales est un phénomène assez drastique pour les cellules puisqu'elles doivent, entre autre, entrer dans la circulation sanguine, induisant des changements environnementaux responsables des mutations ou des modifications d'expressions de gènes (Cf. [Le processus métastatique](#)). A l'inverse, les cellules peuvent en premier lieu acquérir des mutations ou des modifications d'expression de gènes leur permettant par la suite de résister à ces changements environnementaux et de métastaser [194].

Cette hétérogénéité n'est pas seulement présente dans les métastases mais aussi dans la tumeur initiale. Il est établi que le CRCC est un cancer très hétérogène, tant en quantité de sous-populations clonales cancéreuses qu'en diversité de types cellulaires présents dans la tumeur. En effet, par séquençage de cellule unique, Hu et al. ont identifié la présence de 15 types cellulaires dans des échantillons de CRCC [195]. Comme nous le disions précédemment, le microenvironnement tumoral a un grand rôle dans l'hétérogénéité tumorale.

Afin de mieux appréhender l'hétérogénéité des CRCC, Gerlinger et son équipe ont séquencé 4 tumeurs de patients ayant un mCRCC. Ils ont effectué un séquençage multirégional sur 9 morceaux de la tumeur initiale ainsi que sur 3 métastases. De façon très surprenante, le grade de chaque morceau était différent allant de 1 à 4, démontrant déjà une hétérogénéité intratumorale importante. Ensuite, ils ont pu générer un arbre phylogénétique des sous-populations clonales tumorales, présenté dans la Figure 27 ci-dessous, extraite de l'article. Ils ont démontré que chaque morceau avait un profil mutationnel différent, provenant toutefois d'une mutation partagée sur VHL. La tumeur primaire et les métastases possédaient une phylogénie respectivement partagée, suivant une évolution tumorale ramifiée, mais chaque morceau séquencé avait une composition mutationnelle globale unique. En fait, 69% des mutations ne seraient pas ubiquitaires à la tumeur [74], [196]. Les tumeurs peuvent aussi parfois suivre une évolution clonale linéaire, c'est-à-dire que chaque clone est relié au même tronc mutationnel commun [74], [184], [197]. Cette hétérogénéité est une des causes de la résistance thérapeutique et de la rechute des patients et l'espoir est porté par la thérapie combinatoire [197].

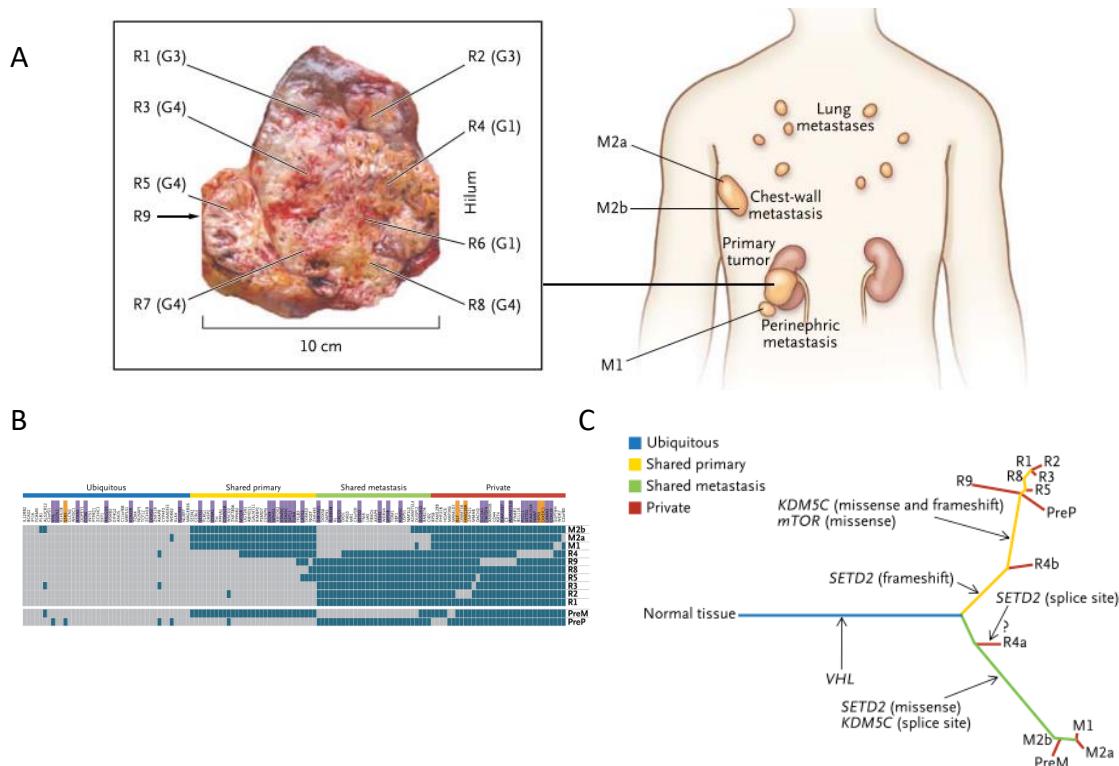


Figure 27 : Profil génétique et phylogénie d'un CRCC humain. A : régions de la tumeur prélevées pour le séquençage avec le grade correspondant (R = région, G = Grade). B : Distribution régionale de 101 mutations retrouvées par séquençage, classifiées en 4 catégories (ubiquitaires, partagées par la tumeur primaire, partagées par les métastases, et privées). C : Arbre phylogénétique du CRCC de ce patient. Pour plus de détails voir [74].

En conclusion, si nous souhaitons à l'avenir aller vers la thérapie personnalisée et traiter les patients en fonction de leurs spécificités mutationnelles, il est impératif de faire du séquençage multirégional afin de ne pas « louper » des mutations qui seraient primordiales dans la réponse au traitement du patient [186]. De plus, il est aussi indispensable de prendre en compte les cellules du microenvironnement pouvant avoir un impact majeur sur la réponse au traitement. Par expérience, notre étude COMBOREIN nous a d'ailleurs démontré l'impact de l'hétérogénéité sur la réponse au traitement. Nous observons souvent que 2 morceaux distincts provenant du même patient ne répondent pas de la même manière aux différentes thérapies.

L'hétérogénéité provenant aussi du microenvironnement, je vais maintenant vous présenter plus en détail les cellules qui composent une tumeur ainsi que leurs différents rôles.

1 . 2 . Les cellules qui composent une tumeur et leur rôle

Une tumeur n'est pas simplement composée de cellules cancéreuses, mais aussi de cellules stromales, immunitaires ou encore endothéliales. Elle a aussi sa propre matrice extracellulaire dont nous parlerons dans la partie suivante. Parmi les cellules cancéreuses, j'ai déjà évoqué la présence d'une sous-population particulière responsable de la résistance aux traitements : les cellules souches cancéreuses (CSCs) (Cf. [Les cellules souches cancéreuses](#)). Ici nous allons donc détailler le rôle de plusieurs autres types cellulaires non cancéreux ayant un rôle majeur dans la croissance tumorale.

1 . 2 . 1 . *Les Fibroblastes associés au cancer : CAF*

Parmi les cellules stromales, les fibroblastes sont les plus abondants et peuvent représenter jusqu'à 80% de la masse tumorale [66], [198]. Les fibroblastes sont à l'origine des cellules quiescentes qui ne sont activées qu'en cas d'inflammation et de dommage tissulaire. On les appelle alors les NAFs pour Fibroblastes activés normaux, aussi appelés myo-fibroblastes dû à leur expression d'α-actine musculaire lisse (α-SMA) [199]. Ils participent au remodelage tissulaire et à la cicatrisation via leur action sur la matrice extracellulaire. Leur activation est normalement réversible, sauf en cas de fibrose ou d'inflammation chronique. Si leur activation persiste trop, ils participent à l'initiation tumorale et sont modifiés par les cellules cancéreuses pour devenir les Fibroblastes associés au cancer (CAFs) [66].

Les CAFs sont en fait une population très hétérogène ayant une trans-origine. Ils peuvent bien sûr provenir de fibroblastes quiescents et des NAFs mais aussi être dérivés d'autres types cellulaires. Comme on peut le voir dans la Figure 28 [200], ils peuvent être dérivés de cellules endothéliales et épithéliales après avoir subi un processus de transition endothélio-mésenchymateuse (TEndM) et de TEM, respectivement. Ils peuvent aussi puiser leur source dans les péricytes, les cellules musculaires lisses et les adipocytes en effectuant une transdifférenciation. Enfin, ils peuvent être directement recrutés sous forme de fibrocytes circulants et de cellules souches mésenchymateuses (MSC) depuis la moelle osseuse, puis activés sur le site tumoral [66], [200].

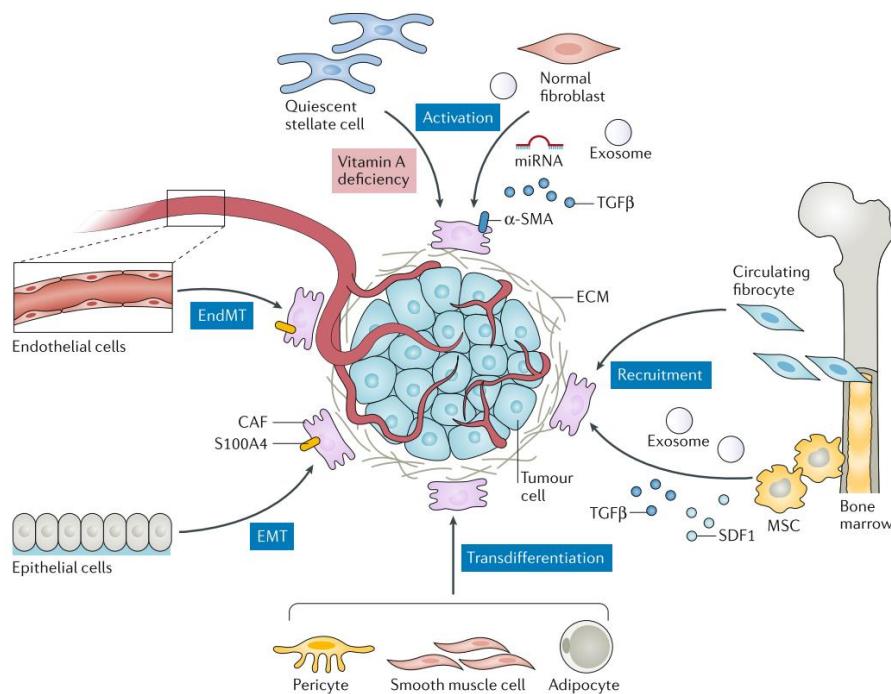


Figure 28 : Les sources cellulaires des CAFs. Les CAFs peuvent être activés à partir des fibroblastes normaux et des cellules stellaires quiescentes présents dans le tissu tumoral. Ils peuvent aussi provenir du recrutement des fibroblastes circulants ou encore des MSCs via l'action de cytokines (TGF β , SDF-1) et d'exosomes. Les CAFs peuvent aussi être issus de la transdifférenciation des péricytes, des cellules musculaires lisses et des adipocytes. Enfin, ils peuvent être dérivés de cellules endothéliales et épithéliales après avoir subi un processus de TEndM et de TEM, respectivement. *CAF : Fibroblaste associé au cancer ; MSC : Cellules souches mésenchymateuses ; TEndM : Transition Endothélio-Mésenchymateuse ; TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse*

La détection de la présence des CAFs dans une tumeur est facilitée par l'expression de divers marqueurs. Au niveau cytosolique, ils expriment α -SMA ou encore la vimentine [201], [202]. Au niveau membranaire, ils expriment la protéine d'activation des fibroblastes (FAP), le récepteur PDGFR ou encore le cluster de différenciation CD10 [203], [204], [205]. Ces marqueurs sont aussi présents dans les NAFs et ne sont donc pas des marqueurs d'exclusion.

Néanmoins, FAP est très utilisée pour détecter les CAFs car elle est surexprimée dans les fibroblastes dans 90% des cancers [200].

Les CAFs ont une importance majeure dans la carcinogenèse et le processus métastatique et interagissent avec toutes les populations cellulaires du microenvironnement tumoral comme on peut le voir dans la Figure 29 [206] ci-dessous.

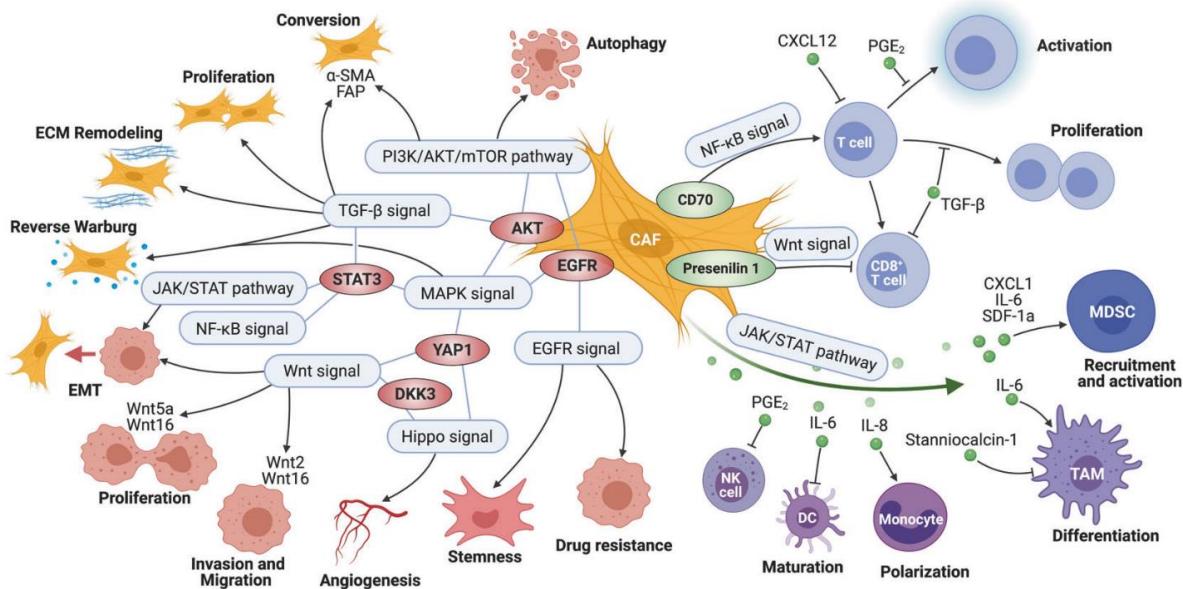


Figure 29 : Voies de signalisation croisées entre les CAFs, les cellules cancéreuses, endothéliales et immunitaires. La génération, la prolifération, le remodelage de la MEC ou encore le métabolisme des CAFs sont régulés par plusieurs signaux tel que le TGF β et la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Les CAFs favorisent aussi l'invasion, la prolifération, l'angiogenèse, le caractère souche et la résistance aux traitements des cellules cancéreuses, via l'activation de voies de signalisation tel que les voies MAPK, Wnt ou NF- κ B. Les voies de signalisations empruntés par les CAFs sont croisées et forment un réseau de signalisation, dont les points de connexions peuvent être STAT3 et AKT par exemple. Les CAFs sécrètent aussi des cytokines et des facteurs de croissances, tel que l'IL-6, le TGF β et CXCL12 (SDF-1), qui induisent l'activation et la prolifération des lymphocytes T, le recrutement des MDSC, ou encore la différenciation des macrophages.

Ils sécrètent des vésicules exosomales, induisent la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses ou encore sécrètent des cytokines protectrices qui sauvent les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par les thérapies [66], [200], [207]. Par exemple, il a été démontré que les CAFs sécrètent la cytokine CXCL12, aussi appelée SDF-1, reconnue par le récepteur CXCR4, qui est un récepteur de cytokine souvent surexprimé dans le CRCC. L'expression de CXCR4 est par ailleurs corrélée à l'accumulation de HIF-1 α et à la capacité métastatique puisque c'est un marqueur des cellules tumorales circulantes [77], [208]. La sécrétion de CXCL12 par les CAFs leur permet aussi de recruter des cellules endothéliales progénitrices [76]. Les CAFs promeuvent donc le processus métastatique et l'angiogenèse. Des études montrent aussi qu'il existe une communication entre les CSCs et les CAFs. Dans une

étude sur le cancer du côlon, il a été montré que les CSCs sécrétaient du TGF- β en faveur des CAFs et qu'en retour, ces derniers sécrètent de l'interleukine-11 (IL-11) qui augmente le potentiel métastatique des CSCs [209]. De plus, les CAFs étant spécialisés dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), les cellules cancéreuses en tirent parti et utilisent les CAFs pour faciliter leur échappement. Les CAFs sécrètent des métalloprotéases pour dégrader la MEC ou encore remodèlent les fibres de collagènes afin de faciliter la TEM des cellules cancéreuses [210]. Pour finir, les CAFs sont aussi capables de réprimer l'immunité tumorale en activant les LyT régulateurs et en inhibant les LyT cytotoxiques, ou encore en recrutant des MDSC qui suppriment la réponse lymphocytaire T et qui induisent l'angiogenèse [82], [206].

Au vu du rôle majeur joué par les CAFs dans la tumorigénèse et le processus métastatique, de nombreux efforts sont mis dans la recherche de traitements ciblant les CAFs. Les essais cliniques actuels ciblent majoritairement des cibles présentes sur les CAFs et les cellules cancéreuses comme l'Imatinib ciblant le PDGFR. Néanmoins, certaines études pré-cliniques s'intéressent à l'inhibition de FAP et une étude clinique de phase I a démontré la faisabilité de traiter des patients avec un inhibiteur de FAP couplé à un radionucléide [204], [211], [212].

Vous l'aurez compris, les CAFs ont un rôle majeur dans la progression tumorale en collaboration avec d'autres cellules, et nous allons maintenant discuter du rôle des cellules endothéliales dans la tumorigénèse.

1.2.2. Les cellules du système vasculaire

La circulation sanguine permet la nutrition des organes, délivrant aux cellules oxygène et nutriments essentiels. Les vaisseaux normaux possèdent une organisation et une structure hiérarchique qui supportent cette distribution. Allant d'artères à capillaires pour aller vers les organes, et de veinules à veines pour retourner au cœur. L'unité fonctionnelle majeure des vaisseaux sont les cellules endothéliales, qui tapissent leur surface interne [78]. Dans le cadre du cancer, on les appelle les cellules endothéliales tumorales (TEC), car il a été démontré qu'elles étaient anormales tant dans leur structure que dans leur communication avec le microenvironnement [213]. Pour les identifier, les marqueurs les plus utilisés sont CD31, CD34 et CD105 (Endogline) car ils marquent les néo-vaisseaux ainsi que les vaisseaux matures et sont en général assez spécifiques. CD31 a malgré tout quelques autres cibles tel que les plaquettes, les neutrophiles ou encore les cellules hématopoïétiques progénitrices [214].

Au cours de la progression tumorale, la néo-angiogenèse est un processus majeur permettant croissance locale et dissémination métastatique (Cf. [Angiogenèse](#)). Seulement, cette néo-vasculature est anarchique et non structurée. Les vaisseaux sont souvent tortueux, très perméables et dilatés, et ils ne couvrent pas la tumeur de façon homogène. Ceci peut s'expliquer par la perte d'association avec les cellules péri vasculaires tel que les péricytes ou encore la diminution de la quantité de jonctions serrées entre les TEC [215], [216]. Cette structure anarchique crée des microenvironnements hypoxiques par endroits. Cela limite la délivrance d'agents thérapeutiques et crée des régions avec un métabolisme modifié, favorisant l'hétérogénéité tumorale, la progression métastatique et la résistance au traitements [217], [218], [219]. Le CRCC est d'ailleurs reconnu comme un cancer très vascularisé, possédant une densité micro-vasculaire supérieure aux autres RCC [220]. De plus, il a été montré que le motif de formation des néo-vaisseaux dans le CRCC était corrélé à la survie des patients. En effet, lorsque les vaisseaux sont continus autour de petits nids tumoraux, la survie à 5 ans est réduite pour ces patients [221]. On peut d'ailleurs observer dans la Figure 30 tiré de [221] les formats continus et discontinus ainsi que l'hétérogénéité de répartition des vaisseaux avec la présence de zones à densité variable.

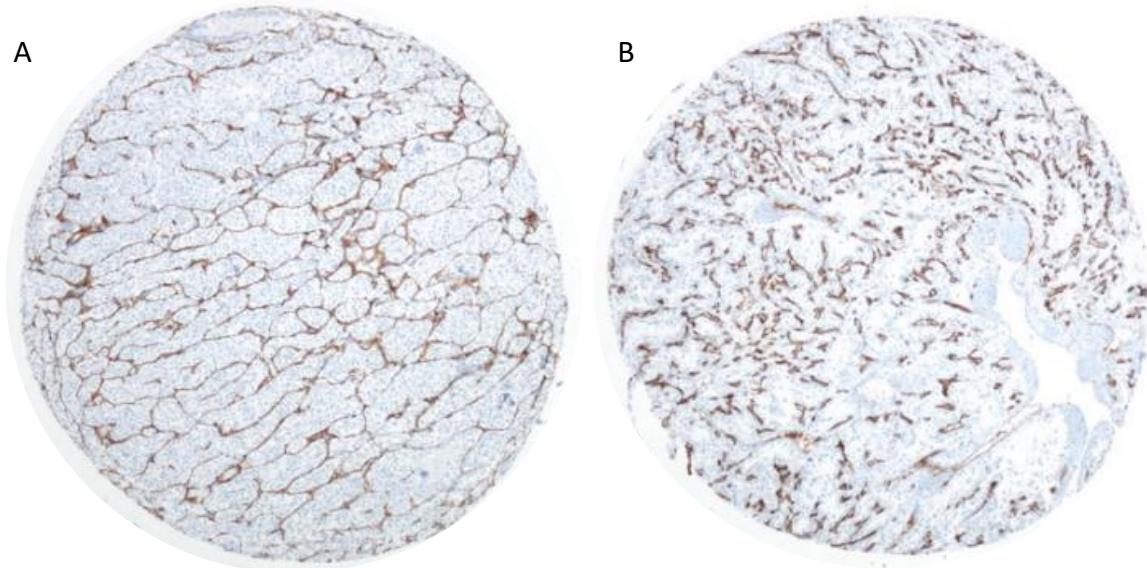


Figure 30 : Motif de formation des néo-vaisseaux dans le CRCC.
Marron : Marquage CD34 ; A : Forme continue ; B : Forme discontinue

D'un point de vue plus mécanistique, les TECs sécrètent et reçoivent des cytokines, leur permettant de communiquer avec le microenvironnement et les cellules tumorales. Par exemple, les cellules tumorales sécrètent du CXCL12 afin d'attirer des TECs exprimant le récepteur CXCR4. Ceci promeut la néo-vascularisation et la formation de métastases distantes

[222]. Au cours de l'angiogenèse classique, le VEGF est une cytokine temporairement sécrétée et très bien régulée. Par contre, dans le cadre d'un CRCC VHL muté, la surexpression de VEGF contribue à la formation de néo-vaisseaux désorganisés. En effet, son expression presque constante perturbe la maturation des vaisseaux et les rend perméables aux cellules tumorales. Plus précisément, cela induit la surexpression de molécules d'adhésion créant un support pour les cellules tumorales permettant leur extravasation [223]. De manière générale les TECs produisent beaucoup de molécules pro-tumorales comme le bFGF, le TGF- β , ou encore des interleukines favorisant la prolifération [78]. Elles expriment aussi des marqueurs de cellules souches comme Nanog, Notch1, Oct4 ou encore Sox2 [224]. Par exemple, l'expression de Notch1 à la surface des TECs est corrélée avec une augmentation des métastases pulmonaires et d'une infiltration des neutrophiles dans la tumeur. Son expression est un marqueur de mauvais pronostic [225].

En conclusion les TECs favorisent la croissance et la progression tumorale via différentes voies de signalisation et il a aussi été montré qu'elles étaient responsables de la résistance à la vincristine dans le cas du CRCC [226]. C'est une des raisons pour lesquelles beaucoup de TKI-VEGFR ont d'ailleurs été développés dans le cadre du traitement du CRCC, car l'implication des cellules endothéliales est majeure dans la progression et l'échappement tumoral. Les TECs entretiennent aussi un lien étroit avec les cellules du système immunitaire (SI), tant en les réprimant qu'en les stimulant parfois [213], et nous allons maintenant décrire le rôle du SI dans le développement tumoral.

1.2.3. Les cellules immunitaires

La présence des cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral revêt une importance majeure dans le fonctionnement et le développement tumoral. Une analyse transcriptomique a d'ailleurs révélé que le CRCC avait le plus haut degré d'infiltrat immunitaire parmi 19 types de cancers étudiés [227], et que ce microenvironnement immunitaire était souvent « chaud » [228]. C'est-à-dire un environnement inflammatoire, avec un SI actif et donc potentiellement répondeur à l'immunothérapie. Un des objectifs de l'association TKI-IT est d'ailleurs de renforcer cette réponse immune déjà active dans le CRCC [229].

Un microenvironnement « froid » ou « chaud » est défini par la quantité et le type de cellules immunitaires infiltrant la tumeur. La présence de cellules immunosuppressives comme les lymphocytes T régulateurs (LyT reg) ou les macrophages M2 sont un signe de

microenvironnement immunitaire dit « froid ». Au contraire, la présence de LyT CD8+ activés ou de macrophages M1 sont un signe d'inflammation et donc de tumeur dite « chaude ». Pour transformer une tumeur « froide » en tumeur « chaude », les chercheurs ont d'ailleurs proposé d'irradier les tumeurs afin d'entrainer une réponse inflammatoire stimulatrice et donc le recrutement ou l'activation des cellules immunitaires cytotoxiques [230]. Pour mieux comprendre le rôle de ces divers acteurs nous allons détailler ci-après la fonction des différents types cellulaires immunitaires.

Les Lymphocytes

Les lymphocytes font partie de l'immunité adaptative et sont classés en deux grands groupes : les Lymphocytes B (LyB) et les Lymphocytes T (LyT).

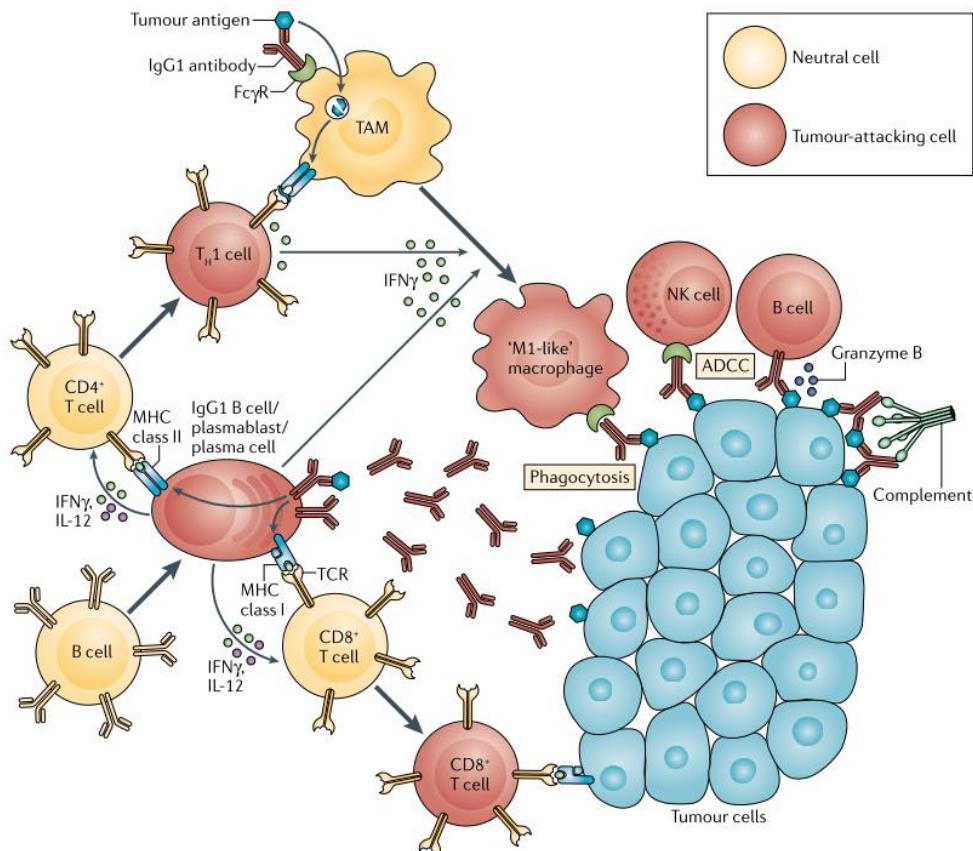


Figure 31 : Rôle anti-tumoral des Lymphocytes B activés. Les plasmocytes anti-tumoraux favorisent l'immunité anti-tumorale via la sécrétion de cytokines (IFN γ , IL-12) qui induisent la maturation des lymphocytes T (LyT) CD4 en LyT Th1, qui favorisent la maturation des macrophages de type M1 et qui permettent l'activation des LyT CD8 cytotoxiques. Toutes ces cellules anti-tumorales agissent conjointement pour attaquer les cellules tumorales, afin d'induire leur mort.

Les LyB, ou plasmocytes dans leur forme active, modulent la réponse immunitaire tumorale via différents mécanismes. Premièrement en sécrétant des anticorps dirigés contre les cellules

cancéreuses, afin de les marquer pour indiquer les cibles aux macrophages M1 ou aux cellules Natural Killer (NK). Ils sécrètent aussi des cytokines, comme l'IFNy et l'IL-12 capables d'activer les lymphocytes T et les macrophages anti-tumoraux de type M1. De plus, ils permettent la présentation antigénique aux LyT CD4 et CD8, favorisant l'immunité anti-tumorale (Figure 31 [231]).

Néanmoins, les LyB régulateurs peuvent supprimer la réponse immunitaire via la production et la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 ou le TGF- β qui transforment les neutrophiles en MDSC et qui favorisent les macrophages immunosupresseurs de type M2. Les LyB reg bloquent aussi les LyT effecteurs via l'interaction récepteur-ligand PD1-PDL1 par exemple (Figure 32 [231]) [229], [231]. Leur fréquence d'infiltration n'est que de 4% dans le CRCC [232]. Mais lorsqu'ils sont présents, il a été démontré que les LyB régulateurs induisaient la migration cellulaire et augmentaient le potentiel métastatique dans le CRCC via la sécrétion d'IL-1 β stimulant HIF-2 α [233]. L'infiltration des LyB reg est donc promotrice de tumeur et donc un marqueur de mauvais pronostic dans le CRCC [234].

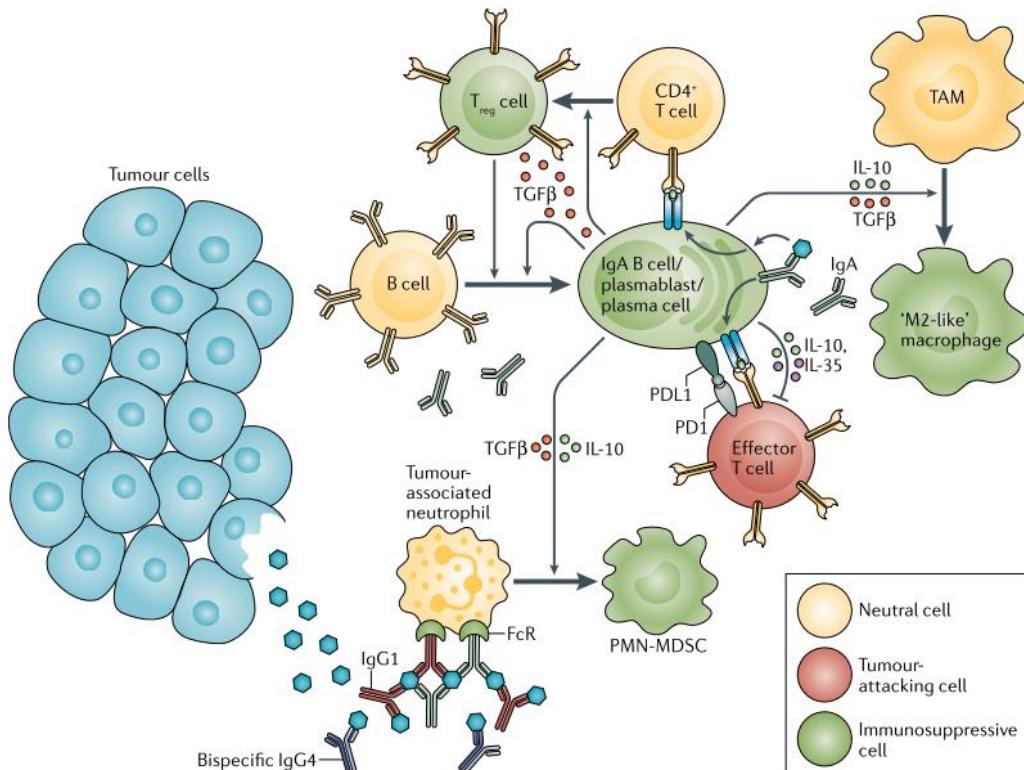


Figure 32 : Rôle pro-tumoral des Lymphocytes B régulateurs. Les plasmocytes pro-tumoraux répriment l'immunité anti-tumorale et favorisent l'immunité pro-tumorale via la sécrétion de cytokines (TGF- β , IL-10) qui induisent la maturation des lymphocytes T (LyT) CD4 en LyT régulateurs, qui favorisent la maturation des macrophages de type M2 et qui permettent l'activation des cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSC). Toutes ces cellules pro-tumoriales agissent conjointement pour protéger les cellules cancéreuses, et favoriser la croissance tumorale.

Les LyT sont quant à eux découpés en différents lignages. D'un côté les LyT CD8+ dits LyT cytotoxiques qui, suite à leur activation, vont directement lyser les cellules cibles grâce à la sécrétion de granzymes et de perforines induisant la lyse cellulaire par apoptose. De l'autre côté il y a les LyT CD4+ ou LyT helper pouvant se différencier en 4 sous types ayant des rôles distincts. Les LyT Th1 sont impliqués dans la réponse immunitaire cellulaire cytotoxique et activent les LyT CD8 ainsi que les cellules NK. Les LyT Th2 soutiennent l'immunité humorale en activant les LyB et peuvent parfois être immunosupresseurs. Les LyT reg sont immunosupresseurs et inhibent l'inflammation. Pour finir, les LyT Th17 sont à la croisée entre immunosuppression et inflammation puisqu'ils sont impliqués dans le maintien de l'inflammation mais aussi de sa réduction en cas de chronicité [229]. De multiples analyses TCGA (The Cancer Genome Atlas) ont montré que parmi 31 cancers, le CRCC possédait la plus grande proportion de tumeurs ayant des LyT pro-inflammatoires et anti-tumoraux, en particulier les LyT CD8+ [235]. En effet, les LyT de manière générale peuvent représenter jusqu'à 51% des cellules du CRCC primaire [232]. Néanmoins, pour les mCRCC avancés, Braun et al. ont noté un enrichissement des LyT CD8 épuisés et une diminution de la diversité de leur répertoire de récepteur [236]. Ceci est corrélé avec le fait que la quantité d'infiltrat lymphocytaire ne peut pas prédire la réponse aux traitements IT tel que le blocage de PD-1 [228]. Cette dysfonction immunitaire est d'ailleurs associée à un mauvais pronostique et ouvre la voie à des thérapies afin de réactiver le système immunitaire et d'éviter l'échappement tumoral.

Les Macrophages

Les macrophages sont les éboueurs des tissus. Leur rôle principal est la phagocytose des cellules, mais ils sont aussi impliqués dans la libération de cytokines et font le lien entre la réponse immunitaire innée et adaptative grâce à leur fonction de présentation d'antigènes. Les macrophages associés à la tumeur (TAM) se différencient à partir des monocytes circulants et des macrophages tissulaires résidents. Ils sont transformés et utilisés par la tumeur pour favoriser la croissance tumorale à travers des processus immunitaires et non-immunitaires [237]. Par exemple, il a été montré que les TAM sécrètent des taux élevés de VEGF favorisant la vascularisation tumorale [238]. Au contraire, ils peuvent favoriser la réponse immune anti-tumorale en se différenciant en TAM de type M1 et en sécrétant des cytokines comme l'IL-12 permettant l'activation des cellules Natural Killer et des LyT Th1 [237]. Néanmoins leur action

majeure est de supprimer la réponse immune et de favoriser la croissance tumorale via leur différenciation en TAM de type M2. Les TAM M2 sont d'ailleurs un des types cellulaires immunitaires les plus abondant dans le CRCC après les LyT CD8 [239]. Afin de promouvoir la tumorigénèse, les TAM M2 sécrètent de l'IL-10 ou du TGF β afin de recruter des LyT régulateurs. Plus précisément, l'IL-10 permet d'inhiber les cellules myéloïdes, ce qui induit une stimulation indirecte des LyT Th2 qui à leur tour renforcent l'activité pro-tumorale des TAM M2 [240]. Ruffell et al. ont en outre démontré que l'IL-10 limitait l'efficacité CD8-induite du Paclitaxel sur un modèle de carcinome mammaire [241]. De plus, les TAMs M2 sont enrichis dans les CRCC avancés et métastatiques, ce qui est concomitant à la présence de LyT CD8 épuisés. Cela appuie la thèse selon laquelle un mCRCC aurait suivi un circuit immunitaire dysfonctionnel [236]. Pour conclure les TAM ont la plupart du temps une action pro-tumorale et leur inhibition ou reprogrammation est une piste thérapeutique afin d'améliorer l'efficacité des traitements. Une étude sur le cancer du pancréas a d'ailleurs mis en évidence que l'irradiation, par faibles doses de rayons γ , pouvait créer une inflammation locale, restaurant la fonction anti-tumorale des TAM [242].

Les Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules sentinelles de l'immunité innée. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles qui initient la réponse immunitaire en présentant les antigènes aux LyT. Les DCs plasmocytaires, c'est-à-dire dérivés de la lignée lymphoïde, ont été parfois retrouvés en surabondance dans le CRCC [243]. L'expression de CD209 à leur surface est un marqueur de mauvais pronostique, puisque ces cellules favorisent la progression des CRCC en diminuant le recrutement des LyT Th1 au site tumoral [244]. Enfin, il a été montré que la quantité de DCs CD83+ infiltrés dans la tumeur pouvait prédire la réponse au traitement pour les mCRCC dans le cadre d'immunothérapies [245]. En conclusion, cela montre l'importance de la présentation antigénique dans la qualité de la réponse immunitaire impactant la progression des CRCC.

Les MDSC

Les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSC) sont dérivées des monocytes (macrophages immatures) ou des granulocytes circulants, c'est-à-dire des leucocytes sanguins [229]. Leur fréquence d'infiltration est de 31% dans le CRCC [232]. Comme l'indique leur nom, les MDSC répriment l'immunité anti-tumorale à travers divers mécanismes tels que la production de cytokines (TGF- β , IL-10) ou la production de ROS [246]. Qui plus est, la présence des MDSC tumoraux et circulants est associé à une augmentation du grade dans le CRCC et est donc un facteur de mauvais pronostique [247]. Néanmoins, il a été démontré que les TKI-VEGF comme le Sunitinib pouvaient aussi inhiber l'activité immunsuppressive des MDSC, favorisant la réponse au traitement [248]. Ceci est clairement mitigé par la sécrétion intra-tumorale de cytokines favorisant l'action des MDSC [249].

Les Natural Killers

Les Natural Killers (NK) sont des cellules cytotoxiques du SI inné dérivées de la lignée lymphoïde. Leur fréquence d'infiltration est de 9% dans le CRCC et est majoritairement présent dans le carcinome papillaire [232]. Ce sont des cellules à pure action cytotoxique que la tumeur ne sait pas détourner en sa faveur. Néanmoins, les cellules tumorales peuvent altérer leur fonction à travers divers mécanismes comme en réprimant la voie des MAP Kinases ou via la sécrétion de TGF- β , les rendant moins efficaces [250], [251]. En conclusion, la présence de cellules NK activées dans la tumeur est un facteur de bon pronostic mais leur inhibition par les cellules cancéreuses est une piste thérapeutique à exploiter.

En conclusion, le SI revêt une importance majeure dans le développement tumoral, le processus métastatique et la résistance au traitement. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses mettent en place des mécanismes pour tirer avantage du SI et l'évolution vers un stade métastatique requiert l'inhibition et le détournement du SI en faveur du cancer. Cela met en exergue l'intérêt clinique de l'immunothérapie, inhibant les mécanismes de détournement afin de rendre de nouveau compétentes les cellules immunitaires. Mais comme nous le disions précédemment, l'immunothérapie est généralement un potentialisateur de cellules compétentes. A un stade avancé avec un SI presque éteint, l'IT n'est plus aussi efficace. Cependant, de nouvelles technologies comme le traitement par cellules CAR-T, qui vise à récupérer les LyT d'un patient, de les modifier pour qu'ils ciblent les cellules tumorales et de les réinjecter au patient, a montré des résultats remarquables dans le cadre de leucémies avancées. En effet, des essais cliniques ont montré une rémission complète pour 92% des patients [252], ce qui est exceptionnel dans le cadre du cancer. Malgré cela, des efforts restent à faire pour le traitement de tumeurs solides, car les cellules CAR-T rencontrent plus de barrières physiologiques et les chercheurs s'essaient actuellement à améliorer leur pénétrance dans les tissus.

Pour conclure cette partie de manière générale, les cellules du microenvironnement tumoral jouent un rôle essentiel dans la progression tumorale. Ceci augmente la complexité à trouver des traitements efficaces, mais ouvre aussi la voie à des traitements alternatifs ciblant d'autres cellules que les cellules cancéreuses elles-mêmes. Le microenvironnement tumoral ne se limite pas aux cellules présentes car la matrice extracellulaire revêt aussi une importance majeure dans la progression tumorale. Nous allons détailler sa composition et son rôle ci-dessous.

1.3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau de molécules en 3 dimensions (3D) très spécialisé et organisé. La MEC est le support des cellules et forme les tissus en collaboration avec elles. Mais la MEC n'est pas juste un support, elle dicte aussi le rôle des cellules et fournit les molécules nécessaires à la survie cellulaire, la prolifération, la migration ou plus simplement le maintien de l'homéostasie tissulaire et cellulaire. Elle est découpée en deux régions : La membrane basale (MB) et la matrice interstitielle (MI) (Figure 33) [253], [254].

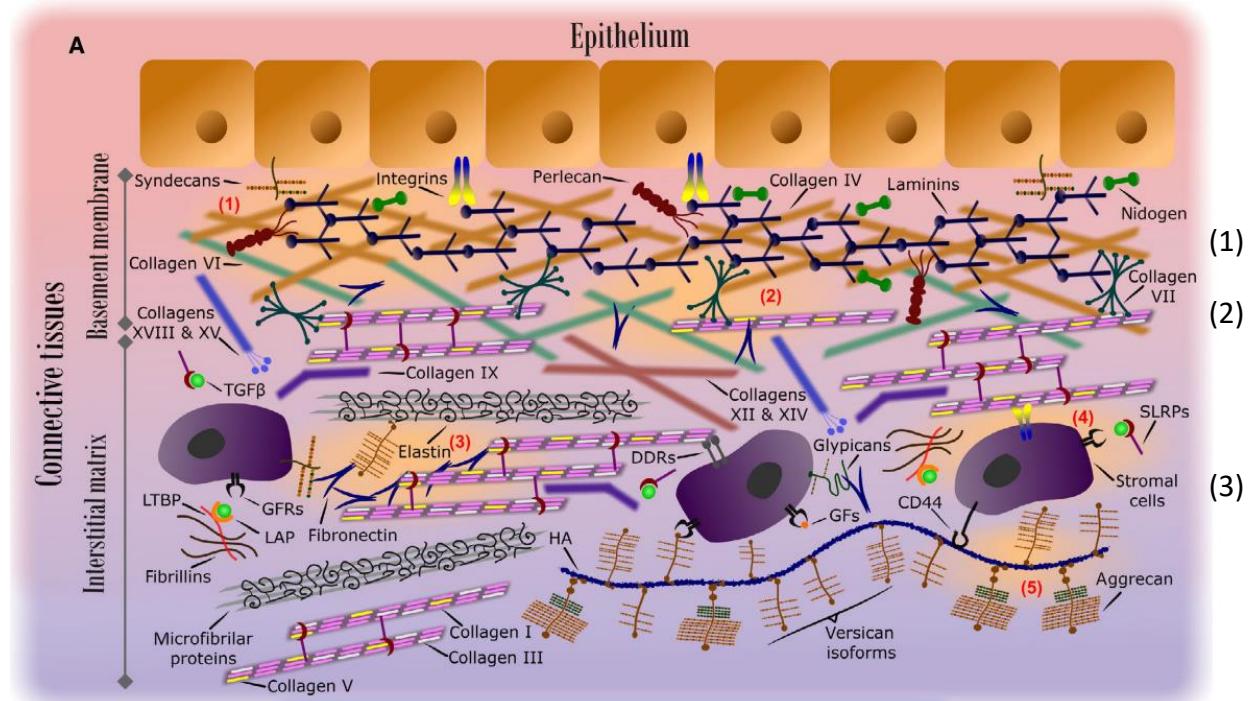


Figure 33 : La matrice extracellulaire d'un épithélium sain. La MEC est découpée en deux régions : la membrane basale (MB) et la matrice interstitielle (MI) qui s'ancrent l'une à l'autre. (1) La MB est définie comme un assemblage de deux réseaux : l'échafaudage de laminines auto-associées et le réseau de collagène IV. Le perlecan et les nidogènes relient ces réseaux. Les cellules épithéliales sont reliées à la membrane basale par des hémidesmosomes, où les laminines sont liées aux intégrines. (2) La membrane basale s'ancre à la matrice interstitielle par l'intermédiaire d'une variété de fibrilles de collagène, dont les collagènes VI et VII. Le premier interagit avec le collagène IV et le perlecan, tandis que le second interagit avec le collagène IV, les laminines et les fibrilles de collagène I. (3) La MI est composée principalement des collagènes I, III et V. Les petits protéoglycans riches en leucine (SLRPs) et la fibronectine participent à l'assemblage du collagène et à la fibrillogénèse. De nombreux autres composants contribuent à l'organisation de la MI, notamment l'élastine, les protéoglycans et l'HA. Les cellules stromales interagissent aussi avec la MI qui est leur lieu de résidence principale.

La MB est la plus spécialisée, sa composition est très stable entre les tissus puisqu'elle est en contact direct avec les cellules épithéliales : c'est leur point d'ancrage. La MI est plus variable et certains tissus comme l'os et le cartilage ont des structures très particulières et différentes de ce qui est présenté ci-dessus [253], [254]. Comme on peut le voir dans la Figure 33, la MEC est principalement composée de collagène, de fibres élastiques, de glycoprotéines (GPs),

comprenant la fibronectine et les laminines, et de protéoglycanes (PGs), comme les syndécanes et les perlécanes. Les cellules s'ancrent et communiquent avec la MEC via des récepteurs tel que les intégrines (Cf. [Les protéines de liaison à la MEC : les intégrines](#)), les PGs transmembranaires, le récepteur de l'acide hyaluronique CD44, ou encore les récepteurs à domaine discoïdine (DDRs) [254][255]. Elles peuvent aussi communiquer avec des récepteurs non conventionnels tel que les récepteurs Toll-Like (TLR) impliqués dans la réponse immunitaire [256]. La MEC est en fait capable d'interagir avec l'épithélium, l'endothélium, les cellules immunitaires et bien sûr les fibroblastes dont le lieu de résidence principal est la matrice interstitielle. La MEC est aussi en perpétuel remodelage, grâce à la présence d'enzymes protéolytiques capables de dégradation dont les plus connues sont les métalloprotéases (MMPs) [257].

En bref, tous ces acteurs communiquent entre eux afin de veiller au bon fonctionnement des cellules et des tissus de manière générale. Dans cette partie, nous allons détailler certains des composants principaux de la MEC ainsi que leurs rôles dans la progression tumorale et le processus métastatique.

1.3.1. *Composition & Rôle*

Les Collagènes

Les collagènes sont les composants principaux de la MEC. Ils représentent plus de 30% des molécules présentes dans la MEC et plus particulièrement les collagènes de type I, II et III qui structurent la matrice interstitielle. Les collagènes possèdent tous une structure en triple-hélice constitué d'homo- ou hétéro-trimères de chaines α . L'assemblage des fibres de collagènes en fibrilles se fait dans la MEC grâce à l'action des lysyl oxydases permettant de lier les fibres de collagènes entre elles. Ces fibrilles forment un réseau orienté dépendant du tissu, donnant la structure, l'élasticité et la stabilité à la MEC (Figure 34 [258]) [259].

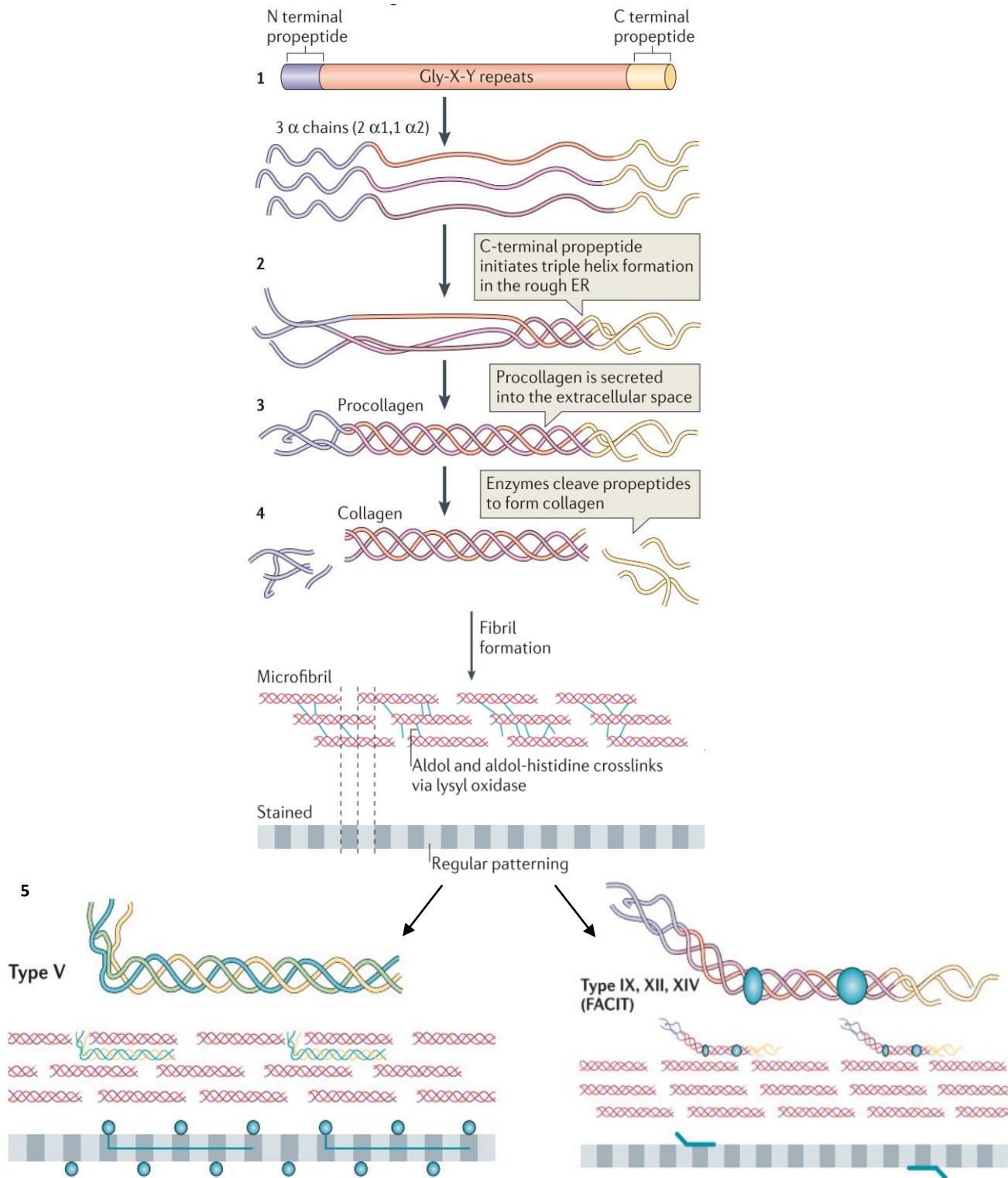


Figure 34 : Assemblage des fibres de collagènes fibrillaires et exemple d'incorporations d'autres types de collagènes qui stabilisent la structure. Trois chaînes α (1) sont assemblées au niveau intracellulaire pour former une triple hélice (2). Ce processus est initié au niveau de la partie C-terminale des fibres de pro-collagènes. Le pro-collagène est ensuite sécrété par les cellules dans l'espace extracellulaire (3) et converti en collagène par l'élimination des parties N- et C-terminales par des métalloprotéinases. Les fibres de collagène s'assemblent en un réseau de microfibrilles grâce à l'action des lysyl oxydases qui réticulent les fibres de collagène entre elles (4). D'autres types de collagène tel que le collagène V et des collagènes associés aux fibrilles avec triple hélice interrompue (FACIT), peuvent ensuite être ajoutées aux fibrilles, modifiant et stabilisant leur structure (5).

La famille des collagènes comprend 29 membres répertoriés en 8 classes selon leur structure et fonction. Il existe des collagènes fibrillaires, non-fibrillaires et transmembranaires jouant des rôles distincts. Les classes, certains types de collagènes et leur description sont présentés dans le Tableau 7 ci-dessous modifié depuis [254] et [256].

Tableau 7 : Description et localisation de la famille des collagènes.

Classe	Type	Gènes	Localisation	Description
Fibrillaire	I	COL1A1-2	Peau, tendons, capsules des organes internes, cerveaux, os, tumeurs	
	II	COL2A1	Cartilage, tendons, inter vertèbres	
	III	COL3A1	Derme, aorte, utérus, intestins, foie, rate, organes internes de manière générale	
	V	COL5A1-3	Placenta, os, cornée, derme, surfaces cellulaires	
	XI	COL11A1-3	Cartilage, disques inter vertébraux	
	XXIV	COL24A1	Régule la fibrillogénèse du collagène I, différenciation des ostéoblastes	
FACIT	XXVII	COL27A1	Cartilage hypertrophié	
	IX	COL9A1-3	Cartilage, tendons, co-distribué avec le collagène II	
	XII	COL12A1	Derme, tendons, cartilage	
	XIV	COL14A1	Derme, tendons, cartilage	
	XVI	COL16A1	Cœur, rein, muscles	« Ponts moléculaires » associés avec les fibrilles en particulier le collagène I et II
	XIX	COL19A1	Expression embryonnaire, interneurones, synapses de l'hippocampe, MB, muscle, rhabdomyosarcome	
Lame Basale	XX	COL20A1	Cornée, peau embryon, sternum, tendon	
	XXI	COL21A1	Vaisseaux sanguins, sécrété par les cellules musculaires lisses	
	XXII	COL22A1	Jonctions tissulaires	
Chaine longue	IV	COL4A1-6	Membranes basales	Structure de la MB comprenant aussi les laminines
	VII	COL7A1-13	Peau, membrane amniotique, cornée, épithélium muqueuses	Fibrilles d'ancre associées à la MB, dimères antiparallèles
Filamenteux	VI	COL6A1-3,5-6	Utérus, derme, cartilage	Microfibrilles perlées qui s'agrègent en tétramères
	VIII	COL8A1	Cellules endothéliales	
Courte chaîne	X	COL10A1	Calcification du cartilage	Structure en treillis hexagonaux, régule et est régulée par l'hypertrophie du cartilage
	XV	COL15A1	Placenta, reins, cœur, ovaires, testicules	
Multi-plexins	XVIII	COL18A1	Rein, foie	Domaines triple hélices multiples contenant des interruptions avec des Glycosaminoglycanes
	XIII	COL13A1	Epidermes, cellules endothéliales	
	XVII	COL17A1	Hémidesmosomes de la peau, épithélium	
MACIT	XXIII	COL23A1	Tumeurs	Molécules couvrant la surface cellulaire avec une partie intercalée dans la membrane

FACIT : Fibril-associated collagens with interrupted triple helices ; MACIT : Membrane associated collagens with interrupted triple helix

Comme on peut le voir, certains collagènes sont retrouvés dans tous les tissus tels que le collagène I et III alors que d'autres sont très spécifiques. Par exemple les collagènes IV et VII sont spécifiques des lames basales et coopèrent pour former une structure très ordonnée nécessaire à l'ancrage cellulaire (Figure 35 [258]). Plusieurs études ont d'ailleurs montré que des cellules cultivées sur du collagène IV avaient une morphologie plus étalée, une meilleure adhésion et une survie cellulaire augmentée [261], [262]. Le collagène IV est d'ailleurs essentiel à la structure et la fonction des glomérules rénaux [263], [264]. Les collagènes IV et VII ont aussi leur importance dans l'évolution du CRCC en mCRCC (Cf. [Modifications dans le cancer](#)) [265]. Un autre exemple d'hyper spécialité concerne le collagène XXII qui est spécifique des jonctions myo-tendineuses [260].

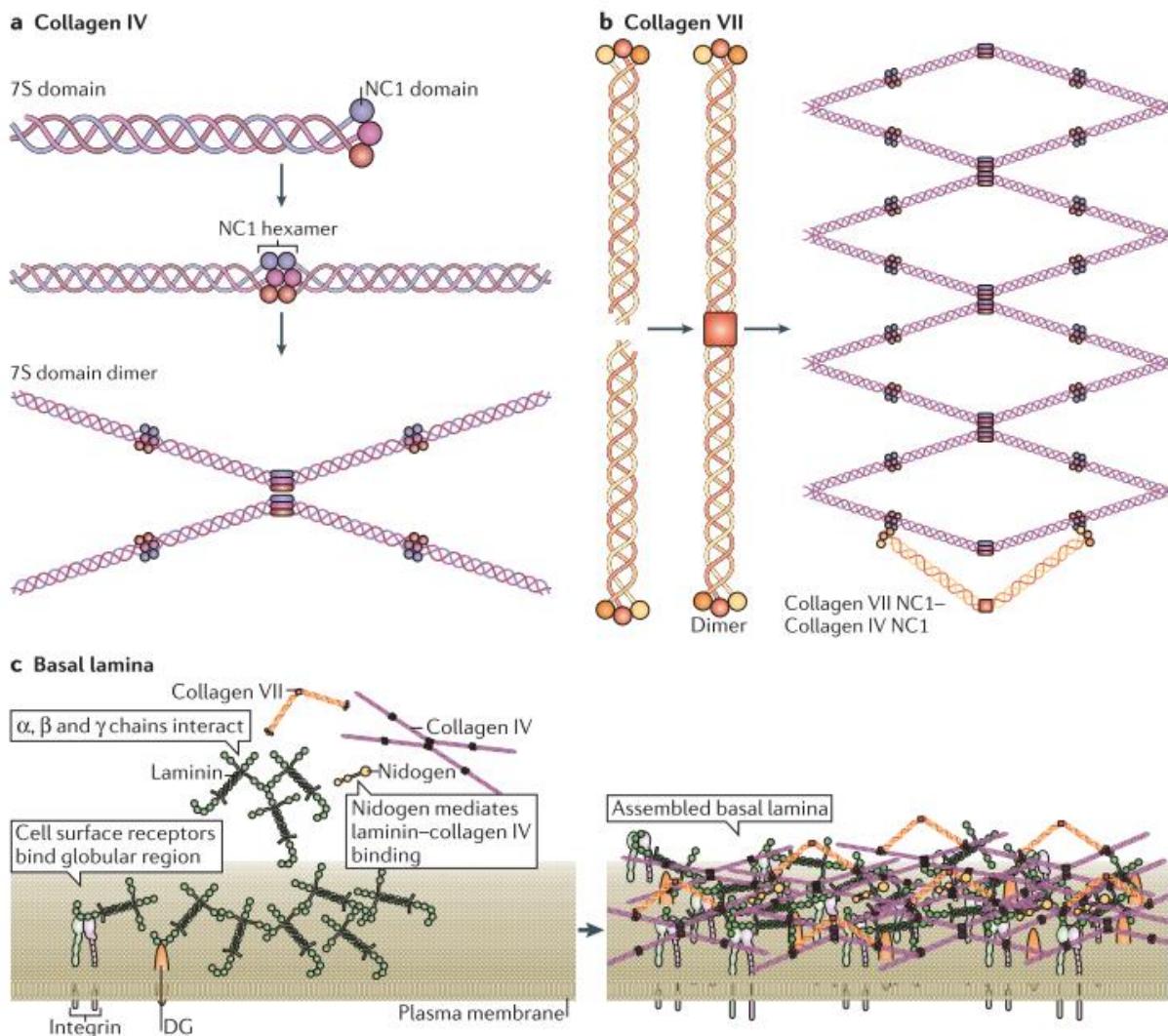


Figure 35 : Assemblage de la lame basale. (a) Assemblage des fibres de collagène IV en dimères via leur domaine globulaire NC1, formant des structures réticulaires ordonnées. (b) Le collagène VII forme de longs dimères qui se plient et se connectent ensuite aux régions globulaires des réseaux de collagène IV. (c) Assemblage des collagènes IV, VII, des laminines et du nidogène pour former la lame basale, permettant la liaison des cellules à la matrice extracellulaire via les intégrines.

Pour conclure, les fibres de collagène sont essentielles à la structure, au soutien tissulaire et permettent aussi l'ancrage des cellules et autres constituants de la matrice. Les cellules peuvent se lier au collagène notamment via les DDRs et certaines intégrines, tous exprimés à la surface cellulaire. Néanmoins, les partenaires principaux des intégrines sont la fibronectine et les laminines dont nous allons parler ensuite [266]. Le collagène est en fait considéré comme le ciment qui permet aux tissus de conserver leur intégrité. Nous verrons dans la partie suivante que le collagène joue un rôle fondamental dans la progression tumorale et le processus métastatique.

La Fibronectine

La fibronectine est le second composant majeur de la MEC. C'est une grosse glycoprotéine composée de sous-unités répétées de modules structurels de type I, II et III comme on peut le voir dans la Figure 36 [258]. La fibronectine s'assemble ensuite sous forme de dimère et peut se replier ce qui lui permet d'interagir avec les intégrines ou avec d'autres molécules de fibronectine. Elles possède aussi des domaines liants le collagène et les protéoglycans [258].

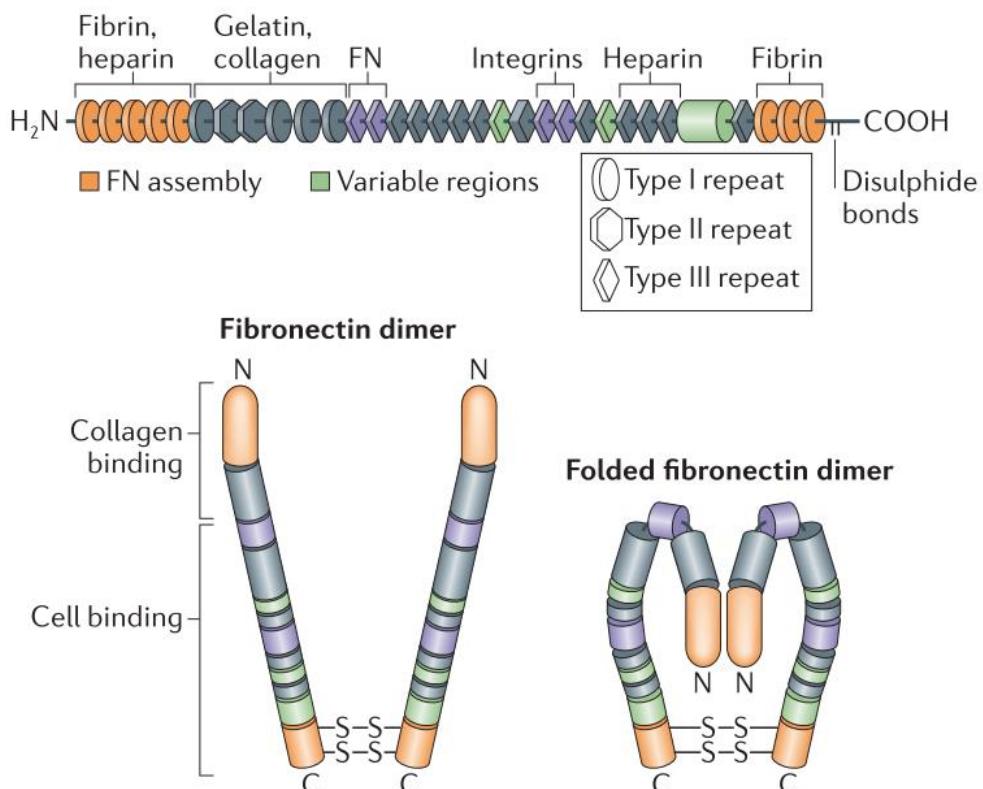


Figure 36 : Structure de la fibronectine. La fibronectine est composée de modules structurels répétés (Type I, II et III), contenant des domaines permettant sont assemblage (FN assembly), de liaison au collagène et aux intégrines (cellules). Les dimères de fibronectine se forment grâce à la formation de pont disulfures aux extrémités C-terminales. Le dimère se replie via des interactions ioniques entre les domaines de type III afin de révéler des sites de liaison à d'autres molécules de fibronectine et des récepteurs de surface cellulaire. FN : Fibronectine.

Le rôle principal de la fibronectine est l'ancrage cellulaire via son interaction avec les intégrines. Elle régule l'adhésion, la migration, la différenciation cellulaire, la maturation tissulaire et est impliquée dans les interactions cellules-MEC et MEC-MEC [267]. Pour effectuer toutes ces tâches, la fibronectine, grâce à sa communication avec les cellules, s'assemble en fibrilles viscoélastiques dans la MEC. Ces fibrilles ont des propriétés mécaniques uniques et sont impliquées dans la mécano-transduction ressentie et relayée par les cellules. De plus, les fibrilles sont aussi le réservoir d'une quarantaine de facteurs de croissance et cytokines impliqués dans la signalisation cellulaire. En effet, la fibronectine possède des sites de liaison au TGF- β , au FGF, au PDGF ou encore au VEGF, responsables de la croissance cellulaire. Les PGs tel que les syndécanes peuvent aussi se lier à la fibronectine ce qui a pour effet de promouvoir son interaction avec les cellules. Au contraire, l'association de la fibronectine avec les perlécanes aurait l'effet inverse, c'est-à-dire antiadhésif vis-à-vis des cellules [268]. En conclusion, la fibronectine est impliquée dans les interactions mécaniques et chimiques des cellules avec la MEC. Elle est le réservoir de molécules solubles essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire et est indispensable à la mécano-biologie tissulaire.

Les Laminines

Les laminines sont des glycoprotéines d'adhésion hétéro-trimériques retrouvées dans la membrane basale. Elles sont composées de trois trimères α , β et γ qui s'auto-polymérisent pour former un réseau associé aux cellules épithéliales via les intégrines (Figure 37 [258]). La création de ce réseau est cruciale pour la formation et la fonction de la MB. Ce sont des protéines hautement spécialisées qui sont les points d'ancrages principaux des cellules et qui favorisent l'adhésion cellulaire, la différenciation, la migration et la résistance à l'apoptose [259], [269]. Elles interagissent via leur domaine globulaire C-terminal avec les cellules via les intégrines, en particulier les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, et $\alpha 7\beta 1$ (Cf. [Les protéines de liaison à la MEC : les intégrines](#)) [270]. A ce jour, il a été identifié 16 isoformes, chacune composée d'une association des chaînes α , β et γ , qui sont spécifiques de certains tissus et localisation [271]. Par exemple la Laminine- $\beta 2$ (LAMB2) est essentielle au bon développement rénal. En effet, il a été démontré qu'un KO LAMB2 chez la souris induisait une dysfonction rénale post-natal fatale [259]. La délétion des Laminines- $\alpha 4$ et $\alpha 5$ (LAMA4 et LAMA5) induit aussi des fibroses et des polykystoses rénales [272]. Pour conclure, les laminines sont d'une importance majeure dans le développement et la structure tissulaire car

elles sont un des points d'ancrage principaux des cellules, en lien avec les autres protéines de la matrice, en particulier le collagène. Elles ont un rôle fondamental dans la migration cellulaire et par conséquent dans l'invasion tumorale et les métastases. Certaines laminines ont d'ailleurs été identifiées comme facteur de mauvais pronostique dans le cancer du côlon [273].

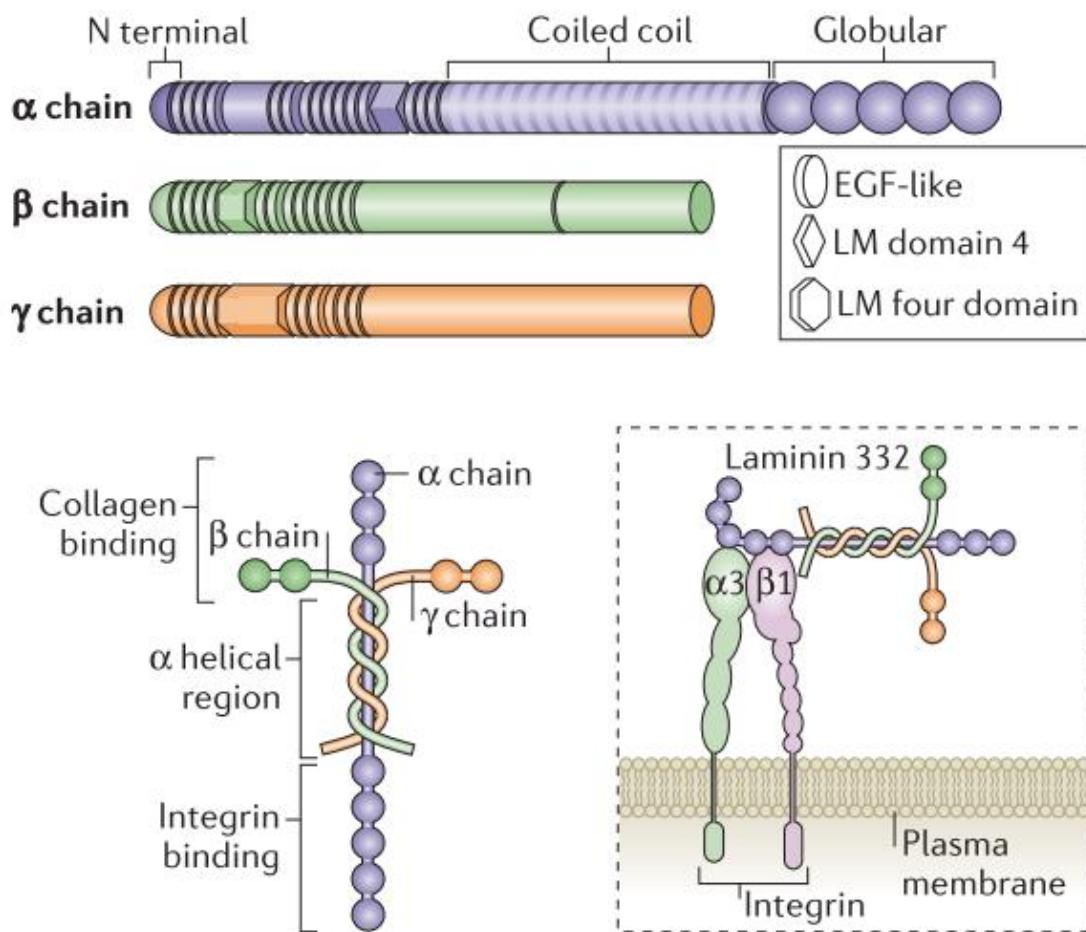


Figure 37 : Structure des laminines et leur interaction avec les intégrines. Les laminines sont formées par l'incorporation de chaînes α , β et γ dans une structure cruciforme, en forme de Y ou de bâtonnet. Ces chaînes sont caractérisées par différents domaines, comme indiqué (EGF, LM domain). Les laminines interagissent avec les intégrines via la chaîne globulaire α et avec le collagène via les parties globulaires α , β et γ .

Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont essentielles à l'extensibilité et l'élasticité de la MEC. Cette élasticité est indispensable pour le fonctionnement des organes, en particulier les artères, la peau, les tendons ou encore les poumons qui subissent de nombreuses déformations par leur fonction biologique. Les fibres élastiques sont composées d'un cœur d'élastine, qui compte pour 90% de la fibre, encerclé par un manteau de microfibrilles de fibrilline [274]. L'élastine

est une protéine fibreuse comme le collagène. Les fibres d'élastines s'assemblent, comme le collagène, grâce à l'action des lysyl oxydases à partir de leur précurseur sécrété par les cellules : la tropoélastine [258] (Figure 38 [259]). De plus, la tropoélastine interagit avec les protéoglycans afin de s'orienter correctement selon les besoins du tissu [275]. Les microfibrilles participent aussi à la signalisation cellulaire via leur interaction avec les intégrines et le stockage de cytokines telles que le TGF- β [259]. Les fibres élastiques sont très stables puisqu'elles sont hydrophobes et insolubles [276]. Leur longue durée de vie peut devenir un défaut puisqu'elles sont peu renouvelées et donc responsables du vieillissement tissulaire. Leur vieillissement est d'ailleurs concomitant au vieillissement de notre organisme de manière général ce qui est corrélé avec la perte d'élasticité de la peau et des artères par exemple. De plus, en se dégradant, l'élastine relargue des peptides bioactifs qui peuvent

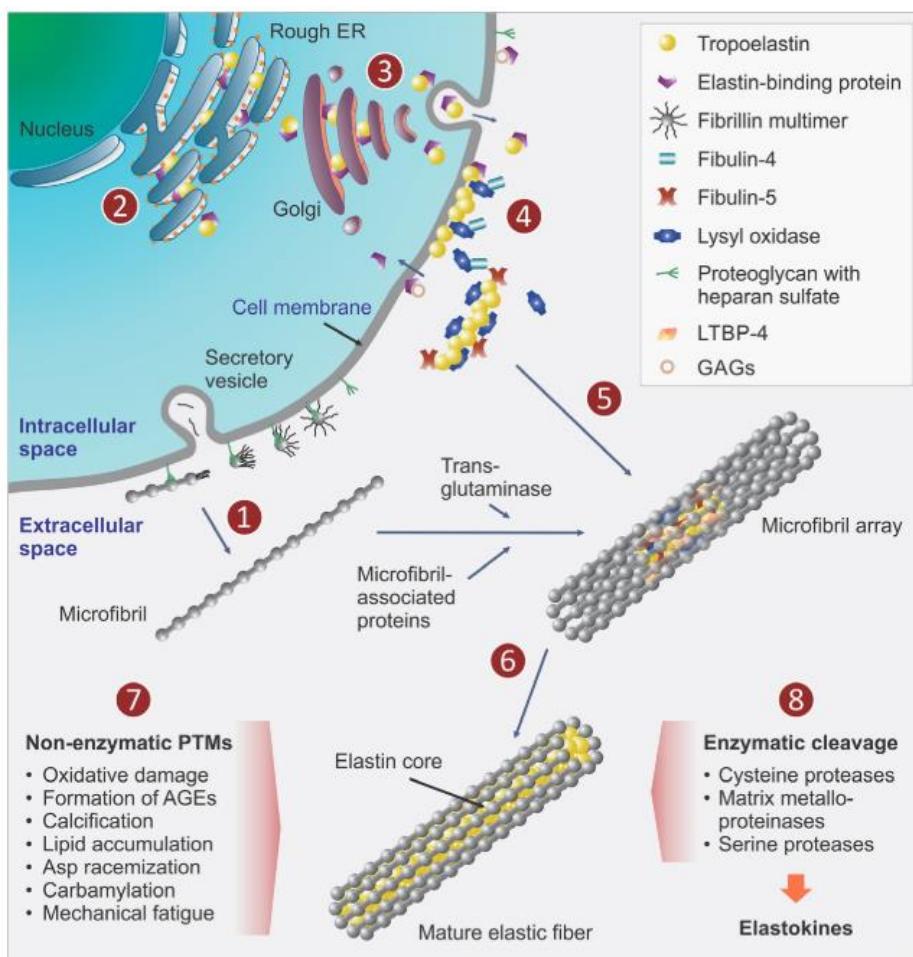


Figure 38 : Assemblage des fibres élastiques constitué d'élastine et de micro-fibrilles de fibrilline. Les microfibrilles de fibrines sont sécrétés dans l'espace extracellulaire (1). En parallèle, la tropoélastine est synthétisée (2) et sécrétée (3) à la membrane cellulaire où elle va former des globules de surface (4). Une fois que la chaîne a atteint une taille critique, elle est transportée vers les microfibrilles de fibrine (5) permettant leur assemblage et leur réticulation en une fibre élastique mature (6). Tout au long de sa vie, l'élastine va subir diverses altérations non-enzymatiques (7) et enzymatiques (8), responsables du vieillissement.

induire des modifications des épithéliums tel que la migration, la prolifération, l'angiogenèse et l'apoptose des cellules environnantes, modifications associées à diverses pathologies telles que le cancer [277]. En conclusion, l'élastine en collaboration avec les protéoglycans et le collagène sont les acteurs principaux de la structuration de la MEC et par extension des tissus.

Les Protéoglycans

Les protéoglycans (PGs) sont des glycoprotéines, c'est-à-dire la combinaison d'une protéine de base sur laquelle sont liées des glycosaminoglycans (GAGs) de façon covalente (Figure 39 [258]). Les protéines de support des GAGs sont variées, présentant des domaines répétés riches en leucine, des répétitions sérine-glycine ou encore des domaines laminine-like et fibronectine-like. Les GAGs peuvent être l'héparine sulfate, la chondroïtine sulfate ou encore l'acide hyaluronique [278]. Leur production et leur association en PGs s'effectuent dans les cellules puis ces PGs sont excrétés dans la MEC par exocytose ou sont attachés à la membrane plasmique. Leurs compositions, longueurs et rôles sont très variables mais ils ont une fonction commune dans la MEC : Ce sont des pièges à eau très important pour l'hydratation tissulaire et ils apportent de ce fait une résistance compressive aux tissus. De manière plus spécifique, il a été montré que les protéoglycans héparine sulfate (HSPGs), tel que les syndécanes et CD44 qui sont reliés à la membrane, avaient une forte affinité pour le FGF, favorisant son

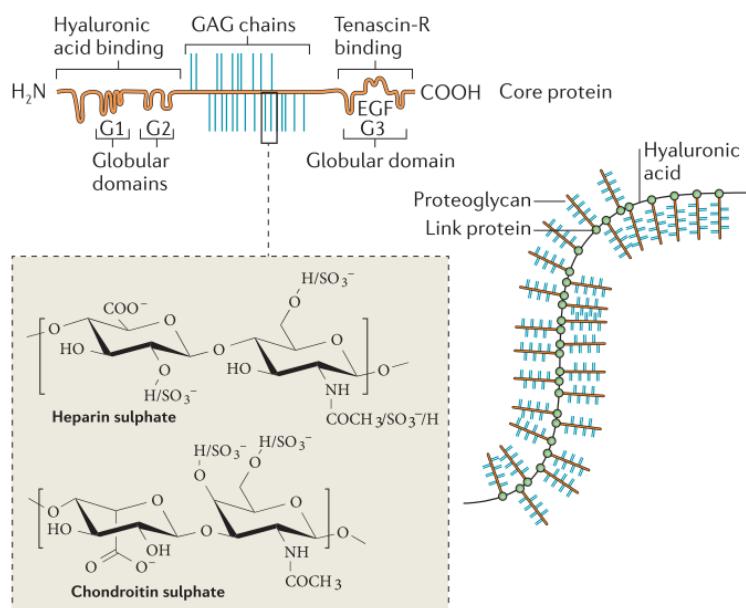


Figure 39 : Structure des protéoglycans. Les protéoglycans tel que l'aggrécane possèdent une protéine centrale avec des domaines de liaison pour les chaînes glycosaminoglycans (GAGs), flanquée de domaines globulaires d'interaction à l'acide hyaluronique et à la tenascine R. Les GAGs fréquents sont représentés ici et sont l'héparane et la chondroïtine sulfate. La structure assemblé de l'aggrécane, la protéine de liaison et l'acide hyaluronique est représenté à droite.

action et par extension la prolifération et la migration cellulaire. De plus, les PGs à domaines répétés riches en leucine (SLRPs) sont importants pour l'assemblage des fibres de collagène et participent donc à la structuration tissulaire [258]. Somme toute, les PGs sont des modulateurs de la structure de la MEC, de la signalisation cellulaire et de l'homéostasie cellulaire. Il a aussi été fait état de leur implication dans les conditions pathologiques telles que l'inflammation, la fibrose et le cancer en particulier via leur interaction avec les MMP et les cytokines [259].

Les enzymes de remodelage

La matrice extracellulaire est une structure dynamique en perpétuel remodelage, de manière quantitative et qualitative, afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. Le clivage des composants de la MEC est le processus principal pour opérer un remodelage et est important pour réguler l'abondance et l'organisation des molécules qui la composent. De plus, ces clivages permettent de libérer des cytokines, comme des facteurs de croissance, nécessaires aux cellules environnantes. Par exemple, les PGs peuvent être remodelés par des héparanases et des sulfatases permettant de modifier leur structure [279]. Ces modifications induisent le relargage de fragments saccharides, de facteurs de croissance et de cytokines pouvant d'ailleurs moduler l'activité pro-tumorale [280]. Les protéines de la MEC peuvent être clivées par différentes familles de protéases, qui sont les MMPs, les Adalysines (ADAMs et ADAMTs) et les Méprines [279]. Les protéases de ces familles, leurs structures ainsi que leur substrats sont présentés dans la Figure 40 tiré de [279].

Les MMPs sont les enzymes majoritaires impliquées dans la dégradation de la MEC. Les MMPs sont sécrétées par les cellules sous forme de zymogène, puis activées dans la MEC, c'est-à-dire sur leur site d'action [279]. Les MMPs peuvent aussi s'activer entre elles par clivage. En effet, certaines MMPs sont membranaires et clivent les pro-MMP sécrétées afin de les activer. C'est le cas de la MMP14, aussi connue sous le nom de MT1-MMP pour Membrane Type MMP, puisqu'elle clive la pro-MMP2, la transformant en sa forme active, MMP2 [281]. De manière générale, les MMPs sont donc impliquées dans le remodelage tissulaire, le développement, la migration et l'invasion cellulaire, l'apoptose et la sénescence [282]. Il en existe 23 et leur activité est généralement faible dans des conditions normales mais augmente en cas de réparation, d'inflammation tissulaire ou de cancer. Comme on peut l'observer dans la Figure

40, les MMPs, de façon collective, sont capables de dégrader toutes les protéines de la MEC. Par exemple, les MMP2 et 9 sont capables de cliver les collagènes IV et VII et sont donc impliquées dans le remodelage de la lame basale. Nous verrons plus tard que ce sont d'ailleurs elles qui sont majoritairement utilisées par les cellules cancéreuses lors du processus métastatique (cf. [La migration mésenchymateuse](#)). Dans le cadre du développement neural, Monea et al. ont aussi démontré que les MMPs membranaires pouvaient cliver des protéines d'adhérence cellulaire. En effet, la MMP24 (MT5-MMP) serait capable de cliver les cadhérines induisant la motilité cellulaire et donc le développement de nouveaux circuits neuronaux [283]. Enfin, en cas de senescence des fibroblastes, il a été montré qu'ils sécrétaient les MMP1 et 2 et que cela favorisait l'EMT des kératinocytes et donc le développement de cancers de la peau [284]. Somme toute, les MMPs sont impliquées dans le remodelage tissulaire normal et la tumorigénèse via leur action sur la MEC mais aussi sur les récepteurs cellulaires, les cytokines et les facteurs de croissance [279], [285].

Les Adalysines sont une famille de protéines comprenant les ADAMs (pour *A Desintegrin And Metalloproteinases*) et les ADAMTs (pour ADAMs ayant un motif thrombospondine). Ce sont des sheddases, c'est-à-dire des enzymes liées à la membrane plasmique qui clivent les parties extracellulaires des protéines transmembranaires mais aussi les composants de la MEC (Figure 40 [279]). Ce clivage permet de libérer dans la MEC les domaines solubles des facteurs de croissance, récepteurs, cytokines et molécules d'adhésion. Par exemple, il a été montré que ADAM-17 était impliquée dans l'activation du TNF- α en clivant son précurseur, le pro-TNF- α . De plus, ADAM-17 serait requise pour produire des ligands alors actifs pour se lier et activer le récepteur de l'EGF. Enfin, il a aussi été montré que les ADAMs interagissaient avec les intégrines. Par exemple, ADAM-9 interagit avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ [286]. Les Adalysines sont donc impliquées dans l'adhésion cellulaire, les interactions cellules-cellules, la migration, la protéolyse et la signalisation cellulaire.

Enfin les Méprines sont des métalloprotéinases qui ont d'ailleurs été décrites pour la première fois dans le rein en 1981. Il en existe 2, la Méprine- α qui est sécrétée dans la MEC et la Méprine- β qui est prédominante à la membrane. Elles clivent des protéines de la MEC, telles que le collagène IV et la fibronectine, ainsi que des peptides bioactifs tels que les hormones parathyroïdes et des cytokines comme l'ostéopontine [287]. De plus, la Méprine est impliquée dans le clivage du pro-collagène I et donc dans la structuration des fibres de collagène.

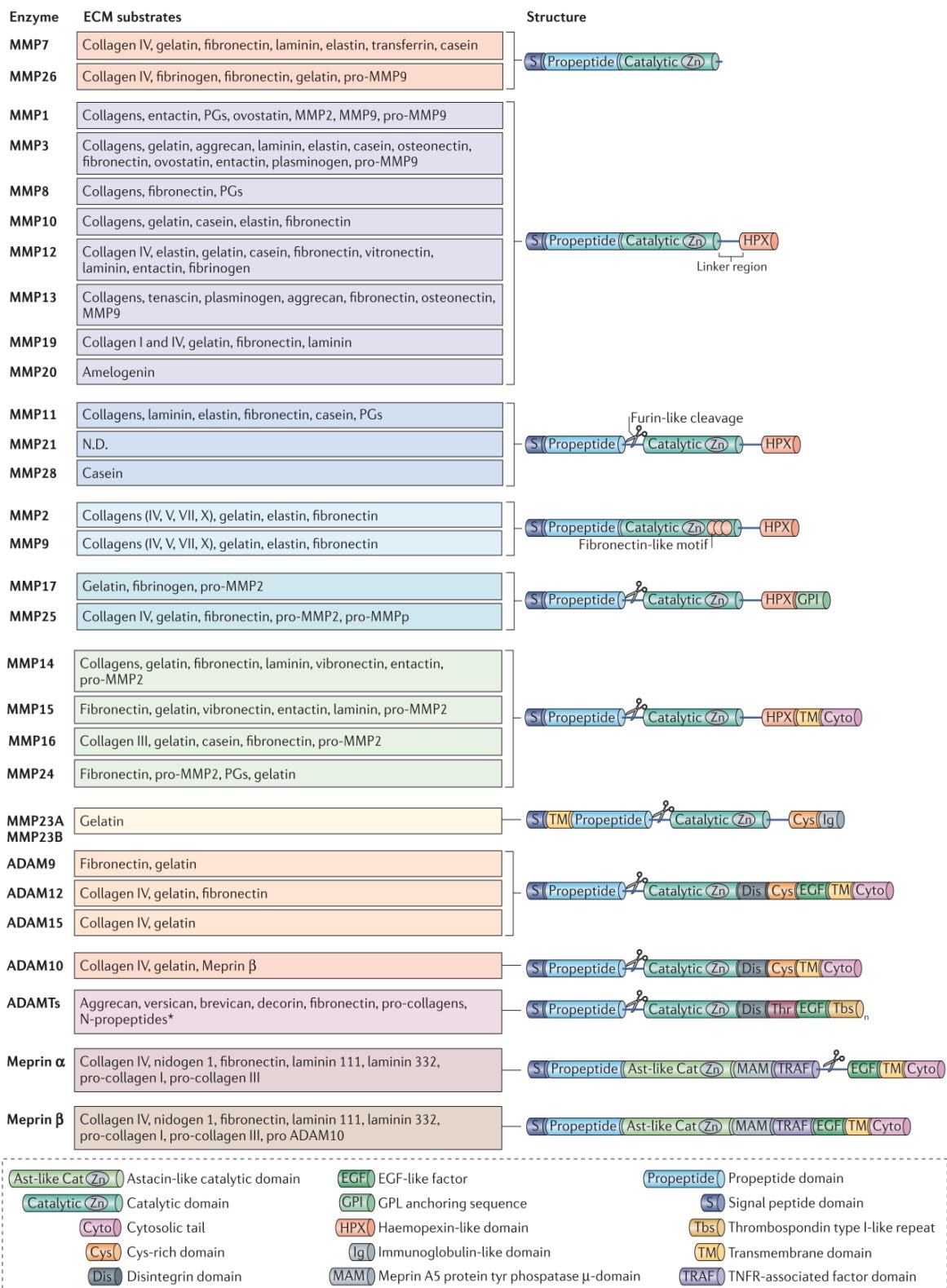


Figure 40 : Cibles et structure des enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases appartiennent à la famille des enzymes métzincines, qui comprend les métalloprotéinases matricielles (MMP), les adamalysines (ADAM (désintégrines et métalloprotéinases) et les ADAMTS (ADAM à motif thrombospondine)) et les méprines. Les MMP sont produites sous forme d'enzymes solubles ou ancrées dans les membranes qui clivent les composants de la matrice extracellulaire (MEC). Les MMP sont composées de plusieurs domaines fonctionnels partagés : domaine peptidique signal, domaine pro-peptidique, domaine catalytique et domaine de type hémopexine ; et de domaines privés tel que le domaine immunoglobuline Like. Toutes ensemble, les MMPs sont capables de cliver tous les composants de la MEC, chaque enzyme ayant sa spécificité comme indiqué.

Finalement les Méprines sont impliquées dans l'activation des ADAMs et des MMPs, faisant d'elles des potentialisateurs de l'activité protéolytique. Elles ont également un rôle dans les maladies inflammatoires chroniques tel que le syndrome de l'intestin irritable et dans les insuffisances rénales aigues [288].

Pour conclure, les MMPs plus particulièrement, sont donc d'une importance majeure dans le remodelage de la matrice et la dégradation de ses composants. Elles sont évidemment d'une importance fondamentale dans l'homéostasie tissulaire normale afin d'éviter un déséquilibre entre production et destruction de la MEC. Nous verrons par la suite leur importance dans l'évolution tumorale en particulier dans les mécanismes d'invasion et d'angiogenèse.

Les protéines de liaison à la MEC : les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs de l'adhésion cellulaire qui reconnaissent les composants de la MEC. Ce sont des hétérodimers transmembranaires composés de sous unité α et β (Figure 41 A tiré de [289]). Il y a actuellement 18 sous unités α et 8 sous-unités β connues chez l'homme qui s'associent en dimère comme représenté dans la Figure 41 C, où chaque trait entre les sous-unités représente un dimère existant. Par exemple, l'intégrine $\beta 4$ ne peut former un dimère qu'avec l'intégrine $\alpha 6$. Chaque hétérodimère possède sa propre spécificité fonctionnelle. Néanmoins, ils sont regroupés par familles reconnaissant les mêmes ligands extracellulaires. Les intégrines peuvent lier le collagène (groupe gris), les laminines (groupe violet), les leucocytes (groupe vert) et les séquences RGD (groupe orange), c'est-à-dire la séquence Arginine-Glycine-Asparagine, présente sur la fibronectine, la vitronectine, l'ostéopontine ou encore la tenascine. Coté intracellulaire, les intégrines lient la taline, la paxilin ou encore la vinculine qui font le lien avec les fibres d'actine [289], [290].

Les intégrines ont pour rôle l'ancrage cellulaire. Pour ce faire, elles transmettent les signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule par leur liaison avec la MEC. En retour, les intégrines reçoivent aussi des signaux intracellulaires qui régulent leur affinité avec la MEC (Figure 41 B) [289], [291]. Par exemple, la liaison de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ à la fibronectine induit une activation de FAK (Focal Adhesion Kinase) ce qui active la voie PI3K/AKT au niveau intracellulaire, permettant l'adhérence et la survie cellulaire. Il a été démontré que si les cellules épithéliales perdent cette liaison, alors elles rentrent en anoïkose, qui est une apoptose spécifiquement programmée due à un défaut d'interaction cellule-MEC [292].

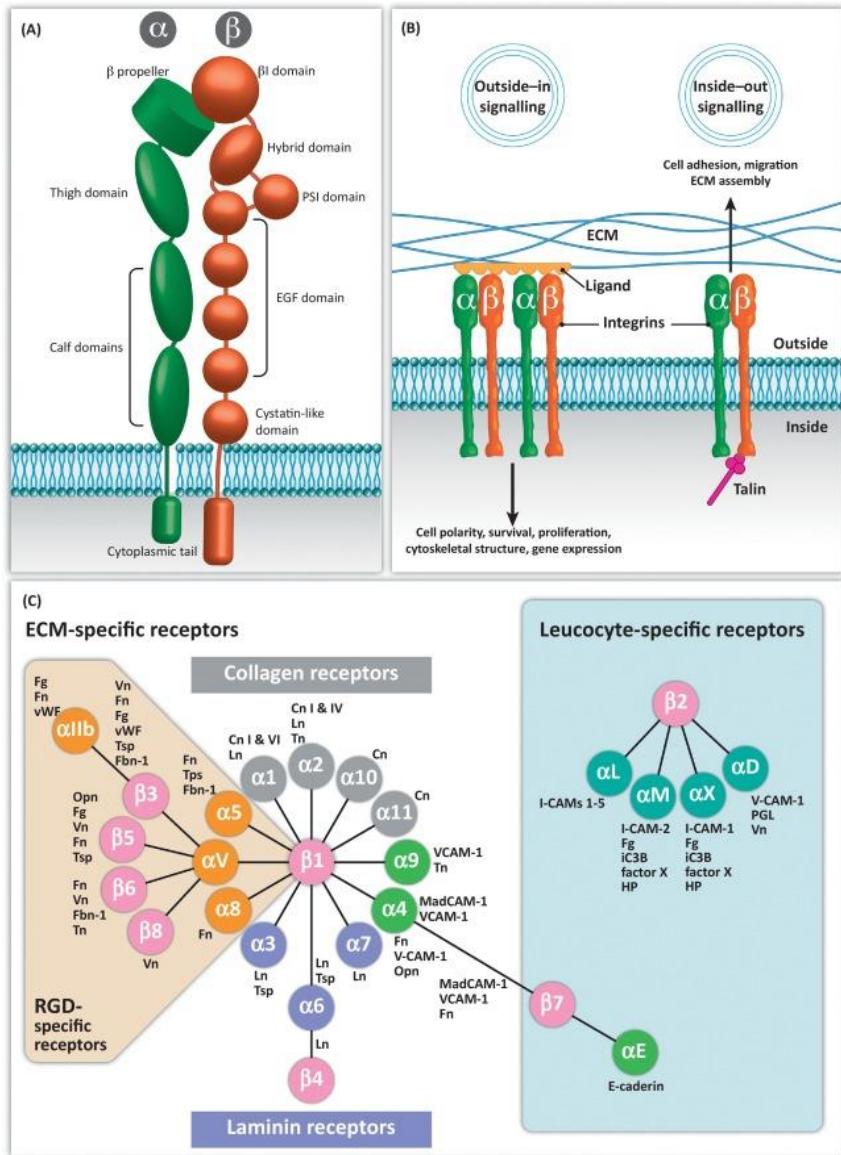


Figure 41 : Structure, signalisation et classification des intégrines et leurs ligands. (A) Structure d'un hétérodimère d'intégrine, comprenant une sous unité α et une sous-unité β , et leurs différents domaines cytoplasmiques, intra-membranaire et extracellulaire comme indiqué. (B) Les intégrines permettent l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire, elles sont reliées à la taline coté cytoplasmique et à différents composants de la matrice extracellulaire (MEC) en dehors de la cellule. (C) Il existe 18 sous unités α et 8 sous-unités β chez l'homme, qui s'associe en dimer, représenté par une barre noire. Chaque dimer possède une spécificité d'association avec un composant de la MEC, comme indiqué.

De plus, il a été montré dans le cadre du développement, que les intégrines peuvent activer la voie ROCK quand elles interagissent avec la fibronectine. Cela induit la contraction du complexe actine-myosine responsable de la migration cellulaire et promeut l'assemblage d'encore plus de fibres de fibronectine dans la MEC. La liaison exclusive des intégrines à la fibronectine induit l'expression du gène BTBD7, qui contribue à réduire l'expression de la E-cadhérine, via l'intermédiaire Snail2, qui est diffusé à la membrane plasmique. Cela induit une modification de la morphologie cellulaire, une réduction de l'adhésion cellule-cellule et donc

l'augmentation de la migration cellulaire [293]. L'axe Fibronectine-BTBD7-E-cadherin est donc impliqué dans le développement mais aussi dans certains cancers, ou il a été associé au grade et à un mauvais pronostique [294]. Enfin, les intégrines peuvent aussi interagir avec les MMPs, en particulier la MMP14 qui régule l'expression de l'intégrine $\beta 1$ et contrôle l'invasion cellulaire [279]. Cela faisant, il est clair que la nature des protéines de la MEC liant les intégrines définit le destin cellulaire en terme de mobilité, de survie et que cela contrôle la TEM.

Pour conclure, les intégrines sont responsables de la communication cellules-MEC et sont impliquées dans la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation et le développement ainsi que dans la migration cellulaire. Elles peuvent aussi contribuer au caractère souche des cellules et nous verrons d'ailleurs par la suite qu'elles ont une importance majeure dans la progression tumorale et la TEM.

1.3.1. Modifications dans le cancer

La matrice extracellulaire est essentielle à la bonne fonction et structure des organes. Dans le cancer, elle est modifiée et prise à partie par les cellules cancéreuses afin qu'elles en tirent avantage. Les cellules tumorales en collaboration avec les CAFs, changent la composition ainsi que la structure de la matrice, modifiant l'orientation des fibres ainsi que leur densité, et perturbent l'homéostasie des enzymes de remodelage afin de dégrader la MEC environnante (Figure 42 [253]). Ces modifications ont un impact sur la prolifération, la migration, l'angiogenèse mais aussi l'échappement tumoral et nous allons voir ici certaines des modifications qui induisent la progression tumorale.

Tout d'abord, la rigidité de la matrice de manière générale est un facteur majeur pouvant influencer le destin cellulaire. Le rein sain a une rigidité d'environ 4 à 5 kPa, c'est un des organes les plus mous. A titre de comparaison, le pancréas est à 2,9 kPa, la vessie est à 50 kPa et les os, très rigides, sont à 20 GPa [295]. Dans la littérature, il y a controverse quant à l'augmentation de la rigidité des cellules cancéreuses par rapport à leurs homologues saines. Pour le CRCC, il a été montré que les cellules tumorales étaient plus rigides que leurs homologues saines [296]. Néanmoins, il semble que la prolifération d'une masse tumorale induise, dans tout type de cancer solide, une augmentation générale de la rigidité tissulaire globale due au stress et à la pression que cela engendre sur l'organe [295]. Par exemple, il a été noté une multiplication de la rigidité par 10 entre une thyroïde saine et un

adénocarcinome papillaire (11 kPa à 110 kPa) chez certains patients [297]. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que la rigidité influence le mode de migration, la capacité invasive et la signalisation exosomale des cellules [298], [299], [300]. De manière générale, beaucoup se rejoignent sur le fait que la rigidité favorise l'invasion et la migration cellulaire. Attention néanmoins, si la rigidité devient excessive, les cellules se retrouvent piégées et ne peuvent plus bouger dans leur environnement. C'est donc une balance entre taille des pores, dégradabilité et rigidité de la matrice, qui est finement régulée par les cellules tumorales et les CAFs, leur permettant de proliférer et/ou de s'échapper le cas échéant [301]. La rigidité permet aussi de contrôler le mode de migration emprunté par les cellules, c'est-à-dire mésenchymateux ou amibioïde [298], et nous en reparlerons dans la partie suivante (Cf. [Modes de migration et mécanismes](#)).

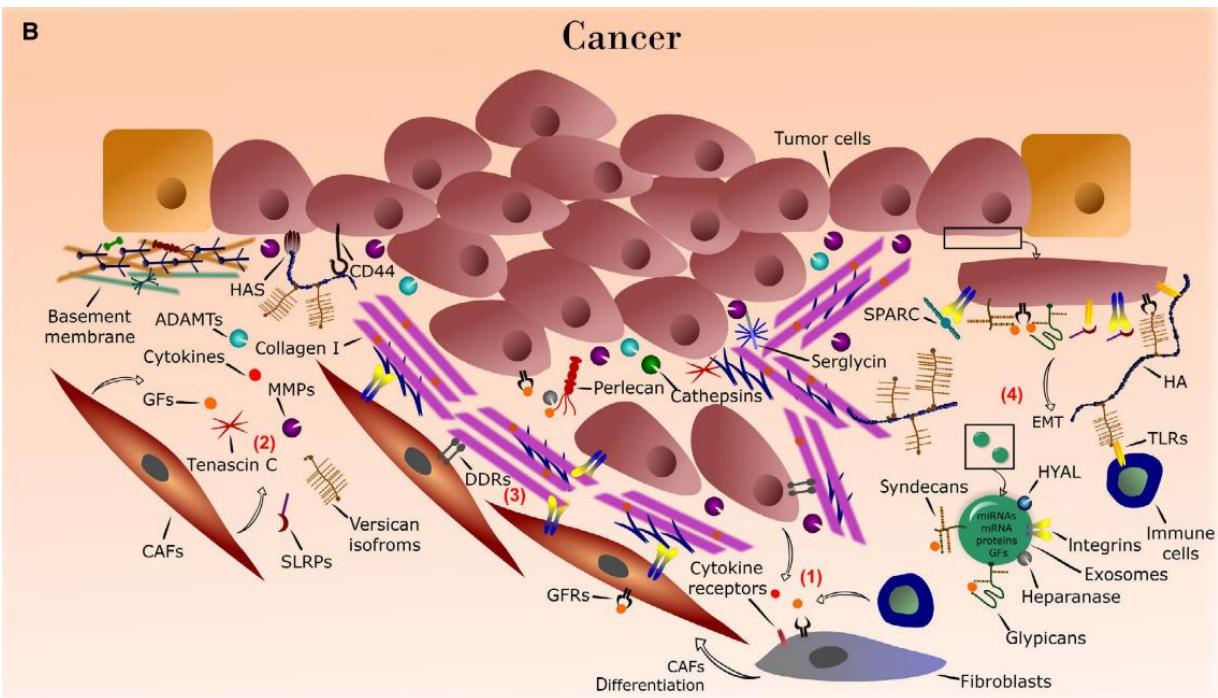


Figure 42 : Remodelage de la matrice extracellulaire dans le cancer. (1) Les cellules tumorales et immunitaires induisent la différenciation des fibroblastes en fibroblastes associés au cancer (CAFs) via la sécrétion de facteurs solubles. (2) Les CAFs et les cellules tumorales, sécrètent une pléthore de cytokines, de facteurs de croissance, de protéoglycans, de protéines et d'enzymes de dégradation de la matrice, facilitant ainsi la croissance et la mobilité des cellules tumorales. (3) Les CAF dirigent l'assemblage d'un réseau rigide et anisotrope de collagène I. Les cellules tumorales interagissent avec les fibrilles de collagène induisant leur prolifération. (4) Les cellules tumorales interagissent avec leur microenvironnement par le biais de nombreux récepteurs de surface cellulaire et d'exosomes. Les exosomes renforcent encore le remodelage de la MEC et jouent un rôle crucial dans la communication entre les cellules.

Hormis la rigidité, la composition de la MEC est modifiée dans le cancer. Plus spécifiquement dans le CRCC, il a été montré que : ① la MEC est majoritairement composée de collagène VI, de fibronectine et de tenascine C ; ② il y a une augmentation des collagènes I et XII ; ③ il y a une diminution du collagène IV et ④ les laminines sont inchangées. A l'inverse, le cortex rénal normal est majoritairement composé de collagène IV, de nidogène et de laminines puisque c'est un tissu très structuré composé majoritairement de lames basales [302].

Un défaut de collagène IV dans la MEC est d'ailleurs un facteur qui induit la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Walter et son équipe ont montré que lorsqu'il y a un défaut en collagène IV sous le tapis cellulaire, cela provoque un switch d'expression entre la E-cadhérine et la vimentine, une augmentation des MMP2 et 9 et donc une augmentation de la TEM et de l'invasion [303]. La surexpression des MMP2 et 9 est d'ailleurs corrélée à la présence de métastases. Ces MMPs sont très souvent retrouvées surexprimées dans de nombreux cancers solides à des stades avancés [304], [305]. De plus, le collagène I a été identifié comme promoteur de la production de ces MMPs par des lignées de CRCC et donc de leur capacité d'invasion [306].

D'autres collagènes non fibrillaires ont aussi été identifiés comme facteur de mauvais pronostic. Par exemple le collagène XXIII, plus précisément COL23A1, est impliqué dans l'adhérence, la prolifération et la migration cellulaire et lorsqu'il est surexprimé, il y a une corrélation avec la survie des patients atteint de CRCC [307]. Aussi, le collagène VII, plus particulièrement COL7A1, est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer gastrique et favorise l'apparition de carcinomes cutanés. Plus précisément, une forte expression de COL7A1, de surcroît intracellulaire, est corrélé à une diminution de la survie des patients de 30% dans les cancers gastriques [308], [309]. Notre équipe a d'ailleurs travaillé sur l'impact de COL7A1 dans le CRCC. Les résultats de ce travail en cours de soumission et auquel j'ai participé, sont présentés dans l'[annexe](#). Nous y montrons que COL7A1 diminue la survie et est un facteur de mauvais pronostic dans le CRCC.

La fibronectine, par son augmentation et son interaction avec les cellules, permet d'activer le système actine-myosine via l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ce qui promeut la migration cellulaire [279]. D'autres études rapportent aussi que la liaison de la fibronectine avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ est impliquée dans l'angiogenèse et par conséquent la croissance tumorale dans le CRCC [306]. Globalement, l'augmentation de la fibronectine dans le cancer est un facteur de

mauvais pronostic puisqu'il a été montré qu'elle était associée à l'invasion et à l'apparition de métastases dans les cancers de l'ovaire et du pancréas en particulier [254].

Les intégrines peuvent aussi prendre diverses fonctions et être exprimées différentiellement, favorisant la progression tumorale, la résistance au traitement et peuvent même influencer la survie. Par exemple, les intégrines $\beta 1$, $\alpha 6$, $\beta 8$ et $\alpha \nu \beta 3$ sont associés à la résistance au traitement dans les cancers du poumon, du sein, et du pancréas. Les intégrines $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha 10 \beta 1$ et $\alpha \nu \beta 6$ sont quant à elles impliquées dans l'invasion, la croissance, la néo-angiogenèse et les métastases dans de multiples cancers solides. Enfin, l'intégrine $\alpha 7$ liant les laminines a été négativement corrélée avec la survie des patients atteints de glioblastome. De plus, certaines intégrines ont été récemment identifiées comme des marqueurs de cellules souches cancéreuses (CSCs), comme c'est le cas pour l'intégrine $\alpha \nu \beta 5$ dans le glioblastome, ou encore l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ dans le cancer du sein [291].

Les CSCs interagissent aussi avec la MEC via leur récepteur spécifique tel que CD44. En effet, CD44 est un PGs qui s'ancre à la matrice et qui garantit l'intégrité et la survie des CSCs et promeut donc leur fonction, en particulier dans la résistante aux traitements [87], [259]. Les PGs ont donc aussi leur rôle dans l'agressivité tumorale, la résistance aux traitements et le potentiel métastatique.

Pour conclure, la MEC, dans sa composition et sa structuration a un impact majeur sur le remodelage tissulaire nécessaire à la progression tumorale et à l'échappement métastatique. Nous verrons dans la prochaine partie, de manière plus mécanistique, comment les cellules migrent à travers cette MEC modifiée (Cf [Modes de migration, d'invasion et mécanismes](#)).

2 . Le processus métastatique

Dans les parties précédentes j'ai insisté sur le fait que les métastases étaient la bête noire du cancer : Renforçant l'hétérogénéité tumorale et la résistance aux traitements ; diminuant drastiquement voir supprimant totalement les possibilités de rémission et de survie. Les progrès actuels en terme de traitement chirurgical et médicamenteux montrent qu'un cancer localisé est traitable, voir curable, hormis quelques exceptions due à leur localisation. Malheureusement ces cancers évoluent parfois trop vite, et ce sont les métastases qui sont dans 67% des cas responsables de la létalité par cancer [310]. Nous travaillons à essayer de prédire le potentiel métastatique des patients et à trouver des traitements efficaces inhibant ce processus. Dans cette partie, nous allons donc décrire toutes les étapes afférentes à ce processus complexe et redoutable, parfois encore mal compris.

2 . 1 . Les grandes étapes

Le processus métastatique comprend de nombreuses étapes complexes, impliquant les propriétés des cellules tumorales et leurs interactions avec le microenvironnement. La finalité de ce processus est l'apparition d'une masse tumorale, distante du site de la tumeur primaire. Afin de s'échapper, les cellules néoplasiques acquièrent des propriétés nouvelles et plus agressives. En effet, les cellules cancéreuses possèdent déjà l'immortalité, l'instabilité génétique, la prolifération incontrôlée, l'échappement à l'apoptose, un métabolisme altéré, l'inflammation, l'évasion du système immunitaire, la capacité d'induire l'angiogenèse ou encore d'envahir le tissu environnant [311], [312]. Elles ont besoin d'acquérir 4 propriétés supplémentaires indispensables pour devenir métastatique : ① La motilité et l'invasion, ② la capacité à moduler leur environnement, ③ une plasticité leur permettant de survivre dans la circulation, et ④ la capacité de colonisation d'un nouvel organe [313]. Les différentes étapes du processus métastatique sont illustrées dans la Figure 43 [314].

Premièrement, les cellules doivent envahir la MEC environnante. Pour cela, elles peuvent emprunter différents modes de migration, tel que la migration mésenchymateuse à cellule unique ou collective, ou la migration amibioïde (Cf. [Modes de migration, d'invasion et mécanismes](#)). Pour cela, elles s'appuient sur les cellules environnantes comme les CAFs et les macrophages M2, que les cellules cancéreuses modulent pour qu'elles les aident. Cela promeut un remodelage de la MEC et favorise l'angiogenèse (Cf. [Angiogenèse](#)), ce qui permet l'échappement des cellules tumorales de la tumeur primaire. Lorsque la circulation est en

place dans la tumeur, elle est généralement peu efficace et dysfonctionnelle comme nous l'avons vu plus tôt. Cette perméabilité va permettre aux cellules tumorales de s'attacher et d'entrer dans la circulation. Une fois l'intravasation effectuée (Cf. [Intravasation](#)), les cellules tumorales circulantes (CTCs) vont devoir apprendre à survivre dans la circulation, dans des conditions de vie très éloignées de celles d'origine. Elles doivent en particulier résister à l'anoïkose, subir des reprogrammations génétiques, s'adapter à la vie sous flux et échapper au SI. Nous verrons que les plaquettes et les cytokines aident en ce sens (Cf. [La survie dans la circulation](#)). Afin d'extravaser la circulation et de coloniser un nouvel organe, les CTCs vont finir par s'attacher aux cellules endothéliales, afin de passer à travers l'endothélium en direction d'un nouveau site (Cf. [Extravasation](#)), où elles pourront rester en dormance, puis

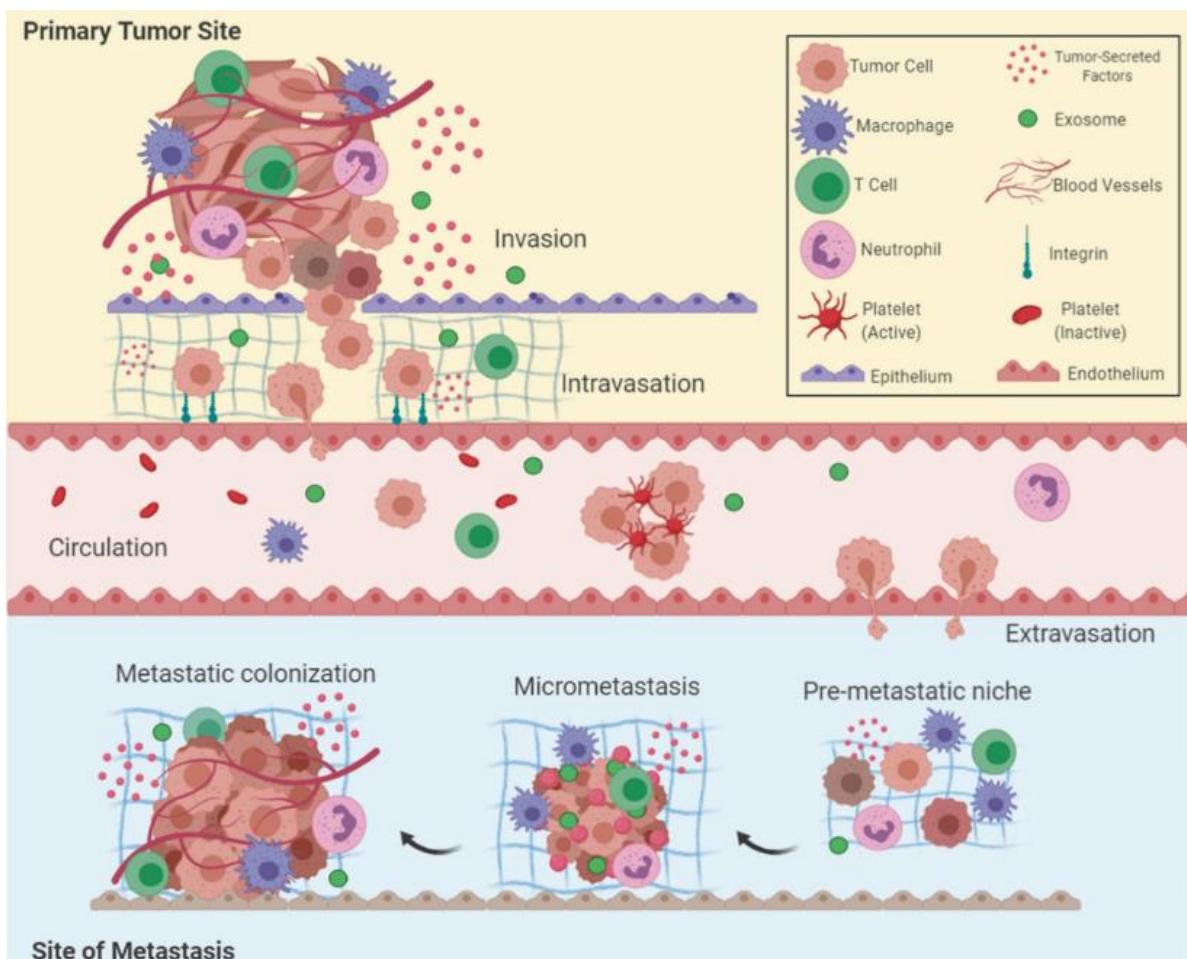


Figure 43 : La cascade métastatique. (1) La tumeur primaire croît et est vascularisée, puis les cellules envahissent l'environnement pour arriver jusqu'aux vaisseaux. (2) Les cellules cancéreuses intravasent dans la circulation sanguine. (3) Les cellules tumorales circulantes (CTCs) détournent les cellules immunitaires circulantes pour se protéger des contraintes de cisaillements, de l'immunité anti-tumorale et doivent résister à l'anoïkose. (4) Les cellules arrivent dans les vaisseaux irriguant un autre organe et s'attachent à la paroi interne des vaisseaux pour extravaser en direction du nouvel organe. (5) Les cellules tumorales arrivent dans une niche pré-métastatique, préparée en amont par les cellules cancéreuses de la tumeur primaire, et recommencent à proliférer, formant une micro- puis une macro-métastase.

proliférer pour former une métastase. Nous verrons que ces sites, ou niches métastatiques, sont en fait préparés en amont par la tumeur primaire, et que le choix et la prolifération sur ces sites n'est pas aléatoire pour les cellules tumorales (Cf. [Les niches métastatiques](#)) [314], [315]. Dans les parties qui suivent, nous allons donc détailler toutes ces étapes et essayer d'expliquer les évènements pouvant conduire à la dissémination métastatique.

2.2. Modes de migration, d'invasion et mécanismes

La motilité cellulaire, c'est-à-dire la migration et l'invasion, sont des prérequis à la dissémination métastatique. La migration réfère au mouvement d'une cellule sur une surface en 2D en réponse à un stimuli chimique ou mécanique. L'invasion réfère à la capacité d'une cellule à devenir mobile et à naviguer à travers la MEC et donc d'infiltrer les tissus environnants. Pour envahir, les cellules peuvent emprunter diverses voies et mécanismes : de façon individuelle ou collective (Figure 44 A), avec un mécanisme mésenchymateux ou amiboïde (Figure 44 B) [316]. Nous allons ici décrire ces deux types d'invasion dans une matrice en 3D.

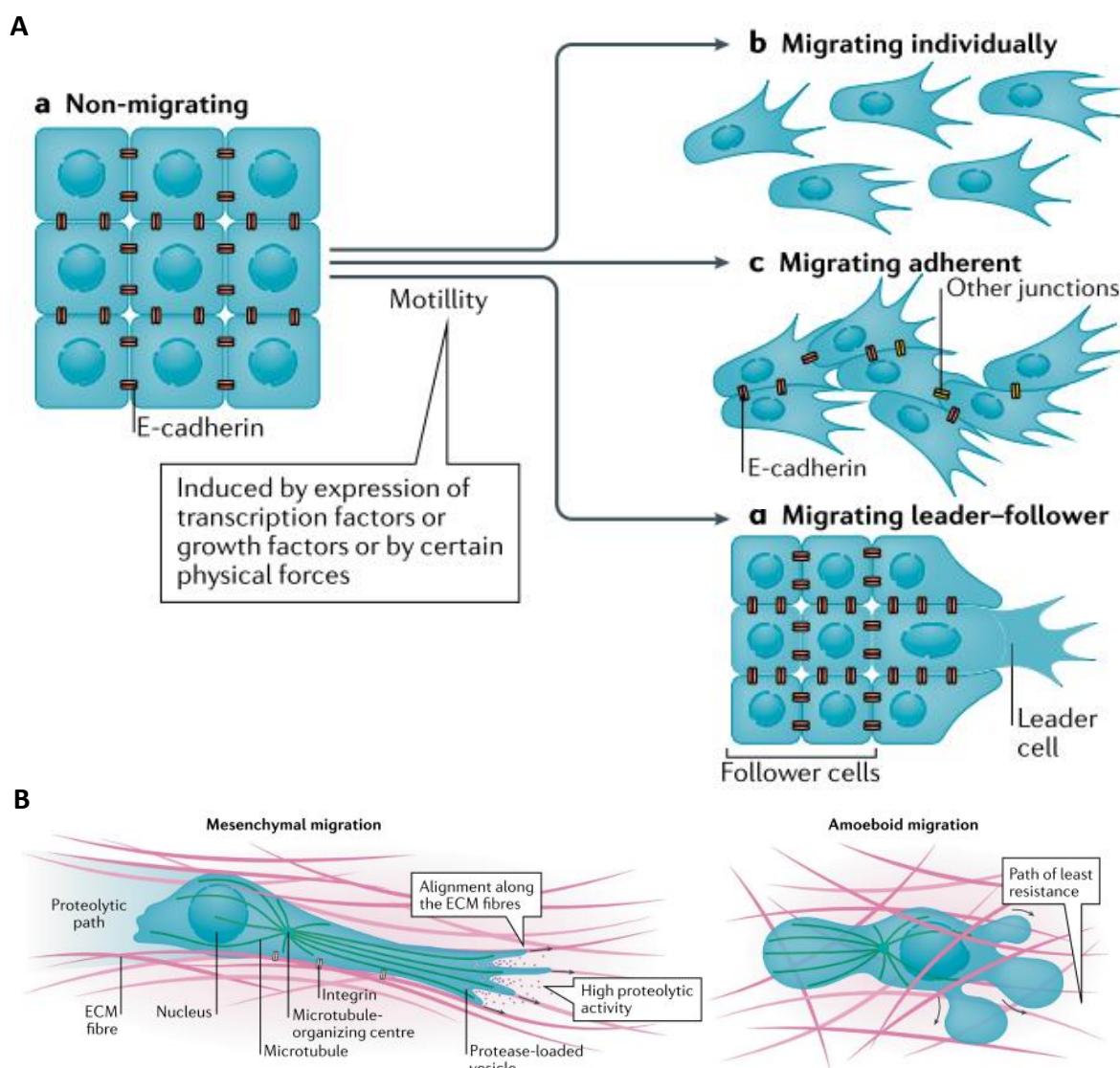


Figure 44 : Modes de migration empruntés par les cellules cancéreuses. A : Les modes d'invasion individuels ou collectifs. La migration collective est caractérisée par la conservation des encrages épithéliaux entre les cellules invasives. B : Migration mésenchymateuse et amiboïde. Les cellules mésenchymateuses sont allongées, ancrées à la matrice extracellulaire et effectuent de la dégradation protéolytique. Les cellules amiboïdes sont arrondies, sans ancrages et n'effectuent pas de dégradation protéolytique.

2.2.1. *La Migration Mésenchymateuse*

La migration mésenchymateuse est un processus complexe impliquant un large nombre de molécules intra et extracellulaires. Elle a longtemps été décrite comme le type de migration principal emprunté par les cellules cancéreuses pour s'échapper du site tumoral. Cette migration est caractérisée par la perte de la polarité épithéliale et le gain d'une forme allongée mésenchymateuse de type fibroblastique, d'où le terme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [317]. Les cellules mésenchymateuses s'allongent et peuvent d'ailleurs mesurer entre 50 et 200 µm. Ce type de migration est persistant, polarisé, adhérant à la MEC (via les intégrines) et plutôt lent (0.1-1 µm/min). Il utilise des protéases dans le cadre de l'invasion et met en jeu des forces contractiles importantes pour se tracter en s'accrochant à la MEC [318], [319]. La migration mésenchymateuse comprend 5 étapes séquentielles formant un cycle illustré dans la Figure 45 [320] :

① La première étape consiste en la formation d'une protrusion à l'avant de la cellule dans la direction où elle migre. Ces protrusions peuvent prendre la forme de lamellipode, de pseudopode ou de filopode. Le lamellipode est une protrusion large, majoritaire en cas d'une migration en 2D. Le pseudopode est cylindrique, comme un doigt épais, qui peut se développer ou se rétracter dans la MEC. Finalement, le filopode est une protrusion cylindrique très fine et très longue pouvant atteindre 50 µm de long. Dans le cas de l'invasion on les nomme les invadopodes, ils sont identiques aux pseudopodes à la différence près qu'ils peuvent dégrader la MEC grâce au recrutement des MMPs aux sites d'adhésion de la cellule et qu'ils peuvent prendre différentes formes (en points, rosettes, agrégats ou linéaires) [321], [322]. Comme on peut le voir dans la Figure 45, ces protrusions sont générées par la polymérisation du cytosquelette d'actine sous le contrôle des GTPases Rac1 et Cdc42 [323] qui recrutent les fibres d'actine à la membrane et qui s'attachent au complexe actine-nucléant ARP2/3 puis à la protéine adaptatrice WASP placée à la membrane plasmique. Cela permet l'elongation de la protrusion dans la MEC [317], [318], [320].

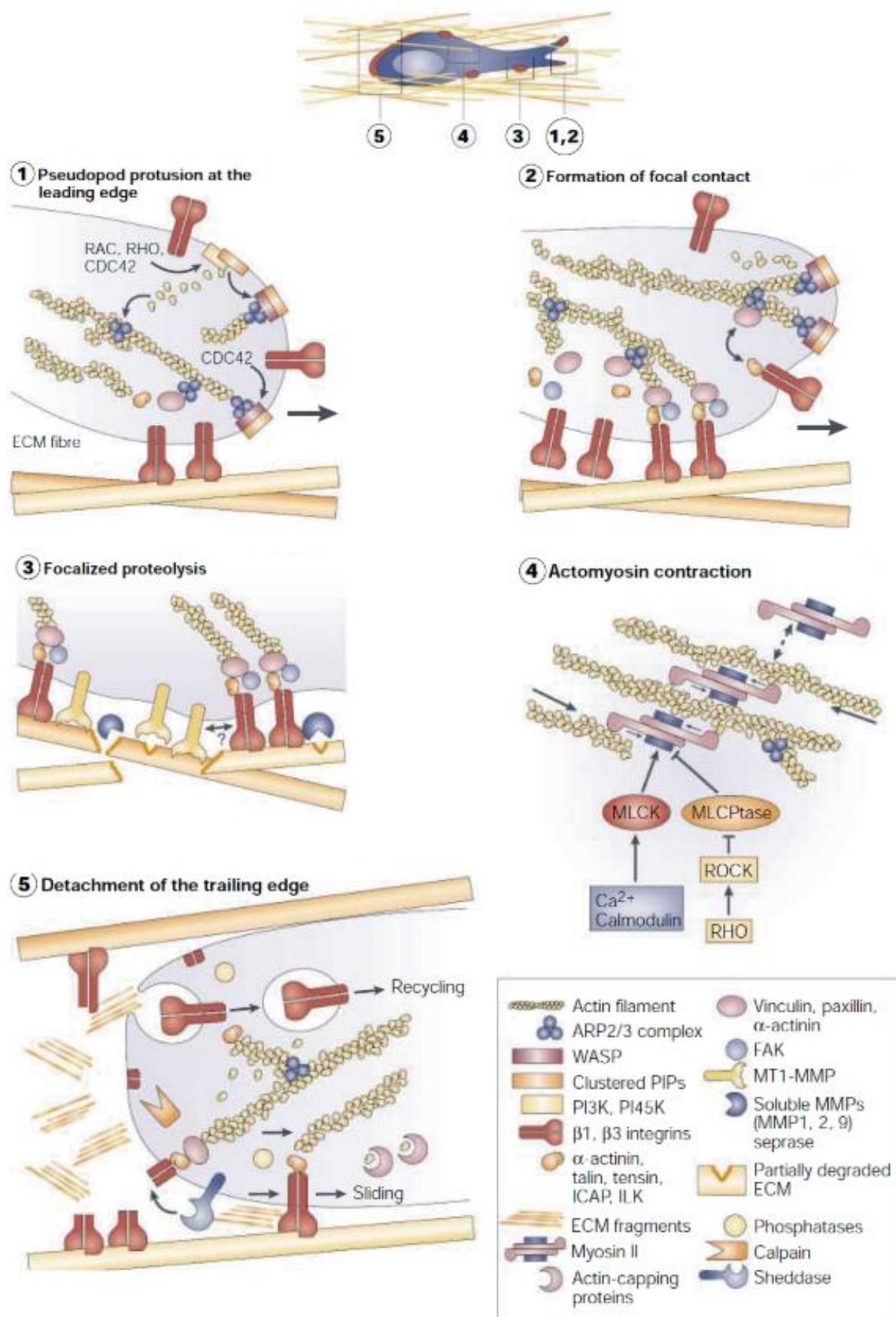


Figure 45 : Les étapes de la migration cellulaire dans une MEC en 3D. La description des étapes est décrite dans le texte. MMP : Metalloprotéase ; ECM : Matrice extracellulaire

② La seconde étape consiste en la formation de points de contact focaux, permettant aux protrusions d'entrer en contact avec leur environnement. Cela s'effectue via le recrutement des intégrines, en particulier $\beta 1$ et $\beta 3$, qui relient la MEC au cytosquelette. Le cluster d'intégrines va permettre le recrutement de protéines intracellulaires tel que la taline, FAK et la vinculine faisant le pont entre les intégrines et l'actine. Ces points de contact focaux sont les points d'ancrages permettant aux cellules de produire des forces contractiles leur permettant de se tracter [318], [320].

③ La troisième étape permet d'amplifier le nombre de points de contacts focaux pour renforcer la traction ainsi que d'engager une dégradation protéolytique dans le cadre de l'invasion [318], [320]. Il a été montré que les métalloprotéinases MT1-MMP (MMP14), MMP2 et MMP9 étaient liées à la présence d'invadopodes et sécrétées dans plusieurs cancers à caractère invasif [305], [306], [324]. De plus, il peut y avoir une augmentation de la cofiline, une protéine déstabilisant l'actine, qui aurait pour effet d'augmenter l'activité protéolytique de la MT1-MMP et de la MMP2. La cofiline a d'ailleurs été retrouvée surexprimée dans plusieurs cancers [325]. En effet l'invasion est un processus dynamique nécessitant des cycles de polymérisation et dépolymérisation successifs de l'actine et la présence de cofiline pourrait favoriser cette dynamique. En conclusion, la dégradation protéolytique et le recrutement de MMPs va permettre la destruction et le remodelage de la MEC permettant aux cellules de progresser et d'envahir le tissu.

④ La quatrième étape correspond à la modification du cytosquelette d'actine et à son interaction avec la myosine II. La myosine va s'intercaler et se lier aux fibres d'actine créant un cytosquelette d'actomyosine générant une contraction de la cellule. Cette contraction induit la génération de forces aux points d'adhérences focales et permet à la cellule de se mouvoir, plus particulièrement ici, de se tracter sur la MEC. Cette contraction est permise par l'action de la voie Calmoduline-MLCK (Myosine Light Chain Kinase) qui active la myosine II [317], [318], [320].

⑤ La dernière étape du cycle est nécessaire au mouvement de la cellule car il permet son détachement sur sa partie arrière. Ceci s'effectue grâce à la dépolymérisation de l'actine, orchestrée par des protéines clivant l'actine telle que la cofiline. De plus, la cellule se détache de la MEC grâce à des enzymes comme la calpaine qui est une protéase clivant la taline et les intégrines sur leur partie cytoplasmique [326]. Les intégrines se détachent alors de leur

substrat et sont soit internalisées par endocytose pour être recyclées à l'avant de la cellule, soit elles sont relarguées dans l'environnement [320].

Dans le cancer, la migration mésenchymateuse peut se présenter sous différentes formes. Elle peut être individuelle ou collective. La migration collective correspond à un groupe de cellules coordonnées qui sont connectées par des jonctions cellulaires, tel que l'E-Cadhérine, et qui migrent ensemble vers la même direction. Cela peut permettre de surmonter la résistance à la MEC et il a été montré que cela augmentait l'efficacité migratoire globale dans le cancer.

Parmi les migrations collectives, on en retrouve deux sortes. Premièrement, la migration adhérente, c'est-à-dire que toutes les cellules migrent de façon individuelles mais sont adhérentes entre elles. La seconde correspond à la migration utilisant une cellule leader et des cellules suiveuses.

La cellule leader mésenchymateuse trace le chemin en dégradant la MEC et tracte les cellules suiveuses. La cellule leader surexprime par ailleurs Rac1 et l'intégrine $\beta 1$ impliqués dans la migration mésenchymateuse et les points de contact focaux [327]. Les cellules suiveuses conservent en majorité leurs caractéristiques épithéliales, poussent à l'arrière du groupe, élargissent le passage via la sécrétion de MMPs et remodèlent la matrice afin d'aligner en leur bord des protéines d'ancre nécessaires à leur progression tel que le collagène IV [316], [328]. La répartition des rôles est importante car il a été montré sur des cellules épithéliales rénales que le retrait de la cellule leader perturbait la migration des cellules suiveuses, modifiant alors leur direction initiale [327]. Cette migration collective peut aussi être menée par un CAF en tant que cellule leader puisque c'est une cellule mésenchymateuse professionnelle [329]. Un des avantages de ce type de migration collective est que la rétention des paramètres épithéliaux dans les cellules suiveuses leur conférerait une plus grande capacité à s'installer dans de nouveaux organes et à faire des métastases. De plus, le fait d'entrer en cluster dans la circulation sanguine leur donne plus de chance de survie et donc un potentiel métastatique supérieur [330].

La migration mésenchymateuse est induite par la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines tels que le TGF- β et CXCL12 qui peuvent par ailleurs être sécrétés par les cellules endothéliales anormales. De plus, la rigidité et l'homogénéité de la matrice sont des paramètres importants qui régulent finement la décision de la cellule d'engager une migration mésenchymateuse. La migration collective mésenchymateuse a été observée dans le mélanome, le cancer du sein, du pancréas ou encore le carcinome colorectal [328].

Pour conclure, la migration mésenchymateuse et collective est un processus finement régulé et complexe dépendant du microenvironnement tumoral, de la structure et composition de la MEC, des cytokines qui y sont sécrétées et de la capacité des cellules tumorales à effectuer une TEM et par conséquent à subir une reprogrammation génétique. Elle est majoritairement utilisée par les cellules cancéreuses pour l'échappement tumoral mais ce n'est pas la seule et nous allons à présent discuter de la migration amiboïde.

2.2.2. La Migration Amiboïde

La migration amiboïde est une migration primitive et en même temps la migration à cellule unique la plus efficiente. Elle est caractérisée par des cellules à la forme arrondie qui se faufilent à travers les pores de la MEC en poussant et en s'appuyant sur l'environnement. Contrairement à la migration mésenchymateuse, les cellules amiboïdes ne sont pas adhérentes, sont indépendantes des intégrines et des protéases et utilisent des forces propulsives pour se mouvoir [331]. Les cellules amiboïdes sont globulaires, possèdent un haut degré de déformabilité, une migration rapide ($20 \mu\text{m}/\text{min}$) et sont capables de former des protrusions pour sonder leur environnement pendant le processus de migration [328]. Ces protrusions membranaires, appelées « Blebs », sont dépourvues d'actine filamentaire et sont formés de myosine II se contractant, créant une pression hydrostatique faisant émerger ces protrusions. Comme on peut le voir dans la Figure 46 (*modifiée depuis [332]*), les cellules amiboïdes peuvent migrer de 3 manières différentes : La première est le mode Bleb (A0), caractérisé par de nombreuses protrusions formées d'actine corticale et de myosine et parfois simplement de la membrane plasmique. Le mode A0 est le précurseur des deux suivants. Le second mode se sert en partie de la polymérisation de l'actine pour former des protrusions ressemblants aux lamellipodes mais dépourvus de contact focaux, c'est le mode pseudopode (A1). Enfin, le dernier est le mode Bleb stable (A2) qui possède une protrusion à l'arrière de la cellule permettant la propulsion cellulaire [332], [333].

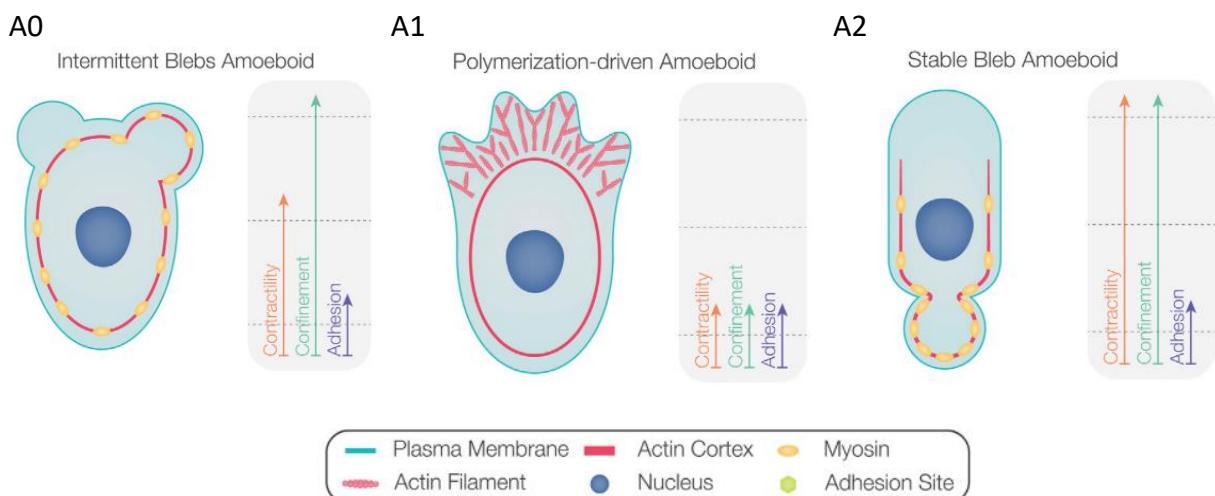


Figure 46 : Configurations cellulaires pendant la migration amiboïde. A0 : Mode Bleb, caractérisé par des protrusions rondes d'actine corticale. A1 : Mode pseudopode, fines protrusion ressemblant aux lamellipodes de la migration mésenchymateuse, mais qui sont dépourvus de contacts focaux. A2 : Mode Bleb stable, qui possède une protrusion à l'arrière permettant la propulsion.

C'est la contractilité de l'actomyosine corticale qui permet aux cellules amiboïdes d'être mobiles et de migrer au travers de la MEC. La contractilité est contrôlée par la voie de signalisation RHO-ROCK elle-même activée par les cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-1 α promouvant la migration amiboïde dans différents cancers solides [334].

Vous aurez néanmoins remarqué dans la Figure 46 que la contractilité est variable entre les modes, avec du plus faible au plus fort : A1, A0 et A2. Il est important de noter que plus la contractilité est importante, et plus la vitesse de migration est élevée. Le mode A2 est donc associé à une migration rapide, contrôlée par un flux rétrograde global d'actomyosine corticale en faveur de l'arrière de la cellule. A l'inverse, le mode A1 à une migration plus lente, contrôlée par une polymérisation de l'actine locale à l'avant de la cellule [333]. Le choix du mode amiboïde emprunté par la cellule dépend de sa préférence d'origine, mais aussi des propriétés mécaniques de l'environnement. En effet, Liu et al. ont montré sur une vingtaine de types cellulaires que le confinement de la cellule dans un environnement où elle ne peut pas adhérer la pousse à enclencher une migration amiboïde et que plus ce confinement est fort et donc l'espace cellulaire petit, plus les cellules choisissent le mode A2. Cela suggère que l'augmentation de la contractilité cellulaire est directement liée à la pression exercée par l'environnement, probablement de manière mécanique induite [335]. Plus largement, Laure Laforgue dans sa thèse et Wang et al. ont aussi démontré que le mode de migration emprunté par les cellules cancéreuses est dépendant de la rigidité de la MEC, du confinement, du type cellulaire et que le mode choisi est réversible si on change les propriétés mécaniques [318], [336].

Hormis le facteur mécanique, les recherches tendent à montrer que la migration amiboïde est préférée par les cellules cancéreuses agressives ou après un traitement médicamenteux, en particulier les traitements bloquant les intégrines et les MMPs [328]. De plus, la transition mésenchymo-amiboïde (MAT) et la transition épithélio-amiboïde (EAT), augmenteraient la capacité des cellules à migrer à travers des environnements complexes et supporteraient donc le caractère invasif des cancers. La MAT et la EAT ont d'ailleurs été identifiées comme promotrices du processus métastatique dans de nombreux cancers tels que le carcinome hépatocellulaire, le cancer du sein et de la prostate. En effet, une cellule amiboïde est dotée de propriétés des cellules souches cancéreuses et a un effet immunosupresseur responsable de la résistance aux traitements, tout cela favorisant l'évolution métastatique du cancer [334].

En bref, le statut amiboïde n'est pas seulement un mode de migration mais aussi une caractéristique cellulaire globale impliquée dans la survie et la capacité invasive des cancers. Néanmoins, la migration amiboïde est moins bien connue et étudiée que la migration mésenchymateuse et certains débâtent encore de leur capacité d'adhésion à la MEC et de sécrétion de MMPs [318], bien que ces paramètres ne semblent pas indispensables à la migration amiboïde. L'inhibition de ce type de migration est donc une piste intéressante pour la clinique.

Afin d'avoir une vue d'ensemble sur ces mécanismes complexes, le Tableau 8 ci-dessous (*traduit depuis [320]*) récapitule les caractéristiques principales des migrations mésenchymateuses et amiboïdes.

Tableau 8 : Différences cellulaires et moléculaires entre les migrations mésenchymateuses et amiboïdes.

Caractéristiques	Mésenchymateuse	Amiboïde
Forme cellulaire	Allongée, type fibroblastes	Arrondie, ellipsoïde
	Longueur : 50 - 200 µm	Longueur : 10 - 30 µm
Croissance en culture	Adhésives	En suspension
Vélocité	Faible Vitesse : 0.1 - 1 µm/min	Rapide Vitesse : 0.1 - 20 µm/min
Interactions cellules-MEC	Points de contacts focaux comprenant intégrines et protéases	Quelques intégrines et protéases non focalisées
Structure du cytosquelette d'actine	Cortical et fibres de stress	Cortical
Forces d'adhésion	Hautes, tirage et groupement de fibres	Faibles, flexion mineure des fibres
Remodelage de la MEC par protéolyse	Présent au niveau des invadopodes	Pas de protéolyse
Mécanisme de migration	Traction	Propulsion
Mécanismes pour surmonter les barrières matricielles	Génération de chemin, et dégradation de la MEC	Recherche de chemin, propulsion et écoulement cytoplasmique rétrograde, compression dans les régions étroites (anneaux de constriction)
Cellule non néoplasique prototype	Fibroblastes, cellules musculaires lisses	Lymphocytes, Neutrophiles
Exemple de cellules néoplasiques	Fibrosarcome, Glioblastome, Cancer épithéliaux différenciés	Lymphome, Carcinome pulmonaire à petite cellule, Cancer de la prostate

La migration/invasion, première étape du processus métastatique, est dirigée et contrôlée par la pression tissulaire exercée, due à la prolifération tumorale excessive, par l'hypoxie [217], le stress oxydatif ainsi que la sécrétion d'une myriade de cytokines. Ce contexte favorise l'échappement des cellules cancéreuses du site de la tumeur primaire qui est devenu « toxique » [336]. Par exemple, l'hypoxie promeut la migration amiboidé via HIF-1 α qui active la Calpaine-2, responsable du clivage de la taline, induisant un détachement des intégrines et diminuant de ce fait l'adhérence cellulaire [337]. En ce qui concerne la migration mésenchymateuse, il semble qu'une rigidité optimale et l'homogénéité de la matrice soient primordiales. En effet, la présence de « trou » dans la MEC due à une inhomogénéité structurelle est incompatible avec ce mode de migration nécessitant des ancrages forts et réguliers [299]. Quoi qu'il en soit, tous ces mécanismes sont régulés par les cellules tumorales, mais aussi appuyés par les cellules du microenvironnement telles que les cellules endothéliales, les CAFs et les cellules du SI en faveur de la tumeur. Par conséquent, l'entrée en TEM puis en MAT ou directement en EAT n'est que le résultat de facteurs biophysiques et biochimiques qui poussent les cellules à aller trouver un environnement aux conditions plus favorables, les dirigeant inextricablement vers la circulation sanguine. Il est d'ailleurs étonnant qu'autant de patients soient à des stades métastatiques, puisque moins de 0.1% des cellules qui seront entrées dans la circulation auront la capacité de produire des métastases distantes [328]. Pour cette étape d'intravasation, les cellules qui migrent viennent à la rencontre de néo-vaisseaux formés dans la tumeur, et nous allons donc à présent décrire le processus d'angiogenèse.

2 . 3 . Angiogenèse

L'angiogenèse tumorale est déclenchée par la tumeur pour qu'elle puisse se développer. En effet, sans vascularisation, la tumeur ne peut s'étendre indéfiniment car elle n'a pas d'accès à l'oxygène et aux nutriments nécessaires à son développement et est aussi dans l'incapacité d'évacuer ses déchets métaboliques [338]. Dans cette partie, je vais exposer les étapes de la mise en place de ce réseau vasculaire dans la tumeur et ses différences avec le réseau vasculaire normal d'un point de vue structurel et sécrétoire. En effet, nous avions déjà discuté dans la partie précédente de l'impact des cellules endothéliales tumorales (TECs) déjà infiltrées et structurées sur la progression tumorale métastatique et leurs nombreuses interactions avec les cellules tumorales favorisant la carcinogenèse et le processus métastatique (*Pour revoir ces interactions, se référer à la partie [1.2.2. Les cellules du système vasculaire](#)*).

L'angiogenèse est initiée quand la tumeur commence à souffrir d'hypoxie (Figure 47). L'hypoxie va induire au niveau des cellules tumorales l'expression de HIF-1, qui va à son tour permettre l'expression et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF, l'EGF ou encore le FGF. Ceci va engendrer un déséquilibre en défaveur des facteurs anti-angiogéniques, tel que l'endostatine et l'angiostatine. L'hypoxie va aussi induire la sécrétion de MMPs, permettant de dégrader la membrane basale (MB) des vaisseaux et de détacher les péricytes à leur surface. Le gradient de facteurs pro-angiogéniques et la dégradation de la MB vont donc permettre la migration et la prolifération des cellules endothéliales en direction des cellules tumorales. Plus précisément, c'est une cellule de pointe spécialisée (« tip-cell ») qui va guider le bourgeonnement du néo-vaisseau. Cette cellule de pointe va migrer le long du gradient et permettre la construction d'un nouvel embranchement vasculaire grâce aux cellules endothéliales progénitrices qui se différencient et prolifèrent afin de former le corps principal du nouveau vaisseau. La cellule de pointe est aussi impliquée dans la suppression de la prolifération via son action sur le récepteur Notch-1, et par conséquent promeut la maturation du néo-vaisseau. Lorsque le nouveau vaisseau irrigue la tumeur, les cellules tumorales se mettent à sécréter du PDGF afin de stimuler le recrutement et l'attachement des péricytes. Cette vascularisation mise en place va donc stimuler la croissance cellulaire cancéreuse [339], [340], [341], [342].

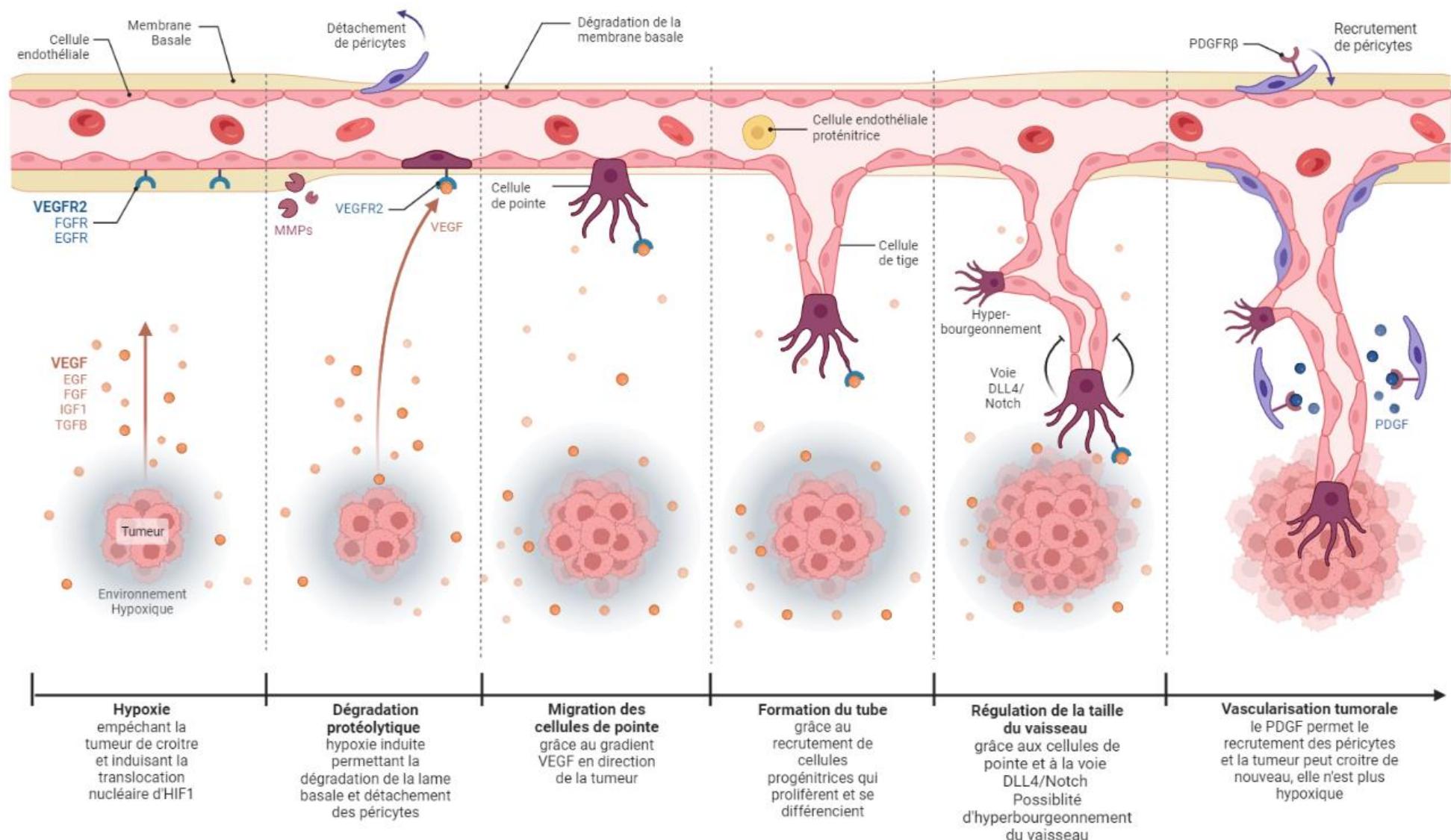


Figure 47 : Les étapes de l'angiogenèse tumorale. Crée sur BioRender.

Ce cycle est en fait un cercle vicieux puisque plus la tumeur grossit et plus elle a besoin d'apports en oxygène et nutriments. L'angiogenèse tumorale est donc un processus presque constant avec la sécrétion de VEGF qui est en permanence relancée. Par conséquent, ces néovaisseaux ont des défauts de maturation structurels, créant une vasculature anarchique, tortueuse et perméable. En effet, dans l'angiogenèse tumorale, il existe à l'origine un déséquilibre dans la balance sécrétoire en faveur des cytokines pro-angiogéniques qui sont sécrétées en masse par les cellules tumorales. Cela induit le recrutement incontrôlé de cellules endothéliales progénitrices et le bourgeonnement d'un réseau dilaté et hémorragique, avec des connexions anarchiques (Figure 48, *Abnormal*, [343]). Les cellules endothéliales de ces vaisseaux ont une morphologie anormale avec une diminution des jonctions intercellulaires à l'origine des fenestrations responsables de la perméabilité. De plus, il existe des défauts de construction de la lame basale et de couverture par les péricytes induisant des défauts structurels qui engendrent une augmentation de la perméabilité [339], [343].

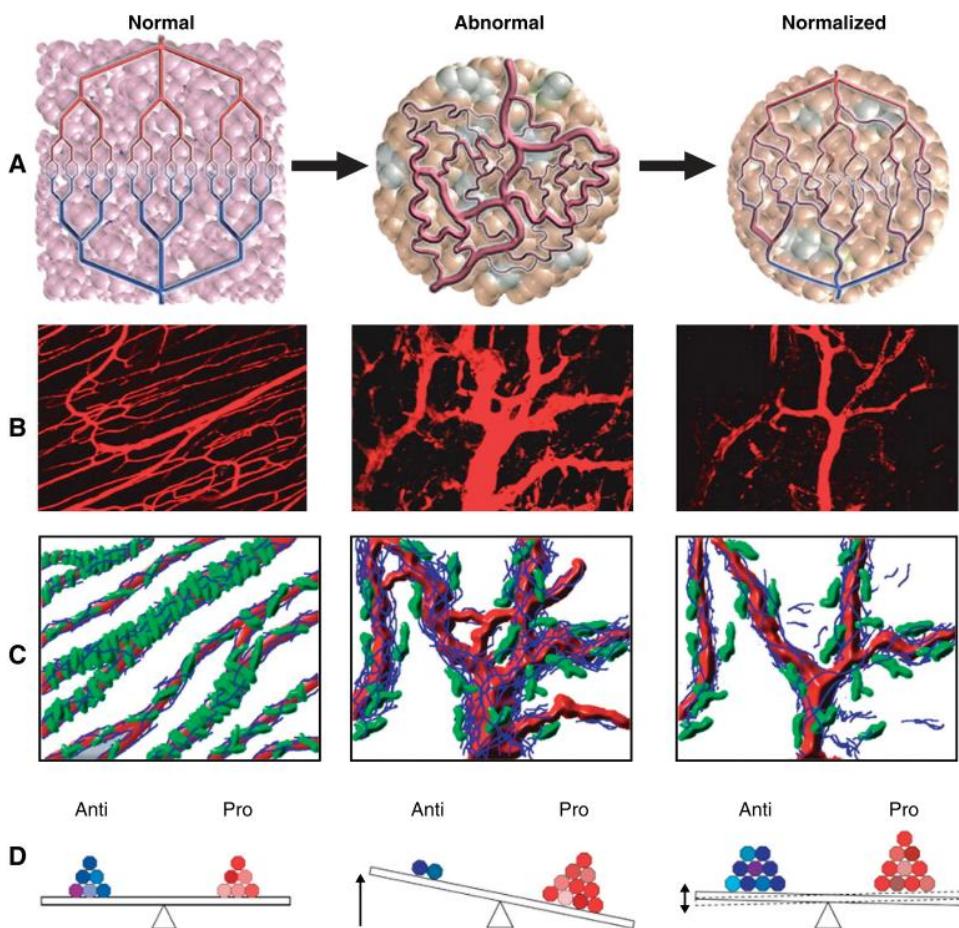


Figure 48 : Organisation des vaisseaux dans les tissus normaux, tumoraux et après une normalisation par traitement anti-angiogénique. A : Schématisation de la structure vasculaire. B : Microscopie bi-photon des vaisseaux. C : Schéma montrant les changements dans la structure concernant les péricytes (vert) et la MEC (bleu). D : Balance des facteurs pro et anti-angiogénique dans les différentes situations.

Au contraire, la vascularisation normale est macroscopiquement et microscopiquement extrêmement bien structurée. Comme on peut le voir dans la Figure 48 (*Normal*, [343]), il existe une hiérarchie qui régit l'organisation des vaisseaux, permise par la structuration de ces derniers, d'une part grâce à la lame basale et aux péricytes qui entourent les cellules endothéliales, et d'autre part grâce aux jonctions serrées qui permettent la cohésion des cellules endothéliales. La stabilité de la vasculature est dépendante de la balance entre facteurs pro et anti-angiogénique qui se trouve normalement à l'équilibre [339], [343].

Depuis plusieurs années maintenant, les traitements anti-angiogéniques ont été développés afin de normaliser cette vascularisation dans le but de la rendre moins perméable (Figure 48 (*Normalized*), [343]). Cela permettrait de toujours acheminer de l'oxygène et des nutriments à la tumeur mais aussi le traitement et d'empêcher les cellules d'intravaser et d'aller métastaser dans un organe distant. C'est le principe du Bevacizumab par exemple, qui, par son inhibition du VEGF, vise à rétablir l'équilibre entre facteurs pro et anti-angiogéniques. Il a d'ailleurs été montré que les thérapies anti-angiogéniques amélioraient la distribution d'oxygène dans les tumeurs, diminuaient la perméabilité, augmentaient la perfusion, diminuaient la pression interstitielle tumorale et de ce fait permettait d'améliorer la délivrance d'autres thérapies telles que l'immunothérapie et la chimiothérapie [343]. L'effet sur la dissémination métastatique est encore discuté. La majorité des études montrent une diminution de la quantité de métastases [343], [344], [345] quand d'autres montrent une augmentation [346], [347]. Il semble néanmoins que l'administration d'un traitement discontinu soit responsable de la dissémination métastatique [348]. Par conséquent, il est indispensable que la fenêtre de temps, la dose et les cycles de traitements soit appliqués de manière stratégique afin d'éviter la propagation métastatique. Ce qui n'est parfois pas simple au vu des effets secondaires pour le patient.

2.4. Intravasation

L'intravasation correspond à l'entrée des cellules dans la circulation sanguine ou lymphatique. Il est important de noter que certaines cellules tumorales peuvent métastaser en passant par la lymphe ou en migrant le long des vaisseaux lymphatiques. De manière plus générale, l'intravasation, la circulation et l'extravasation, sont des mécanismes observés dans des conditions physiologiques normales, telles que lors de l'inflammation et le recrutement des cellules du SI [349]. Ici, nous ne parlerons que de l'intravasation hématogène des cellules tumorales.

L'intravasation est contrôlée par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques (Figure 49 [350]). Les facteurs intrinsèques concernent les cellules cancéreuses qui doivent posséder la capacité d'invasion et de sécrétion de protéases. Les facteurs extrinsèques concernent la présence de cellules du microenvironnement facilitantes telles que les macrophages M2, les TECs et les fibroblastes. Par exemple, il a été montré que la suppression des TAMs dans le cancer du sein inhibait la formation de métastases dans un modèle de tumeur murin. En effet, les macrophages sécrètent de l'EGF, attirant les cellules cancéreuses, qui à leur tour stimulent les macrophages en sécrétant du CSF-1 (Colony-stimulating factor 1). Cela crée une boucle paracrine facilitant l'invasion des cellules cancéreuses vers les vaisseaux [351]. De plus, les cellules endothéliales peuvent sécréter du CXCL12 en cas de situation hypoxique. L'hypoxie induisant aussi l'expression de CXCR4 à la membrane des cellules cancéreuses, l'activation de cette voie de signalisation va donc faciliter le recrutement et l'intravasation, en particulier de cluster tumoraux hypoxiques [315].

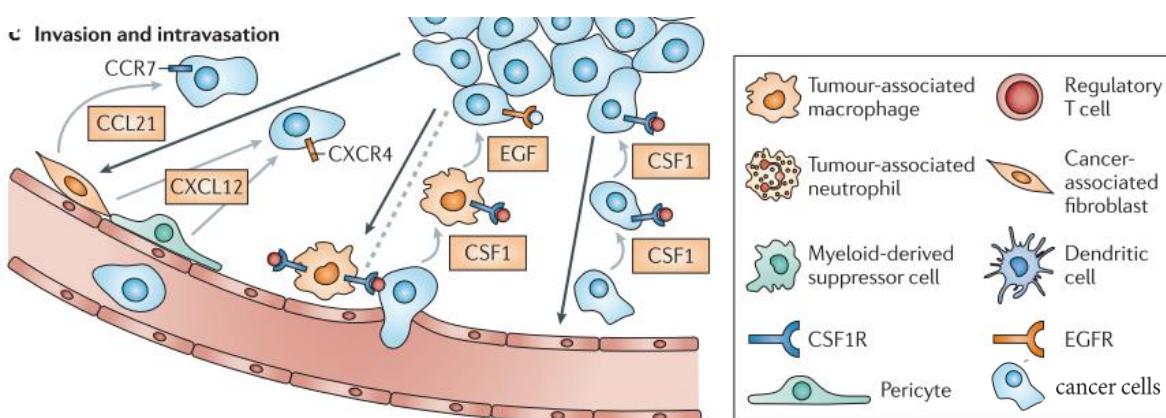


Figure 49 : Mécanismes et acteurs impliqués dans l'invasion et l'intravasation des cellules cancéreuses. Les fibroblastes et les péricytes près des vaisseaux sécrètent des cytokines afin d'attirer les cellules cancéreuses. Les macrophages sécrètent aussi de l'EGF pour attirer les cellules cancéreuses, qui en retour, sécrètent du CSF-1 en direction des macrophages, induisant une collaboration permettant l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux. *EGF : Facteur de croissance épithéial, CSF : Colony-stimulating factor.*

Une fois que les cellules cancéreuses sont proches de la circulation, elles vont former des invadopodes leur permettant de dégrader la membrane basale (MB), conjointement avec l'aide des TAMs et des CAFs, qui sécrètent les MMPs 2 et 9 [315]. Une fois un passage dans la MB ouvert, les cellules cancéreuses vont étendre des filopodes entre les cellules endothéliales pour atteindre la lumière du vaisseau. En fait, les cellules cancéreuses, grâce à des mécanismes qui ne sont pas encore pleinement compris, vont se faufiler entre les cellules endothéliales, sans perturber complètement le mur endothérial, afin d'entrer dans la circulation. Il est néanmoins observé des fuites de l'intima capillaire [313]. Vous l'aurez compris, l'intravasation est donc évidemment favorisée par une vasculature perméable anormale possédant des défauts dans ses jonctions serrées [315].

Certains récepteurs sur les cellules cancéreuses ont plus particulièrement été démontrés comme impliqués dans l'intravasation. Par exemple, Lau et al. ont démontré que les cellules du cancer du sein avaient besoin du complexe c-Met/Intégrine $\beta 1$ à la membrane pour intravaser. Cela reflète la capacité des cellules cancéreuses à se lier aux cellules endothéliales, ce qui va servir de point d'ancrage à la cellule tumorale pour entrer dans la circulation [352]. Dans le cadre du CRCC, il a été montré que l'inhibition du récepteur des prostaglandines EP4 inhibait l'intravasation tumorale. En fait, lorsqu'EP4 est stimulé, il induit l'expression de CD24 à la surface des cellules cancéreuses qui est le ligand de la protéine d'adhésion P-sélectine exprimé par les cellules endothéliales. Le complexe d'ancrage CD24-/P-sélectine est donc impliqué dans l'intravasation tumorale des CRCC [353]. Enfin, une étude clinique sur 42 patients atteint de CRCC a montré que des fragments tumoraux entiers, contenant des cellules tumorales, du microenvironnement et même endothéliales, étaient retrouvés dans les veines rénales pour 33% des patients et que la présence de ces fragments était corrélée avec la présence ou le développement métachrone de métastases pulmonaires [354]. Cela semble démontrer que l'intravasation par cluster augmenterait la probabilité de survie des cellules cancéreuses dans la circulation et donc le potentiel métastatique.

Pour conclure, plusieurs mécanismes d'intravasation ont été observés, tels que l'invasion par cellule unique, par clusters tumoraux proches de la circulation ou encore l'intravasation coopérative pour laquelle une cellule non-tumorale « ouvre la voie ». Néanmoins, les acteurs protéiques impliqués dans la régulation de ces mécanismes sont encore peu connus. Il serait intéressant de les étudier afin de trouver des stratégies thérapeutiques évitant l'intravasation.

2.5. La survie dans la circulation

La survie dans la circulation sanguine est l'étape qui succède à l'intravasation. Dans ce cadre, on appelle alors les cellules cancéreuses des Cellules Tumorales Circulantes (CTCs). Elles sont la graine des métastases distantes. Les CTCs doivent survivre dans la circulation et il est intéressant de savoir que seul 0.01% des CTCs seront capables de former des métastases [355]. En effet, les conditions de vie dans la circulation sont extrêmement éprouvantes pour les cellules. Les CTCs doivent résister au flux sanguin et aux contraintes mécaniques associées, à l'anoïkose due à la perte d'ancre ainsi qu'à la surveillance immunitaire [356]. Pour faire face à l'anoïkose par exemple, il a été démontré que les cellules maintenaient un stade de TEM en sécrétant du TGF- β ainsi qu'en exprimant fortement HIF-1 α afin d'induire une reprogrammation métabolique leur permettant de survivre [315]. De plus, les CTCs coopèrent entre elles et avec les cellules du système immunitaire afin de se protéger. Par exemple, les CTCs se lient entre elles via CD44 afin de former des clusters plus résistants, qui ont par ailleurs été démontrés comme ayant une capacité métastatique accrue [357]. Les cellules immunitaires qui favorisent la survie des CTCs sont les plaquettes et les neutrophiles. Plusieurs études ont démontré que les plaquettes en particulier, formaient une structure autour des CTCs, permettant de les protéger des contraintes de cisaillement [356]. Quant aux neutrophiles, ils augmenteraient la capacité des CTCs à former des métastases. Plus particulièrement, l'interaction ICAM-1/Mac-1 (CTC/Plaquette) a été démontrée comme impliquée dans la migration trans-endothéliale permettant aux CTCs de coloniser un organe distant [358]. A l'inverse, les cellules NK sont souvent associées à la mort des CTCs, par exemple via le ligand FAS qui induit l'apoptose des CTCs [359]. Globalement, ce sont toutes ces interactions ainsi que les modifications métaboliques que subissent les CTCs qui leur permettront de survivre et de potentiellement coloniser un nouvel organe.

Les chercheurs se sont beaucoup intéressés aux CTCs ces dernières années, en particulier dans le cadre du diagnostic. Leur détection par simple prise de sang permettrait un diagnostic plus précoce de beaucoup de cancers solides pas encore visibles en imagerie et donc un traitement plus efficace. Cela permet par la même occasion de détecter les marqueurs présents et donc de décider du plan thérapeutique le plus adapté au patient. Il existe différentes méthodes de détection et d'amplification des CTCs comme l'immunocytotomie, la PCR ou encore la cytométrie en flux [355]. Récemment, In't Veld et al. ont aussi démontré qu'on pouvait

discriminer 18 types de cancer solide grâce à l'ARN des plaquettes circulantes, puisqu'elles seraient éduquées par les CTCs. C'est une grande avancée puisque la quantité de plaquettes dans le sang est bien supérieure au nombre de CTCs et permettrait donc d'augmenter la fiabilité des tests avec une faible quantité de sang [360].

D'un point de vue du pronostic, la présence de CTCs dans le sang est généralement un facteur de mauvais pronostic. Par exemple dans le cancer du sein, il a été montré que les patients ayant plus de 5 CTC pour 7,5 mL de sang avaient un temps sans progression et une survie réduite [361]. Pour le CRCC, 4 études ont montré un lien entre la présence de CTCs et une diminution de la survie quand 2 autres n'ont pas démontré de corrélation [355]. Enfin, comme énoncé dans la partie précédente, la présence de fragments tumoraux dans la circulation pour les patients atteint de CRCC, même s'ils sont plus rares que les cellules uniques, augmentent grandement le risque d'avoir des métastases [354].

Pour conclure, la capacité des CTCs à produire des métastases dépend de leur capacité à survivre dans la circulation sanguine en s'aidant des cellules du sang, mais aussi de leur capacité à s'attacher aux parois des vaisseaux et à extravaser la circulation en direction d'un nouvel organe.

2 . 6 . Extravasation

L'extravasation est le processus par lequel une CTC est capable de sortir de la circulation pour aller vers un organe. Aucune stratégie thérapeutique n'a encore été mise en œuvre pour contrer cette étape contrairement à toutes les autres. Pour cause, c'est une des étapes la plus difficile et par conséquent la moins étudiée. Les connaissances sur les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore limitées. Cette étape requiert l'adhésion des CTCs au cellules endothéliales dans un contexte de flux important suivi de leur transmigration en direction du tissu. Les premières études consistaient en trois couches successives de gélatine, cellules endothéliales et cellules cancéreuses pour étudier les interactions. Cette technique a ensuite évolué avec l'utilisation des chambres de Boyden pour étudier la chimio-attraction. Néanmoins, ces techniques sont limitantes puisqu'on ne peut recréer les structures 3D et les contraintes de flux continu que subissent les CTCs. En parallèle, certains ont étudié l'extravasation *in vivo* à l'aide de modèles comme la souris, le poisson zèbre ou encore la membrane chorioallantoïde de poulet, mais qui posent des questions éthiques et dans lesquels la compréhension mécanistique est limitée. Récemment grâce à l'avènement de la

microfluidique, les chercheurs ont réussi à recréer des structures endothéliales perfusées sur puce, permettant d'étudier les interactions dans des conditions mécaniques et biologiques comparables à une vasculature humaine. Ces nouveaux systèmes sont donc un espoir pour la compréhension de cette étape cruciale et pour la découverte de nouveaux traitements [362].

De manière plus mécanistique, l'extravasation débute par l'adhérence des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales dans le lumen (Figure 50 [362]).

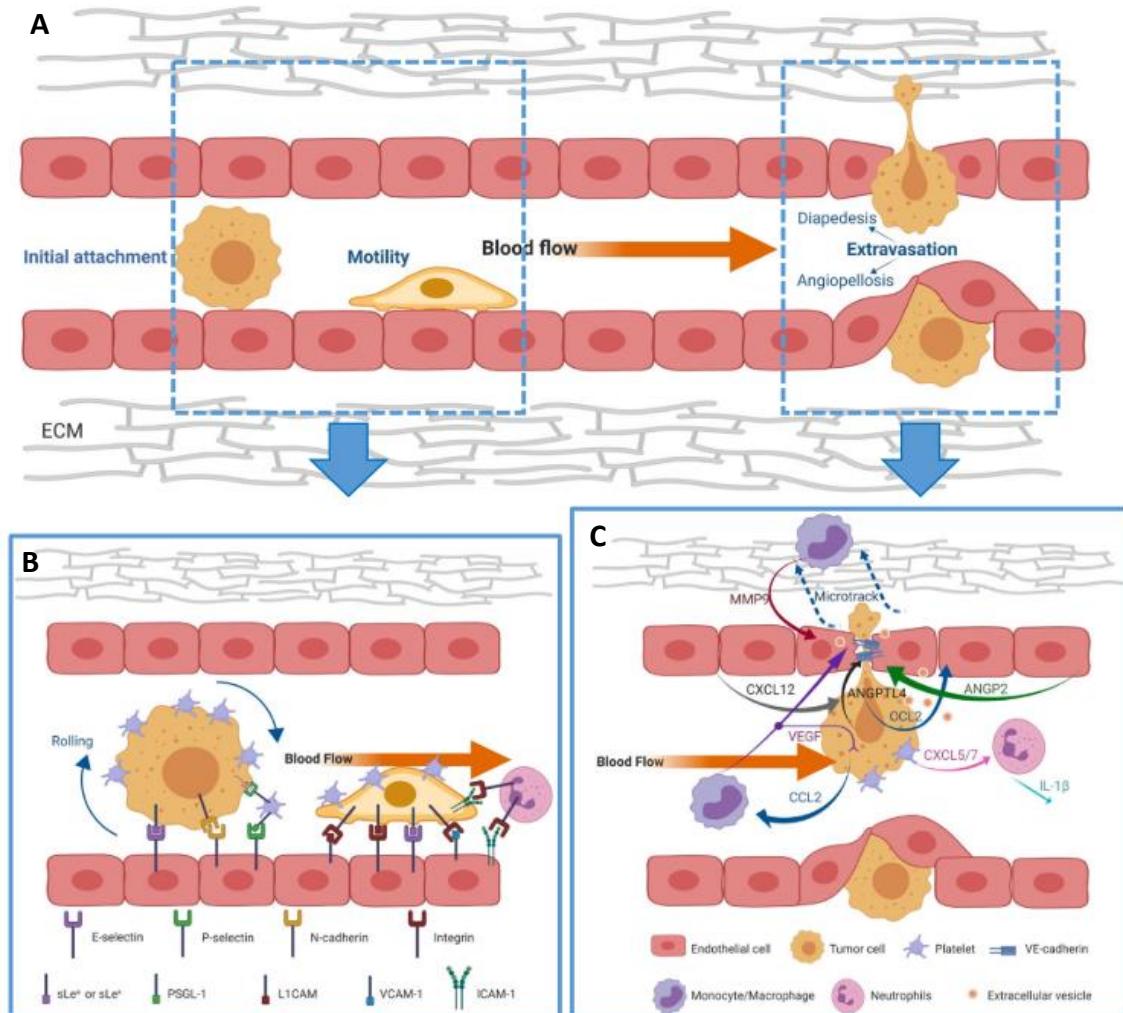


Figure 50 : Etapes de l'extravasation et les principaux acteurs. A : Etapes de l'extravasation : adhésion, mobilité sur la paroi interne vasculaire et extravasation par diapédèse ou angiopellose. B : Les molécules d'adhésion cellulaire (sélectines, N-cadherines, intégrines) médient l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium, et sont aidés par les plaquettes et les neutrophiles. C : Les cellules cancéreuses forment des protubérances (invadopode) pour transmigrer la barrière endothéliale. De multiples facteurs de croissance, chimiokines, protéases et vésicules extracellulaires sont sécrétés par les cellules cancéreuses ou les leucocytes associés afin de faciliter la migration transendothéliale en perturbant l'intégrité du vaisseau.

Pour cela, les CTCs s'aident des plaquettes et des neutrophiles. Les CTCs vont sécréter des cytokines, tel que le TNF- α et l'IL-1 afin d'induire l'expression des sélectines, qui sont des molécules d'adhésion, à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales. Les plaquettes

vont donc agir comme un lien ou un pont entre les cellules cancéreuses et endothéliales et permettre leur attachement à la paroi vasculaire. Par la suite, les cellules cancéreuses vont elles-mêmes s'attacher aux cellules endothéliales via les sélectines exprimées sur les cellules endothéliales, en exprimant leur ligand comme PSGL-1 par exemple. Ce sont ensuite les intégrines, par exemple $\alpha 4\beta 1$, exprimés sur les CTCs, qui vont renforcer l'ancrage aux cellules endothéliales en se liant au ligand VCAM-1 (pour vascular cellular adhesion molecule 1). Cela permet aux cellules cancéreuses de migrer le long de la paroi vasculaire [363], [364].

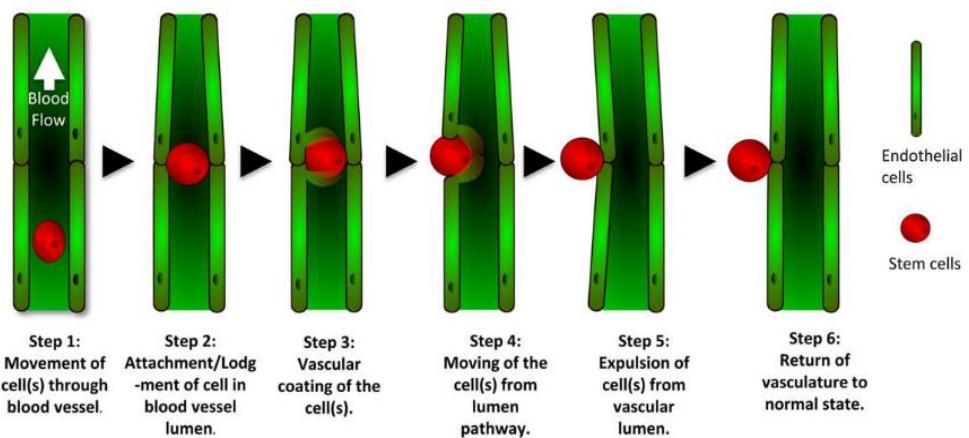


Figure 51 : Les étapes de l'angiopellose. Les cellules s'attachent à la paroi vasculaire interne puis sont recouvertes par les cellules endothéliale. Les cellules endothéliales vont pousser la cellule cancéreuse hors du vaisseau afin de l'expulser de la lumière. La cellule se retrouve dans le tissu et le vaisseau retourne à son état d'origine.

La seconde étape correspond à la sortie de la circulation sanguine. Pour cela, les cellules utilisent la diapédèse ou l'angiopellose [362]. Lors de la diapédèse, les cellules, comme lors de l'intravasation, vont former un invadopode pour passer entre les cellules endothéliales en poussant les jonctions serrées. Les cellules vont donc moduler la perméabilité de la paroi et sécréter des MMPs afin de remodeler la MEC derrière les cellules endothéliales afin de coloniser le tissu [365]. Cette étape se fait en coopération avec les macrophages, les neutrophiles et les plaquettes, qui appuient la sécrétion cytokinique des cellules cancéreuses amenant à l'extravasation. L'angiopellose est un mécanisme d'extravasation découvert récemment en 2017 par Allen et al., qui nécessite le remodelage de la paroi vasculaire. En fait, les cellules cancéreuses vont induire un remodelage des cellules endothéliales qui vont englober la cellule cancéreuse fixée à la paroi. Ces cellules endothéliales vont ensuite pousser et expulser la cellule cancéreuse hors du vaisseau en direction du tissu (Figure 51 [366]). Ce mécanisme est très intéressant car, contrairement à la diapédèse qui est un mécanisme à cellule unique, l'angiopellose permettrait à des cluster entiers de CTCs de pénétrer en une

seule fois dans un tissu [366]. Ceci expliquerait alors le fait que les clusters de CTCs aient une capacité métastatique plus grande, car en colonisant un tissu à plusieurs, elles ont plus de chance de former une métastase.

Ces dix dernières années auront donc permis de comprendre plus amplement les mécanismes sous-jacent à l'extravasation en particulier via la découverte de l'angiopellose pouvant expliquer l'agressivité des clusters tumoraux circulants, sans oublier le fait que ça leur confère une résistance accrue dans la circulation. Néanmoins, l'extravasation reste un processus complexe et il est encore difficile d'expliquer quels évènements poussent les CTCs à s'attacher aux cellules endothéliales en un endroit précis du corps. Comprendre la mécanique et découvrir de nouveaux traitements semble néanmoins envisageable aujourd'hui. En effet, les puces microfluidiques permettent de recréer les conditions physiologiques de l'extravasation tout en donnant la possibilité d'observer les mécanismes en microscopie haute résolution. Malgré tout, ces dispositifs nécessitent une grande expertise et des moyens financiers importants limitant leur application pour le criblage moléculaire haut contenu nécessaire à la découverte de nouveaux traitements performants [362].

2.7. Les niches métastatiques

Après des années d'études de cas cliniques, il ressort que chaque cancer a une préférence pour une série d'organes et que les métastases s'implantent souvent au même endroit. Dans le cas du cancer du rein, les organes préférentiels métastatiques sont le foie, les poumons et les os [367]. Ces préférences de sites ont d'ailleurs été étudiées *in vitro* avec l'utilisation des puces microfluidiques dans le cadre du cancer colorectal par exemple [368]. Cela a suscité nombre de questions dans la communauté scientifique, se demandant pourquoi certains organes étaient préférés par les cellules cancéreuses pour y former des métastases. C'est en 2005 que Kaplan et al. ont mis en lumière le concept de niche pré-métastatique. Ils ont démontré que des progéniteurs hématopoïétiques exprimant VEGFR1 étaient recrutés au futur site métastatique, formant des clusters et préparant le terrain pour accueillir les cellules cancéreuses [369]. En fait, la niche pré-métastatique est définie comme un environnement tissulaire favorable à l'arrivée des cellules cancéreuses. Cela est rendu possible grâce à des modifications moléculaires et cellulaires rendant le « sol » fertile, c'est-à-dire l'organe récepteur, pour les « graines » que sont les cellules tumorales [370]. Dans cette partie seront

détaillés les 4 étapes qui permettent la préparation des sites distants menant à la formation de macro-métastases. Ces étapes sont illustrées dans la Figure 52 [370].

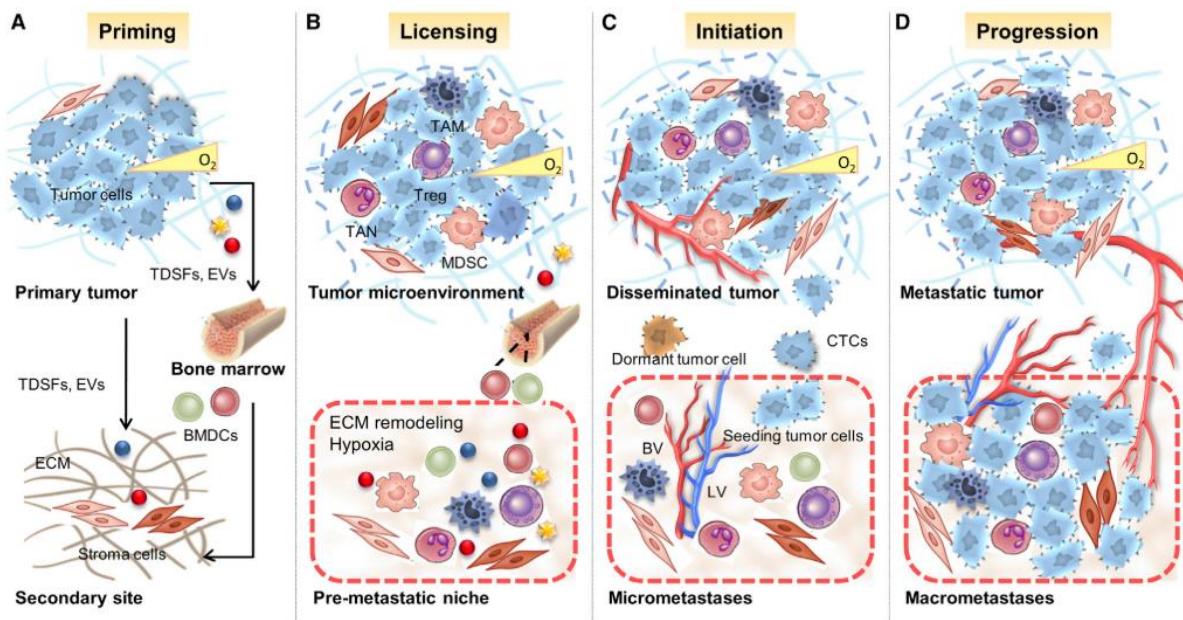


Figure 52 : Etapes de la préparation des niches pré-métastatiques jusqu'à la formation de métastases. **A :** Phase d'amorçage : La tumeur primaire sécrète des facteurs solubles et vésicules en direction d'un site secondaire, ou sont aussi recruté des cellules immuno-suppressives. **B :** Phase d'autorisation : La niche pré-métastatique subi un remodelage de son microenvironnement matriciel et cellulaire, préparant l'arrivée des cellules cancéreuses. **C :** Phase d'initiation : Les premières cellules tumorales circulantes (CTCs) arrivent dans la niche pré-métastatique, formant des micro-métastases, souvent quiescentes. **D :** Phase de progression : Les cellules tumorales métastatiques prolifèrent et continuent d'arriver et forment alors une métastase. *BMDC* : Cellules dérivées de la moelle osseuse ; *EV* : Vésicules extracellulaires ; *MDSC* : Cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde ; *TAM* : Macrophages associés à la tumeur ; *ECM* : Matrice extracellulaire

La phase d'amorçage – Sécrétion et Recrutement

Les niches pré-métastatiques sont préparées en amont par la tumeur primaire grâce à la sécrétion de facteurs solubles, de vésicules extracellulaires (EVs) comme les exosomes, au recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) ou encore grâce à l'appui des cellules résidentes (Figure 52 A) [371]. La préparation des niches débute quand la tumeur primaire devient hypoxique et inflammatoire. Elle va alors sécréter des facteurs solubles et des EVs en direction d'un site secondaire ainsi qu'en direction de la moelle osseuse pour recruter des BMDCs comme par exemple les MDSCs qui sont immuno-suppressives [370]. C'est une étape cruciale afin de démarrer la préparation des organes récepteurs, qui est spécifique pour chaque organe. En effet il a été montré que des exosomes portant les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 6\beta 1$ induisait une inflammation, une modification de la MEC et des fibroblastes résidents dans le poumon et que cela favorisait l'implantation métastatique pulmonaire [372], [373].

Etonnamment, les exosomes portant l'intégrine $\beta 4$ en particulier, n'étaient pas retrouvés chez les patients sans métastases ou ayant des métastases au foie démontrant la spécificité des EVs pour l'organe récepteur [374].

Il semble en fait exister de multiples scénarios sécrétoires pour la préparation des niches pré-métastatiques, dépendant de la tumeur d'origine et des sites visés, avec des actions parfois contradictoires. D'ailleurs les cytokines peuvent avoir des rôles différents en fonction de l'organe récepteur et du type de cancer. En effet, il a été montré que la cytokine CXCL5, dont le récepteur est CXCR2, inhibait la formation de métastases pulmonaires dans le cancer du rein [375]. Au contraire, CXCL5 favorise la formation de métastases osseuses dans le cancer du sein [376]. Néanmoins, certains axes sécrétoires semblent plus ubiquitaires, sinon indispensables, à la formation de métastases, comme c'est le cas pour l'axe CXCL12/CXCR4 qui favorise les métastases osseuses et pulmonaires dans plusieurs types de cancers [377], [378]. L'amorçage des niches pré-métastatiques consiste donc en une fine régulation du sécrétome de la tumeur primaire et du microenvironnement de l'organe récepteur.

La phase d'autorisation – Remodelage et Immunomodulation

La seconde étape correspond à la phase d'autorisation (Figure 52 B), c'est-à-dire qu'elle permet au site secondaire de devenir une niche pré-métastatique permissive à l'arrivée et la colonisation par les cellules cancéreuses. Pendant cette phase, les BMDCs arrivent au site secondaire et il s'en suit une mobilisation de cellules immunitaires suppressives induisant un remodelage de la MEC et une hypoxie.

Par exemple dans le foie, les exosomes portant de l'EGFR sont capables de cibler les cellules de Kupffer, les macrophages spécialisés du foie. Les cellules de Kupffer peuvent donc être retournées en faveur de la tumeur et peuvent sécréter du TGF- β [379], induisant le dépôt de fibronectine qui facilite la colonisation métastatique. En effet, les cellules souches cancéreuses agressives portent souvent le récepteur CD44 qui a une grande affinité pour la fibronectine. De plus, CD44 permet l'assemblage de matrice soluble qui appuie l'action des exosomes sur les cellules cibles dans la niche pré-métastatique [372]. Cette étape comprend aussi le recrutement de cellules immunitaires suppressives tel que les LyT régulateurs, les MDSCs et les macrophages M2, et l'inhibition des cellules immunitaires anti-tumorales tel que les LyT cytotoxiques et les NK. Plus précisément, le recrutement des MDSCs induit la sécrétion

de cytokines immunsuppressives telles que le TGF- β et l'IL-10 induisant la polarisation des lymphocytes T en LyT reg et Th2 et la dysfonction des LyT cytotoxiques [372].

Ces différentes interactions entre les exosomes, la MEC et les cellules de l'environnement « fertilisent » l'organe cible en vue de l'arrivée et la colonisation par les CTCs.

La phase d'initiation – Formation de micro-métastases

La troisième étape correspond à l'initiation (Figure 52 C). Elle est concordante à la circulation des CTCs dans les vaisseaux et à l'extravasation des premières CTCs dans la niche pré-métastatique, et donc à la formation de micro-métastases. Pendant cette étape, la niche métastatique facilite l'extravasation des CTCs permettant la colonisation de l'organe cible.

Afin de faciliter l'extravasation des CTCs, il est noté une augmentation de l'hypoxie et donc de l'expression de HIF-1 par les cellules résidentes, ce qui augmente le chimiotactisme des CTCs pour la niche [370]. De plus, il a été montré dans le cancer du rein que les cellules souches cancéreuses sécrétaient des EVs exprimant le marqueur de cellules souches CD105, aussi exprimé par les cellules endothéliales, qui induit l'angiogenèse dans l'organe cible. Les néovaisseaux, plus perméables, permettent donc une colonisation facilitée par les CTCs [380]. De plus, l'expression de marqueurs spécifiques par les cellules cancéreuses leur confère un tropisme pour certains organes facilitant leur arrivée dans la niche. Par exemple dans le cancer du sein, il a été montré que les cellules possédant le récepteur aux œstrogènes (ER+) augmentaient leur tropisme et facilitaient la colonisation des os contrairement aux cellules ER- [378].

Un autre facteur important dans le tropisme des cellules cancéreuses pour un organe donné semble aussi être leur capacité à modifier leur métabolisme. Dupuy et al. ont démontré que les cellules du cancer du sein utilisant la phosphorylation oxydative comme source d'énergie allaient préférentiellement métastaser dans les poumons et l'os. Au contraire, les cellules utilisant majoritairement la glycolyse métastaseront dans le foie [381].

Hormis la composante chimio-attractrice, un des paramètres majeurs favorisant la colonisation de certains organes est la capacité des cellules cancéreuses à s'accrocher au bon endroit dans la circulation sanguine. Par exemple, les CTCs exprimant à leur surface la glycoprotéine du Golgi 1 (Glg1) vont avoir une préférence métastatique pour l'os. En effet, les cellules

endothéliales de la moelle osseuse, contrairement à celles des poumons et du foie, expriment l'E-sélectine, le récepteur du ligand Glg1. La liaison des CTCs à l'E-sélectine va donc favoriser la métastase osseuse ainsi que la transition mésenchymo-épithéliale (TME) conférant un caractère souche aux cellules cancéreuses, favorisant l'implantation métastatique [382]. La capacité d'adhésion et d'extravasation peut aussi être conférée par les paramètres physiologiques de l'organe. Par exemple, le fait que le foie soit un des organes favoris des métastases distantes n'est pas un hasard. Premièrement, il reçoit un double flux sanguin par la veine porte et la veine hépatique, ce qui augmente les chances des CTCs d'entrer dans le réseau vasculaire hépatique, particulièrement en cas de cancer gastrique et colorectal. Deuxièmement, le gradient de pression sanguine est beaucoup plus faible que dans les autres organes, augmentant les chances des CTCs d'adhérer aux parois des vaisseaux. Enfin, les parois vasculaires du foie sont fenestrées et donc potentiellement plus permissives à l'extravasation [372], [378].

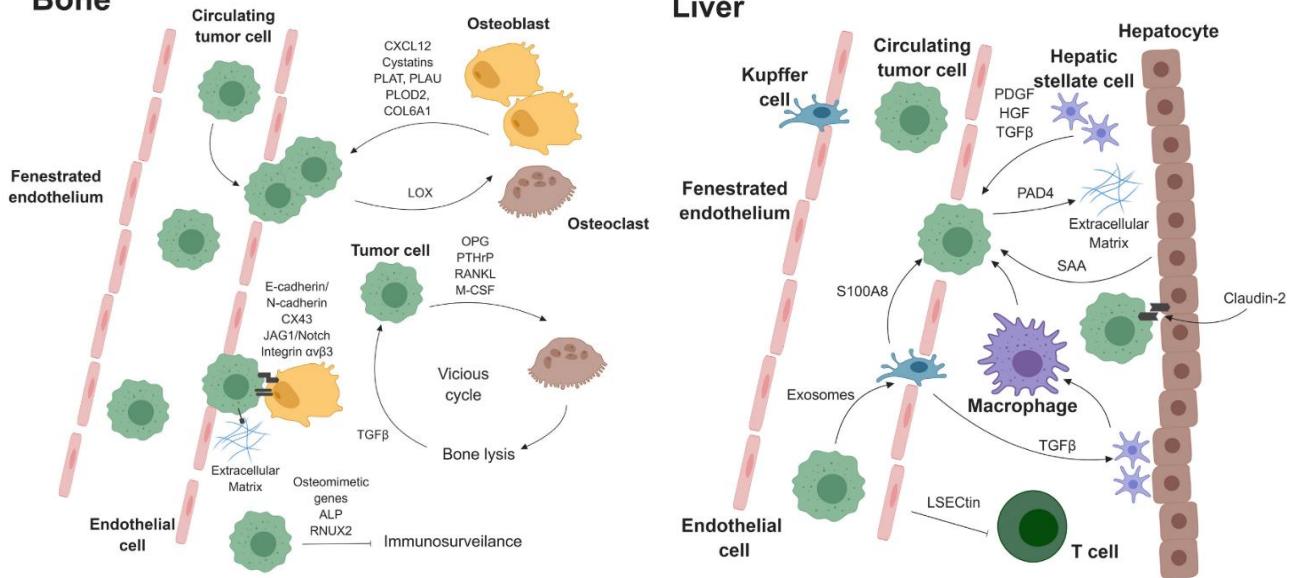
L'étape d'initiation correspond donc à la formation de micro-métastases, c'est à dire l'entrée des CTCs dans les organes distants. Elle est régulée par de nombreux paramètres : chimio-attraction, capacité d'adhésion, d'extravasation et de reprogrammation métabolique mais aussi capacité de survie dans l'organe récepteur. Lors de cette étape, il se peut que la niche ne soit pas encore tout à fait favorable à la prolifération des cellules cancéreuses, par exemple à cause de la présence de cellules immunitaires compétentes anti-tumorales. Dans ce cas, la niche régule leur dormance jusqu'à ce que le microenvironnement leur soit favorable et qu'elles puissent proliférer de nouveau afin de former une macro-métastase [370].

La phase de progression – Formation de macro-métastases

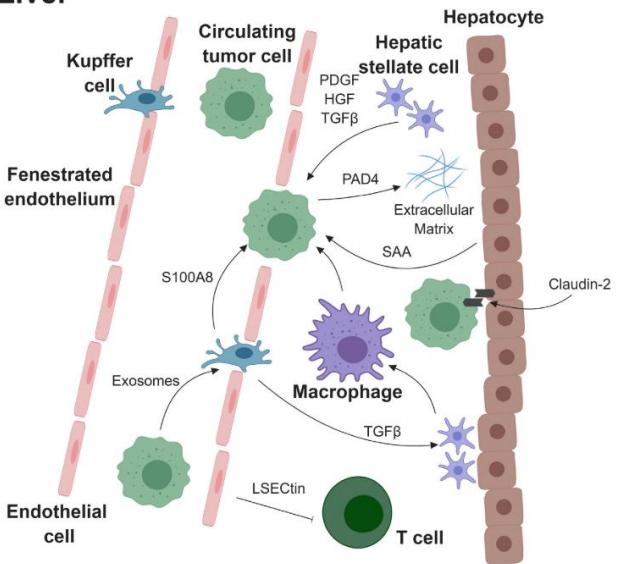
La phase de progression correspond à l'augmentation du nombre de cellules arrivant dans la niche métastatique depuis la tumeur primaire. Cela peut aussi correspondre à la prolifération des cellules cancéreuses qui sont déjà infiltrées dans le tissu. Afin de s'étendre et de former une nouvelle masse tumorale, les cellules cancéreuses interagissent directement avec les cellules de l'environnement. Dans l'os par exemple, les cellules cancéreuses sont capables de mimer les ostéoblastes en exprimant des gènes caractéristiques de l'os tel que l'ALP ou RUNX2. Cela leur permet d'échapper à la surveillance immunitaire. De plus, les cellules cancéreuses activent les ostéoclastes afin qu'ils lysent l'os afin de leur faire de la place (Figure

53, Bone [378]). Dans le foie, les cellules cancéreuses interagissent avec les hépatocytes via la Claudine 2 pour former des jonctions cellulaires ce qui promeut leur installation.

Bone



Liver



Lung

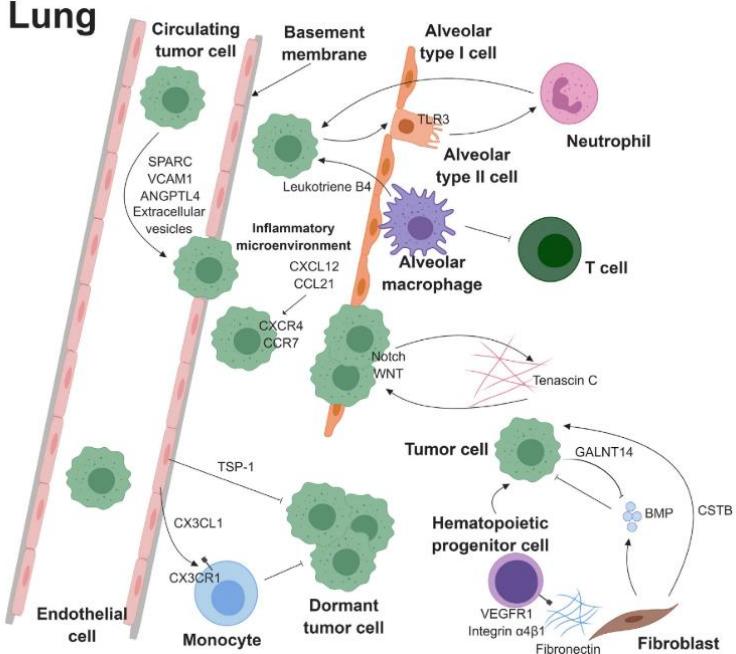


Figure 53 : Interaction des cellules cancéreuses avec les cellules de l'os, du foie et des poumons. **Os :** La formation d'une niche métastatique osseuse est favorisée par la sécrétion de cytokines et la lyse osseuse, qui favorisent l'attraction et la croissance tumorale. Aussi grâce aux interactions directes des cellules tumorales et des ostéoblastes via les cadhérines et intégrines, et à l'expression de gène ostéomimétiques par les cellules tumorales, ce qui leur permet d'échapper à la surveillance immunitaire. **Foie :** La formation d'une niche métastatique dans le foie est favorisée par la sécrétion de cytokines par les cellules stellaires hépatiques et par les interactions directes des cellules cancéreuses avec les hépatocytes grâce à la Claudine-2. Par ailleurs, la stimulation des cellules de Kupffer par les cellules cancéreuses via les exosomes, induit la sécrétion de TGF- β , qui active les cellules stellaires hépatiques favorisant les métastases au foie. **Poumons :** La formation d'une niche métastatique pulmonaire est favorisée par la sécrétion de cytokines pro-tumoriales dans les poumons (CXCL12) et la suppression de la réponse immunitaire lymphocytaire, via l'activation de macrophages pro-inflammatoires. Par ailleurs, les fibroblastes sécrètent des cytokines permettant la survie des cellules cancéreuses sur site.

Les cellules cancéreuses s'aident aussi des cellules stellaires hépatiques afin qu'elles sécrètent des cytokines immuno-suppressives et qu'elles remodèlent la MEC (Figure 53, Liver [378]). Enfin dans les poumons, les macrophages alvéolaires sécrètent des molécules pro-inflammatoires pour supprimer la réponse lymphocytaire ce qui facilite l'installation des cellules cancéreuses. Les fibroblastes sécrètent aussi de la cathepsine B (CSTB) qui promeut la survie des cellules cancéreuses (Figure 53, Lung [378]) [378].

L'installation et la prolifération des cellules cancéreuses dans les organes cibles est donc très spécifique et dépend des interactions avec les cellules spécialisées résidentes. Néanmoins, il semblerait que l'os soit un réservoir à métastase possédant des caractéristiques particulières. En effet de façon assez étonnante, Zhang et al. ont récemment démontré que le microenvironnement osseux permettait aux cellules métastatiques du cancer du sein et de la prostate de repartir et d'aller métastaser dans d'autres sites métastatiques secondaires. En fait, une fois arrivées dans l'os, les cellules cancéreuses subiraient une reprogrammation épigénétique qui leur confèreraient des propriétés de cellules souches avec une plasticité accrue. Cette reprogrammation permettrait donc d'augmenter la capacité métastatique de ces cellules dans d'autres organes tel que le foie, les poumons et le cerveau [383]. De la même manière, Bado et al. ont démontré que l'os augmentait plasticité et le caractère souche des cellules cancéreuses du sein en réduisant l'expression du récepteur aux œstrogènes de façon transitoire. Ces modifications seraient responsables de la résistance aux traitements [384].

Il semble donc primordial d'étudier les modifications que subissent les cellules cancéreuses dans les organes métastatiques afin de trouver de nouveaux traitements efficaces contre les métastases. Ces dernières années avec les progrès technologiques, les chercheurs se sont attelés à développer des modèles *in vitro* reproduisant l'environnement de ces organes. Par exemple, avec la culture de sphéroïdes de lignées sur puce pour comprendre la préférence de site [368] ou étudier la capacité migratoire et de colonisation d'un organe cible en particulier [385]. D'autres ont reproduit l'environnement d'organes cibles à partir de poudres d'organes décellularisés de foie et de poumon afin de faire pousser des métastases à partir de lignées cellulaires modifiées [386]. De la même manière Lü et al. ont utilisés des coupes de tissus décellularisés pour cultiver des cellules cancéreuses dans un environnement plus proche de leurs conditions de vie physiologique [387]. A terme ces modèles seront utiles afin de comprendre les mécanismes mis en jeu par les cellules cancéreuses pour s'installer et

proliférer ainsi que pour étudier les modifications et mutations qu'elles subissent au cours du processus métastatique. A grande échelle, certains modèles pourront aussi servir au criblage de nouvelles molécules ciblant les caractéristiques des cellules métastatiques.

Pour conclure cette partie, le processus métastatique est complexe et dépend de beaucoup de facteurs dont les évolutions mutationnelles et épigénétiques, l'environnement tumoral et des organes cibles, de la capacité des cellules à survivre dans la circulation ou encore des modifications métaboliques cellulaires. Afin de mieux comprendre ces étapes, l'un des défis est de reproduire *in vitro* la complexité d'une tumeur primaire et des compartiments métastatiques potentiels. Pour cela, la recherche a beaucoup évolué et est passée des simples modèles de culture cellulaire en 2D à l'élaboration de modèles beaucoup plus complexe grâce aux organoïdes, aux tumoroïdes et à la culture d'explants. Ces modélisations ont aussi été rendues possible grâce à la technologie des puces microfluidiques. Dans la partie suivante, nous parlerons de ces évolutions et de l'utilité de ces modèles dans le cadre de l'étude du processus métastatique.

3 . De la culture en 2D à la modélisation tumorale complexe

3 . 1 . Histoire de la culture cellulaire

La culture cellulaire permet de décortiquer les mécanismes biologiques fondamentaux par lesquels les cellules s'assemblent en tissus, comment elles fonctionnent et dysfonctionnent en cas de maladie. La communauté scientifique à tenter de cultiver des cellules en culture à partir de la fin du 19^e siècle, sans grand succès. C'est en 1907 que Ross Granville Harrison démontra qu'il était possible de cultiver des tissus en dehors du corps. Il cultiva des explants de neuroblastes de grenouille dans du plasma coagulé, ce qui fut le début de la culture d'explants appelée aujourd'hui culture organotypique, ainsi que le début de la recherche sur les cellules souches [388]. En 1912 le prix Nobel et chirurgien français Alexis Carrel réussit à maintenir en culture des cellules de cœur de poulet à partir d'explants. Ces cultures ont été conservées jusque dans les années 1940 dans le laboratoire mais aucun scientifique n'a jamais réussi à reproduire ces expériences, se demandant si les cellules vivantes ne venaient pas en réalité de la solution nutritive qui était appliquée sur la culture [389], [390]. C'est en 1951 qu'il y eu une véritable avancée avec la mise en culture des cellules cancéreuses d'Henrietta Lacks, aujourd'hui connues sous le nom de cellules HeLa. Ce fut la première lignée cellulaire immortalisée et beaucoup de travaux importants ont été effectués grâce à cette lignée [391]. Depuis les années 1950, beaucoup d'autres lignées cellulaires immortalisées ont été développées, principalement cancéreuses [392], mais aussi des cellules d'organes sains immortalisés artificiellement en laboratoire [393] ainsi que des cellules souches [394]. Depuis les années 50, la culture d'explants a donc été mise de côté au profit de la culture cellulaire de lignées immortalisées.

Depuis maintenant une centaine d'années, les cellules sont cultivées en laboratoire, et les techniques de culture en 2 dimension (2D) ont permis des avancées significatives dans notre compréhension des mécanismes biologiques, dû à leur simplicité d'utilisation. La culture 2D conventionnelle repose sur l'adhérence des cellules sur une surface plane, généralement du plastique, supportant la croissance grâce à des milieux riches en facteurs de croissance. Malheureusement, la culture 2D ne permet pas de contrôler la forme et la polarisation cellulaire, induit des changements transcriptionnels et morphologiques conséquents, qui déterminent les fonctions biologiques des cellules. La communauté scientifique a essayé de remédier à ces défauts, par exemple grâce à la conception de biomatériaux de surface,

permettant de moduler la forme, la rigidité et la composition des supports de culture. Néanmoins, ces supports ne permettent pas de reproduire entièrement la topographie en 3 dimension (3D) des cellules dans les tissus, leurs interactions avec le microenvironnement et par conséquent la complexité biologique des tissus [395]. Par exemple, la culture cellulaire en 2D ne tient pas compte du microenvironnement dans le développement et l'évolution tumorale, pourtant primordial comme nous l'avons détaillé plus haut.

Afin de remédier à ces limitations, la communauté scientifique a développé de nouveaux modèles cellulaires *in vitro* en 3D, comprenant les sphéroïdes, les organoïdes et les tumoroïdes. La définition et description de ces modèles seront détaillés dans les parties suivantes correspondantes. Ces dernières années, il y a eu aussi un retour et un perfectionnement de la culture d'explants, appelée aujourd'hui culture organotypique [396]. Néanmoins, les criblages de nouveaux traitements et les tests mécanistiques sont encore très largement effectués sur des cultures cellulaires en 2D, ce qui explique en partie le faible pourcentage de molécules toujours actives chez le patient. La nécessité d'utiliser ces nouveaux modèles est soulignée par le fait que le taux d'échec des médicaments testés dans les essais cliniques reste extrêmement élevé. En effet, le taux de succès des essais cliniques de phase I à III dans le traitement du cancer n'est que de 3,4% [397].

Ces méthodes ont été permises grâce au développement simultané de technologies comme l'utilisation de matrice extracellulaire en culture, ainsi que grâce aux puces microfluidiques. En effet ce n'est qu'en 1956 que Ehrmann et Gey ont réussi à produire un gel de collagène I et le Matrigel n'a quant à lui été isolé qu'en 1977 par Orkin et commercialisé bien plus tard [398]. Il a fallu aussi attendre la caractérisation et l'identification des différents composants de la matrice extracellulaire des tissus, avec par exemple la découverte de la laminine en 1979 [398], afin de pouvoir espérer concevoir des matrices « sur mesure » spécifiques de chaque tissu. L'ingénierie cellulaire étant longue et souvent difficile, il a fallu attendre 2009 pour que Sato et al. développent les premiers organoïdes cultivés en Matrigel [399]. Ces méthodes ont démontré que la structure 3D et la matrice extracellulaire avait un impact significatif sur la différenciation, la prolifération, la mécano-transduction et la survie cellulaire, important dans le développement et le devenir cellulaire [395]. Dans les parties qui suivent seront détaillés ces différents modèles et technologies, ainsi que leur utilité dans la compréhension du cancer et plus largement des maladies.

3 . 2 . La culture cellulaire 3D

La culture cellulaire 3D a pris une place importante dans la recherche ces dernières années mais aucune nomenclature officielle n'est venue accorder la communauté scientifique pour identifier les différents modèles. Par exemple, Lugand et al. nomment « sphéroïde » tant des cultures 3D produites à partir de lignées cellulaires qu'à partir de cellules de patients, bien qu'il y ait une forte distinction d'origine et de composition entre les deux modèles [400]. La différence entre ces modèles 3D est définie par la source cellulaire qui les composent ainsi que leur capacité d'auto-structuration. Dans cette partie nous détaillerons ces différents modèles et les méthodes pour les produire.

3 . 2 . 1 . Les sphéroïdes

Les sphéroïdes correspondent à la culture en 3D de lignées cellulaires différencierées primaires [401] ou secondaires [158]. Les lignées primaires sont souvent utilisées pour produire des sphéroïdes d'organe sains ou avec des mutations particulières. Par exemple, des sphéroïdes produits à partir de cellules primaires de foie ont permis d'étudier la toxicité de diverses molécules et son impact sur la fibrose et l'inflammation [402]. Les sphéroïdes tumoraux sont quant à eux souvent produits à partir de lignées cellulaires secondaires. C'est le cas de plusieurs études utilisant des lignées de CRCC par exemple [81], [158], [400], [403]. Ils peuvent aussi être formés à partir de plusieurs lignées cellulaires, dans ce cas, il s'agit de la co-culture de sphéroïde. Par exemple l'assemblage de cellules cancéreuses avec des cellules immunitaires [404].

Aujourd'hui, plus de 380 lignées cellulaires ont été cultivées sous forme de sphéroïdes. La culture de sphéroïdes à partir de lignées permet d'avoir accès à un matériel cellulaire constant et homogène tout en se rapprochant des conditions physiologiques, contrairement à la culture 2D. En effet, en 3D les cellules s'organisent et forment des contacts cellules-cellules et cellules-MEC. Le modèle 3D reproduit aussi la rigidité, les gradients chimiques et les interactions biomécaniques physiologiques [405]. Plus particulièrement, les contacts cellules-MEC sont permis soit grâce à l'utilisation d'hydrogels pour produire les sphéroïdes, soit par la sécrétion des composants de la MEC, directement par les cellules du sphéroïde [406]. Les différentes méthodes de production seront détaillées plus bas. Ces interactions induisent une organisation en 3 couches : une centrale anoxique (nécrotique), une médiane hypoxique (quiescente) et une extérieure normoxique (en prolifération) (Figure 54 [407]).

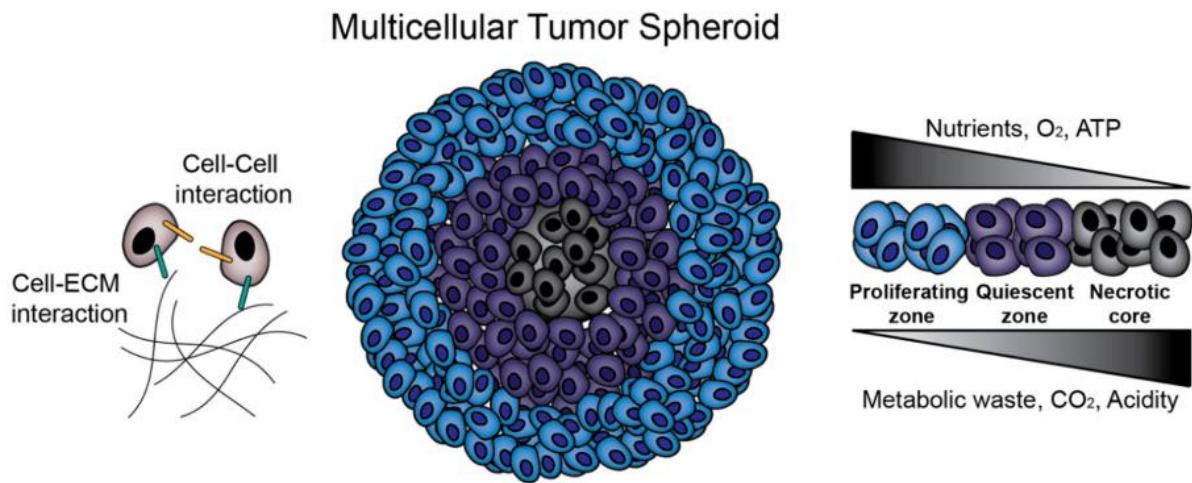


Figure 54 : Biologie et organisation d'un sphéroïde en culture. Les cellules s'auto-organisent et forment des contacts cellules-cellules et cellules-matrice. Du centre du sphéroïde vers l'extérieur, on retrouve un cœur cellulaire nécrotique, une zone quiescente et une zone où les cellules prolifèrent, corrélé à la présence de nutriments et d'oxygène.

Cette organisation est comparable à la structure des tumeurs solides non vascularisées [405], [408] et confère aux cellules des caractéristiques semblables à celles des cellules tumorales *in vivo*. En effet, l'augmentation des interactions via l'adhésion et la sécrétion de cytokines induit une diminution du pH et l'apparition de zones hypoxiques qui favorisent la progression tumorale [408]. Il a d'ailleurs été montré que les sphéroïdes permettaient l'enrichissement en clones cellulaires ayant des propriétés de CSCs comparé aux même cellules cultivées en 2D [409], [410], [411]. La culture 3D permettrait de maintenir le caractère souche des cellules et donc la résistance aux traitements qu'elles confèrent à la tumeur [412]. Aussi, Wang et al. ont observé que les sphéroïdes de cancer ovarien avaient une capacité d'auto-renouvellement et d'invasion augmentée par rapport à la culture en 2D [413]. Ces modifications ont pour conséquence une sensibilité diminuée aux thérapies, avec une apoptose significativement plus basse qu'en culture 2D pour les mêmes concentrations de traitement. De plus, il a été montré que la résistance thérapeutique sur des sphéroïdes était équivalente à celle induite *in vivo*, alors qu'aucune résistance n'était observée en culture cellulaire classique [408]. Il est donc nécessaire d'augmenter les concentrations de traitement lorsqu'on utilise des sphéroïdes, et ces concentrations se rapprochent plus des doses physiologiques et donc facilitent la transition vers le modèle animal [158], [408]. C'est une des raisons pour laquelle la culture 2D est de moins en moins utilisée au profit des sphéroïdes pour le criblage de nouvelles molécules [403].

En fait de manière générale, le modèle sphéroïde permet d'augmenter la complexité et l'agressivité du modèle tumoral et donc sa proximité avec les conditions de vie physiologiques. De plus, les sphéroïdes sont faciles à produire et peu couteux lorsqu'il s'agit d'utiliser des lignées cellulaires secondaires. Ils auront aussi permis à la communauté scientifique de mieux comprendre diverses fonctions cellulaires comme la prolifération, l'adhésion, la viabilité, la morphologie ou encore l'impact du microenvironnement sur le processus métastatique et l'angiogenèse [408]. Ils permettent aussi d'améliorer la découverte de nouveaux traitements puisqu'ils peuvent être utilisés sur des plateformes de criblage [405]. Néanmoins, ces cultures sont souvent effectuées avec un seul type cellulaire homogène en conditions statiques et ne peuvent pas à eux seuls récapituler la complexité physiologique des tissus [408]. Par exemple, ils ne permettent pas de définir une thérapie anti-cancéreuse de manière personnalisée [405], ou encore de reproduire les structures vasculaires. Malgré cela, les sphéroïdes ont permis de développer de nouvelles techniques de production et de maintenance en culture pour complexifier le modèle. Par exemple via la co-culture en introduisant les populations cellulaires du microenvironnement indispensables au développement et à la tumorigénèse, le cas échéant [408]. Aux vues de l'importance de la structure tissulaire et de l'hétérogénéité tumorale, ce sont aujourd'hui les modèles d'organoïdes et de tumoroïdes qui sont de plus en plus développés et nous allons maintenant décrire ces modèles.

3 . 2 . 2 . *Les organoïdes et tumoroïdes*

Les organoïdes

Les organoïdes sont générés à partir de cellules progénitrices, telles que les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) [405], [414] ou les cellules embryonnaires [415], [416]. Ils sont caractérisés par leur capacité à proliférer et s'auto-organiser de manière à mimer la structure et l'architecture du tissu dont ils sont dérivés. Les organoïdes sont majoritairement produits à partir d'une iPSC qui va suivre les stades de développement menant à la formation des organes. Le développement est induit grâce à l'addition de milieu de culture contenant des cytokines et facteurs de croissance spécifiques du tissu souhaité [416]. Dans cette thèse, le terme organoïde sera défini comme tel et réfèrera uniquement aux organoïdes reproduisant des structures d'organes sains. Beaucoup d'organoïdes récapitulant les structures et la fonction des organes ont été produits ces dernières années, comprenant les glandes

mammaires [417], le foie [418], [419], le pancréas [414], [416], les poumons [420], les reins [415], [421] ou encore les intestins [399]. Par exemple, Pagliuca et al. ont produit des organoïdes de cellules pancréatiques capables de sécréter de l'insuline en réponse à une stimulation par le glucose. Ces organoïdes transplantés dans un modèle de souris diabétique permettaient d'améliorer significativement l'hyperglycémie [422]. Concernant les organoïdes rénaux, il a été montré que les modèles produits exprimaient les protéines requises à la fonction glomérulaire, contrairement aux modèles 2D. La fonctionnalité n'a pas été encore totalement étudiée, mais quelques études montrent que les cellules différenciées des tubules proximaux sont capables d'endocytose et d'échanges ioniques. Les autres fonctions tubulaires, comme la réabsorption d'eau, n'ont pas encore été étudiées [421]. Le modèle organoïde permet donc l'étude de processus biologiques difficilement appréciables *in vivo* et pourrait à terme être utilisé comme outils de transplantation chez l'homme dans le cas d'organes afonctionnels, comme dans le cas pour le diabète par exemple.

Les tumoroïdes

Les tumoroïdes, sont souvent nommés « tumor organoids » ou « cancer organoids » dans la littérature. De la même manière que les organoïdes, ils correspondent à une structure 3D auto-organisée qui reprend les caractéristiques histologiques, génétiques et phénotypiques principales de la tumeur dont ils sont issus [423]. Les tumoroïdes sont dérivés de cellules tumorales de patients ou de souris, à partir de la tumeur primaire, d'une métastase ou encore des CTCs [423]. Ils peuvent aussi être générés à partir d'iPSC modifiés par ingénierie cellulaire afin de transformer un organoïde normal en organoïde tumoral. Néanmoins, il semble que les tumoroïdes produits à partir d'iPSC soient moins populaires car ils sont exempts des spécificités génétiques et de l'hétérogénéité tumorale qu'on retrouve entre les patients [405]. En effet, l'objectif du modèle tumoroïde est de capturer les mutations et le microenvironnement tumoral cellulaire spécifique des patients dans l'objectif de la thérapie personnalisée.

Sato et al. ont développés en 2011, le premier modèle de tumoroïde de cancer du colon [424]. Par la suite, beaucoup de tumoroïdes d'autres cancers ont été développés [425], comprenant le cancer du sein [426], de la prostate [427], ovarien [428], le glioblastome [429], [430], le cancer de la vessie [431], le cancer gastrique [427], [433], [429] ou encore de l'oesophage

[435]. Concernant le cancer du rein, il existe à notre connaissance cinq modèles, utilisant tous des technologies différentes et dont certains n'ont pas été entièrement caractérisés [400], [436], [415], [437], [438]. Les modèles de tumoroïdes ont révélé qu'ils permettaient de préserver les caractéristiques histologiques et génétiques propres aux patients dont ils sont issus [436]. De plus, plusieurs études ont montré que la réponse au traitement des tumoroïdes en culture était corrélé avec la réponse des patients au même traitement, en faisant un excellent modèle prédictif et un excellent avatar pour le criblage de nouveaux traitements [425], [439], [440]. Concernant l'étude du microenvironnement plusieurs modèles ont démontré une conservation de la population fibroblastique [436], [437], [441]. Par ailleurs, Neal et al. ont pu démontré grâce à leur modèle, que les cellules du système immunitaire, comprenant les LyT CD4 et CD8, les LyB, les macrophages et les NK étaient préservées dans le modèle après 7 jours mais que leur survie à long terme (30 jours) nécessitait l'ajout d'interleukine-2 [437]. Afin d'évaluer la compétence du système immunitaire *in vitro*, Lugand et al. ont généré des lignées cellulaires primaires de CRCC à partir de 3 tumeurs de patients afin de produire des tumoroïdes exempts de cellules immunitaires. Ces tumoroïdes ont ensuite été mis en contact avec des cellules immunitaires activées, et ils ont démontré que cela engendrait la mort des cellules tumorales. De plus, l'ajout d'immunothérapies à ces cellules immunitaires activées avait une action synergique sur la mort cellulaire des tumoroïdes [400]. Néanmoins, il a été démontré que les tumoroïdes dérivés de lignées cultivées en 2D perdaient certaines caractéristiques de la tumeur d'origine, dont l'hétérogénéité [405]. Cette méthode pourrait donc rendre les tumoroïdes plus sensibles aux traitements. Cela démontre l'avantage de cultiver les cellules directement en 3D.

Néanmoins, il y a quelques limitations au modèle tumoroïde. Premièrement, à cause de l'utilisation d'hydrogels (cf. [Les méthodes de production](#)) comme support mimant le microenvironnement. La majorité des modèles publiés utilisent encore du Matrikel [436] ou du collagène [437] de provenance murine, pour lesquels la composition est variable et non spécifique de chaque tissu ou environnement tumoral [442]. De plus, il est parfois difficile de maîtriser les propriétés biomécaniques de ces environnements. Aussi, beaucoup de modèles actuels ne sont pas entièrement caractérisés et ne sont pas composés de tous les types cellulaires du microenvironnement. En particulier, aucun des modèles que j'ai cités précédemment n'ont mentionné les cellules endothéliales et la formation de néo-vaisseaux.

En effet, la formation de ces structures complexes est extrêmement limitée en condition de culture statique et nous verrons dans la partie suivante que les puces microfluidiques permettent de remédier à cette limitation [443]. D'autre part, les cultures d'organoïde et de tumoroïde sont souvent établies grâce à des milieux de culture extrêmement riches en suppléments, tels que les facteurs de croissance et les inhibiteurs, qui peuvent modifier les caractéristiques tumorales et affecter la réponse au traitement dans le cadre de criblages. Pour finir, l'efficacité de production reste faible (de 15 à 90% en fonction du cancer [440]) et ce sont souvent des modèles qui sont longs à produire et couteux, en particulier ceux utilisant des hydrogels [405]. Concernant les tumoroïdes de RCC, les techniques sont souvent peu efficientes contrairement à d'autres cancers car les RCC sont généralement très nécrotiques [442].

En somme, les tumoroïdes sont des modèles permettant de mimer l'histologie, la génétique, l'hétérogénéité et le microenvironnement tumoral dans une certaine mesure. Ces technologies pourraient être utilisées dans le cheminement clinique, afin de définir le plan de traitement pour les patients au vu de leur potentiel prédictif. Néanmoins, quelques améliorations doivent être apportées pour fiabiliser le modèle et mieux récapituler les propriétés intrinsèques des tumeurs dont ils sont issus. Pour mieux appréhender la complexité d'utilisation de ces modèles, nous allons à présent décrire les différentes techniques de production et de maintenance en laboratoire.

3.2.3. Les méthodes de production

Plusieurs méthodes ont été mises au point afin de développer les modèles de culture cellulaire en 3D. Ces méthodes sont séparées en deux groupes : les méthodes « scaffold-based » et les méthodes « scaffold-free ». Les méthodes « scaffold-based » (Figure 55 [405], [444]) consistent en l'utilisation d'un support pour la culture des cellules. Il est possible d'utiliser de la matrice extracellulaire (hydrogels biologiques et matériaux synthétiques), des supports inertes poreux, la bio impression 3D et le micropatterning [439], [445]. Les méthodes « scaffold-free » (Figure 56 [444]) consistent en la culture des cellules en suspension pour la formation des structures 3D. La culture en suspension peut s'effectuer grâce à l'utilisation de bioréacteurs rotatifs, sur des substrats anti-adhésifs, dans une goutte suspendue (« hanging-drop ») ou encore par lévitation magnétique [444], [446]. La description, les avantages, inconvénients et couts de ces techniques sont comparés dans le Tableau 9 (traduit de [444]).

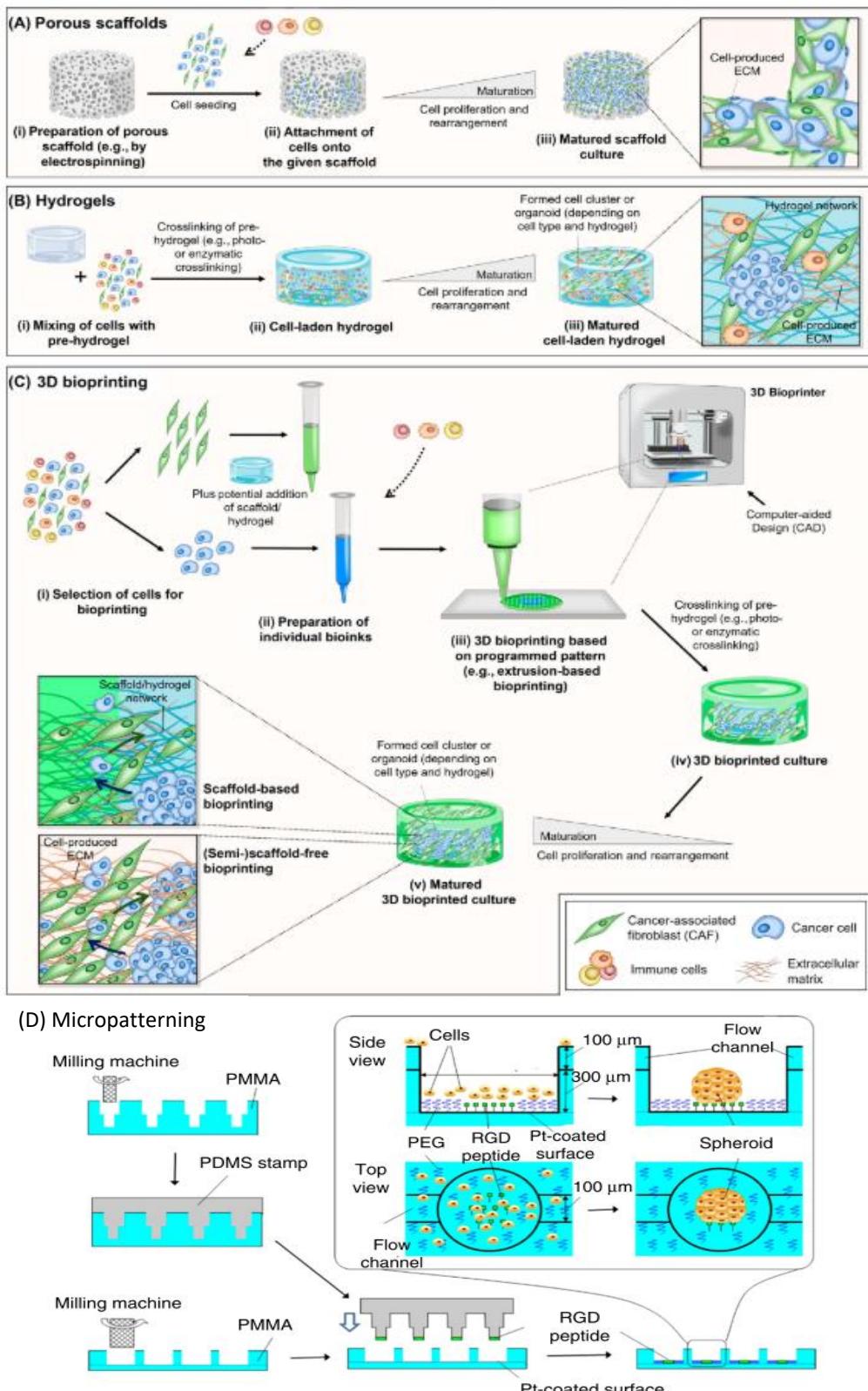


Figure 55 : Méthodes de culture 3D "scaffold-based". A : Utilisation d'un support poreux fabriqué par électrospinning sur lequel les cellules sont mises en culture. Les cellules s'attachent et se structurent en fonction de la forme du support. B : Culture de cellules dans un hydrogel (ex : Matrigel, Collagène I). C : La bio impression 3D consiste en l'injection des cellules et de la MEC grâce à une imprimante 3D bio-compatible. Il est possible de mélanger différents types cellulaires et matrices de support. D : Exemple de micropatternning. Des plaques de plastique (PMMA) sont forés avec une fraise afin de créer des motifs spécifiques puis le support est fonctionnalisé avec des peptides pour effectuer la culture en 3D.

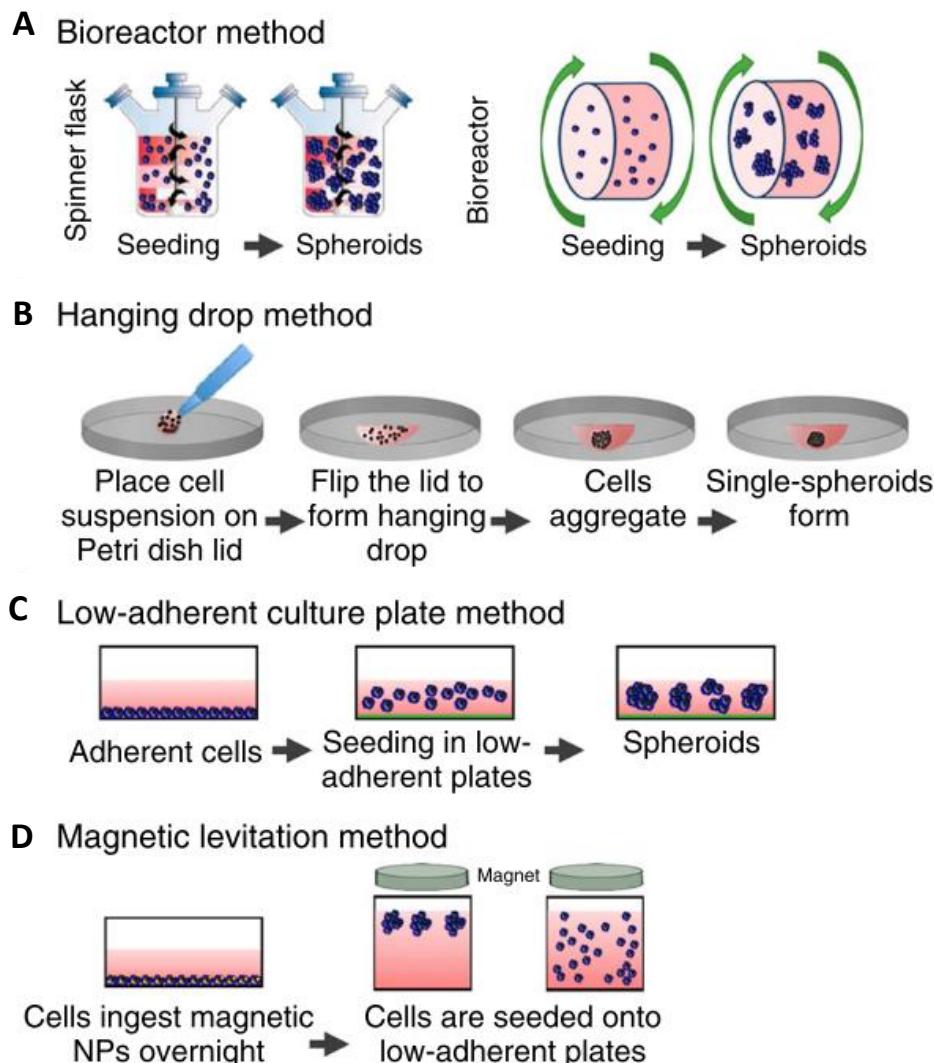


Figure 56 : Méthodes de culture 3D « scaffold-free ». A : Bioréacteur : Les cellules sont placées dans du milieu de culture à haute viscosité dans un bioréacteur rotatif pour éviter l'attachement des cellules et qu'elles s'agrègent pour former des structures 3D. B : Hanging drop : Les cellules sont ensemencées sous forme de goutte sur un couvercle qui est ensuite retourné pour qu'elles s'agrègent et forment un sphéroïde à l'interface air-liquide. C : Substrats antiadhésifs : Les cellules sont ensemencées dans un puit non adhérent afin qu'elles s'agrègent et forment un sphéroïde. D : Magnétisme : Des nanoparticules aimantées sont incorporées aux cellules afin d'utiliser un aimant pour les attirer et former un sphéroïde. Cette technologie peut aussi être utilisée sur des plaques non adhérentes avec l'aimant en dessous du puit.

La méthode la plus utilisée a été développée par l'équipe d'Hans Clever et correspond à la culture des cellules dans un support fait de matrice extracellulaire. A l'origine, la méthode a été développée avec du Matrigel, qui correspond à de l'extrait de membrane basale de sarcome murin [444]. Depuis, de nombreux hydrogels biologiques et matériaux synthétiques ont été conçus et utilisés. Cela comprend les bio-polymères naturels tels que le collagène de

type I, la fibrine, la gélatine ainsi que des matrices décellularisées d'organes animaux ; et les bio-polymères inertes comme l'alginate et la nano-cellulose. Plus récemment, il y eu un essor des matériaux synthétiques tel que le PEG (Polyéthylène Glycol), le polyacrylamide et l'ELP (Elastin-like protein) qui mime l'élastine. Ces différents matériaux peuvent être mélangés pour concevoir des matrices personnalisées et les matériaux synthétiques et inertes peuvent être fonctionnalisés pour favoriser les ancrages cellulaires [423]. C'est une des technologies la plus utilisée, en particulier pour la production d'organoïdes à partir de cellules souches, qui nécessitent des milieux très riches en facteurs de croissance, cytokines et inhibiteurs pour leur différenciation. Cette technologie à tout de même quelques limitations, comme décrit dans la partie précédente, notamment à cause de l'hétérogénéité des hydrogels ainsi que la nécessité d'utiliser un grand nombre de facteurs de croissance pouvant impacter la croissance et la réponse au traitement [442]. De plus, on observe dans la littérature que les hydrogels permettent de produire des organoïdes et tumoroïdes très hétérogènes en taille ce qui peut être un problème pour la reproductibilité et le criblage de nouvelles thérapies [414], [447]. C'est pourquoi il a été développé des technologies dépourvues d'hydrogel, telles que la culture magnétique, d'après l'hypothèse que les cellules en culture sont capables de sécréter leur propre matrice extracellulaire [426], [446]. Néanmoins, il réside parfois un doute dans la communauté scientifique quant à la toxicité des nanoparticules aimantées, bien qu'Eckhardt et al. aient démontré que les nanoparticules aimantées n'avaient pas d'effet nocif et n'interféraient pas avec la sensibilité aux médicaments [426]. D'autres technologies dépourvues d'hydrogel ont aussi été développées dans le but de normaliser la culture et d'augmenter le rendement. Tang et al. ont développé des micro-puits en agarose antiadhésifs de 2 millimètres de diamètre. Ils ont démontré que la taille des sphéroïdes était constante et que ces micro-puits pouvaient servir de plateforme de criblage pour la recherche de nouveaux traitements [448].

Pour conclure, il existe beaucoup de technologies et le choix d'en utiliser une plus qu'une autre repose majoritairement sur le tissu sur lequel on travaille, sur les moyens technologiques et financiers à notre disposition, sur la question scientifique ainsi que sur les besoins pour l'application (bas et haut débit par exemple).

Tableau 9 : Description, avantages et inconvénients des différentes techniques de culture cellulaire 3D.

Scaffold-Based					Scaffold-free			
	Matrice extracellulaire	Support poreux	Bio impression	Micropatterning	Bioréacteur rotatif	Hanging-drop	Substrat antiadhésif	Magnétisme
Description	Cellules placées dans un hydrogel et maintenus en culture	Micro fabrication basé sur des bio-encres polymérisables	Fabrication additive de MEC, de cytokines et cellules	Impression par microcontacts et lithographie sur de la MEC	Cellules en suspension dans une flasque rotative dans un milieu de culture à haute viscosité	Cellules suspendues dans une goutte de milieu qui s'agrègent à l'interface air-liquide	Cellules cultivées sur substrat antiadhésif pour former des agrégats	Nanoparticules ingérées par les cellules puis placées sur substrat antiadhésif, rassemblés par un aimant
Challenges	Manque de reproductibilité sur les MEC, Taille des organoïdes non homogène, les MEC synthétiques nécessitent des fonctionnalisations complexes	Manque de reproductibilité si pas automatisé, difficulté de fonctionnalisation, équipements chers	Sélection de la bonne bio-encre pour les caractéristiques voulues	Manque de reproductibilité si pas automatisé, manque d'efficacité, équipements chers	Sphéroïdes gros et hétérogènes, impose des forces de cisaillement	Changement de milieu difficile, couteux si utilisation de robotique, gouttes < 50µL	Pas possible avec tous les types cellulaires	Nanoparticules peuvent être toxique à forte concentration et cher
Avantages	Reproduit le microenvironnement, observation adhésion & migration	Structure sur mesure, implantable chez l'animal pour la réparation tissulaire, choix du matériaux	Permet la conception de structures complexes et organisées, utilisation de plusieurs types cellulaires	Contrôle de la structure, productions de tests spécifiques	La taille de la flasque permet de générer des modèles sur une grande gamme de taille	Marche avec peu de cellules, pas de MEC	Pas besoin de MEC, rentable	Taux de croissance accru, pas besoin de MEC et peu de facteurs de croissances
Complexité	Modérée	Modérée	Modérée	Modérée	Modéré	Simple	Simple	Simple
Rendement	Modéré	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé
Cout par lot d'organoïde	700-800\$	NA.	20\$	1.5\$	100/200\$	2\$	20\$	200\$
Applications	Prostate, ovaire, hépatocytes, cancer du poumon etc...	Cancer du sein, Os	Organoïdes cardiovasculaire	Hépatocytes, développement embryonnaire	Rein, cerveau, poumon	Cancer du sein	Intestin, cancer du rein	Cancer du sein, cellules mésenchymateuse

3.2.4. Comparaison des différents modèles

La culture cellulaire 3D est une avancée technologique importante pour la compréhension des mécanismes biologiques qui définissent le développement tissulaire et du cancer. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différents modèles cellulaires 3D de complexité croissante. Le Tableau 10 ci-après (depuis [449], [450], [451]) récapitule les caractéristiques de ces modèles 3D en comparaison de la culture cellulaire 2D et du modèle animal PDX (patient derived xenograft).

Tableau 10 : Comparaison des modèles de culture cellulaire 2D et 3D au modèle PDX.

	Culture 2D	Sphéroïdes	Organoïdes & Tumoroïdes	PDX
Génération	Très Facile et rapide	Facile et rapide	Difficile et longue	Inefficace, taux de succès extrêmement bas
Maintenance	Elevée	Elevée	Modérée	Modéré à élevé
Reproductibilité	Elevée	Elevée	Moyenne	Moyenne
Cout	Faible	Faible	Moyen à Elevé	Elevé
Organisation tissulaire	La 2D contraint la morphogenèse	Zonation hypoxique et contact cellulaires	Structure 3D auto-assemblée ressemblant à <i>l'in vivo</i>	Conservée, récapitule les caractéristiques du tissu du patient
Hétérogénéité	Homogène	Légère hétérogénéité clonale	Hétérogène	Hétérogène
Fonction cellulaire	Limitée	Modérée	Modérée	Conservée
Micro environnement	Absent	Absent	Préservé en fonction du modèle hormis la vascularisation fonctionnelle	Conservé excepté les cellules immunitaires
Vascularisation	Non	Non	Non, présence de cellules endothéliales non fonctionnelles possible	Oui
Analyse fonctionnelle	Facile mais moins pertinente	Facile, peut être compliquée par la MEC	Facile, peut être compliquée par la MEC	Facile après échantillonnage, Difficile <i>in vivo</i>
Modélisation maladies	Mauvaise	Moyenne	Bonne	Bonne
Expériences haut débit	Facile	Possible, dépend de la technique	Difficile mais possible	Difficile
Criblage de médicaments	Facile mais peu pertinent	Possible et plus pertinent que le 2D	Possible, très pertinent pour le patient	Difficile, très pertinent pour le patient
Médecine personnalisée	Non	Non	Oui	Oui

Le modèle PDX consiste en l'implantation de tumeurs de patients chez des souris afin de produire des modèles précliniques prédictifs reproduisant les caractéristiques de la tumeur dont elles sont issues. Ce sont des modèles très fidèles à la biologie tumorale humaine et d'un intérêt majeur mais leur rendement et taux de succès sont très bas et par conséquent non accessibles à tout le monde [452]. Pour donner un ordre d'idée il a fallu 2 ans à Lang et al. pour produire 30 modèles de PDX de RCC et le taux de succès tout grade et stade confondus était de 8,9 % après 3 passages effectués chez la souris [453]. Malgré tout, ces modèles seront toujours pertinents car ils prennent en compte la vascularisation et les interactions physiologiques d'un organisme entier non présent avec la culture cellulaire 3D.

La culture cellulaire 3D est donc un entre-deux précieux pour la recherche, en particulier pour la médecine personnalisée, le criblage de nouveaux traitements et la compréhension du développement normal et tumoral, qui reste plus accessible et éthique que l'utilisation d'animaux. Une autre technologie, entre la culture 3D et le modèle animal a été améliorée ces dernières années, il s'agit de la culture organotypique dont nous allons à présent discuter.

3.3. La culture organotypique

La culture organotypique correspond à la mise en culture de morceaux ou de coupes de tissus, d'origine animale ou humaine. C'est une technique bien antérieure à la culture cellulaire, mais elle avait été laissé de côté dans les années 1950 avec le développement de la lignée cellulaire HeLa, car c'est un modèle complexe et difficile à maintenir en culture de manière pérenne. La culture organotypique a ensuite été utilisée dans les années 1970 pour des études pharmacologiques mais c'est en 2009 que la technique a été grandement améliorée, grâce à Ootani et al. qui ont développé la culture en interface air-liquide [454], [455].

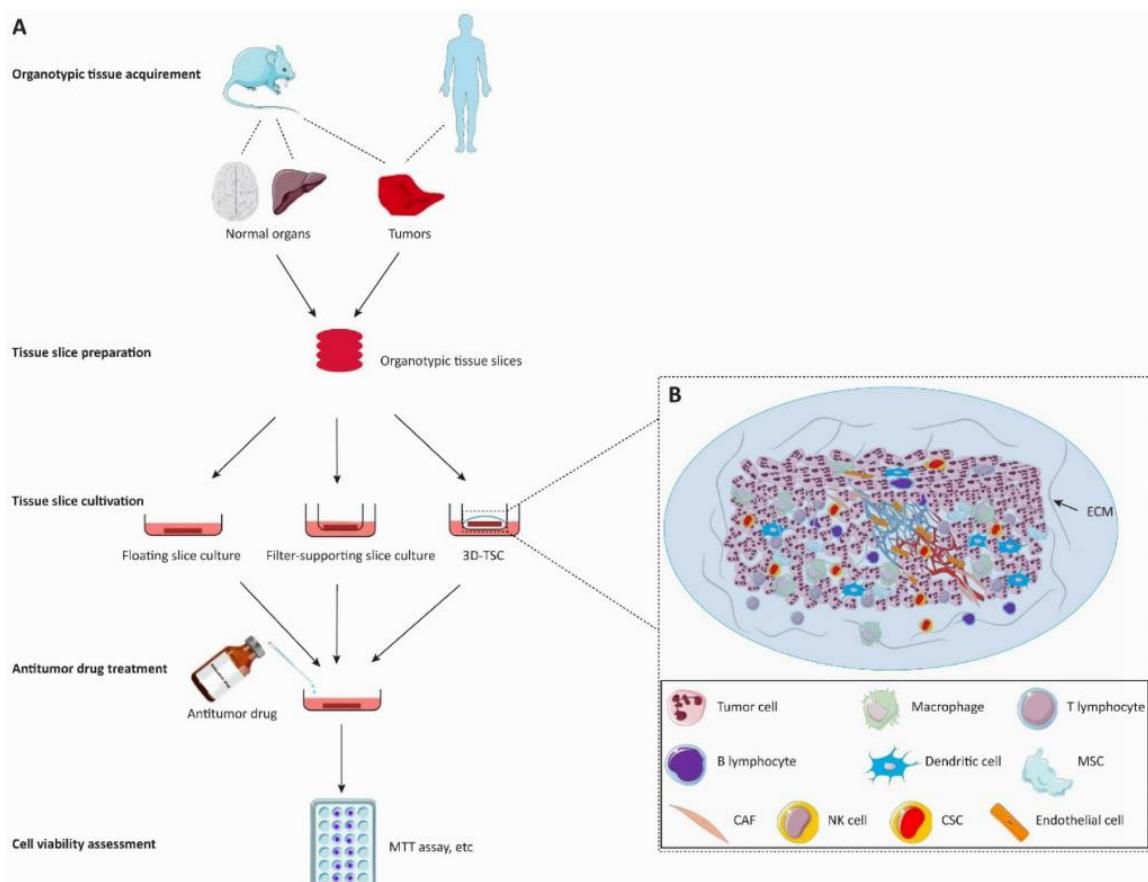


Figure 57 : Etapes de la culture organotypique (A) et la composition des coupes conservant l'hétérogénéité tumorale (B). A : Les tissus sont coupés en tranches, pouvant aller de 250 à 500µm puis cultivées soit en flottaison, soit en interface air-liquide avec ou sans hydrogel. Cela permet d'évaluer la viabilité cellulaire après avoir effectué un test d'efficacité avec des traitements anti-tumoraux. B : La coupe conserve la structure du tissu d'origine et contient les cellules tumorales, du microenvironnement et la matrice extracellulaire.

La culture organotypique et ses étapes sont décrites dans la Figure 57 [455]. Brièvement, après avoir récupéré le tissu, il est une première fois coupé, grossièrement, en forme cubique ou cylindrique. Cette pièce de tissu est ensuite coupée en tranches, manuellement au scalpel ou à l'aide d'un vibratome, dans les 6 heures suivant la résection et en milieu stérile. La majorité

des coupes font entre 250 et 500 µm d'épaisseur en fonction des tissus et des études. Elles sont ensuite mises en culture dans un incubateur. Plusieurs méthodes existent pour la culture des coupes, cela comprend la flottaison de la coupe dans du milieu de culture et la culture air-liquide sur un insert poreux supportant la coupe (ex. *Millicell®*), où la coupe est à nue ou enveloppée dans un hydrogel [455], [456]. La plus utilisée est celle sur insert qui permet une distribution homogène de l'oxygène et augmente la viabilité cellulaire [457]. Cette méthode peut être statique ou dynamique, dans ce cas, la plaque de culture peut être placée sur un agitateur rotatif pour créer un mouvement de flux entre la coupe et le dessous du filtre [396]. D'autres méthodes de culture dynamique ont été développées, en particulier grâce à la microfluidique qui permet de perfuser les coupes de tissu [458]. La viabilité en culture est comprise entre 4 et 16 jours et est dépendante du tissu et de la méthode [455].

La culture organotypique en cancérologie est la technologie *in vitro* la plus proche de l'*in vivo*. En effet, les coupes de tissus conservent la structure tissulaire, l'hétérogénéité tumorale et donc les populations tumorales et stromales comprenant les cellules endothéliales, les CAFs et les cellules immunitaires. Il a d'ailleurs été montré que les coupes conservaient le répertoire de LyT préexistants ainsi que leur fonction [455], [457]. En effet, Seo et al. ont démontré que le traitement combinatoire anti-CXCR4 et anti-PD1 sur des coupes de cancer pancréatique induisait la mort cellulaire concomitante à l'expansion de la population lymphocytaire dans la coupe [459]. Récemment, la technologie CAR-T cell a aussi été testée sur des coupes de tissu afin d'évaluer son potentiel dans le traitement des tumeurs solide [460]. La culture organotypique permet donc de déterminer l'activité anti-tumorale de divers traitements, comprenant les inhibiteurs de kinases [461], l'immunothérapie [459], la chimiothérapie et la radiothérapie [462]. De plus, elle serait prédictive de la réponse au traitement pour les tumeurs de patients [455], [458]. Elles pourraient aussi à terme remplacer le modèle animal dans le cadre d'études préclinique ou du moins, être une étape supplémentaire augmentant les chances de succès des études *in vivo*.

Malgré cela, une des préoccupations soulevées de ce modèle est la capacité de ces fines tranches de tissus à récapituler l'hétérogénéité tumorale et de combien de tranches il faudrait disposer pour en tenir compte. De plus, c'est une méthode très sensible et son succès est dépendant du temps écoulé entre la résection chirurgicale et la mise en culture, de la fluctuation des niveaux d'oxygène si la coupe n'est pas parfaitement plane ou encore de la

qualité du matériel pour couper les tranches qui peut avoir un impact sur la largeur et l'épaisseur de la coupe. En effet l'épaisseur peut parfois être approximative en fonction de la rigidité du tissu mais surtout si la tranche a été coupée trop fine, il a été noté une nécrose très importante [455]. Aussi, le retrait de son environnement d'origine interrompt les réseaux lymphatiques et vasculaires limitant les études sur les facteurs solubles provenant des tissus environnant par le biais de la vascularisation ainsi que l'étude sur le recrutement des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells). Pour finir, la source de tissu biologique est limitée et il est impossible de répliquer des explants comme c'est le cas pour les technologies de culture cellulaire 3D par exemple [457].

Pour conclure, la culture organotypique est un pas de plus vers la complexité physiologique tumorale, de par la conservation des populations cellulaires et de la structure du tissu d'origine. Néanmoins, l'impact de la vascularisation, comme pour les modèles 3D statiques, semble difficile à étudier dans ces modèles. C'est pourquoi de plus en plus de laboratoire incorporent ces modèles 3D dans des systèmes de puce microfluidique capable de reproduire les contraintes de cisaillement et la mécanique des fluides corporels.

3.4. Les systèmes fluidiques : Organes sur puce

La microfluidique est une technologie basée sur l'utilisation de petits volumes de fluides circulants dans des canaux de l'ordre du micromètre. Elle permet l'étude de réactions chimiques et enzymatiques, de biomolécules et de cellules en conditions miniatures et plus variées que les méthodes conventionnelles [463]. Les puces microfluidiques prennent leur origine dans la microélectronique qui a été détournée pour l'étude des liquides. Tout a commencé avec l'invention de la photolithographie en 1950, permettant d'obtenir des circuits métalliques extrêmement fins, utilisée pour la conception des cartes électroniques. Ces circuits fins imprimés ont ensuite été détournés afin de servir de moule pour produire des pièces en plastique dans le cadre de la microfluidique [464]. C'est en 1970 que Stephen Terry a inventé la première puce microfluidique, dont l'application était la chromatographie en phase gazeuse intégrée dans un moule en silicium [465]. A l'origine, les puces étaient fabriquées en silicium qui n'était pas compatible avec la biologie et l'observation microscopique dû à son opacité et sa porosité. C'est en 1990 que George Whitesides introduit l'utilisation du PDMS (Poly Dimethylsiloxane), majoritairement utilisé aujourd'hui en microfluidique car peu cher, transparent et facile à modeler. Il fallut attendre 1994 pour que la première puce microfluidique ayant une application en biologie cellulaire soit développée. Le développement des organes sur puce tels qu'on les connaît aujourd'hui a débuté en 2005 de façon concomitante au développement des modèles cellulaires 3D [464]. Aujourd'hui, il existe de multiples technologies pour concevoir des puces, ainsi que différents matériaux. Il est possible de développer des puces très complexes comme des systèmes multi-organes perfusés sur puce [451]. La méthode de fabrication des puces en PDMS est illustrée dans la Figure 58 [466].

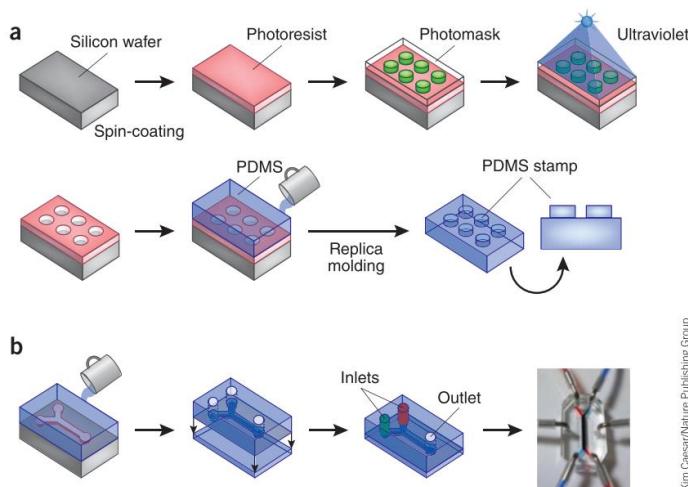


Figure 58 : Méthode de fabrication des puces microfluidiques en PDMS.

a : Création d'un moule par photolithographie et de la puce par coulage du PDMS.

b : Exemple de circuit microfluidique. Une fois la pièce de PDMS produite, elle est fixée sur un support plat, ce qui ferme les canaux, les rendant accessibles par les points d'entrées et de sorties.

Kim Caesar/Nature Publishing Group

Les puces microfluidiques permettent de reproduire la structure tissulaire et cellulaire d'un organe entier. Elles peuvent être simples, par exemple avec l'utilisation d'un seul type cellulaire, ou très complexes, comme la culture de multiple organes séparés par un réseau vasculaire [451]. En effet, la microfluidique est la seule technique *in vitro* permettant de recréer des vaisseaux lymphatiques et vasculaires perfusables aux fonctions proches de l'*in vivo*. Il a d'ailleurs été montré que lorsqu'un canal vasculaire tapis de cellule endothéliales est mature, il est possible de remplacer le milieu de culture par du vrai sang pendant quelques heures, démontrant la capacité de ce modèle à se rapprocher des conditions physiologiques [467]. Les puces microfluidiques permettent de récapituler l'architecture multicellulaire, les interfaces tissus-tissus, les propriétés mécaniques tissulaires, les gradients chimiques ou encore la perfusion vasculaire du corps et tout en autorisant une observation par microscopie haute résolution.

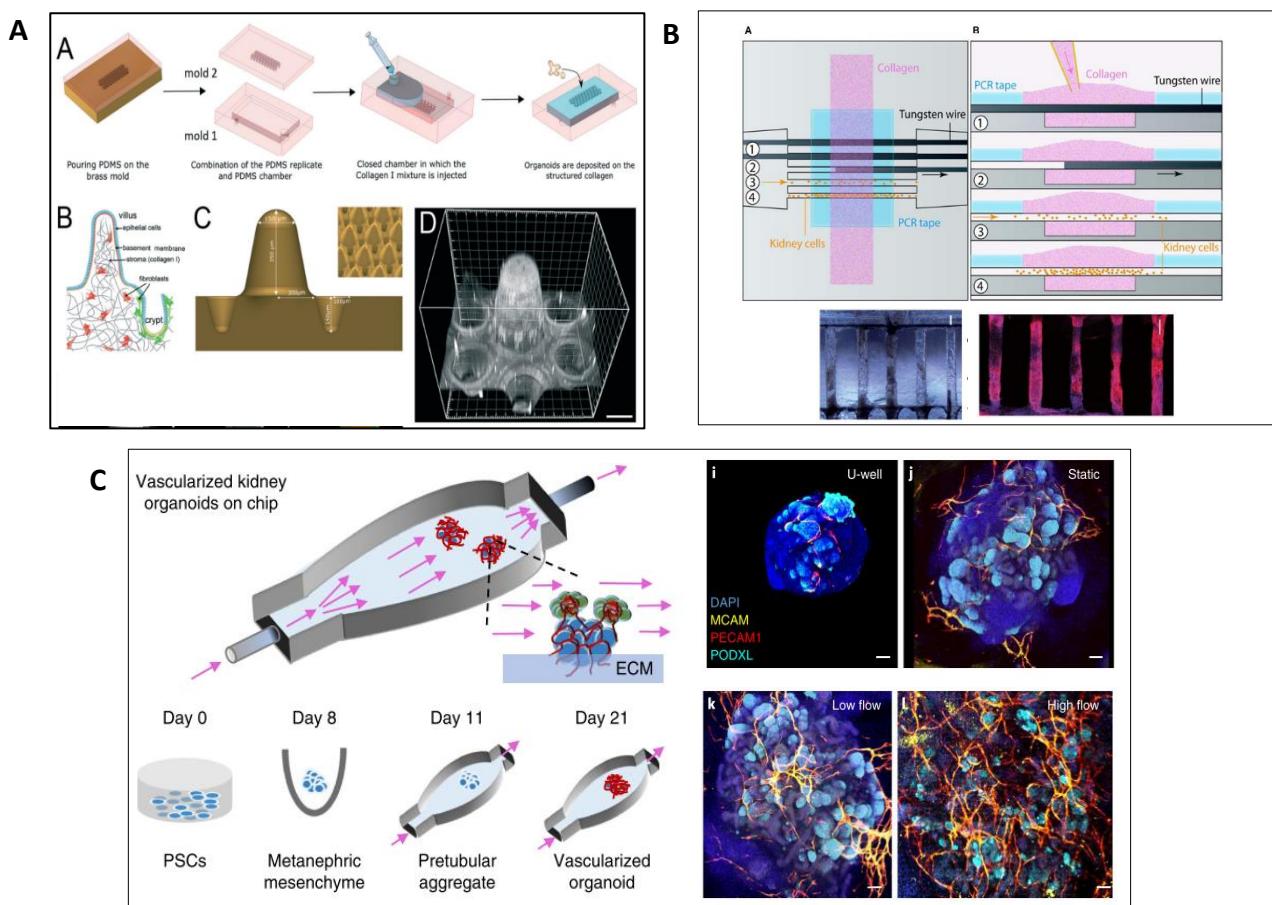


Figure 59 : Exemple d'organes sur puce développés. **A :** Intestins sur puce sur un moule de collagène I reproduisant la structure de la paroi intestinale. **B :** Création de tubules rénaux sur puce à l'aide de collagène I et de fils de tungstène rétractables permettant de créer des tubulures. **C :** Organoïde rénal vascularisé sur puce. La quantité et qualité de la vascularisation augmente avec la force du flux dans la puce microfluidique.

De nombreux organes sur puce ont été développés [468] (Exemples : Figure 59). Cela comprend la reproduction de cryptes et villosités intestinales (Figure 59 A [469]), de cellules pulmonaires cultivées dans une chambre à air en interface avec un réseau vasculaire [470] ou encore des tubules rénaux alignés afin d'étudier le développement de la polykystose rénale (Figure 59 B [471]). De manière assez spectaculaire, Homan et al. ont réussi à reproduire un glomérule rénal vascularisé et perfusables sur puce dans une seule chambre (Figure 59 C [472]). C'est-à-dire que les cellules s'auto-organisent dans la chambre de la puce et qu'au cours du développement, les conditions de culture et particulièrement les contraintes de cisaillements imposées par la fluidique, permettent aux cellules endothéliales de se structurer pour former des vaisseaux s'intégrant dans le glomérule comme c'est le cas physiologiquement [472]. Les puces microfluidiques permettent donc d'étudier le développement ou des maladies spécifiques d'organes dans des conditions très proches de l'organisme entier [467].

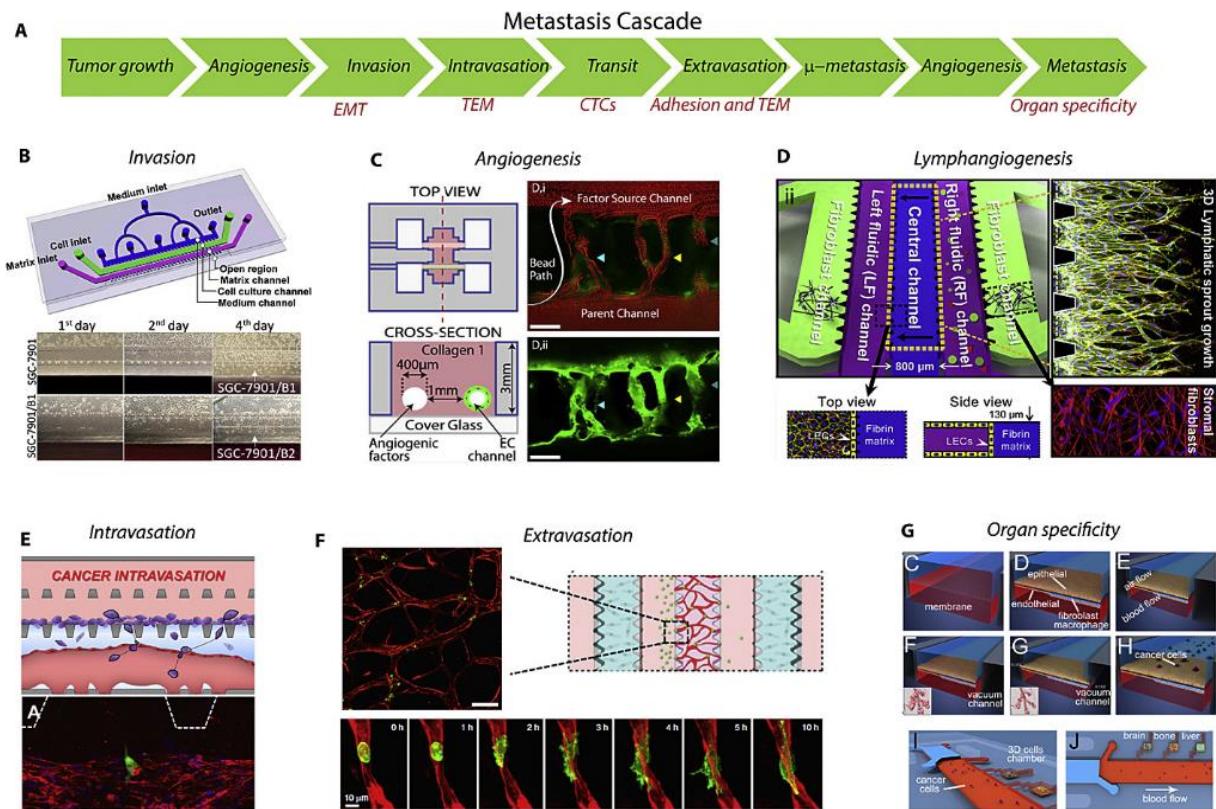


Figure 60 : Exemples de dispositifs microfluidiques mimant les étapes de la cascade métastatique. Les étapes de la cascade métastatique (A) et des exemples de dispositifs mimant l'invasion (B), l'angiogenèse (C), la lymphangiogenèse (D), l'intravasation (E), l'extravasation (F) et évaluant le tropisme des cellules tumorales circulantes pour des organes spécifiques ou niches pré-métastatiques (G).

Dans le cadre du cancer, les puces microfluidiques permettent de reproduire l'hypoxie intratumorale [473], ainsi que les différentes étapes du processus métastatique (Figure 60 [474]). Cela inclut la croissance tumorale, l'invasion avec ou sans gradient de chimio attraction (Figure 60 B [475]), [476], [477], [478], l'angiogenèse (Figure 60 C [479]), [480], la lymphangiogenèse (Figure 60 D [481]), l'intravasation (Figure 60 E [482]), l'extravasation (Figure 60 F [483]), ou encore le tropisme pour un site métastatique spécifique (Figure 60 G [484]), [368], [385].

Ces modèles peuvent aussi être produits à partir de matériels biologiques complexes dérivés de patients, c'est-à-dire en y incorporant des tumoroïdes [474], ou de la culture organotypique. Par exemple Chakrabarty et al. ont optimisé la culture organotypique sur puce afin de tester différents traitements dans un objectif de médecine personnalisée. La culture en perfusion permettait de normaliser le procédé de traitement, d'augmenter la survie des cellules en culture (> 14 jours) et la méthode était prédictive de la réponse au traitement des souris PDX correspondantes [458]. De plus, sachant que l'angiogenèse anormale tumorale est majeure dans le CRCC, Virumbrales-Muñoz et al. ont reproduit la vasculature des patients sur puce. En effet, ils ont récupéré des cellules endothéliales normales (NEC) et tumorales (TEC) chez des patients atteints de CRCC et les ont ensemencé dans une puce contenant un canal central moulé en collagène. Ils ont pu démontré que les TECs formaient un réseau moins dense et moins structuré et produisaient plus de bourgeonnements que les NECs. Aussi, les vaisseaux de TECs étaient plus perméables que les NECs. Pour finir ils ont pu démontrer que la perméabilité et le bourgeonnement pouvaient être normalisés grâce à l'ajout de traitements [485].

Pour conclure la microfluidique est la méthode *in vitro* la plus aboutie permettant de reproduire des interactions biologiques complexes, tenant compte du microenvironnement, et de la vasculature. De plus, les puces peuvent être faites à façon, permettant de créer des milliers de designs pour des applications diverses et variées. Elles sont aussi un outil indispensable pour comprendre des mécanismes complexes difficilement observable *in vivo* puisqu'on peut les suivre en temps réel et par microscopie haute résolution. L'espérance de la communauté scientifique est qu'un jour les puces microfluidiques à système multi-organes puissent remplacer les modèles *in vivo*, peu éthiques, longs à mettre en place, chers, et pas tout à fait représentatifs de la biologie humaine.

C'est ici que se termine l'introduction de ce chapitre. Une tumeur est donc un système complexe et hétérogène, dont le devenir est influencé par de multiples acteurs. Cela comprend le microenvironnement matriciel et cellulaire, les mutations intrinsèques ou encore les millions de molécules circulantes qui régissent les fonctions de nos cellules dans notre corps, sans parler des facteurs environnementaux souvent intangibles. Il semble clair que le problème majeur dans l'échec de remédier au cancer soit la propagation métastatique, dont les étapes sont multiples et imprévisibles. C'est un processus silencieux à l'échelle médicale, pour cause, les cellules circulantes, les niches pré-métastatiques et les micro-métastases quiescentes sont imperceptibles avec les techniques d'imagerie actuelles. De plus, nos modèles d'études n'ont pas toujours rendu compte de la réalité physiologique. Un grand espoir est donc porté sur les avatars et les organes sur puces qui sont de plus en plus représentatifs de la réalité physiologique humaine et à terme pourraient être employés pour la médecine personnalisée.

OBJECTIFS DU PROJET ONCOTRAP

Grâce aux avancées en oncologie, la capacité à détecter et traiter les tumeurs solides au stade précoce s'est grandement améliorée. Au contraire, lorsque les cellules cancéreuses commencent à s'échapper pour former des métastases, les traitements médicamenteux sont souvent peu efficaces dans la durée, et la présence de métastases distantes est une des principales raisons de la mortalité par cancer. La détection précoce d'un cancer métastatique reste un défi, en particulier à cause de la présence de cellules tumorales circulantes et des niches métastatiques dormantes, difficilement appréciables par imagerie contrairement à la tumeur primaire. De plus, les CTCs, bien qu'elles soient définies comme un biomarqueur avéré du processus métastatique, sont rares dans le sang et donc difficiles à détecter. Cela demande aussi des analyses supplémentaires qui ne sont pas encore transposées en clinique. Par conséquent, la détection des premiers stades de la cascade métastatique ainsi que leur attrait pour une niche en particulier, pourrait grandement améliorer la prise en charge et diminuer le risque de rechute de patients ayant une tumeur opérée, qu'on pensait totalement circonscrite.

Actuellement, les modèles d'études des métastases comprennent les modèles *in vitro* ainsi que les modèles *in vivo* utilisant la souris en majorité. Les modèles animaux sont limités par le cout, la difficulté de génération de modèles représentatifs, en particulier pour les PDX [453], l'optimisation médicamenteuse à bas débit ainsi que la controverse éthique. Les modèles *in vitro* vont de la culture 2D, à haut débit mais peu représentative, à la modélisation de certaines étapes de la cascade métastatique sur puce grâce aux modèles 3D et à la fluidique. Néanmoins, la majorité de ces dispositifs sont conçus dans le but de mieux comprendre certaines des étapes clés, tel que l'intravasation [482], ou ciblent des caractéristiques précises, tel que la particularité des TECs de certains patients [485], mais ne récapitulent pas toutes les étapes de la cascade métastatique. Certains ont développé des modèles intégrant tumeur primaire, migration/circulation et choix de la niche métastatique, mais toutes ces études utilisent des lignées cellulaires [368], [385].

Nous avons observé qu'aucun test personnalisé prédictif des métastases et de réponse au traitement n'a été développé à ce jour. Or, dans l'introduction nous avons démontré que l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale joue un rôle majeur dans la prédiction du potentiel métastatique et dans la réponse aux traitements de chaque patient. Il est donc urgent, au plan

clinique, de pouvoir prédire cette réponse pour chaque tumeur de patients afin de les traiter de manière personnalisée et efficace. De même, tester la probabilité de ces tumeurs à métastaser est un challenge en oncologie. L'objectif du projet Oncotrap est donc de développer un dispositif médical, visant à évaluer le potentiel métastatique et le tropisme pour certaines organes cibles, des tumeurs primaires de patients et à terme de tester l'efficacité de médicaments anti-métastatiques.

Pour répondre à cet objectif, le projet est découpé en trois axes de recherche afin de développer les compartiments de ce dispositif médical :

- (1) Développer des modèles tumoraux à partir de tumeurs de patients et évaluer leur capacité métastatique dans un environnement pro-invasif.
- (2) Développer des niches métastatiques *in vitro*, comprenant le foie, les poumons et l'os.
- (3) Concevoir une puce microfluidique mimant les compartiments impliqués dans la cascade métastatique.

Afin de répondre à l'objectif (1), j'ai développé plusieurs modèles tumoraux. Les premiers correspondent à des sphéroïdes de lignées cellulaires saines (RPTEC) et tumorales (786-O, Caki-1, ACHN) afin d'avoir des modèles contrôles de l'invasion tumorale permettant de développer un hydrogel permissif à l'invasion pertinent. C'est-à-dire capable de discriminer les cellules tumorales et non tumorales d'après leur capacité invasive. Le second modèle, et le travail le plus conséquent de cette thèse, est le développement et la caractérisation d'un modèle de tumoroïde dérivé de tumeurs de souris et de tumeurs de patients. Le dernier modèle correspond à la standardisation de la culture organotypique. Une fois ces modèles développés, leur capacité d'invasion a été évaluée dans différents hydrogels, afin de déterminer quelle était la matrice la plus pertinente, c'est-à-dire celle récapitulant les caractéristiques invasives du modèle. Les capacités invasives des tumoroïdes et des coupes de tissus dérivés de patients étant variables et inconnues, les hydrogels ont été validés grâce aux sphéroïdes de lignées et aux tumoroïdes dérivés de tumeurs de souris. Le développement du modèle tumoroïde est décrit dans la [première partie](#) des résultats de ce chapitre, et fait l'objet d'une publication qui est en cours de soumission. Enfin, l'évaluation de la capacité invasive des trois modèles sphéroïdes, tumoroïdes humains et coupes de tissus est décrite dans la [seconde partie](#) des résultats.

Dans le but de concevoir les niches métastatiques (2), nous avons en premier lieu décidé de développer les niches de poumons et de foie. Pour cela, plusieurs techniques ont été employées, en particulier la culture de cellules cancéreuses sur des poudres d'organes décellularisés et sur des coupes fraîches de tissu. Au cours du projet, l'équipe BRM (Biomimétisme et Médecine Régénératrice), spécialisée dans le développement de biomatériaux pour la réparation osseuse, a rejoint notre unité. Nous avons donc mis en place une collaboration afin de développer une niche osseuse à partir de leurs biomatériaux et de cellules primaires de périoste. Le développement de ces niches avec les différentes méthodes est décrit dans la [troisième partie](#) des résultats.

Concernant l'objectif (3), il nous a fallu deux ans afin de mettre en place une forte collaboration avec le CEA Leti de Grenoble, et nous avons créé nos propres puces personnalisées il y a quelques mois. Cette partie sera donc exposée dans les perspectives de cette thèse.

MATERIEL ET METHODES

1. Tests cellulaires

1.1. Prolifération

Les lignées 786-O, Caki-1 et ACHN provenant de l'ATCC (CRL-1932, HTB-46 et CRL1611 respectivement) ont été ensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 5000 cellules par puits en milieu RPMI 1640 complet (Sérum de Veau Fœtal (SVF) 10%, Pénicilline 100 U/mL, Streptomycine 100 µg/mL). Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 4 jours dans l'Incucyte ZOOM® (Essen Biosciences, États-Unis). L'Incucyte est un vidéo microscope placé dans un incubateur et couplé à un logiciel (Zoom) permettant de faire de l'analyse d'image en temps réel. Pour analyser la prolifération, le logiciel mesure pour chaque puit l'aire occupée par les cellules par rapport à l'aire totale du champ de la photographie. Les acquisitions en contraste de phase ont été programmées avec un objectif 10X (Plan Fluor, NA = 0.3) toutes les 2 h. L'analyse d'images a permis d'obtenir des données de confluence (%) au cours du temps.

1.2. Migration

Les lignées 786-O, Caki-1 et ACHN ont été ensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 30 000 cellules par puits en milieu RPMI 1640 complet. Après 24 h, une blessure de 700-800 µm de largeur dans la monocouche cellulaire a été faite à l'aide du WoundMaker (Essen Biosciences). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 4 jours dans l'Incucyte ZOOM®. Le logiciel d'analyse IncuCyte® Scratch Wound a été utilisé pour mesurer en temps réel et de manière automatisée la confluence de la zone blessée. Ce logiciel utilise le même procédé que lors de la mesure de la confluence pour la prolifération, à la différence que l'aire totale correspond ici à la zone blessée. Les acquisitions en contraste de phases ont été programmées avec un objectif 10X (Plan Fluor, NA = 0.3) toutes les 2 h. L'analyse d'image a permis d'obtenir des données de largeur de blessure (µm) au cours du temps.

1.3. Invasion

Les lignées 786-O, Caki-1 et ACHN ont été ensemencées sur des chambres de Boyden contenant du Matrikel (Corning) à raison de 200 000 cellules par chambre, dans du milieu RPMI 1640 contenant 2% de SVF. Du RPMI 1640 contenant 20% de SVF a été placé sous la chambre afin de créer un gradient de SVF. Après 48 h d'incubation à 37°C, les cellules ont été fixées dans du PFA (4%) pendant 15 min à 4°C et marqué avec du Hoechst (1/1000e). Les

membranes des chambres de Boyden ont été grattées sur le dessus pour retirer les cellules n'ayant pas envahi. La membrane a été découpée, placée sur lame et observée à l'aide de l'AxioObserver Z1 (Zeiss), objective 10x. Enfin, les noyaux ont été comptés à l'aide du logiciel Image J pour obtenir un nombre de cellules ayant envahi par champ.

2 . Conception des niches métastatiques

2 . 1 . Production des BMS de foie et de poumon

Décellularisation d'organes et production de poudres

La production des BMS (pour « Biomaterial Scaffold ») a été faite d'après le protocole de Tian et al. [386]. Brièvement, des rats ont été euthanasiés puis les poumons et le foie ont été perfusés via la veine porte (foie) ou la veine cave inférieure (poumons) avec les solutions de décellularisation. La vascularisation a été perfusée avec un milieu basal (DMEM sans sérum) jusqu'à ce que le sang soit éliminé, puis avec 250 mL de désoxycholate de sodium à 1 % contenant 36 unités/L de phospholipase. Ensuite, les organes ont été perfusés avec du chlorure de sodium 3,5 M (NaCl). Enfin, les tissus ont été rincés avec du milieu basal et congelés à sec à -80°C. Les organes décellularisés congelés ont ensuite été broyés en une poudre fine à l'aide d'un mortier en métal sur carboglace pour maintenir les morceaux congelés. La poudre BMS transformée a ensuite été stockée à -80 °C.

Détermination de la concentration protéique et préparation de plaque de cultures

Pour déterminer les concentrations protéiques des BMS, elles ont été dissoutes dans une solution composée de 4 M de chlorure de guanidine (HCl), 50 mM d'acétate de sodium (pH 5,8) et 25 mM d'acide éthylènediaminetéraacétique (EDTA) contenant des inhibiteurs de protéinases et de phosphatases. Un dosage à l'acide bicinchonique (BCA) a ensuite été effectué pour déterminer les concentrations totales de protéines. Pour préparer les surfaces revêtues de BMS, les BMS ont été suspendues dans du milieu (DMEM/F12) aux concentrations souhaitées, ajoutées aux plaques de culture cellulaire et laissées sécher pendant la nuit. Les plaques ont été stérilisées par irradiation (100 Gy).

2 . 2 . Co-culture 786-O et périostes

Les cellules souches de périostes ont été cultivées sur une plateforme biomimétique, capable d'induire la différenciation osseuse lorsqu'elle contient de la BMP2. Des plaques 96 trous fond verre ont été fonctionnalisées avec le biomatériau, qui est composé de poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol)biotin(3.4) 50% (PLL-g-PEGbiotin50%), de Streptavidine, de peptides d'adhésion à séquences RGD et d'héparane sulfate fonctionnalisé ou non avec de la BMP2 (Bone Morphogenic Protein 2) comme décrit par Sefkow-Werner et al. [486]. Les cellules souches de périostes ont été ensemencées sur la plateforme à raison de 15 000 cellules par trou en DMEM sans pyruvate complet (SVF 10%, Pénicilline 100 U/mL, Streptomycine 100 µg/mL) supplémenté d'acide ascorbique (250 µM) et de β-glycérophosphate (1 mM) pour induire la différenciation osseuse. Après 14 jours de différenciation, des sphéroïdes de 786-O H2B-mCherry ont été déposés sur les périostes non différenciés (contrôle négatif, plateforme sans BMP2) ou sur les périostes différenciés (plateforme avec BMP2). Les étapes pour la production des sphéroïdes sont décrites dans l'article qui suit. Après 3 jours de co-culture, les cellules ont été observées à l'aide de l'AxioObserver Z1 (Zeiss).

RESULTATS

1. Développement d'un nouveau modèle de tumoroïde de carcinome rénal pour la prédiction de réponse au traitement et l'évaluation du potentiel métastatique des patients.

1.1. Contexte

Dans le cadre de la conception du dispositif microfluidique Oncotrap, nous souhaitions développer des modèles tumoraux de complexité croissante. L'objectif de développer un modèle de tumoroïde découle de la pertinence scientifique de ce modèle dans l'étude du cancer, mais aussi de sa capacité à permettre la création de bio-banque à l'instar de la culture organotypique, pour laquelle le matériel biologique est limité. En effet, la capacité de prolifération ainsi que le temps de viabilité en culture sont augmentés pour le modèle tumoroïde. De plus, dans l'objectif futur de trouver de nouveaux traitements, un criblage pourrait être envisagé sur ce modèle alors qu'il semble difficile à réaliser sur des coupes de tissu. Néanmoins, l'objectif final est d'utiliser la culture organotypique dans la puce microfluidique, car elle conserve l'organisation cellulaire et tissulaire et l'utilisation en clinique serait facilitée. En effet, la seule étape pour les cliniciens serait de couper la tumeur et de la déposer dans le dispositif médical, alors que la culture de tumoroïde demande plus de techniques et de temps pour la maturation des tumoroïdes.

Le papier ci-dessous décrit la méthode de conception du modèle tumoroïde majoritairement à partir de tumeurs générées chez la souris. Il décrit la caractérisation phénotypique qualitative et quantitative par immunofluorescence des tumoroïdes, par rapport au tissus tumoraux dont ils sont issus. J'ai aussi réalisé des profils transcriptomiques par une approche de séquençage d'ARNm (BRB-seq) pour observer les différences entre le tissu et les tumoroïdes au niveau du transcriptome. Par la suite, j'ai évalué le potentiel invasif des tumoroïdes dans l'hydrogel que j'avais sélectionné, appelé TissueSpec Kidney, qui correspond à de la matrice rénale reconstituée d'origine porcine. Ses capacités d'invasion ont été comparées aux modèles sphéroïdes. L'établissement des conditions favorables à l'invasion et le choix de la matrice sont décrits dans la seconde partie des résultats. Nous avons aussi évalué la réponse au traitement du modèle, en comparant la réponse à deux traitements sur des sphéroïdes, des tumoroïdes, de la culture organotypique et *in vivo* chez la souris. Pour finir, la dernière figure montre la faisabilité d'application sur des tumeurs humaines, avec la

caractérisation et la réponse aux traitements de tumoroïdes humains générés à partir d'une tumeur de patient. La génération d'autres tumoroïdes et organoïdes humains, qui n'ont pas pu être entièrement caractérisés, est décrite dans les résultats supplémentaires.

1 . 2 . Establishment of a new scaffold-free tumoroid model to investigate invasion and drug response in Renal Cell Carcinoma

Establishment of a new scaffold-free tumoroid model to investigate invasion and drug response in Renal Cell Carcinoma

Irinka Séraudie¹, Catherine Pillet¹, Beatrice Cesana¹, Pauline Bazelle¹, Florian Jeanneret¹, Christophe Battail¹, Bertrand Evrard², Assilah Bouzit^{3,4}, Jean-Alexandre Long^{3,4}, Jean Luc Descotes^{3,4}, Claude Cochet¹ and Odile Filhol^{1*}.

Clear cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC) is one of the most prevalent kidney cancers, which is often asymptomatic and thus discovered at a metastatic state (mRCC). mRCC are highly heterogeneous tumors composed of subclonal populations that lead to poor treatment response rate. Several recent works described the establishment and characterization of ccRCC tumoroids culture derived from patients that more accurately recapitulate tumor features. These models would help guiding personalized therapy as they can be used as avatars. However, all models were produced following a scaffold-based method using collagen I or Matrigel that are complex and exhibit lot variability. Moreover, they used highly supplemented media that could induce treatment response modifications and phenotypic alterations. We hypothesized that cells in the tumoroid create their own niche by secreting extracellular matrix components. Thus, we decided to conceive the first scaffold-free tumoroid model of ccRCC tumors. We developed tumoroids from mice and human tumors, using a magnetic suspension method and a standard culture media. We could demonstrate that the scaffold-free magnetic technique allows us to preserve the phenotypic and transcriptomic characteristics of the cancer cells and the microenvironment of the corresponding tumor tissue. Our tumoroid model demonstrates self-organization capacities and most importantly, endothelial cells retentions, which was never reported in any other ccRCC tumoroid model. Impressively, endothelial cells have been able to organize in a round plexus-like structure, which we could try to perfuse to induce vessel formation in future work. Moreover, we found a clear concordance in the tumor response to treatments in this tumoroid culture model compared to tumor slice cultures or orthotopic renal cancer xenografts. Finally, we demonstrated that it is feasible to assess metastatic potential via invasion assay using this model. Our model open new perspectives for personalized medicine and anti-metastatic drug screening.

Keywords

ccRCC, cancer organoids, tumor tissue slice, metastasis, invasion, drug response, prediction

Introduction

Kidney cancer represents the 8th most frequent type of cancers in the world [1]. Among them, Renal Cell Carcinoma (RCC) is the most common and englobes a number of histological subtypes comprising clear cell RCC (ccRCC) and papillary RCC. The most frequent is ccRCC, which represent 70-80% of patients, followed by papillary RCC, which represent 10-15% [2][3]. RCC patients are often asymptomatic, leading to 30% of metastatic RCC (mRCC) at diagnosis. Moreover, 10% of patients that are undergoing surgery for a localized cancer will relapse and develop mRCC during their follow up [4]. mRCC can be treated with Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) or Immunotherapy [5]. Recently, a combination of Immune checkpoint inhibitors like Ipilimumab targeting CTLA-4 plus Nivolumab targeting PD-1 has been approved for Metastatic Renal Cell Carcinoma management [6]. However, intrinsic and therapy-induced heterogeneity, and changes in the tumor microenvironment often yield to multiple cross-resistance mechanisms in non-responder patients. Phylogenetic studies showed that subclonal populations with different mutations arise from the trunk mutations that are present in all regions of the

tumor before formation of the founder cancer cells. Those subclones are often responsible of metastasis and are not many to be detected by bulk sequencing [6], [7], [8], [9]. This leads to mRCC patients with a therapeutic response that differs significantly independently of their trunk mutation status [10], [11].

Tumors appear as complex systems with many elements that display dynamic spatial and temporal evolution as they progress and respond to stressors, including the immune system and cancer therapies. Recently, advances in tumor models have demonstrated the value of organoid technology for the generation of *in vitro* three-dimensional models, including patient-derived organoids that have been shown to more accurately recapitulate the structures, specific functions, molecular characteristics, genomic alterations and tumor microenvironment of primary tumors. In addition, they may be useful for identifying *in vitro* drug response as well as biomarker assessment to help guiding personalized therapy and molecular profiles to define predutive molecular profiles of drug responsive tumors [12], [13], [14]. The need for such a dynamic system is emphasized by the fact that the failure rate of drugs tested in clinical trials remains

¹ Interdisciplinary Research Institute of Grenoble, IRIG-Biosanté, University Grenoble Alpes, CEA, UMR 1292, F-38000 Grenoble, France,

² Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail), University Rennes, UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

³ Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, CS 10217, CEDEX 9, F-38043 Grenoble, France;

⁴ TIMC-IMAG, Grenoble Institut National Polytechnique, CNRS, University Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France

* Correspondence: odile.filhol-cochet@cea.fr; Tel.: +33-(0)4-38785645; Fax: +33-(0)4-38785058

extremely high. Indeed, the success rate for cancer treatments is 3.4% in phase I–III clinical trials [15]. Sato *et al.* developed in 2011, the first tight irregular cancer cell aggregates that appeared similar to *in vivo* tumors, nowadays referred to as tumoroids [16]. Subsequently, tumoroids of numerous cancer types were established [14], including prostate [17], ovarian [18], brain [19], [20], bladder [21], gastric [22], [23], [24], esophageal [25] revealing that patient-derived tumoroids recapitulate patient-specific histological features. However, their use in the field of kidney cancers remains limited [26], [27], [28], [29], [30]. Over all those methods, tumoroids derivation varied widely, including the different sources of tumor tissue they are generated from. They can be derived from primary tumors, metastatic lesions, tumor cells from liquid effusion and circulating tumor cells [13]. Following collection, processing of tumor samples can be achieved with different strategies like enzymatic and/or mechanic dissociation, and tumoroids can be formed from progenitor single cell, multicellular reassembly or millimeter-scale tumor fragments [17], [22]. Several recent works described the establishment and characterization of ccRCC organoid cultures derived from patients' tissues revealing biological insights for ccRCC research [25], [27], [28], [29], [30]. However, for their establishment, these organoid models rely on their plating on low-density Matrigel® or type 1 Collagen matrices that are complex and exhibit lot variability. Given this limitation, there is an emerging need to develop Matrigel®-independent organoid culture methods. Despite the assumption that a matrix is required to sustain long-term organoid culture, it was hypothesized that cells in the organoid create their own niche by secreting extracellular matrix components. This led to the development of matrix-free culture systems in a narrow range of tissues [31], [32], [33]. In the present work, we describe the establishment, characterization and several applications of a matrix-free technique for the culture of renal tumor organoids (tumoroids) derived from renal tumor xenografts in mice and human tumor specimen. We provide a phenotypical, transcriptomic and molecular analysis of these organoids and the corresponding tumors. Moreover, we found a clear concordance in the tumor response to treatments in this tumoroid culture model compared to tumor slice cultures or orthotopic renal cancer xenografts.

Results

Establishment of ccRCC tumoroid cultures

We generated renal tumor in mice by surgically implanting 786-O-Luc or ACHN-Luc cells under the renal capsula. 786-O cell line is a classically used ccRCC cell line that harbors VHL mutation and constitutively active HIF α , while ACHN cell line is defined as papillary RCC without VHL mutation [34], [35]. Human ccRCC tumor samples were recovered from the hospital just after surgery (Clinical trial NCT03571438). Several pieces of tumors were snap frozen for RNA isolation and cryo-microtome sectioning. The remainder was mechanically and enzymatically dissociated. After counting, dissociated

cells were either frozen for RNA sequencing or subjected to magnetic-induced cell aggregation by coating with magnetic nanoparticles before seeding into flat repellent 96-well plates (Fig. 1A). Mice tumoroids were culture in DMEM supplemented while human tumoroids were cultured in DMEM/F12 supplemented plus EGF. After 7 days, formation of live tumoroids was clearly visible by microscope evaluation. The tumoroids were viable for at least 14 days. (Fig. 1B). Thus, with a success rate of 100% in mice samples and 90% in human tumors, this model allows an accurate comparison to evaluate its translational potential with other pre-clinical cancer models.

Phenotypic characterization of ccRCC tumoroids

To determine whether phenotypic features are retained *in vitro*, we histologically characterized the ccRCC tumoroids. Gross morphology of tumoroids as well as examination of hematoxylin and eosin (H&E) staining revealed the presence of different cell populations within individual tumoroid possibly representing distinct subclonal entities. They generally resembled the parental tumor tissue. Like in the matching tumor tissue, 786-O-derived tumoroids consist of dense packed cells with a filled cytoplasm, an histological feature already reported in mouse xenograft models [9], while ACHN show tubulo-papillary architecture with clear cell-like areas (Fig. 2A). In most tumoroids, different clusters could be distinguished demonstrating a rather heterogeneous composition of different sub- populations (Supp Fig.1). The major one is represented by cancer cells, assessed by the expression of vimentin and the classical ccRCC-specific marker CAIX [3],[36]. A second population showed strong enrichment for stromal markers such as FAP thus likely representing fibroblasts (Fig. 2B). Interestingly, Pan Collagen labeling was intracellular, suggesting that cells were able to produce de novo collagen to build their own extracellular matrix (Fig. 2C a,b) [37]. Enrichment for the progenitor-like marker CD44 was observed mostly at the periphery of several tumoroids (Fig. 2C a,b), as in the original tumor tissue (Fig. 2C c). Tumor tissue show low proliferation index (Ki67 negative), while it is restored in growing tumoroids (Fig. 2C d,e,f). Clusters of CD68+ cells were observed at the periphery of the tumoroids (Fig. 2C g,h), likely representing tumor associated macrophages (TAMs) that is the most abundant immune cell population infiltrating the tumor microenvironment (Fig. 2C i) [38], [39]. Interestingly, at day 12 and 15 of culture, 786-O and ACHN tumoroids disclosed CD31+ cells that form circular layers with densely packed cells at the surface of the structure, evoking a primitive vascular-like plexus as in the original tissue (Fig. 2D). These CD31+ cells also express vimentin (Fig. 2E a, white arrow) and most importantly collagen, in higher proportions than other cell types (Fig. 2E b, white arrow), thus suggesting that CD31+ cells may start to secrete collagen IV that is necessary to create their basement membrane [40], [41].

Figure 3A shows immunofluorescence images of 786-O or ACHN tumoroids and the corresponding parental tumor stained with antibodies directed against different biomarkers. Figure 3B illustrates the grouped analysis of

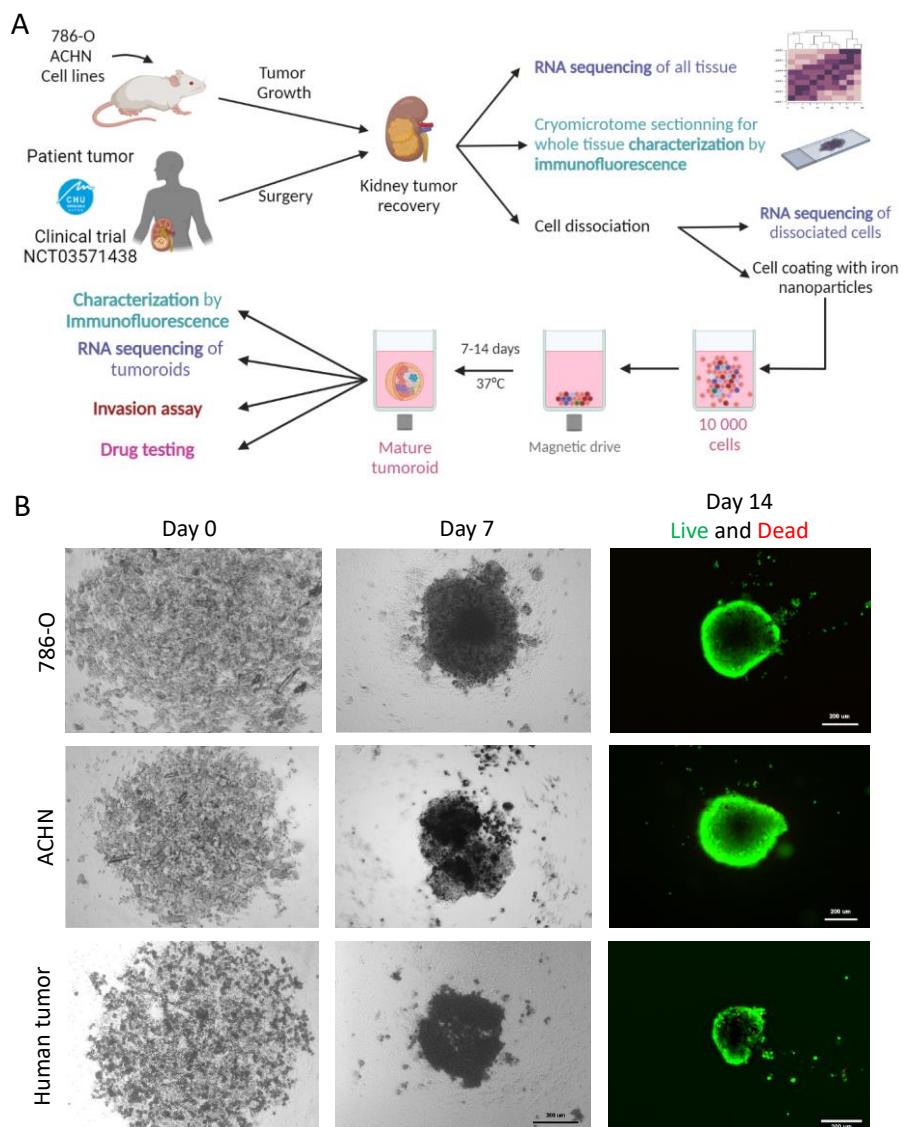


Figure 1 : Generation of tumoroids from mice tumors and human tumors. **A :** 786-O-Luc and ACHN-Luc cells are surgically implanted under renal capsula (1.10^6 cells/mice) and tumor growth is followed using luminescence (IVIS imager). Mice are euthanized when tumor growth is above 1.10^9 photon/sec/cm 2 . Human tumors are recovered fresh just after surgery at Grenoble Alpes Hospital. Kidney tumors are split into 3 pieces : 2 are fresh frozen for RNA sequencing and cryomicrotome sectioning. The third one is used to produce tumoroids in culture. Tumors are mechanically and enzymatically dissociated. One fraction is fresh frozen while the second fraction is coated with iron nanoparticles to produce tumoroids thanks to a magnetic spheroid drive. After 1 or 2 weeks of maturation, tumoroids are characterized by immunofluorescence and RNA sequencing and they are used for invasion assay and drug testing. **B :** Example of tumoroids' maturation from ACHN, 786-O and ccRCC human tumors during 7 days. At 14 days, viability assay (Live&Dead, using Calcein (green) and Ethidium homodimer (red)) is performed on tumoroids. Scale bar = 200 μ m.

their expression levels in tumoroids in comparison with the original tumor tissue (4 tumor-tumoroids grouped per cell line). Images and analysis were performed using a CX7 high content screening microscope. As previously shown in Fig.2, CD31+ cells were detectable in the tumoroids but with a reduced expression compared to the parental tumors, suggesting that angiogenesis is weak in growing tumoroids. Many cell nuclei in the tumoroids were positive for Ki67 staining as compared to the original tissue, indicating that actively dividing cells are present after >2 weeks of culture. Surprisingly, compared to original tumor tissues, E-cadherin expression was lower in the 786-O tumoroids while higher in the ACHN tumoroids. In contrast, both types of tumoroids showed a similar expression of CAIX, vimentin and FAP as compared to parental tissues, indicating that

cancer cells and fibroblasts are preserved in tumoroids. Similarly, pan collagen, the CD44 and CD68 markers were expressed to similar levels in the tumoroids and the parental tissues. This suggests that the CD44 progenitor-like cells as well as the CD68+ macrophages infiltrating into the tumor stroma were preserved in the tumoroids.

We then performed a pairwise correlation of expression of these markers in tumoroids and their respective tumor tissue (Fig.3C). As previously described, no clear correlation was found for CD31 and Ki67 expression meaning that CD31+ cells were reduced while proliferation was increased in the tumoroids as compared to the original tumor tissues. In contrast, significant correlations were found for FAP, Vimentin, CAIX, CD68 and CD44, thus indicating that tumoroids are able to

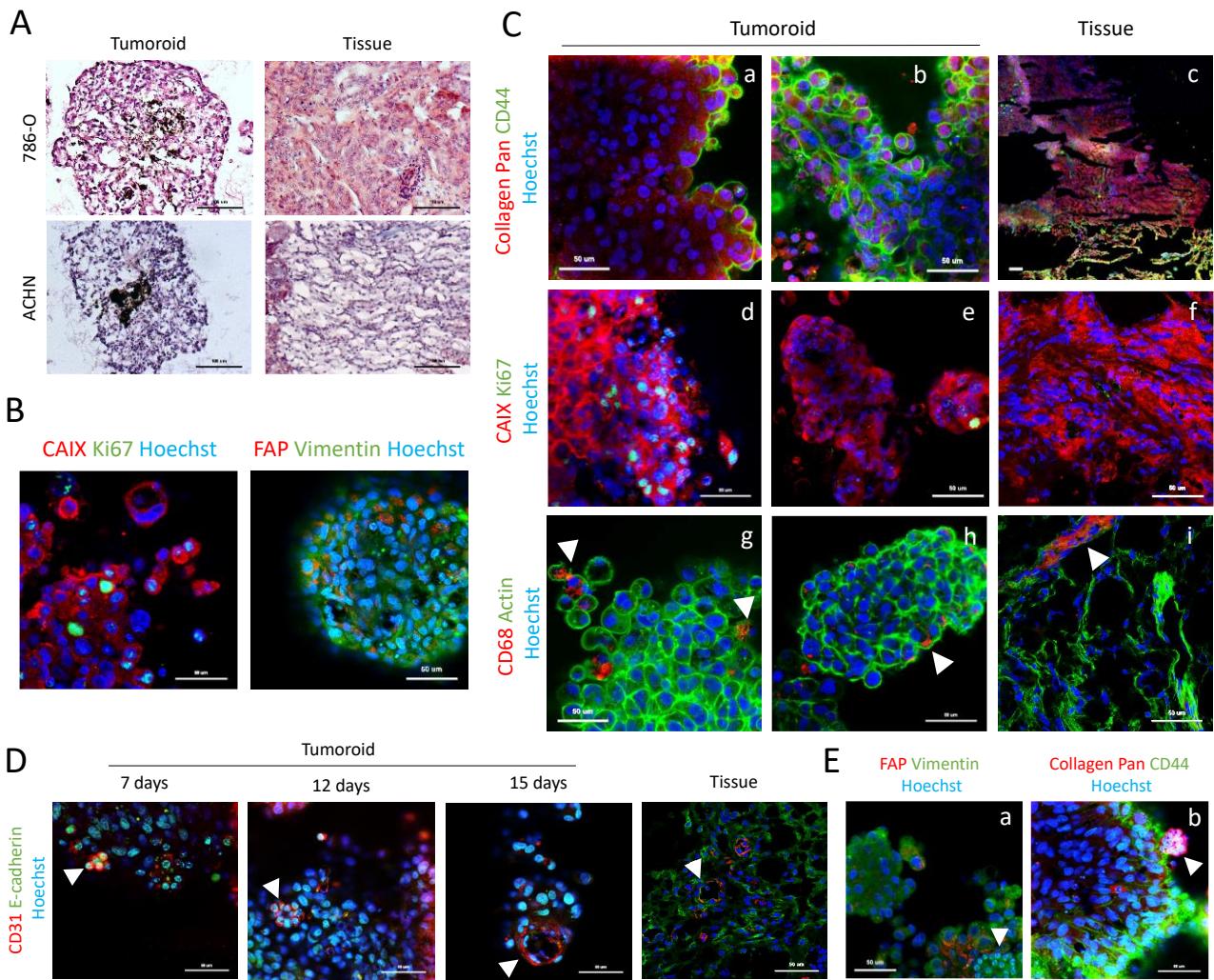


Figure 2: Phenotypic characterization of mice tumoroids by immunohistochemistry and immunofluorescence. A: 786-O and ACHN tumoroids and their counterpart tissue stained with Hematoxyline and Eosine (HE). Images were taken with AxioVision Zeiss microscope. Scale bar = 100 μ m. B-E: Immunofluorescence images of tumoroids and tissue that were taken using the LSM 880 AiryScan confocal microscope (Zeiss). Scale bar = 50 μ m. All samples are stained with Hoechst. B: Tumoroids labeled with CAIX, Ki67, Vimentin and FAP. C: Tumoroids and their corresponding tissue labeled with Collagen Pan and CD44 (a-c), CAIX and Ki67 (d-f) and CD68 and actin (g-i). D: Tumoroids labelled with CD31 and E-cadherin at different time point (7, 12 and 15 days) and the corresponding tissue. E: Tumoroids labeled with FAP and Vimentin (a), and Collagen Pan and CD44 (b).

retain the intra-tumor heterogeneity present in the tumor tissues. Finally, approximately 40% of the cells are producing collagen in the tumoroids, regardless of its amount present in their respective original tissue. This suggests that tumoroids are able to produce de novo collagen, in order to restore the ECM lost during the enzymatic dissociation process.

Altogether, these data indicate that these renal tumoroids display diverse differentiated cell types that are present in their respective original tumor tissue. Moreover, the tumoroids preserve the integrated stroma, which includes the extracellular matrix, vascular-like structures, signaling molecules and other cell types.

Gene expression of tumoroids and tumor tissues.

To evaluate the similarity in gene expression between tumoroids and the corresponding tumor tissues, we performed RNA sequencing of cells for each experimental condition (see "Methods"). RNA was extracted from cells isolated from tumoroid cultures or from frozen tumor tissue, sequencing libraries were prepared after ribosomal RNA depletion and subjected to BRB-seq to obtain a total

depth of approximately 80 million reads using Illumina Novaseq 6000. Since we injected human cancer cells into mice, cancer cells in the tumors were human while microenvironmental cells (ex. Fibroblasts, Immune cells,...) were derived from mice. Thus, the sequenced datasets were mapped on human and mouse genome using ACHN or 786-O tumor tissues (AxM and 7xM) and their respective tumoroids (AxTx and 7xTx).

We initially performed hierarchical clustering analysis on gene expression values for human cancer cells and mice microenvironment cells (Fig. 4A and 4B respectively). For cancer cells (Fig. 4A), all ACHN tumoroids (AxTx) were grouped with their tumoral tissues (AxM), as for 71T tumoroids and their matched tissue 71M, indicating that tumoroids shared a high similarity in cancer cells transcriptional profile with the tumoral tissue they were derived from. There were a few exceptions, as the tumoral tissues A3M and 74M were not clustered with their corresponding tumoroids A3Tx and 74T2, respectively, probably associated with experimental technical variability for these tumoroid replicates. However, the

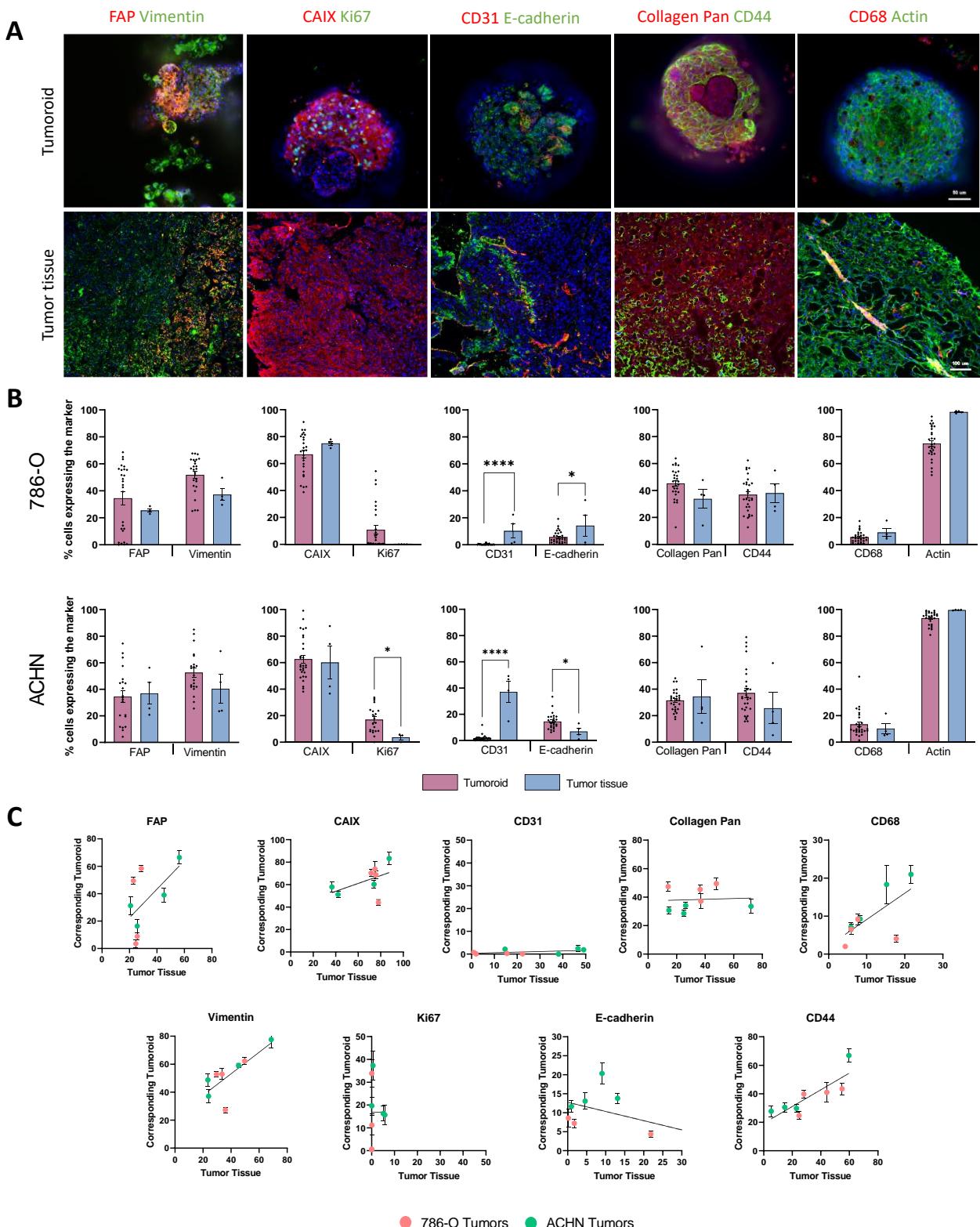


Figure 3: Cell populations proportions retained in 786-O and ACHN tumoroids compared to their original tumor tissue.

A: Immunofluorescent images of 786-O or ACHN whole mounted tumoroids and their counterpart tissues. Tissue sections are 8 μ m thick. Each column represent a different co-labeling : (1) FAP & Vimentin, (2) CAIX & Ki67, (3) CD31 & E-cadherin, (4) Pan collagen & CD44, (5) CD68 & Actin. Images were obtained using the Cell In Sight CX7 High throughput automated microscope (ThermoFisher) using 20x objective (NA 0.45) for tumoroids and 10x objective (NA 0.4) for tissue slices. Tumoroid scale bar = 50 μ m ; Tissue scale bar = 100 μ m. **B:** Percentage of cells expressing the different markers in tumoroids and tissues in a grouped analysis. 786-O tumoroids and ACHN tumoroids were respectively grouped to obtain global proportions. Quantification of different populations was made by the Thermo Fisher's HCS studio software using the spot detector bioapplication. Reference levels for positive cells to each marker was the same for all samples. Quantification was made on the following number of replicates : Tumoroids 786-O = 27 ; Tumoroids ACHN = 20-28 ; Tissues = 4. Statistical analysis was made using student t test, $p < *0.05$, ****0.0001. **C:** Correlation and linear regression of the percentage of cells that are positive for a markers in tumoroids compared to their respective tissue they are derived from. X-axis correspond to the percentage of positive cells for a marker present in the tissue while Y-axis correspond to the mean of the percentage of positive cells for 6 to 8 tumoroids per tumor. Correlations are significant for FAP, Vimentin, CAIX, CD68 and CD44 ($p < 0.05$).

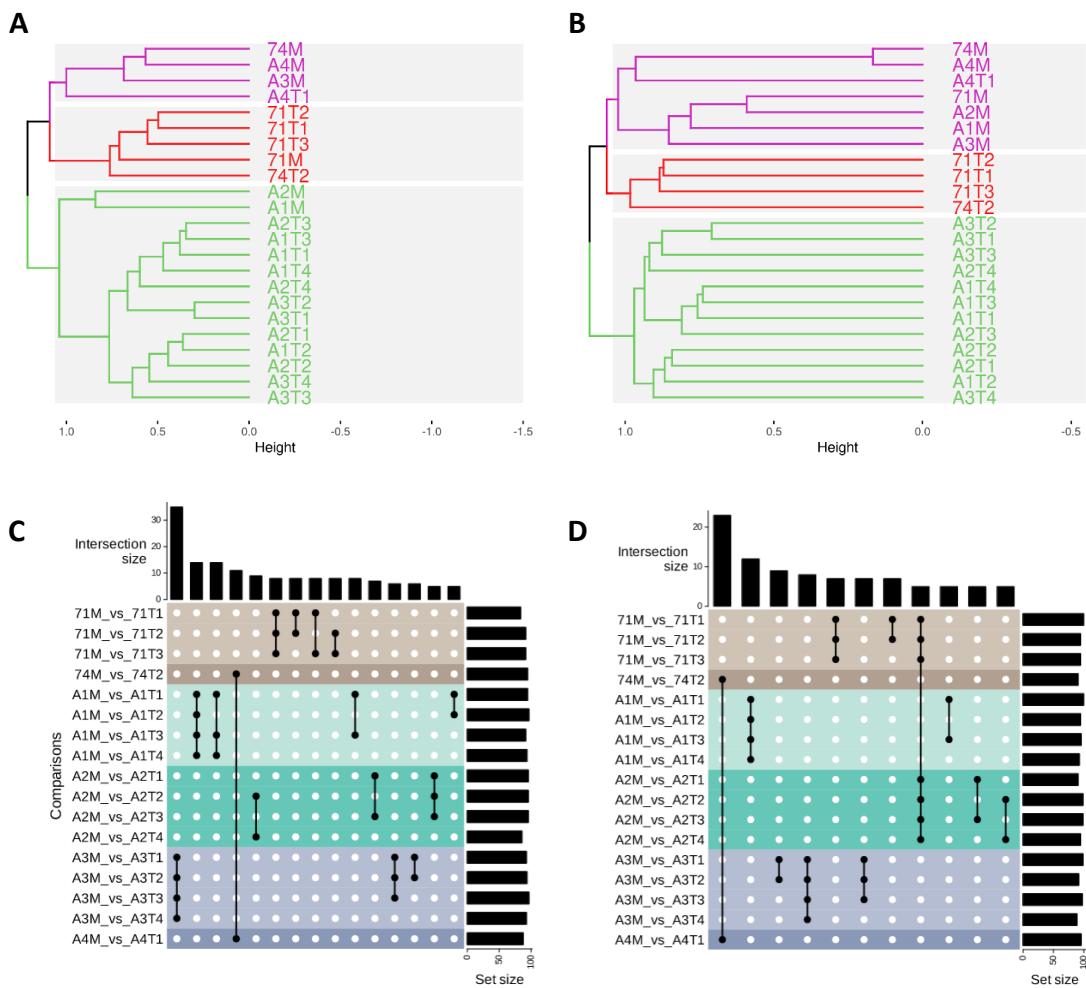


Figure 4 : mRNA expression analysis of tumoroids versus tumor tissue. **A-D :** 7xM and AxM are tumoral tissue samples while AxTx and 7xTx are their corresponding tumoroids. For example, 786-O tumor number 1 is named 71M and its corresponding tumoroids are 71T1, 71T2 and 71T3 ; ACHN tumor number 1 is named A1M and its corresponding tumoroids are A1T1, A1T2, A1T3 and A1T4. **A-B** Dendrogram representing the hierarchical clustering analysis for the mapped datasets in the human genome (**A**) and mouse genome (**B**) with 3 clusters. **C-D :** Intersection plots of comparisons between tissues and matching tumoroids for human (**C**) and mouse (**D**) mapped datasets. Set size is the number of selected genes based on a threshold applied on the \log_2 (fold change) from gene expression values comparisons between the M and T samples in M_vs_T labels. Intersection size were plotted only if ≥ 5 .

74T2 tumoroid was clustered with the other 786-O tumoroids (71Tx) and the A3Tx tumoroids were clustered with the other ACHN tumoroids, showing a clustering of transcriptomes between ACHN tumoroids on one side and 786-O tumoroids on the other. Globally, tumoroids exhibited a high similarity in cancer cell transcriptional profile as compared to their corresponding tumor tissue. Looking at the microenvironmental cells (Fig. 4B), all tumor tissues were clustered together, indicating that the *in vivo* tumor microenvironment is quite stable, independently of the cancer cell line. Moreover, ACHN and 786-O tumoroids were respectively forming a cluster. This means that the microenvironment of all tumoroids derived from the same cancer cell line are close, indicating a good reproducibility of the tumoroid production protocol. More precisely, it allows to keep the same proportion and cell diversity in all tumoroids produced from the same tumor. Of note, 786-O tumoroids were closer to their original tumor tissue compared to ACHN tumoroids. This could be explained because 786-O tumors are often more homogeneous than ACHN tumors *in vivo*. However, tumor tissues and tumoroids were not

grouped together, indicating that tumoroids have lost some of the cells of the microenvironment, which may correspond to endothelial cells as described before (Fig. 3B,C). Also, branching length separating the cluster of samples were smaller for human cancer cells (Fig. 4A) compared to microenvironment cells (Fig. 4B), suggesting a greater heterogeneity between tumoroids at the microenvironment level compared to tumor cells.

We then performed comparisons between tissues (AxM or 7xM) and their respective tumoroids (AxTx or 7xTx) for cancer and microenvironment gene expression data. For each sample pairwise comparison, we identified differentially expressed genes using a Log2 fold change plot. This consists of counting the number of conserved genes for a range of thresholds of [Log2 fold change] and selecting the threshold corresponding to the inflection point of the curve. The differentially expressed gene selections obtained by each comparison were then visualized using an UpsetPlot (Fig. 4C, D). Of approximately 12 000 expressed genes, a maximum of 100 were identified as differentially expressed by comparison of the tumoroid with its associated tissue.

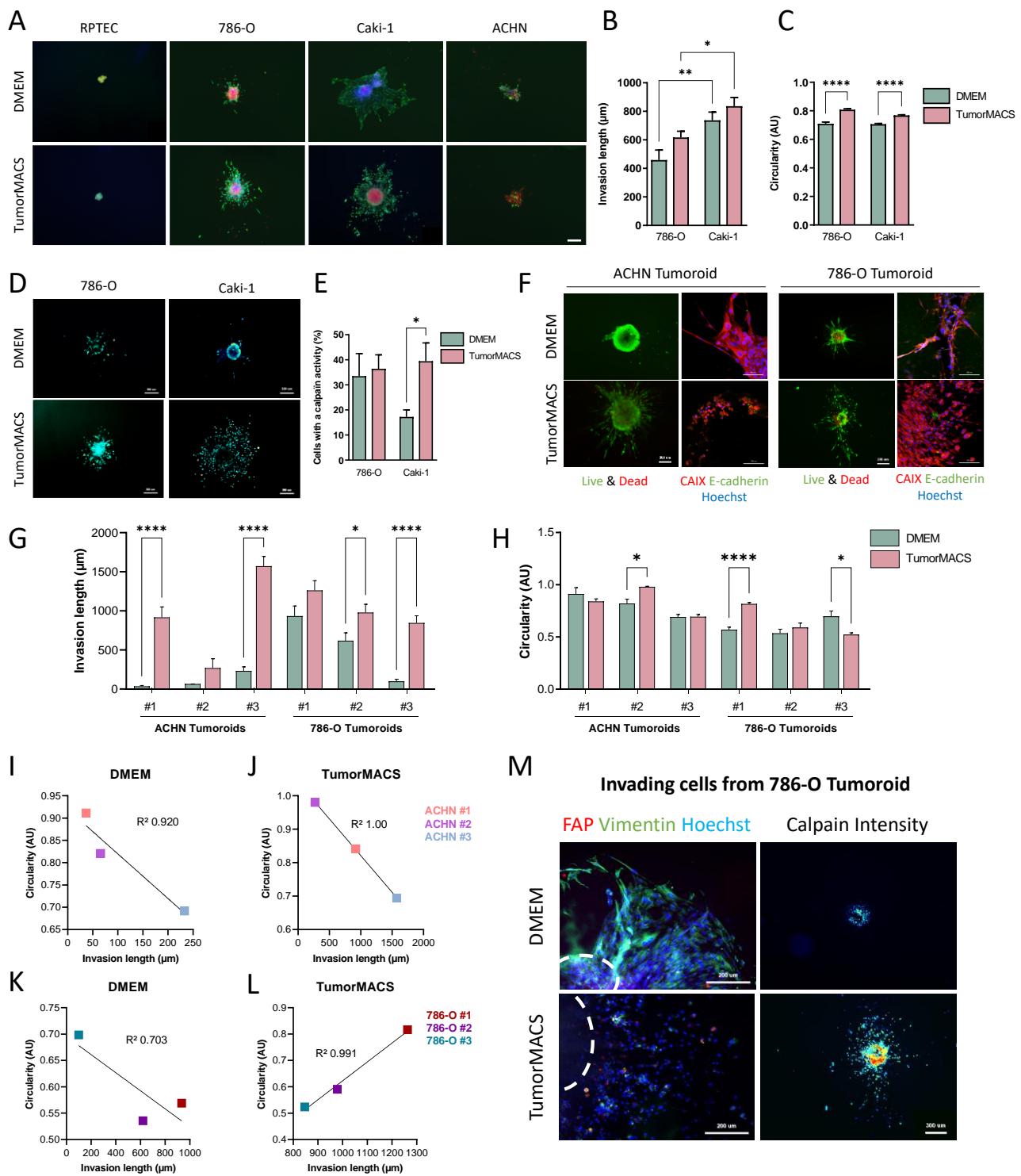


Figure 5: Invasion modes of spheroids and tumoroids in TissueSpec Kidney hydrogel.

A-E: Spheroids from cell lines that were embedded in TissueSpec Kidney hydrogel and incubated with DMEM supplemented or Tumor MACS (n = 10). RPTEC are healthy kidney cells, 786-O and Caki-1 are ccRCC cell lines and ACHN is a papillary RCC cell line. **A:** Live and Dead staining (CMAC, Calcein, Ethidium Homodimer) performed after 7 days of culture. **B:** Invasion was quantified by measuring the invasion length from the border of the spheroid up to the farthest cell. **C:** Cell circularity of invading cells was quantified, 0 meaning straight line while 1 means circle. **D:** Calpain-2 activity in spheroids using CMAC labeling and **E:** quantification of invading cells with a calpain-2 activity after 7 days of culture. **F:** ACHN and 786-O tumoroids derived from mice tumors that were embedded in TissueSpec Kidney hydrogel. After 14 days, tumoroids were labeled with Live and Dead staining (scale bar = 300 μm), and invading cells were fixed and stained for CAIX and E-cadherin (scale bar = 100 μm). **G:** quantification of Invasion length or **H:** cell circularity after 7 days of invasion (n = 2 tumoroids per tumor). **I-L:** Pairwise correlation of invasion length (x-axis) and circularity (y-axis) for ACHN and 786-O tumoroids invading the hydrogel feeded with the indicated media. **I:** ACHN tumoroids cultured in DMEM or **J:** TumorMACS and **K:** 786-O Tumoroids cultured in DMEM or **L:** in TumorMACS. **M:** Labeling of Mesenchymal cells (Vimentin), Fibroblasts (FAP) (scale bar = 200 μm) and Calpain-2 activity (CMAC) (scale bar = 300 μm) in cells that egress from 786-O tumoroids cultured in DMEM or TumorMACS after 14 days of culture. White dotted lines represent the emplacement of the tumoroids. Statistical analysis for histogram is student t test while linear regression was performed on the correlation plots. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

This was very low, indicating high similarities between tumoroids and their corresponding tumor tissues, either for human cancer cells (Fig. 4C) or microenvironment mouse cells (Fig. 4D). Moreover, an intersection size analysis shows that deregulated genes were shared between the tumoroids produced from the same tumor, whereas no common deregulation was observed between tumoroids derived from different tissues. For example, cancer cells from A3M versus A3Tx (Fig. 4C) shared more than 35 commonly deregulated genes, but did not share any with other tissue or tumoroids. Regarding the microenvironment (Fig. 4D), less genes were commonly deregulated, indicating a pronounced tumoroid to tumoroid variability.

Altogether, these data reveal that most of the tumoroids can preserve both the main cancer cell characteristics and the microenvironment of the original tumor. Importantly, comparison analysis between tumoroids generated from the same tumor tissue shows a small number of deregulated genes that could be due to cell reprogramming imposed by cell suspension culture as well as the breaking of original cell-cell and cell-ECM interactions. Finally, the higher variability of gene expression that we observed in the tumoroid microenvironment is reminiscent of the intra-tumoral spatial heterogeneity recently described in ccRCC [42].

Three-dimensional tumoroid invasion

Migration is one of the first mechanisms that cancer cells use to escape from a primary tumor before metastatic colony formation in distant organs. To examine invasion in a 3D physiological context, spheroids generated from healthy kidney cells (RPTEC) or ccRCC cells (786-O, Caki-1) or papillary RCC cells (ACHN) were fully embedded within TissueSpec Kidney® hydrogel and incubated with different cell culture media (DMEM supplemented or Tumor MACS®). We then determined the capacity of the cells to migrate and escape from spheroids and to survive in the surrounding 3D matrix after 7 days of culture using the Live and Dead staining. As shown in Figure 5A, no sign of invasion was detected from RPTEC spheroids. In contrast, the three different renal cancer cell lines actively invade at a variable extent in this assay. Unlike the ACHN, which are established as invasive, Caki-1 and 786-O cells exhibited a high degree of invasion in both cell culture media. However, the amount of cell egress as well as the cell circularity were statistically increased in the TumorMACS® medium (Fig.5 B,C). Calpain-2 has been shown to regulate cancer cell invasion and metastasis through the cleavage of the focal adhesion and invadopodia-associated protein talin [43], [44], leading to amoeboid conversion of disseminated cells [45]. As depicted in Figure 5 D,E, Calpain-2 activity was detectable after 7 days of culture and significantly increased in cells escaping from Caki-1 and 786-O spheroids cultured in TumorMACS® medium, suggesting an amoeboid-like mode of invasion [46].

Following these observations on spheroids, we next examined cell invasion using ACHN or 786-O tumoroids. We first noticed that cells were able to invade the

surrounding matrix and were viable after 7 days (Fig.5 F Live & Dead staining). The escaping cells which were identified as renal cancer cells disclosed a round-shaped phenotype in TumorMACS® compared to DMEM (Fig.5 F CAIX/E-cadherin staining). It was also clear that egress from the tumoroids was increased in the TumorMACS® medium (Fig.5 G), while cell circularity was variable between both types of tumoroids (Fig.5 H). Pairwise comparisons of invasion length and circularity show that in both culture media, cells escaping from ACHN or 786-O tumoroids with the lowest circularity, displayed enhanced invasiveness (Fig.5 I,J,K). In contrast, in the presence of TumorMACS®, a different migration behavior emerged in 786-O tumoroids (Fig.5 L). Egressing cells have an enhanced circularity leading to a more deformable and viscous phenotype [47], possibly correlated with their high Calpain-2 activity and low vimentin expression (Fig.5 M).

Altogether, these data indicate that both the media and the cell characteristics can affect their migration mode. In particular, the TumorMACS® medium may contain a signaling molecule composition that could promote round-shaped amoeboid-like migration of 786-O cells, while DMEM do not [48],[49]. In line with this, 786-O cells that have a constitutive activation of HIF α , would be more receptive and prone to Calpain-2-mediated amoeboid migration [45].

Comparison of tumor response to treatment on *ex vivo* and *in vivo* tumor models.

786-O and ACHN cells grown as spheroids or as tumoroids derived from mice tumor samples were subjected to the FDA-approved compound sunitinib, used for first-line treatment of ccRCC or to KU-60019 plus CX-4945 (KU-CX), a combined inhibition of ATM and CK2 kinases which has shown promising activities in a previously published drug screen [10]. After 48 h of treatment, spheroids as well as tumoroids were highly sensitive to sunitinib or the KU-CX combination (Fig.6 A,B). Similarly, renal tumor slice cultures displayed sensitivity to the same drug concentrations (Fig.6 C,D). Thus, spheroids, tumoroids, and tumor slices derived from the same ccRCC sample showed similar drug sensitivities. We also performed xenograft studies by subcutaneously injecting 786-O luc cells into mice. Oral drug administration started when average tumor size reached about 250 to 300 mm³. Using ccRCC vehicle-treated mice as a reference, mice were treated for ten consecutive days with KU-60019 plus CX-4945 or Sunitinib (Fig.6 E,F). In concordance with the effect observed on tumoroids, growth of the corresponding tumor in mice was substantially inhibited by sunitinib or the drug combination, validating these renal tumoroids as a relevant model for testing anti-cancer compounds.

Phenotypic characterization and treatment response of Human Tumoroids

Patient-derived renal cancer tumoroids were generated from patient's tissue sample NJ115 that was identified as a grade pT1a ccRCC by pathologists. H&E staining revealed the renal clear cell phenotype of the original

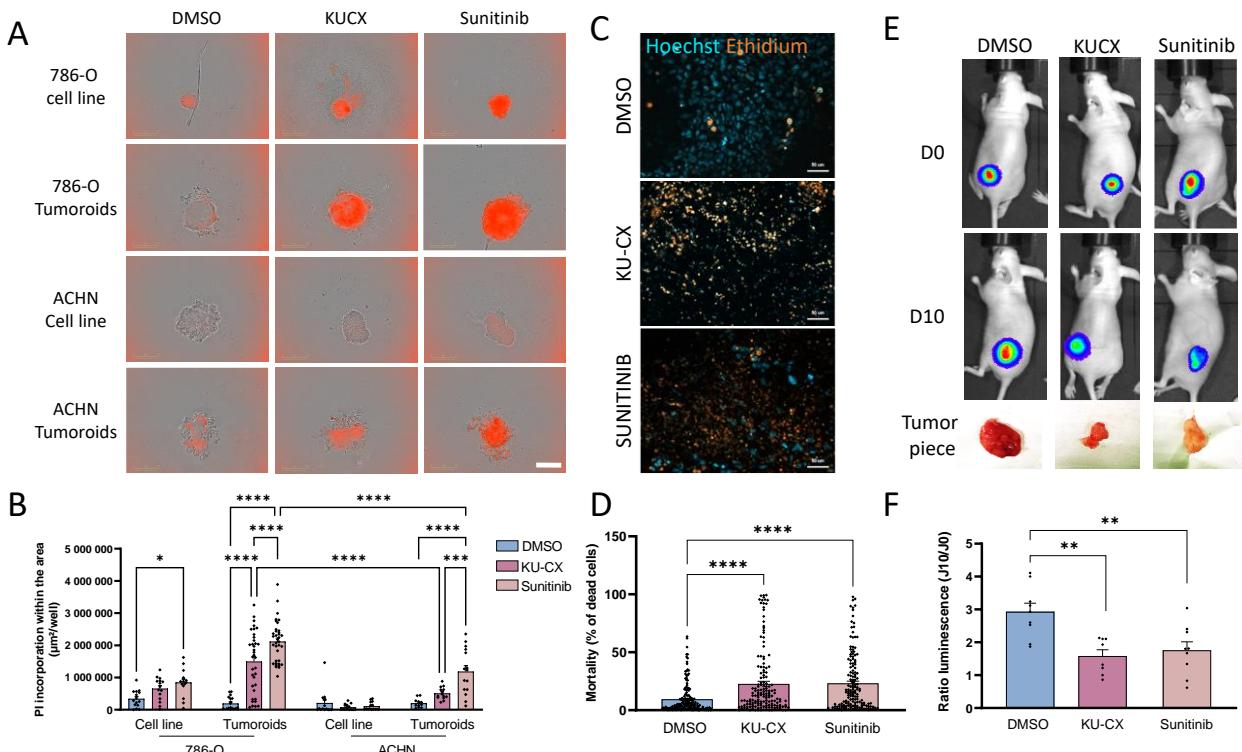


Figure 6 : Assessment of tumoral response to treatment on different tumor models. (A-D) Spheroids, tumoroids and tissue slices were treated with KU-60019 (10 μM) plus CX-4945 (10 μM), Sunitinib (10 μM) or DMSO as control. (A,B) Spheroids and tumoroids were treated for 48 hours and mortality was assessed with propidium iodide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) using Incucyte zoom Imager, $n=12/18$, scale bar = 300 μm . (C,D) Tumor slices were culture on air liquid interface and after 48 h they were labelled with Hoechst and Ethidium homodimer. (C) Pictures were taken using Zeiss Apotome microscope (20x, NA 0.7, scale bar = 50 μm) and analyzed with ImageJ and R studio to obtain percentage of dead cells ($n = 13$ mice) (D). (E,F) 3 weeks old mice were subcutaneously injected with 8 millions 786-O Luc cells. After tumor growth they were treated for 10 consecutive days by force-feeding with KU-60019 (25 mg/kg) plus CX-4945 (12.5 mg/kg) or Sunitinib (50 mg/kg) or DMSO as control. (E) Luminescence follow up of tumors during treatment (days 0 and 10) and the piece of tumors after the sacrifice. (F) Ratio of luminescence of tumors before and after treatment ($n = 8$ mice per group). Kruskall Wallis and Mann Whitney statistical analysis were performed for *in vitro* and *in vivo* experiments respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

tissue was conserved in the tumoroids (Fig.7 A). NJ115 tumoroids were sensitive to Sunitinib only (Fig.7 B) while corresponding organotypic slice culture was sensitive to both KU-CX and Sunitinib (Fig.7 C), unveiling differences in drug sensitivity of both models. Figure 7D shows immunofluorescence images of NJ115 tumoroids and the parental tumor stained with antibodies directed against different biomarkers. Figure 7E illustrates the grouped analysis of their expression levels in tumoroids in comparison with the original tumor tissue, as described earlier. As for mice-derived 786-O tumoroids, patient-derived tumoroids showed a decrease in E-cadherin expression compared to the original tumor tissue, thus probably correlating with the ccRCC subtype. Surprisingly, NJ115 tumoroids did not retain CD44+ progenitor-like cells compared to mice tumoroids. Moreover, cell proliferation was not restored in the tumoroids, as the level of Ki67 was equivalent between tumoroids and the original tumor tissue. In contrast, we found similar expression levels of FAP, Vimentin, CAIX, CD68 and PanCollagen. This means that multiple cell types and matrix components such as fibroblasts, cancer cells, macrophages and de novo collagen production were maintained in patient-derived tumoroids. Interestingly, we could also observe CD31+ cells, thus probably indicating that the addition of F12 and EGF in

the culture media was sufficient to preserve endothelial progenitor cells.

Altogether, these data indicate that it is feasible to produce patient-derived renal cancer tumoroids, even from low grade tumors. They provide a biologically relevant model system that recapitulates tumor intrinsic characteristics, preserving the cell diversity of the parental tumor, which includes cancer cells, endothelial cells, fibroblasts and immune cells. Moreover, they could be used as avatars to screen new drugs as we demonstrate that it is possible to assess treatment response *in vitro*.

Discussion

Evidences were provided that tumoroids derived from primary cell lines lost inter-tumor heterogeneity as well as the appropriate features of the tumor from which they originated [50]. Tumoroids generated from patient tumor samples have shown many advantages to recapitulate patient's tumors properties as well as to predict patient's treatment response [51], [52]. They have been proposed as avatars for drug screening because of their accuracy to recapitulate cancer heterogeneity, but also for their expanding capacities, thus allowing a better selection of potential anti-cancer treatments before assessing them *in vivo* [14]. Moreover, they take into account the wider

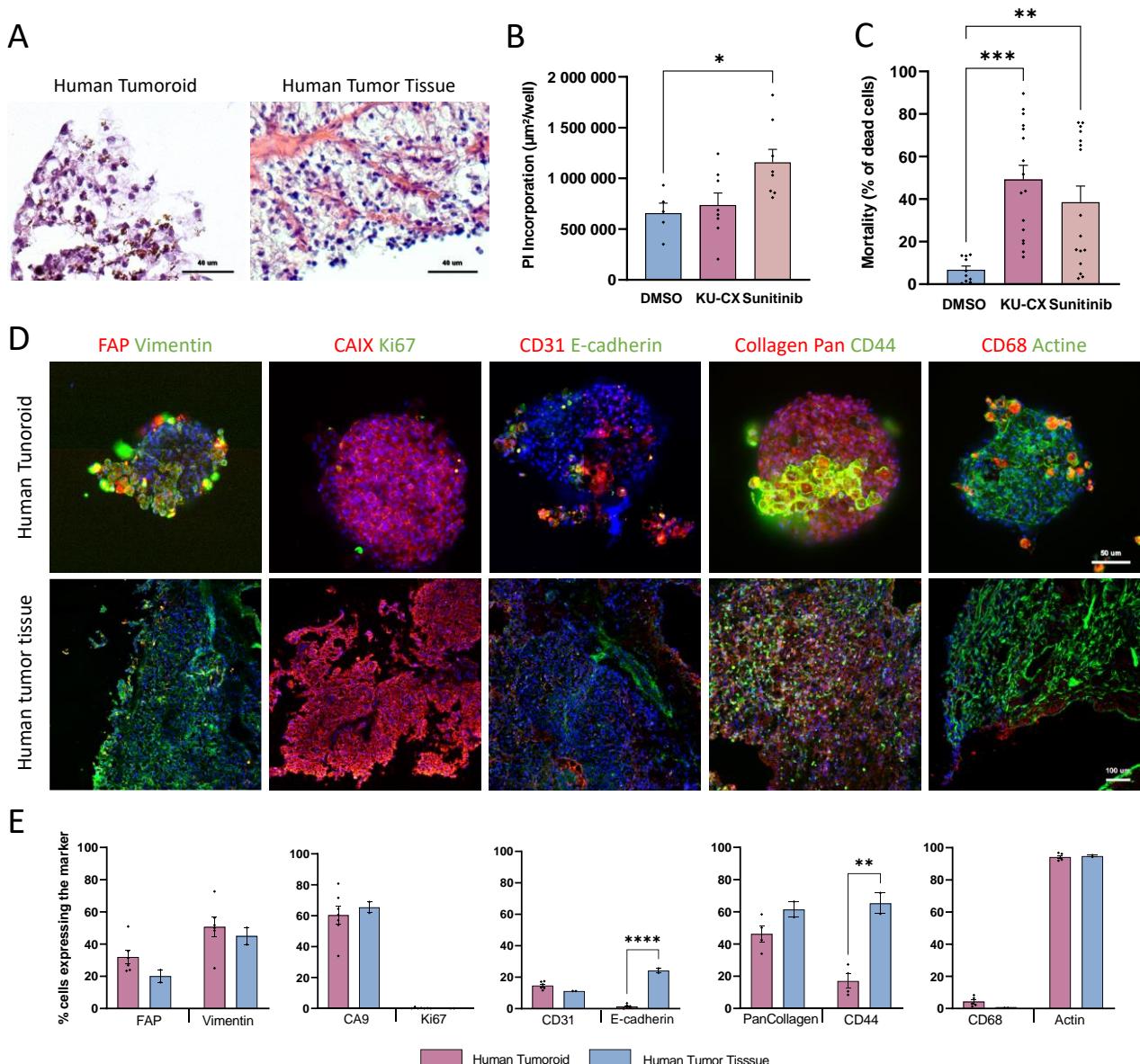


Figure 7 : Characterization and drug sensitivity of the human ccRCC tumoroids. **A:** Human tumoroid and its counterpart tumoral tissue from patient NJ115 stained with HE. Scale bar = 40 μm . **B-C:** Tumoroids (B) and tissue slice (C) treated with KU-CX (10 μM each) or Sunitinib (10 μM) or DMSO as control. Mortality was assessed as in fig. 5. **D:** Immunofluorescent images of NJ115 whole mounted tumoroids and its counterpart tissue. Tissue sections are 8 μm thick. Each column represent a different co-labeling : (1) FAP & Vimentin, (2) CAIX & Ki67, (3) CD31 & E-cadherin, (4) Pan collagen & CD44, (5) CD68 & Actin. Images were obtained using the Cell In Sight CX7 High throughput automated microscope (ThermoFisher) using 20x objective (NA 0.45) for tumoroids and 10x objective (NA 0.4) for tissue slices. Tumoroid scale bar = 50 μm ; Tissue scale bar = 100 μm . **E:** Percentage of cells expressing the different markers in tumoroids and tissue for the human tumor NJ115. Quantification of different populations was made by the Thermo Fisher's HCS studio software using the spot detector bioapplication. Reference levels for positive cells to each marker was the same for all samples. Quantification was made on the following number of replicates : Tumoroids = 6-8 ; Tissues = 2. Statistical analysis was made using student t test, $p < *0.05$, ** 0.01, *** 0.001, **** 0.0001.

tumor microenvironment, that can modulate treatment response to chemotherapy or even immunotherapy [53].

Several models of ccRCC organoids using Matrigel® [26], [27], [29], or collagen I [28] have been reported. Lugand et al. also produced tumoroids from ccRCC patient's samples using the liquid overlay suspension method, however, they removed immune cells and cultured cancer cells in 2D before reassembling them as tumoroids and their model was not fully characterized [30].

Here, we demonstrated, for the first time, the feasibility of culturing mice and human ccRCC tumoroids directly from fresh tissue using a scaffold-free method. We could

establish a stable culture method using magnets that are known not to be toxic and not to alter treatment response [33], [54]. Moreover, we could show that our model retains the cellular heterogeneity and tumor microenvironment. RNA sequencing highlighted the reproducibility of the method and that the majority of expressed genes were conserved in tumoroids compared to their matching tumor tissue. Patient-derived tumoroids had a weak proliferation index, which is often the case with ccRCC tumors that have a Ki67 positive median of 5% [55]. Importantly, they were able to maintain multiple cell types, including endothelial progenitor cells, which were never reported in other ccRCC tumoroid static

culture models. Indeed, vasculature establishment usually requires shear stress and microfluidic devices as it was demonstrated for the development of perfused healthy kidney organoids [56]. Our tumoroid model disclosed endothelial progenitor cells that were able to form plexus-like structures. Indeed, tumoroid function can be influenced by altering the media conditions. DMEM alone was not able to preserve endothelial cells in the mice tumoroids compared to original tissue. This loss was also suggested by RNA analysis (Fig.4 B,D). As already reported [57], we found the the addition of EGF in culture media for culturing patient-derived tumoroids was sufficient to maintain a significant population of endothelial progenitor cells into patient-derived tumoroids. We also showed that spheroids generated from different renal cancer cell lines or mice tumoroids provide opportunities to evaluate the invasive capacity of renal cancer cells in a 3D physiological context. This analysis revealed that spheroids as well as tumoroids derived from different cell lines did not exhibit the same invasive capacities. Moreover, the microenvironment plays an essential role in the invasive potential of tumors, since ACHN spheroids were not able to invade compared to their counterpart tumoroids.

Moreover, our tumoroid model allows accurate assessing the response to chemotherapeutic agents, which was in line with alternative methods like tumor tissue slice culture or *in vivo* xenograft model. Thus, this tumoroid model can help in the future to capture a personalized tumor response to chemotherapy, but also to prevent cancer patients from receiving ineffective treatments.

In summary, our study validates a scaffold free ccRCC tumoroid model that can be used for personalized medicine, to screen new drugs as well as to evaluate invasive potential of tumors *in vitro*.

Material and Methods

Cell culture

ccRCC cell lines 786-O, Caki-1 and ACHN were obtained from ATCC (CRL-1932, HTB-46 and CRL-1611 respectively). The cell lines were grown in 10 cm diameter plates in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂) with RPMI 1640 medium (Gibco) containing 10% of fetal bovine calf serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). RPTEC cell line was obtain from Evercyte and grown in ProXup media (Evercyte). To produce spheroids, cells were counted and coated with magnetic NanoShuttle (Greiner) (1 µL per 20 000 cells) thanks to 3 centrifugation/resuspension cycles at 400 g for 5 min each. Cells were seeded into U-bottom 96-well plates coated with 20 mg/mL poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PolyHema) (Sigma-Aldrich) at the density of 1500 cells per well, centrifuged at 400 g for 5 min and then were grown for 3 days.

Generation of luciferase expressing cells

786-O and ACHN cells were plated into 6-well plates in 2 mL of serum-supplemented RPMI 1640 medium. The day after, adherent cells were infected with Lenti-II-CMV-Luc-IRES-GFP virus (ABM, Deutschland) (1–5 MOI (multiplicity

of infection)) diluted in 1 mL of serum-supplemented medium containing 8 µg/mL of polybrene (Sigma). After 4 h, 1 mL of medium was added to each well and transduction was maintained for 16 h before changing the medium. For stable transduction, puromycin selection started 36 h post-infection (at the concentration of 2 µg/mL) and maintained for 2 weeks.

Mice Orthotopic and Subcutaneous Tumor Xenograft model

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. Renal orthotopic implantation was carried out by injection of 1.10⁶ 786-O luc or ACHN luc cells into the left kidney of athymic nude mice as previously described [10],[58]. Subcutaneous xenografts were obtained by injecting 8.10⁶ 786-O luc cells on the back of athymic nude mice. Tumor growth was followed by intraperitoneal injection of 150 mg/kg D-luciferin Potassium salt using IVIS Imager (Perkin Elmer).

Patients and Clinical Samples

All human renal carcinoma samples were obtained from patients, with their informed consent, and all procedures were approved by the ethics committee (Patient Protection Committee No. 2017 A0070251). Patients were recruited under the clinical trial, Comborein (NCT03572438)[59]. Fresh renal tumor tissue was obtained from patients undergoing a partial or a total nephrectomy for cancer at the Urology Department, University Hospital Center of Grenoble, Alpes (CHUGA).

Fresh Tissue Sectioning

A Vibratome VT1200 (Leica Microsystems) was used to cut thin (300 µm) slices from fresh tumor tissue as previously described [10], [11]. Briefly, samples were soaked in ice-cold sterile-balanced salt solution (HBSS), orientated, mounted and immobilized using cyanoacrylate glue. Slicing speed was comprised between 0.03–0.08 mm/s depending on tissue stiffness. Vibration amplitude was set between 2.95 and 3.0 mm.

Organotypic Tissue Cultures

Tissue slices were cultured as previously described [10], [11]. Briefly, they were cultured on organotypic inserts for 48 h (one slice per insert; Millipore) at 37°C in a 5 % CO₂ humidified incubator under agitation, using 2 mL of DMEM media supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (GIBCO), 100 U/mL penicillin + streptomycin (Invitrogen). The slices were incubated with following compounds dissolved in DMSO: KU-60019 (10 µM; Selleck Chem) plus CX-4945 (10 µM ; Plateau Synthèse Organique, UGA) ; Sunitinib (10 µM ; Selleck Chem) and DMSO (0.1%; Sigma) as control. After 48 h the viability of tumor slices was assayed [11].

Cell dissociation and tumoroids production

Cell dissociation was perform thanks to the gentleMACS Dissociator and the Tumor dissociation kit (Miltenyl Biotec) according to manufacturer's instructions. Briefly, pieces of fresh tumors from mice or patients were chopped with a scalpel and transferred into the "C"

dissociation tube. Chopped tumor was suspended in supplemented DMEM and enzymes from the kit (A, H and R). Mechanical dissociation was performed by 3 cycles of stirring using the GentleMACS Dissociator. Between each cycle, the tube was incubated 30 min at 37°C for enzymatic digestion. Cell suspension was then filtered and washed through the MACS SmartStrainers (70 µm pores) to remove undissociated particles. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min and Red Blood Cells (RBC) were lysed thanks to the RBC Lysis buffer during 4 min at 4°C. The reaction was stopped by PBS addition. Cells were counted and coated with magnetic NanoShuttle (Greiner) (1 µL per 20 000 cells) thanks to 3 centrifugation/resuspension cycles at 400 g for 5 min each. Cells were seeded into flat repellent 96-well plates (Greiner) at the density of 10 000 cells per well. For tumoroids formation, plates were maintained on the Spheroid Drive support (Greiner) for 14 days at 37°C with 5 % CO₂ in a humidified incubator as described in [33]. Mice tumoroids were cultured in DMEM media supplemented with 10 % FBS (GIBCO), 100 U/mL penicillin + streptomycin (Invitrogen), while human tumoroids were cultured in DMEM/F12 (1/1) supplemented with 10 % FBS (GIBCO), 100 U/mL penicillin + streptomycin, and 10 ng/mL EGF.

Three-dimension (3D) cell death measurements

Three days-old spheroids (786-O and ACHN) and 14 days-old tumoroids were transferred into a U-bottom 96-well plate coated with 20 mg/mL polyHema. They were treated for 48 h, with KU-60019 (10 µM) plus CX-4945 (10 µM) or Sunitinib (10 µM) or DMSO (0.1 %) as control. To assess cell death, 0.5 µg/mL Propidium iodide (PI) was added to the culture during all the treatment. PI incorporation was followed in real time with the Incucyte ZOOM® imager.

Invasion assay

Three days-old spheroids and 14 days-old tumoroids were included in TissueSpec Kidney hydrogel (Xylyx Bio, New York, USA). At day 0 and 7, cells were stained with Live and Dead viability kit containing Calcein and Ethidium Homodimer (Invitrogen). They were also stained with CMAC t-BOC-Leu-Met (Invitrogen) for calpain activity measurement. CMAC is a calpain peptidase substrate that will fluoresce when cleaved by active calpain [46]. Image analysis was performed using Icy and ImageJ softwares.

Cryomicrotome sectioning

Pieces of fresh tumors and tumoroids were fixed in Paraformaldehyde 4 % (Sigma) for 1 h at room temperature. The pieces were included in OCT mounting medium and frozen in liquid nitrogen up to solidification. Tissues and tumoroids were conserved at -80°C before use. Slices (8 µm thick) were cut with a Cryo-microtome (Leica) to perform immunofluorescence and Hematoxylin and Eosin staining for tumor characterization.

Immunofluorescence labeling of tumoroids

Tumoroids were labeled one by one in a flat repellent 96-well plate. For all liquid removing steps, we used the Handling Magnetic support (Greiner) to keep tumoroids

inside the wells while removing the solutions. Tumoroids were washed in PBS and fixed in paraformaldehyde 4 % (Sigma) for 1 h at 4°C. All the next steps were performed under horizontal agitation (60 rpm). After 10 min in PBS-Tween 20 0.1%, they were permeabilized and saturated 1 h in Organoid Washing Buffer (OWB) containing 0.1 % Triton-X100 and 0.2 % BSA diluted in PBS. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. On the second day, tumoroids were washed 3 times during 2 h in OWB and secondary antibodies were incubated overnight at 4°C. On the third day, tumoroids were washed 3 times and during the second one, Hoechst was added to OWB (1/1000^e) for nuclei staining. At the end, tumoroids were transferred into 96-CellView Microplate glass bottom (Greiner) for fluorescence imaging. The primary antibodies used are the following ones : FAP (Abcam #ab53006, 1/100^e), Vimentin (Sigma #V5255, 1/200^e), CD31 (Abcam #ab28364, 1/25^e), E-cadherin (BD #610181, 1/200^e), PanCollagen (ThermoFischer #PA5104252, 1/100^e), CD44 (SantaCruz #sc-53298, 1/200^e), CA9 (NovusBio #NB100-417, 1/500^e), Ki67 (DAKO #M7240, 1/100^e), CD8 (Abcam #ab101500, 1/100^e), CD68 (ThermoFisher #PA5-32330, 1/100^e) and Phalloidin (Invitrogen #A12379, 1/400^e). Secondary antibodies are the following ones: Cy3 Goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch #111-165-003, 1/1000^e), 488 Goat anti-mouse IgG (Invitrogen #a11001, 1/2000^e) and 488 Goat anti-Mouse IgM µ chain (Invitrogen #a21042, 1/2000^e).

Immunofluorescence labeling of cryomicrotome slices

Frozen slices were allowed to stabilize at room temperature (RT) for 10 min. They were washed 3 times with PBS (1X) and then permeabilized in PBS Triton-X100 0.5 % for 10 min at RT. After 3 washes in PBS-Tween20 0.05 %, they were saturated with PBS-Tween20 0.05 %, 5 % SVF and 0.2 % BSA for 1 h at RT. Antibodies were incubated overnight at 4°C. The day after, slices were washed 3 times in PBS-Tween20 0.05 % and incubated for 1 h at RT in the dark with secondary antibodies. Slices were washed 5 times in PBS-Tween20 0.05 % and nuclei staining was performed with Hoechst for 15 min at RT in the dark. After a final wash, slices were mounted for microscopy using Fluoromount-G (Southern Biotech). Antibodies used were the same as described for tumoroids labeling.

Hematoxylin and Eosin Staining

Frozen slices were allowed to stabilize at room temperature (RT) for 10 min and washed in water to remove OCT mounting medium. Slices were stained for 40 sec with Hematoxylin (Sigma) followed by washing using water and stain for 4 min using Eosin (Sigma). Slices were then dehydrated in ethanol 100 % for 2 x 5 min and with Xylene for 2 x 2 min. Slices were mounted using Merkoglass (Sigma) and visualized under microscope.

Fluorescence microscopy

Qualitative imaging was performed thanks to the confocal microscope LSM 880 with AiryScan module (Zeiss) at the µLife platform, CEA Grenoble. Pictures were taken using the 40X oil objective. Quantitative imaging

was performed thanks to the CX7 Cell Insight high throughput confocal microscope (ThermoFisher) at the CMBA platform, CEA Grenoble. Pictures were taken using the 20X air objective (NA 0.45) for tumoroids and 10X air objective (NA 0.4) for tissue slices. Image quantification was performed with the Thermo Scientific HCS studio Cellomics Software by using the spot detector bio-application.

RNA extraction

RNA extracts from tumoroids were obtained using the RNeasy Micro Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. Two tumoroids were used for each extract. RNA Extracts from tissues were obtained using the MirVana PARIS kit (ThermoFisher).

Bulk RNA Barcoding (BRB)-sequencing and raw data preprocessing

BRB-sequencing was performed at the Research Institute for Environmental and Occupational Health (Irset, Rennes, France) as previously described [10], [60]. The first read contains 16 bases that must have a quality score higher than 10. The first 6 bp correspond to a unique sample-specific barcode and the following 10 bp to a unique molecular identifier (UMI). The second reads were aligned to the human reference transcriptome from the UCSC website (release hg38) using BWA version 0.7.4.4 with the non-default parameter “-l 24”. The second reads were also aligned to the mouse reference transcriptome from the UCSC website (release mm10) using BWA version 0.7.4.4 with the non-default parameter “-l 24”. Reads mapping to several positions in the genome were filtered out from the analysis. The pipeline is described in Reference [10.1016/j.chemosphere.2020.128468]. After quality control and data preprocessing, a gene count matrix was generated by counting the number of unique UMIs associated with each gene (lines) for each sample (columns). The resulting UMI matrix was further normalized by using the rlog transformation implemented in the DeSeq2 package [10.1186/s13059-014-0550-8].

Bioinformatics analysis

The hcut method of the factoextra package on R (version R 4. 1) with 3 clusters is implemented on the original tumor tissue samples (A1M, A2M, A3M, A4M, 71M and 74M) and on the tumoroids samples (A1T1, A1T2, A1T3, A1T4, A2T1, A2T2, A2T3, A2T4, A3T1, A3T2, A3T3, A3T4, A4T1, 71T1, 71T2, 71T3, 74T2), for the human genome (11443 genes) and for the mouse genome (11914 genes) independently. This method computes hierarchical clustering and splits the tree into 3 clusters. It also accepts distance measurement methods based on pearson correlation. To visualize the results of the hierarchical clustering, we use the fviz_dend method of the R package factoextra (version R 4.1). This method allows creating dendograms. We have chosen to perform the hierarchical clustering and the dendrogram with 3 clusters. Indeed, a preliminary analysis of the shape of the dendrogram gave us an indication on the number of clusters to retain and then we calculated the inertia of the clustering tree. The result of these two observations was to realize the

hierarchical clustering with 3 clusters. The distinct intersections of set of genes or pathways were visualized by the make_comb_mat() function with a mode parameter set to “distinct” followed by the UpSet() function from the ComplexHeatmap R/Bioconductor package (version 2.14.0).

Statistical Analysis

The statistical significance of differences between the means of two groups was evaluated using GraphPad version 9. Tests are indicated below in each figure legend.

Acknowledgments

We thank the animal unit staff (Bama S. Magallon C., and Pointu H.) at Interdisciplinary Research Institute of Grenoble (IRIG) for animal husbandry; GenomEast Platform (Illkirch, France) for the sequencing and Thomas Darde (SciLicium) for preprocessing of the BRB-seq data. Part of this work has been performed at the CMBA platform - IRIG-DS-BGE-Gen&Chem-CMBA, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble, (a member of GIS-IBISA and ChemBioFrance infrastructure) supported by GRAL, a programme of the Chemistry Biology Health Graduate School of Université Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003) for the use of the High content screening CX7 microscope. This work was supported by recurrent institutional funding from INSERM, CEA, and Ligue Comité de l'Isère, University Grenoble Alpes, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble-Alpes (CHUGA), Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (GEFLUC).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

“Conceptualization, I.S., C.C. and O.F.; Investigation and Methodology, I.S., C.P., P.B., F.J., B.C. B.E. and O.F.; Validation, I.S., C.B., C.C. and O.F.; Formal Analysis, I.S., C.B., and O.F.; Software, I.S., P.B., F.J.; Resources, A.B., J.L.D.; Data Curation, I.S., P.B., F.J.; Visualization, I.S., C.P., P.B., F.J.; Writing – Review & Editing, I.S., O.F. and C.C.; Supervision, O.F., C.C.; Project administration and Funding Acquisition, C.C.; O.F.”.

References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA: Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [2] C. J. D. Wallis, “Epidemiology and Etiology of Kidney Cancer,” *Urotoday*, 2018. <https://www.urotoday.com/library-resources/kidney-cancer-today/109190-epidemiology-and-etiology-of-kidney-cancer.html?tmpl=component&print=1> (accessed Mar. 23, 2020).
- [3] A. Y. Warren and D. Harrison, “WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies,” *World J. Urol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1913–1926, 2018, doi: 10.1007/s00345-018-2447-8.
- [4] M. D. Galsky, “Metastatic renal cancer: Better never than late,” *Eur. Urol.*, vol. 65, no. 6, pp. 1093–1094, 2014, doi: 10.1016/j.eururo.2013.08.004.
- [5] B. Escudier et al., “Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,” *Ann. Oncol.*, vol. 25, no. August, pp. iii49–iii56, 2014, doi: 10.1093/annonc/mdw328.
- [6] M. Roberto et al., “Metastatic Renal Cell Carcinoma Management: From Molecular Mechanism to Clinical Practice,” *Front. Oncol.*, vol. 11, no. April, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.657639.
- [7] K. J. Gotink et al., “Cross-resistance to clinically used tyrosine kinase inhibitors sunitinib, sorafenib and pazopanib,” *Cell. Oncol.*, vol. 38, no. 2,

- [8] pp. 119–129, 2015, doi: 10.1007/s13402-015-0218-8.
- A. T. Beksaç, D. J. Paulucci, K. A. Blum, S. S. Yadav, J. P. Sfakianos, and K. K. Badani, "Heterogeneity in renal cell carcinoma," *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 35, no. 8, pp. 507–515, 2017, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.05.006.
- [9] M. M. Wolf, W. K. Rathmell, and K. E. Beckermann, "Modeling Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Therapeutic Implications," *Oncogene*, vol. 39, no. 17, pp. 3413–3426, 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1234-3.
- [10] I. Séraudie et al., "Cooperative blockade of CK2 and ATM kinases drives apoptosis in VHL-deficient renal carcinoma cells through ROS overproduction," *Cancer (Basel.)*, vol. 13, no. 3, pp. 1–27, 2021, doi: 10.3390/cancers13030576.
- [11] C. Roelants et al., "Ex-vivo treatment of tumor tissue slices as a predictive preclinical method to evaluate targeted therapies for patients with renal carcinoma," *Cancers (Basel.)*, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3390/cancers12010232.
- [12] C. Corrò, L. Novellasdemunt, and V. S. W. Li, "A brief history of organoids," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 319, no. 1, pp. C151–C165, 2020, doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020.
- [13] B. L. LeSavage, R. A. Suhar, N. Broguiere, M. P. Lutolf, and S. C. Heilshorn, "Next-generation cancer organoids," *Nat. Mater.*, vol. 21, no. 2, pp. 143–159, 2022, doi: 10.1038/s41563-021-01057-5.
- [14] M. Verduin, A. Hoeben, D. De Ruyscher, and M. Vooijs, "Patient-Derived Cancer Organoids as Predictors of Treatment Response," *Front. Oncol.*, vol. 11, no. March, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.641980.
- [15] C. H. Wong, K. W. Siah, and A. W. Lo, "Estimation of clinical trial success rates and related parameters," *Biostatistics*, vol. 20, no. 2, pp. 273–286, 2019, doi: 10.1093/biostatistics/kxx069.
- [16] T. Sato et al., "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1762–1772, 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.
- [17] D. Gao et al., "Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer," *Cell*, vol. 159, no. 1, pp. 176–187, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.08.016.
- [18] O. Kopper et al., "An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity," *Nat. Med.*, vol. 25, no. 5, pp. 838–849, 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0422-6.
- [19] M. Chadwick et al., "Rapid Processing and Drug Evaluation in Glioblastoma Patient-Derived Organoid Models with 4D Bioprinted Arrays," *iScience*, vol. 23, no. 8, p. 101365, 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101365.
- [20] J. M. Ayuso et al., "Glioblastoma on a microfluidic chip: Generating pseudopalisades and enhancing aggressiveness through blood vessel obstruction events," *Neuro. Oncol.*, vol. 19, no. 4, pp. 503–513, 2017, doi: 10.1093/neuonc/now230.
- [21] S. H. Lee et al., "Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer," *Cell*, vol. 173, no. 2, pp. 515–528.e17, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.017.
- [22] X. Li et al., "Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 7, pp. 769–777, 2014, doi: 10.1038/nm.3585.
- [23] L. D. Nadauld et al., "Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 8, p. 428, 2014, doi: 10.1186/s13059-014-0428-9.
- [24] K. Nanki et al., "Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independence during Human Gastric Carcinogenesis," *Cell*, vol. 174, no. 4, pp. 856–869.e17, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.07.027.
- [25] X. Li et al., "Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05190-9.
- [26] C. Calandri et al., "An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15155-6.
- [27] L. Grassi et al., "Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1453-0.
- [28] J. T. Neal et al., "Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment," *Cell*, vol. 175, no. 7, pp. 1972–1988.e16, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.11.021.
- [29] H. A. Bolck et al., "Tracing Clonal Dynamics Reveals that Two- and Three-dimensional Patient-derived Cell Models Capture Tumor Heterogeneity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma," *Eur. Urol. Focus*, vol. 7, no. 1, pp. 152–162, 2021, doi: 10.1016/j.euf.2019.06.009.
- [30] L. Lugand et al., "Methods for Establishing a Renal Cell Carcinoma Tumor Spheroid Model With Immune Infiltration for Immunotherapeutic Studies," *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 3109, Jul. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.898732/BIBTEX.
- [31] G. G. Nair et al., "Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 21, no. 2, pp. 263–274, 2019, doi: 10.1038/s41556-018-0271-4.
- [32] F. W. Pagliuca et al., "Generation of functional human pancreatic β cells in vitro," *Cell*, vol. 159, no. 2, pp. 428–439, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
- [33] B. L. Eckhardt et al., "Clinically relevant inflammatory breast cancer patient-derived xenograft-derived ex vivo model for evaluation of tumor-specific therapies," *PLoS One*, vol. 13, no. 5, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0195932.
- [34] K. K. Brodaczewska, C. Szczylik, M. Fiedorowicz, C. Porta, and A. M. Czarnecka, "Choosing the right cell line for renal cell cancer research," *Mol. Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 1–15, 2016, doi: 10.1186/s12943-016-0565-8.
- [35] V. H. Haase, "The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease," *Kidney Int.*, vol. 69, no. 8, pp. 1302–1307, 2006, doi: 10.1038/sj.ki.5000221.
- [36] J. Tostain, G. Li, A. Gentil-Perret, and M. Gigante, "Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: A marker for diagnosis, prognosis and treatment," *Eur. J. Cancer*, vol. 46, no. 18, pp. 3141–3148, 2010, doi: 10.1016/j.ejca.2010.07.020.
- [37] M. M. Capeling et al., "Suspension culture promotes serosal mesothelial development in human intestinal organoids," *Cell Rep.*, vol. 38, no. 7, p. 110379, 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110379.
- [38] B. Z. Qian and J. W. Pollard, "Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis," *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 39–51, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
- [39] R. Ostuni, F. Kratochvil, P. J. Murray, and G. Natoli, "Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications," *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 4, pp. 229–239, 2015, doi: 10.1016/j.it.2015.02.004.
- [40] L. C. Boraas and T. Ahsan, "Lack of vimentin impairs endothelial differentiation of embryonic stem cells," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. July, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1038/srep30814.
- [41] G. E. Davis and D. R. Senger, "Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization," *Circ. Res.*, vol. 97, no. 11, pp. 1093–1107, 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3.
- [42] R. Li et al., "Article Mapping single-cell transcriptomes in the intra-tumoral and associated territories of kidney cancer II Mapping single-cell transcriptomes in the intra-tumoral and associated territories of kidney cancer," pp. 1583–1599, 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.11.001.
- [43] V. Hoskin, A. Szeto, A. Ghaffari, P. A. Greer, G. P. Câtéc, and B. E. Elliott, "Ezrin regulates focal adhesion and invadopodia dynamics by altering calpain activity to promote breast cancer cell invasion," *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 19, pp. 3464–3479, 2015, doi: 10.1091/mbc.E14-12-1584.
- [44] C. L. Cortesio et al., "Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion," *J. Cell Biol.*, vol. 180, no. 5, pp. 957–971, 2008, doi: 10.1083/jcb.200708048.
- [45] V. te Boekhorst et al., "Calpain-2 regulates hypoxia/HIF-induced plasticity toward amoeboid cancer cell migration and metastasis," *Curr. Biol.*, vol. 32, no. 2, pp. 412–427.e8, 2022, doi: 10.1016/j.cub.2021.11.040.
- [46] L. Svensson, A. McDowell, K. M. Giles, P. Stanley, S. Feske, and N. Hogg, "Calpain 2 controls turnover of LFA-1 adhesions on migrating T lymphocytes," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0015090.
- [47] O. Ilina et al., "Cell-cell adhesion and 3D matrix confinement determine jamming transitions in breast cancer invasion," *Nat. Cell Biol.*, vol. 22, no. 9, pp. 1103–1115, 2020, doi: 10.1038/s41556-020-0552-6.
- [48] J. J. Falke and B. P. Ziembra, "Interplay between phosphoinositide lipids and calcium signals at the leading edge of chemotaxing amoeboid cells," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 182, pp. 73–79, 2014, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2014.01.002.
- [49] P. Friedl and E. B. Bröcker, "The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 57, no. 1, pp. 41–64, 2000, doi: 10.1007/s00180050498.
- [50] J. Rodrigues, M. A. Heinrich, L. M. Teixeira, and J. Prakash, "3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions," *Trends in Cancer*, vol. 7, no. 3, pp. 249–264, 2021, doi: 10.1016/j.trecan.2020.10.009.
- [51] S. H. Lee et al., "Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer," *Cell*, vol. 173, no. 2, pp. 515–528.e17, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.017.
- [52] S. N. Ooft et al., "Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients," *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, no. 513, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1126/scitranslmed.aay2574.
- [53] R. T. H. Tse, H. Zhao, C. Y. P. Wong, P. K. F. Chiu, J. Y. C. Teoh, and C. F. Ng, "Current status of organoid culture in urological malignancy," *Int. J. Urol.*, vol. 29, no. 2, pp. 102–113, 2022, doi: 10.1111/iju.14727.
- [54] J. T. Caleffi et al., "Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances," *Life Sci.*, vol. 286, p. 120028, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.120028.
- [55] H. Kikuchi et al., "Nephrometry score correlated with tumor proliferative activity in T1 clear cell renal cell carcinoma," *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 37, no. 5, pp. 301.e19–301.e25, May 2019, doi: 10.1016/j.urolonc.2019.02.005.
- [56] K. A. Homann et al., "Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro," *Nat. Methods*, vol. 16, no. March, 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0325-y.
- [57] S. Proulx et al., "Optimization of culture conditions for porcine corneal endothelial cells," *Mol. Vis.*, vol. 13, p. 524, Apr. 2007, Accessed: Dec. 12, 2022. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC2652016/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2652016/).
- [58] C. Roelants et al., "Combined inhibition of PI3K and Src kinases demonstrates synergistic therapeutic efficacy in clear-cell renal carcinoma," vol. 9, no. 53, pp. 30066–30078, 2018.
- [59] O. Filhol and J. L. Descotes, "Evaluation of a Promising New Combination of Protein Kinase Inhibitors on Organotypic Cultures of Human Renal Tumors (COMBOREIN)," *NCT03571438*, 2018.
- [60] D. Alpern et al., "BRB-seq: Ultra-affordable high-throughput transcriptomics enabled by bulk RNA barcoding and sequencing," *Genome Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1186/s13059-019-1671-x.

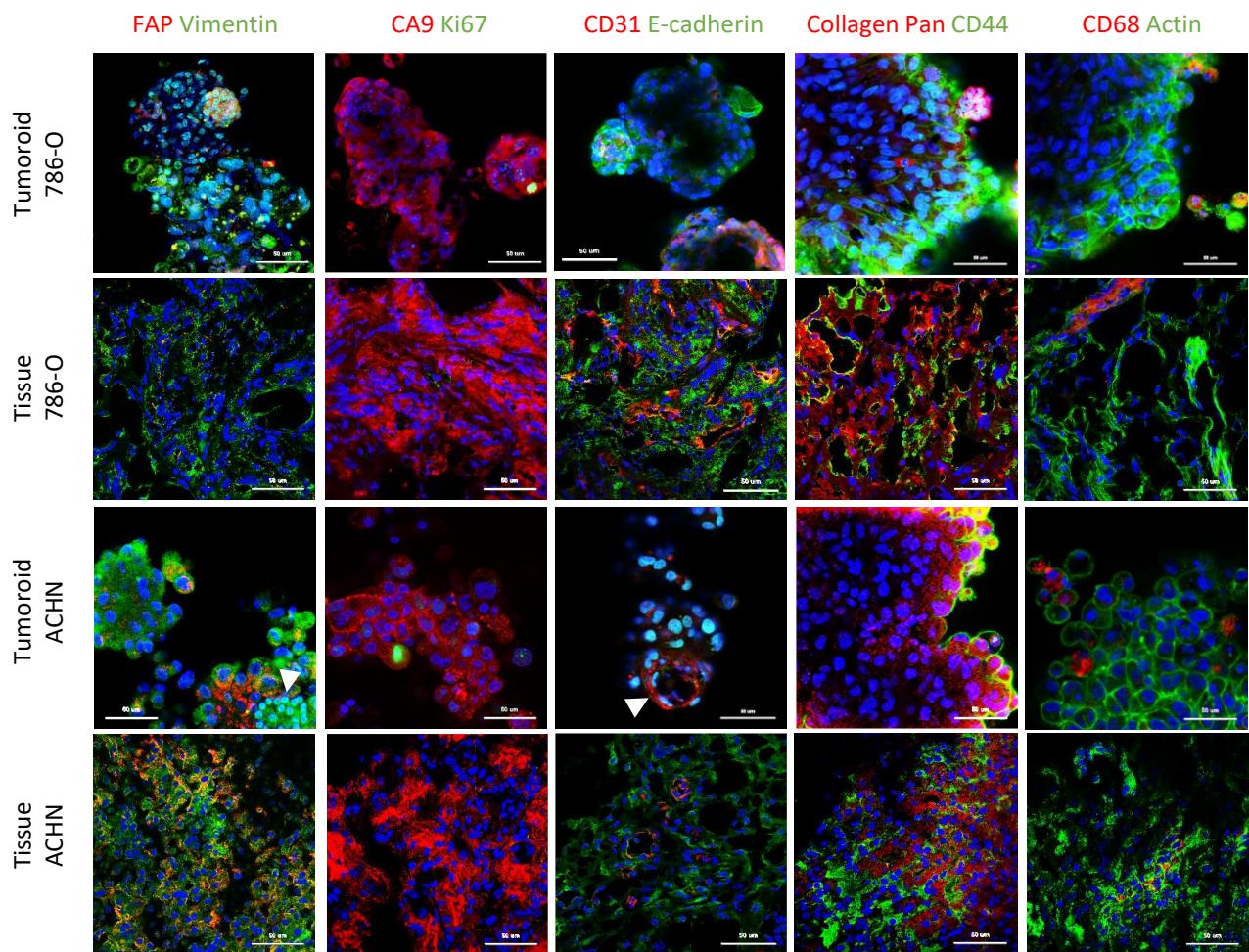


Figure S1 : Immunofluorescence images of tumoroids and their counterpart tissue. Immunofluorescence images of mice tumoroids and their matching tissue depending on the cell line and labeled with the indicated antibodies that were taken using the LSM 880 AiryScan confocal microscope (Zeiss). Scale bar = 50 μ m.

1.3. Résultats supplémentaires : Les tumoroïdes et organoïdes humains

1.3.1. *Culture des tumoroïdes dérivés de tumeurs humaines*

Comme il a été exposé dans l'article, la génération des tumoroïdes en suspension magnétique à partir de tumeurs de souris a un taux de succès de 100%. Les tumoroïdes sont très homogènes entre eux, en terme de cohésion cellulaire et de taille. Par contre, la culture de tumoroïdes dérivés de tumeurs de patient est plus difficile, et différents taux de croissance et phénotypes ont été observés. La Figure 61 montre l'aspect des tumoroïdes humains en culture dérivés de cancers de patients, classés selon leur sous-type histologique. Cela comprend des CRCC, des carcinomes papillaires et des oncocytomes. En effet, notre équipe travaille sur le CRCC mais lorsque nous recevons des pièces opératoires, nous ne savons pas encore de quel sous-type histologique il s'agit puisqu'aucune biopsie pré-opératoire n'est effectuée. Nous exécutons donc le protocole préclinique quel que soit la tumeur que nous récupérons.

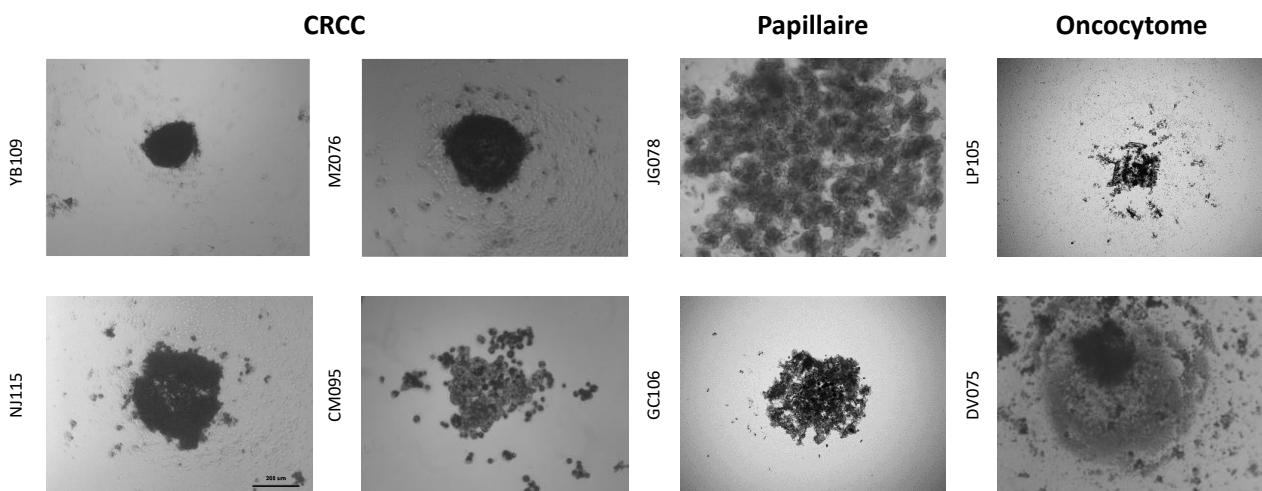


Figure 61 : Tumoroïdes dérivés de tumeurs humaines après maturation en culture. Photos prises à l'aide du microscope inversé AxioVert de Zeiss, objectif 5x, barre d'échelle = 200μm

Les tumoroïdes dérivés de patients ayant un CRCC forment en majorité des structures rondes, denses et homogènes, de taille variable entre les patients (200-300 μm). De façon surprenante, les tumoroïdes issus de la tumeur CM095 étaient moins denses, et on peut voir distinctement les cellules uniques qui composent le tumoroïde. Il ne semble pas que cela soit lié au stade et au grade puisque les tumeurs YB109 et NJ115 sont de stade T1a, ISUP 3 et 2 respectivement, la tumeur CM095 est de stade T1b ISUP 3 et la tumeur MZ076 de stage T3a ISUP 3. Par contre, la culture organotypique effectuée en parallèle sur la tumeur CM095 a montré un taux de mortalité entre 40 et 60% dans les conditions de traitement contrôle

(données non incluses dans la thèse, relatives à l'essai pré-clinique Comborein). En effet, la viabilité cellulaire est un paramètre essentiel à la bonne formation des tumoroïdes. Actuellement, notre protocole ne comprend pas l'étude de la viabilité cellulaire après dissociation et avant ensemencement. Il serait judicieux d'effectuer un test au bleu de trypan avant ensemencement pour être sûr d'ensemencer des cellules vivantes. Néanmoins, la formation des tumoroïdes est globalement homogène, indépendamment du stade et du grade de la tumeur.

Concernant les tumoroïdes dérivés de patients ayant un carcinome papillaire, on observe dans les deux tumoroïdes une organisation cellulaire lobulaire, faisant penser à la structure en grappe caractéristique de ces tumeurs. Malheureusement, cela produit des tumoroïdes très hétérogènes et peu compacts, difficilement pipetable et exploitable pour une caractérisation en immunofluorescence ou pour effectuer des tests d'invasion en hydrogel. En fait, ces tumoroïdes ont des tailles extrêmement variables, comme c'est le cas avec les techniques de culture « scaffold-based ». Par conséquent, cette technique par suspension magnétique n'est peut-être pas adaptée aux carcinomes papillaires.

Enfin les tumoroïdes dérivés d'oncocytomes sont aussi très hétérogènes et on observe la présence de nombreux débris cellulaires autour de la structure sphérique principale. Il n'est pas étonnant que leur croissance soit plus faible puisque ce sont des tumeurs bénignes qui ont un pronostic très favorable sur le plan clinique. Ces tumoroïdes ont tout de même une importance majeure dans le développement de nos tests évaluant la capacité invasive, puisqu'ils peuvent nous servir de contrôle négatif.

Pour conclure et de manière générale, indépendamment du sous-type histologique et de la cohésion cellulaire, le taux de succès de culture des tumoroïdes était de 90%. Seule une tumeur n'a pas formé de tumoroïde, car elle était hémorragique et la quasi-totalité des cellules dissociées correspondaient à des hématies.

1.3.2. Caractérisation phénotypique des tumoroïdes

Certains des tumoroïdes humains produits ont été utilisés afin de mettre au point le protocole et les anticorps nécessaires à la caractérisation par immunofluorescence présentée dans l'article. Les derniers produits ont pu être entièrement caractérisés. Les résultats des tumoroïdes YB109 (CRCC), GC106 (Papillaire) et LP105 (Oncocytome) sont présentés dans la Figure 62 ci-dessous. La tumeur entièrement caractérisée dans la publication correspondait à NJ115 que je ne représenterai pas ici.

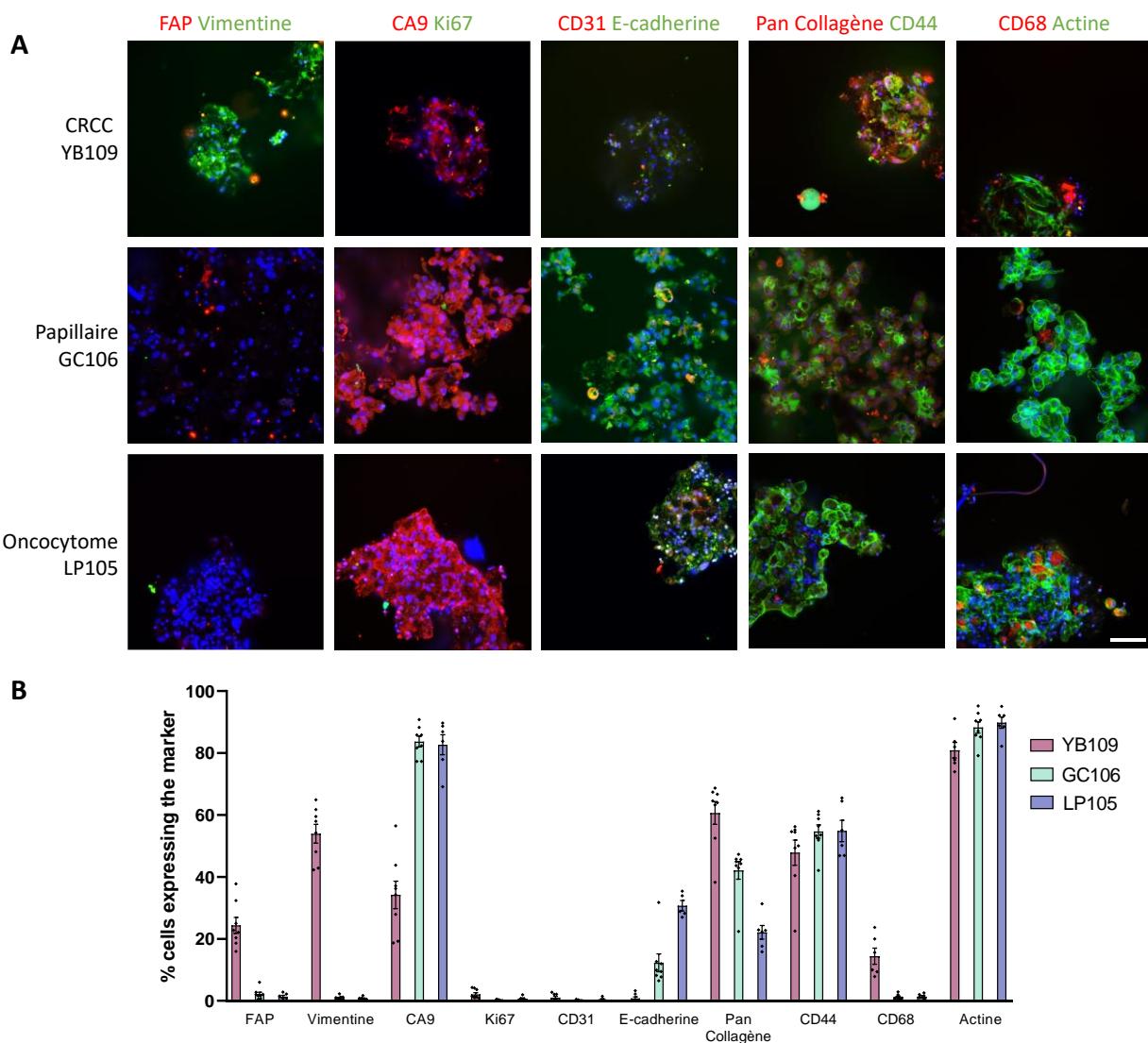


Figure 62 : Caractérisation phénotypique des tumoroïdes humains. A: Images en immunofluorescence des tumoroïdes YB109, GC106 et LP105 marqués avec les anticorps FAP, Vimentine, CA9, Ki67, CD31, E-cadhéline, Pan Collagène, CD44, CD68 et l'actine avec une contre-coloration au Hoechst. Images acquise avec le microscope automatisé Cell In Sight CX7 High throughput (ThermoFisher), Objectif 20x (NA 0.45), Barre d'échelle = 50µm. B: Quantifications associées aux images représentant le pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs, effectuées avec le logiciel HCS Studio.

Comme on peut l'observer dans la Figure 62, tant qualitativement que quantitativement, les 3 tumeurs expriment CA9, marqueur des cellules tumorales rénales. Les tumoroïdes issus du CRCC (YB109), sont les seuls à exprimer de la vimentine (54% des cellules). Ceci est cohérent avec le fait que les cellules de CRCC expriment de la vimentine contrairement aux autres sous-types histologiques, qui sont majoritairement épithéliaux. On remarque d'ailleurs que l'E-cadhérine n'est pas exprimée dans les tumoroïdes YB109 contrairement aux tumoroïdes issus de GC106 (12%) et LP105 (30%). De plus, tous les tumoroïdes sont composés de 47 à 54% de cellules exprimant CD44, qui est un récepteur liant la matrice extracellulaire mais aussi un marqueur de cellules souches cancéreuses. En effet, la méthode en suspension augmente la population en cellule souche [409], et il n'est pas étonnant de voir cette population dans les 3 tumeurs malgré leur différence d'agressivité. Pour autant, le taux de prolifération est extrêmement bas dans tous les tumoroïdes (entre 1 et 4%), peut être car ils sont à 14 jours de culture et que la croissance diminue après un certain temps. Par ailleurs, les tumoroïdes produisent tous du collagène, avec par ordre décroissant YB109 (60%), GC106 (42%) et LP105 (22%), ce qui semble lié à la cohésion cellulaire des tumoroïdes. En effet, les tumoroïdes YB109 étaient denses et cohésifs alors que les tumoroïdes GC106 et LP105 avaient tendance à éclater en plusieurs clusters.

Concernant le microenvironnement, les tumoroïdes YB109 contiennent des fibroblastes (24%) et des macrophages (14%), indiquant une tumeur infiltrée et hétérogène. Au contraire, les tumoroïdes GC106 et LP105 en contiennent des quantités extrêmement faibles (< 2%). Enfin, les cellules endothéliales n'ont pas été conservées dans les tumoroïdes (CD31 <1%), bien que des vaisseaux aient été observés macroscopiquement avant dissociation cellulaire en particulier les tumeurs GC106 et LP105 qui étaient en partie hémorragiques.

Ces résultats sont très encourageants pour la culture de tumoroïdes humains. Malgré tout, il semble indispensable d'améliorer le milieu de culture afin d'augmenter la prolifération et de conserver la population endothéliale. Par exemple par ajout d'hydrocortisone pour les cellules rénales, et d'EGF ou de VEGF pour les cellules endothéliales. Malheureusement, les marquages des tissus d'origine correspondants n'ont pu être effectués de la même manière. Plus précisément, les tumeurs sont conservées en paraffine et le protocole de marquage a entièrement été mis au point sur des coupes cryoconservées, et il faudra mettre au point un nouveau protocole de marquage d'immunofluorescence pour ces tissus inclus en paraffine.

Cela permettrait de confirmer dans le modèle humain, comme dans le modèle souris, que la majorité des populations cellulaires sont conservées dans le modèle tumoroïde.

1.3.3. Culture et caractérisation d'organoïdes

Il arrive que nous recevions, en plus des morceaux tumoraux, du tissu sain adjacent à la tumeur, ce qui fut le cas pour la tumeur YB109. Des organoïdes depuis du tissu sain (YB109S) ont été produits, avec la même méthode que pour les tumoroïdes, en ajoutant simplement de l'EGF (10 ng/mL) au milieu de culture. Les résultats de la culture ainsi que de la caractérisation par immunofluorescence sont présentés dans la Figure 63.

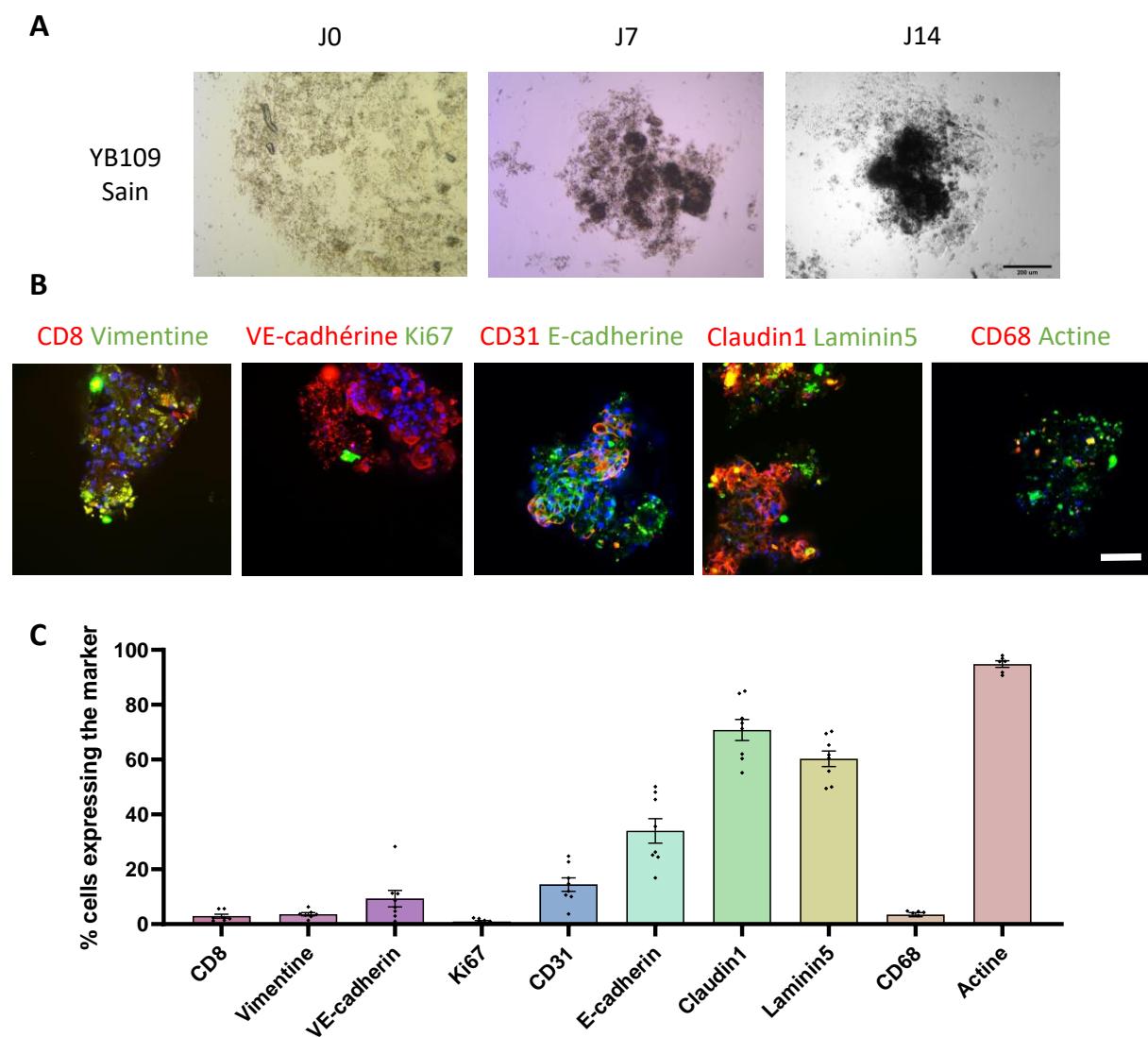


Figure 63 : Culture et caractérisation phénotypique des organoïdes YB109S. A : Formation des organoïdes en culture en suspension magnétique jusqu'au 14^e jour, Barre d'échelle = 200 μm. B : Images en fluorescence des organoïdes YB109S marqués avec les anticorps indiqués. Images effectuées avec le microscope Cell in Sight CX7, Objectif 20x (NA 0.45), Barre d'échelle = 50μm. C : Quantifications associées aux images représentant le pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs, effectuées avec le logiciel HCS Studio.

La Figure 63A démontre que la culture en suspension magnétique permet la formation d'organoïdes dérivés de cellules différenciées de patients, et ce, dans un milieu classique (DMEM:F12 (1:1), 10% SVF, Pen/Strep), supplémenté uniquement avec de l'EGF. D'après la caractérisation effectuée en IF (Figure 63 B et C), les organoïdes possèdent quelques cellules immunitaires résidentes, tel que les LyT CD8 (3%) ou les macrophages CD68 (3.4%) et la technique utilisée a permis de conserver une fraction conséquente de cellules endothéliales. Probablement grâce à l'ajout d'EGF en culture comme décrit plus haut. En effet, il y a en moyenne 15% de cellules CD31 et 10% de cellules VE-cadhérine. De plus la majorité des cellules sont épithéliales (34%) et il y a très peu de cellules mésenchymateuses (4%) ce qui est cohérent avec la composition rénale saine. Malheureusement, le taux de prolifération est très faible, peut-être car les cellules ont été fixées 15 jours après le début de la culture et que la capacité de prolifération de cellules primaires différenciées est limitée. Enfin, la majorité des cellules de l'organoïde expriment de la Claudine 1 (70%), qui est un transporteur d'ions exprimé par les podocytes du glomérule, ce qui confirme que l'organoïde est composé de cellules rénales saines [487]. Aussi, 60% des cellules expriment de la Laminine-5, ligand des intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$, et composant majoritaire de la membrane glomérulaire pendant le développement rénal [488].

En conclusion, les organoïdes YB109S expriment des marqueurs du rein sain récapitulant les caractéristiques d'un glomérule rénal. Cela confirme que la technologie de culture par suspension magnétique permet la formation d'un organoïde à partir de tissu rénal sain différencié. De plus, il semble que l'ajout d'EGF favorise le maintien de 15% de cellules endothéliales. Néanmoins, il faudra effectuer les mêmes marquages sur le tissu sain, afin de vérifier que le modèle permet de récapituler la composition cellulaire du tissu dont les organoïdes sont dérivés. Malheureusement cette méthode ne permet pas d'avoir un taux de prolifération conséquent. Il semble donc difficile de maintenir ces organoïdes en culture plus de 15 jours et de les amplifier. Ceci est un défaut de notre méthode par rapport à la culture à partir d'IPSCs ainsi qu'à cause de la culture en suspension, moins nutritive que les méthodes « scaffold based ». Malgré cela, cette technologie est intéressante dans le contexte de notre projet puisque ces organoïdes peuvent nous servir de contrôle négatif pour l'étude du potentiel métastatique et de la réponse au traitement patient-spécifique.

1 . 4 . Discussion et conclusion

Nous avons développé un tout nouveau modèle de tumoroïde de CRCC, basé sur une méthode « scaffold-free », utilisant la suspension magnétique, récapitulant la majorité des caractéristiques de la tumeur d'origine. Cela permet de refléter l'hétérogénéité inter-tumorale grâce à la conservation des cellules du microenvironnement et des cellules tumorales propres à chaque tumeur. De plus, le séquençage ARN de plusieurs tumoroïdes issus de la même tumeur a permis de démontrer que la méthode était reproductible. En effet, les dérégulations d'expression de gènes induites par le processus de mise en culture étaient en majorité communes aux tumoroïdes issus de la même tumeur, en particulier pour les cellules cancéreuses. Il n'est pas étonnant de voir quelques dérégulations d'expression de gènes, au vue de la déstructuration totale que subissent les cellules pendant le processus de mise en culture. Il subsiste néanmoins une légère hétérogénéité inter-tumoroïdes concernant le microenvironnement, qui peut être due à la répartition aléatoire de la suspension cellulaire dans les puits avant la formation des tumoroïdes. Quoi qu'il en soit, cette hétérogénéité peut être un atout, nous permettant de mimer l'hétérogénéité intra-tumorale caractéristique des CRCC [74]. En effet, avoir des tumoroïdes dont le microenvironnement est hétérogène pourrait nous permettre d'évaluer la réponse au traitement en fonction des zones tumorales. Li et al. ont d'ailleurs démontré que les CRCC étaient structurés en zones et que la distribution des cellules immunitaires était hétérogène au sein de la tumeur. Par exemple, les macrophages sont majoritaires à l'interface cancer-tissu sain, favorisant l'EMT et donc l'échappement des cellules tumorales vers le tissu sain [489]. Certains morceaux tumoraux ont aussi été identifiés comme plus éloignés de leurs tumoroïdes. Cela peut s'expliquer par la source de tissu ayant servi à la production de tumoroïde et au séquençage ARN qui sont deux morceaux distincts et révèle donc une certaine hétérogénéité intra-tumorale. Il serait intéressant d'effectuer un échantillonnage plus diversifié pour chaque branche expérimentale afin de mieux capturer l'hétérogénéité intra-tumorale. Le modèle permet aussi de préserver une certaine proportion de cellules endothéliales, qui sont capables de s'auto-structurer et de former des plexus primitifs. Dans le cas des tumoroïdes humains, les cellules endothéliales étaient difficiles à conserver (< 1%). L'ajout d'EGF au milieu de culture des tumoroïdes NJ115 a amélioré la capacité de rétention des cellules endothéliales, contrairement aux tumoroïdes YB109, LP105 et GC106 qui étaient cultivés sans EGF.

Les avantages majeurs de notre modèle reposent sur l'utilisation d'une technologie « scaffold-free », évitant l'utilisation de matrices d'origine animale dont la composition est variable et peut influencer le destin cellulaire [444]. De plus, nous utilisons des milieux de culture classiques, avec très peu de suppléments, sans risque de modifier la signalisation cellulaire basale et la réponse au traitement [442].

Les traitements expérimentaux et cliniques peuvent d'ailleurs être évalués sur le modèle tumoroïde, qui a montré une plus grande capacité à discriminer les traitements entre eux que la culture organotypique. Il serait intéressant d'évaluer l'impact des traitements sur la composition des tumoroïdes en identifiant les types cellulaires affectés ou encore l'évolution du système immunitaire après traitement. Par ailleurs, nous pourrions tester nos inhibiteurs en coopération avec l'activation du système immunitaire du tumoroïde, par exemple via l'ajout d'IL-2 [437] ou d'IL-15 [400].

L'étude de l'invasion a aussi permis de démontrer la faisabilité d'utiliser les tumoroïdes comme outils prédictifs du potentiel métastatique, bien que l'invasion ne suffise pas à récapituler un processus aussi complexe. Néanmoins, nous avons pu développer un modèle permissif à l'invasion, laissant libre aux cellules de choisir une migration mésenchymateuse ou amibioïde en fonction des cytokines présentes dans le milieu de culture. Ceci est important pour notre modèle puisque les cytokines sécrétées par les cellules du microenvironnement peuvent varier [320]. L'hydrogel permet donc aux cellules tumorales de conserver leur plasticité en choisissant leur mode d'invasion selon leur caractéristiques intrinsèques et leurs capacités à un instant donné.

Pour conclure, notre modèle permet de préserver l'hétérogénéité inter-tumorale et serait un bon avatar pour la médecine personnalisée. Les perspectives de ce travail sont de continuer la production et la caractérisation de tumoroïdes de tumeurs de patients afin de créer une bio-banque, utilisable dans le cadre de la médecine personnalisée et de criblages de nouvelles molécules anti-métastatiques.

2. Etude de l'invasion pour la prédition du potentiel métastatique

Afin d'essayer de prédire le potentiel métastatique des tumeurs de patients, nous avons cherché à identifier les tumeurs capables d'envahir leur environnement matriciel, correspondant à la première étape de la cascade métastatique. Pour cela, différents hydrogels ont été testés et les modèles sphéroïdes, tumoroïdes et coupes de tissus ont été évalués pour leur capacité invasive. Cette partie décrit donc la sélection de cet hydrogel ainsi que les capacités invasives des différents modèles, hormis les tumoroïdes de tumeurs de souris qui ont été décrits dans l'[article](#).

2.1. Le modèle sphéroïde : établissement des conditions favorables à l'invasion

2.1.1. *Sélection de lignées cellulaires d'agressivité variable*

Afin de sélectionner l'hydrogel le plus adapté à l'invasion, il a d'abord fallu évaluer l'agressivité des lignées cellulaires 786-O (CRCC VHL-), Caki-1 (CRCC VHL+) et ACHN (Papillaire) que nous avons au laboratoire. Cela dans l'objectif d'avoir des modèles aux compétences invasives variables pour valider la capacité de l'hydrogel à sélectionner les clones invasifs pour évaluer le potentiel métastatique des tumeurs de patients. Dans ce cadre, la Figure 64 montre l'évaluation de la capacité de prolifération, de migration et d'invasion de ces 3 lignées.

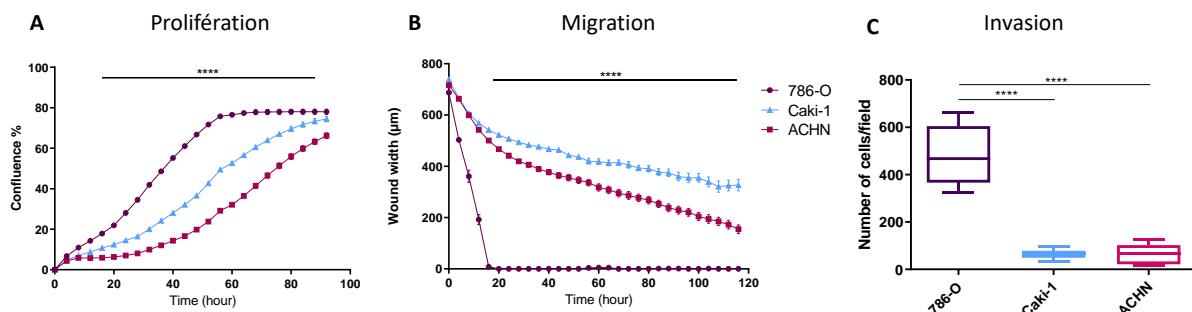


Figure 64 : Capacité de prolifération, de migration et d'invasion des lignées cellulaires 786-O, Caki-1 et ACHN. A : Confluence des cellules en culture au cours du temps (%). B : Test de migration montrant la fermeture de la blessure au cours du temps (μm). La prolifération et la migration ont été quantifiées grâce au microscope en temps réel et logiciel d'analyse Incucyte Zoom. C : Invasion des cellules en chambre de Boyden contenant du Matrigel, et analyse en point final après 48 h de culture des cellules ayant traversé le filtre (nombre de cellules/champs). Tests statistiques : A-B : ANOVA 2W ; C : ANOVA 1W, **** p < 0.0001

La capacité de prolifération a été évaluée par mesure de la confluence des cellules au cours du temps. Pour cela, les cellules ont été ensemencées (5000 cellules/puits) en plaques 96 puits et la confluence a été mesurée à l'aide du microscope en temps réel Incucyte Zoom. Les trois lignées ont des capacités de prolifération différentes, avec par ordre de rapidité : 786-O, Caki-1 et ACHN. Néanmoins, il n'est jamais possible d'obtenir une confluence de 100% avec les cellules ACHN, qui poussent en grappe et en hauteur arrivées à une certaine confluence.

La capacité de migration a été évaluée à l'aide d'un test de blessure et quantifiée d'après leur rapidité à refermer cette blessure. Pour cela, les cellules ont été ensemencées totalement confluentes puis une blessure centrale a été effectuée à l'aide du dispositif de blessure fourni avec le microscope Incucyte. La fermeture du puit en distance a été évaluée au cours du temps avec le microscope. Les lignées ont des capacités de migration variables. Les 786-O referment la blessure en seulement 16h, alors que les Caki-1 et ACHN ne parviennent jamais à la refermer. Néanmoins, les ACHN migrent plus rapidement que les Caki-1.

Pour finir, les cellules ont été ensemencées dans des chambres de Boyden contenant du Matrigel pour évaluer leur capacité invasive. Les cellules ont été placées au-dessus de la chambre dans du milieu pauvre en facteur de croissance (2%), et attirées par la chambre inférieur contenant du milieu riche en facteur de croissance (20%). De manière étonnante, seules les 786-O avaient une capacité invasive importante contrairement aux Caki-1 et ACHN pour lesquelles peu de cellules avaient réussi à envahir.

Ce résultat a soulevé beaucoup de question. En effet, les ACHN sont reconnues comme ayant la plus grande capacité métastatique *in vivo* comparé aux deux autres [367] mais ont une capacité invasive et migratoire inférieures *in vitro* [490]. De plus, les Caki-1 sont des cellules issues d'une métastase de CRCC contrairement aux 786-O issues d'une tumeur primaire. De façon contradictoire, plusieurs équipes ont d'ailleurs montré que les Caki-1 possédaient une capacité invasive supérieure aux 786-O [490], [491] et que les Caki-1 induisaient la formation de tumeurs de grade 3 chez la souris [492]. Sachant cela, il semblerait que le Matrigel ne permette pas de récapituler le caractère invasif de nos lignées. Par conséquent pour la suite de nos tests, nous n'avons pas utilisé cet hydrogel. De plus, nous avons essayé de reproduire le test d'invasion en remplaçant le Matrigel par du collagène I, mais cela fut laborieux car le dépôt de collagène I sur les membranes poreuses des chambres de Boyden n'était pas homogène, rendant le test peu fiable.

2.1.2. Sélection de l'hydrogel récapitulant les propriétés invasives

Afin de se placer dans les conditions les plus proches de la puce microfluidique, les tests d'invasion en hydrogel ont été effectués en incluant des sphéroïdes dans de l'hydrogel en plaque 96 puits. La Figure 65 montre les résultats d'invasion des sphéroïdes des lignées 786-O, Caki-1, ACHN et RPTEC (cellules de rein sain, contrôle négatif) dans le TissueSpec Kidney (Tspec), matrice de rein bovin, et dans du collagène I (Col1), dans 3 conditions de milieu de culture. Les milieux sont soit : (1) du DMEM, milieu classique utilisé pour la culture organotypique ; (2) du TumorMACS Kidney, milieu enrichi favorisant les cellules tumorales rénales ; (3) du Milieu Os contenant du DMEM complet, de l'acide ascorbique, du β -glycérophosphate et de la BMP2, qui est le milieu de culture des périostes, permettant de vérifier la compatibilité de notre modèle d'invasion avec la possibilité d'une niche osseuse métastatique au sein de notre dispositif microfluidique.

Premièrement, il est fort de constater que les matrices ne sont pas permissives à l'invasion de cellules non cancéreuses, puisque les cellules RPTEC n'envahissent ni le Tspec, ni le Col1. Malheureusement, aucun des hydrogels ne permettait l'invasion des cellules ACHN. Concernant les Caki-1, la distance d'invasion est supérieure dans le Col1 ($\sim 1500 \mu\text{m}$) comparé au Tspec ($\sim 1000 \mu\text{m}$), et ce quel que soit le milieu de culture utilisé. Pour les 786-O, les cellules envahissent de manière plutôt équivalente dans les deux matrices, hormis avec le MilOs, qui semble favoriser l'invasion dans le Tspec. L'invasion des Caki-1 dans le collagène est significativement supérieure à celle des 786-O alors que les 786-O sont des cellules VHL muté que l'on a supposé plus agressive *in vitro*. De plus, cette inversion de capacité invasive est contradictoire aux tests d'invasion en chambre de Boyden fait précédemment. Néanmoins, comme mentionné dans la partie précédente, la littérature est contradictoire à ce sujet. Au contraire dans le Tspec, les cellules 786-O et Caki-1 ont une capacité invasive équivalente, hormis dans le DMEM ou les 786-O envahissent moins bien.

Globalement, le milieu de culture a une incidence assez faible sur la capacité invasive des différentes lignées. Cela est appréciable puisque cela nous permettra à terme de perfuser la puce microfluidique Oncotrap avec le milieu de culture de notre choix, en fonction de la niche métastatique choisie. Les 786-O étant notre modèle principal puisqu'elles sont mutées pour VHL et donc caractéristiques des CRCC agressifs, j'ai sélectionné le TissueSpec Kidney pour la suite des expériences. De plus, ne connaissant pas les molécules d'adhésion à la matrice

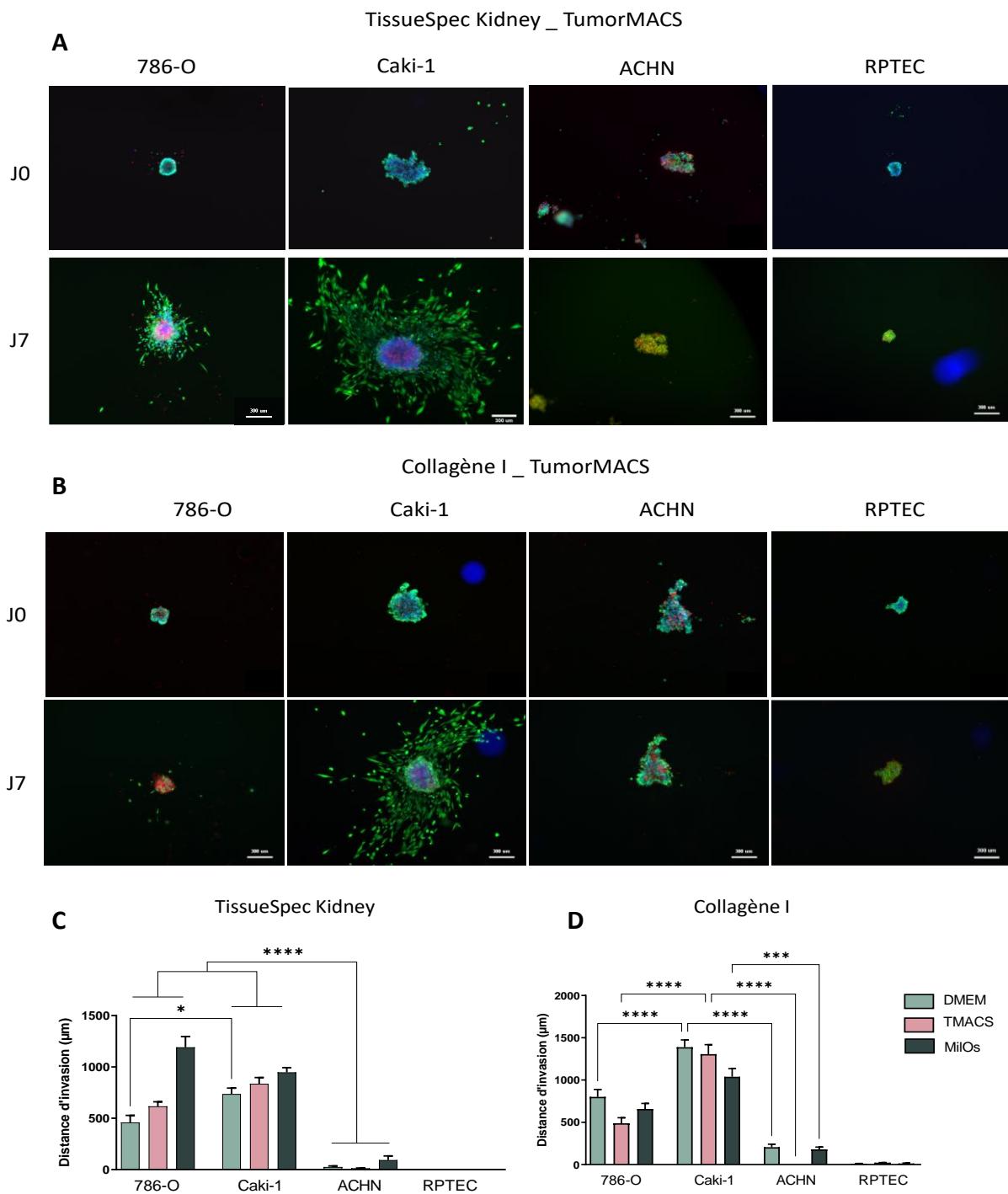


Figure 65 : Capacité invasive des lignées dans différents hydrogels et milieux de culture. Les sphéroïdes ont été déposés dans du TissueSpec kidney (A, C) ou du collagène I (B, D), et cultivés en présence de DMEM complet, de TumorMACS ou de Milieu Os (DMEM complet, acide ascorbique, β -glycérophosphate, BMP2). L'invasion est observée après 7 jours grâce à un marquage **calcéine**, **homodimère d'éthidium**, **hoechst**. Les images représentent les sphéroïdes à 0 et 7 jours de culture dans du TumorMACS (barre d'échelle = 300 μ m). **C-D** : Distance d'invasion (μ m) maximale à 7 jours pour les différentes lignées avec les différents milieux de culture, mesurée grâce au logiciel Image J ($n = 6$ tests indépendants). Test statistique : ANOVA 1W, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

exprimées par les cellules cancéreuses des patients, j'ai jugé que l'utilisation du Tspec serait judicieuse car il contient, entre autre, de la fibronectine, favorisant l'invasion cellulaire dans le cancer. Malheureusement, je ne suis pas parvenu à trouver un hydrogel qui permette l'invasion des cellules ACHN.

Pour conclure, les expériences qui suivent, en particulier les tests d'invasion avec les tumoroïdes, ont été effectués avec du TissueSpec Kidney.

2 . 2 . Evaluation de la capacité invasive des tumoroïdes humains

Afin d'évaluer la capacité d'invasion, les tumoroïdes, une fois matures, ont été inclus dans du TissueSpec Kidney et l'invasion a été suivie pendant 14 jours.

La Figure 66 montre les tumoroïdes issus des tumeurs MZ076, YB109, NJ115, GC106 et LP105 inclus dans du TissueSpec Kidney, suivis en phase ou en fluorescence pendant 14 jours. Au premier jour, tous les tumoroïdes ont une viabilité cellulaire excellente. Cela démontre que la culture en suspension magnétique permet de maintenir viable les tumoroïdes pendant au moins 14 jours. Aucune invasion n'a été constatée pour les tumoroïdes de CRCC YB109 et NJ115 et les tumoroïdes GC106 (papillaire) et LP105 (oncocytome). De plus, les tumoroïdes étaient totalement morts après 7 jours de culture, hormis les tumoroïdes GC106 qui affichent une viabilité excellente à 7 jours, mais dont la mortalité est équivalente aux autres tumoroïdes après 14 jours de culture. Au contraire, les tumoroïdes de CRCC MZ076 ont démontré une capacité invasive dans l'hydrogel jusqu'à 14 jours. Ce résultat est extrêmement encourageant puisque la tumeur MZ076 est la seule tumeur de haut grade (pT3a) contrairement aux autres qui sont toutes de bas grade (pT1a). Par conséquent, il semble que nos conditions de culture ainsi que l'hydrogel sélectionné permettent de discriminer les tumeurs d'après leur grade et donc potentiellement de leur capacité métastatique.

Pour conclure, le TissueSpec kidney semble discriminer les tumeurs selon leur potentiel invasif. Ce résultat est évidemment à confirmer avec d'autres tumoroïdes de cancers de patients.

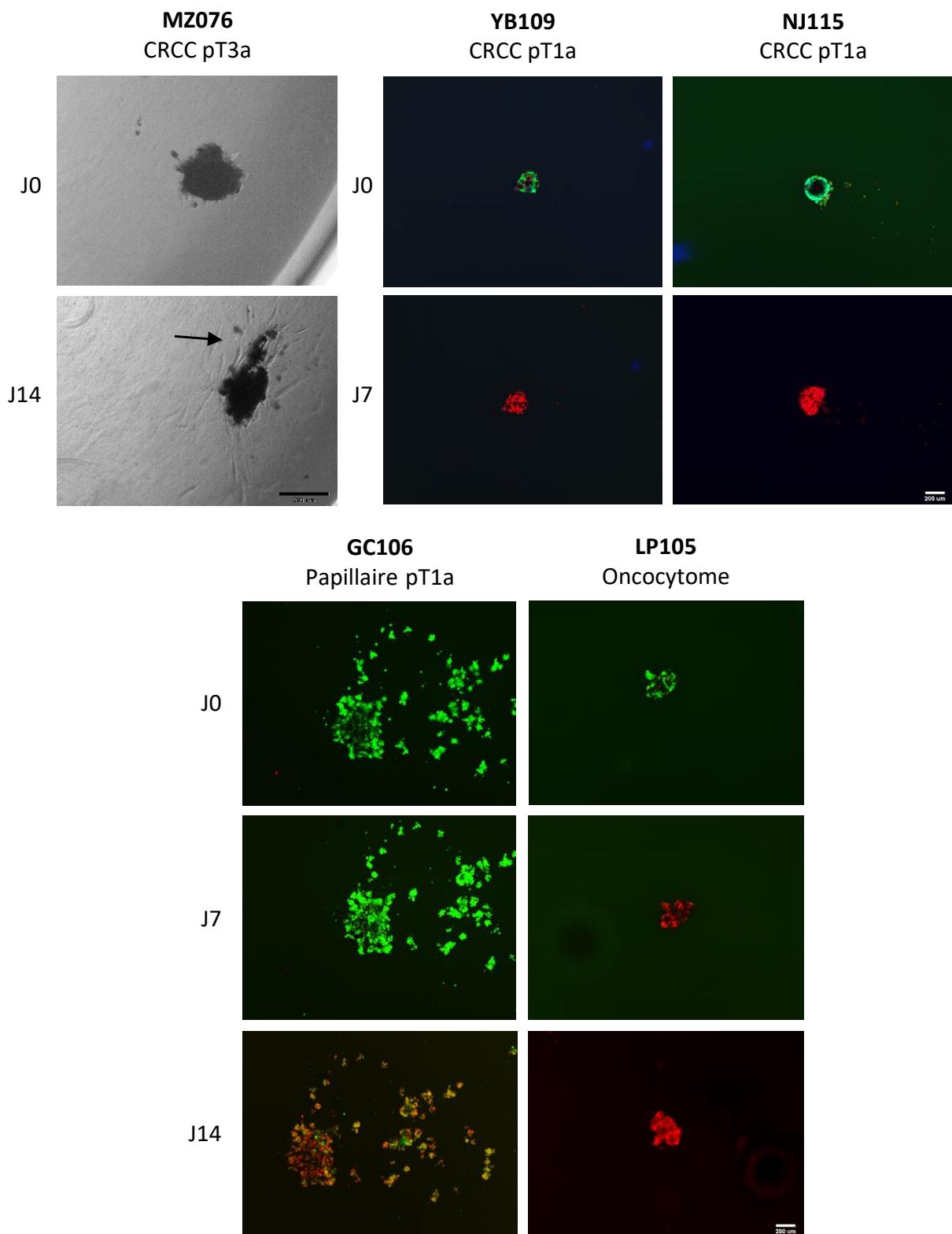


Figure 66 : Evaluation de la capacité invasive des tumoroïdes humains dans du TissueSpec Kidney. Les tumoroïdes sont inclus dans la matrice et suivis pour l'invasion soit en contraste de phase (MZ076) soit grâce à un marquage **Calcéine Homodimère d'éthidium** pour évaluer la viabilité. Barre d'échelle = 200 µm

2.3. La culture organotypique comme outil prédictif

Dans l'objectif du dispositif Oncotrap, nous souhaitons à terme, utiliser la culture organotypique comme outil prédictif du potentiel métastatique des patients et de la réponse au traitement. Dans ce cadre, la culture organotypique classique, effectuée dans le cadre du protocole Comborein, a été normalisée sous forme de « punchs » et les capacités invasives des tumeurs de souris et des tumeurs humaines ont été évaluées.

2.3.1. *Normalisation des échantillons*

La culture organotypique est obtenue grâce à l'inclusion d'un morceau de tumeur ($\leq 1\text{cm}^3$) dans de l'agarose, puis à sa découpe en tranches de $300\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur grâce à un vibratome (Figure 67 A). Néanmoins, ces coupes de tissu ont une surface variable en fonction de la taille du morceau inclus au départ. Cela dépend de la taille du morceau d'origine et est variable entre les différentes tumeurs et aussi parfois même au sein de la même tumeur si le morceau n'était pas parfaitement cylindrique ou cubique (Figure 67 B). Par conséquent, la culture organotypique est toujours homogène entre les patients en terme d'épaisseur, mais pas en terme de surface.

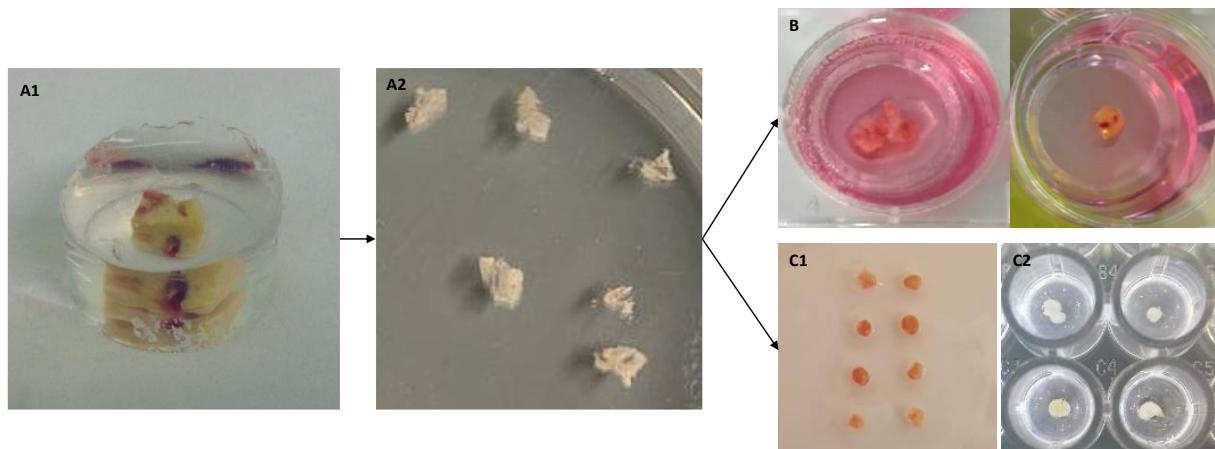


Figure 67 : Culture organotypique classique et normalisée sous forme de punchs. A : Coupes de $300\text{ }\mu\text{m}$ faites au vibratome de surface variable (A2) faites à partir d'un morceau inclus en agarose (A1). B : Culture organotypique classique en interface air-liquide, sur des Millicell en plaque 6 trous. C : Normalisation de la culture organotypique via la formation de punchs de 2 mm de diamètre (C1) et inclusion de ces punchs dans du TissueSpec Kidney en plaque 96 trous pour l'étude de l'invasion (C2).

Dans le cadre du dispositif Oncotrap, nous souhaitons évaluer le potentiel invasif depuis la culture organotypique, et ce de manière standardisée pour tous les patients. Dans ce cadre, les coupes de $300\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur sont redécoupées sous forme de « punchs », à l'aide d'un emporte-pièce, afin d'obtenir des coupes de 2 mm de diamètre (Figure 67 C1). Ces « punchs » sont ensuite inclus dans de l'hydrogel pour effectuer les tests d'invasion (Figure 67 C2).

2.3.2. Etude de l'invasion en hydrogel

Afin d'évaluer la capacité invasive des tumeurs, elles ont été incluses dans du TissueSpec Kidney et/ou du collagène I dans différents milieux de culture, de la même manière que pour les sphéroïdes et tumoroïdes décrits plus haut. Cette partie détaille les capacités invasives des tumeurs générées chez la souris et de quelques tumeurs humaines.

Tumeurs de souris

La capacité invasive des tumeurs 786-O et ACHN générées chez la souris dans le TissueSpec Kidney et le Collagène I est illustrée et quantifiée dans la Figure 68.

Les punchs tumoraux ont été inclus dans les hydrogel et cultivés en DMEM complet. En effet, le DMEM correspond au milieu utilisé pour la culture organotypique classique, et c'est le milieu le plus neutre par rapport au TumorMACS et au Milieu Os. Dès 7 jours de culture, les tumeurs 786-O ont démontré une capacité invasive conséquente dans les deux hydrogels (Figure 68 A). De plus, après 14 jours, la distance d'invasion maximale était significativement supérieure dans le TissueSpec (1350 µm) comparé au collagène I (1050 µm) (Figure 68 B). Concernant les tumeurs ACHN, elles ont démontré une légère capacité invasive dans le TissueSpec dès 7 jours et jusqu'à 14 jours de culture (310 µm), contrairement au Collagène I qui permettait seulement l'apparition d'un léger bourgeonnement autour de la coupe après 14 jours (~ 40 µm) (Figure 68 A et B).

Ces résultats semblent confirmer l'intérêt d'utiliser le TissueSpec Kidney comme hydrogel pour évaluer la capacité métastatique. En effet, les cellules ACHN ayant un potentiel métastatique élevé *in vivo*, il était étonnant qu'elles n'envahissent pas dans les essais avec les sphéroïdes (Cf. [Sélection de l'hydrogel](#)). De plus, comme l'a démontré l'article, la capacité invasive était aussi restaurée dans le modèle tumoroïde ACHN. Il semble donc que les cellules ACHN aient besoin des cellules du microenvironnement tumoral pour envahir. Par conséquent, la conception de modèles cellulaires complexes, prenant en compte le microenvironnement tumoral ainsi que l'organisation cellulaire, est primordial à la prédiction du potentiel invasif et métastatique des tumeurs. Etonnamment, d'après tous les modèles cellulaires *in vitro* testés (sphéroïdes, tumoroïdes et coupes de tissus), les cellules 786-O semblent posséder une capacité invasive supérieure aux cellules ACHN, alors que leur capacité métastatique *in vivo* est inférieure. Néanmoins, cela ne signifie pas que les cellules 786-O aient

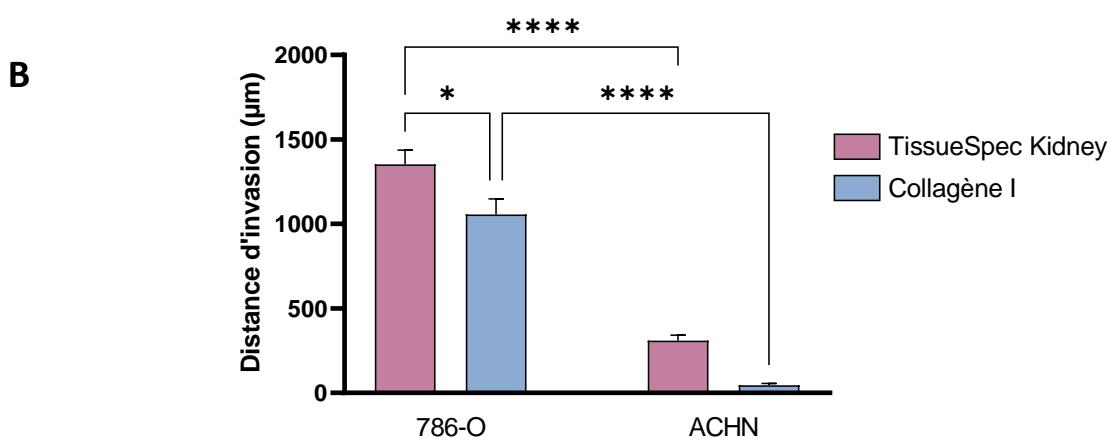
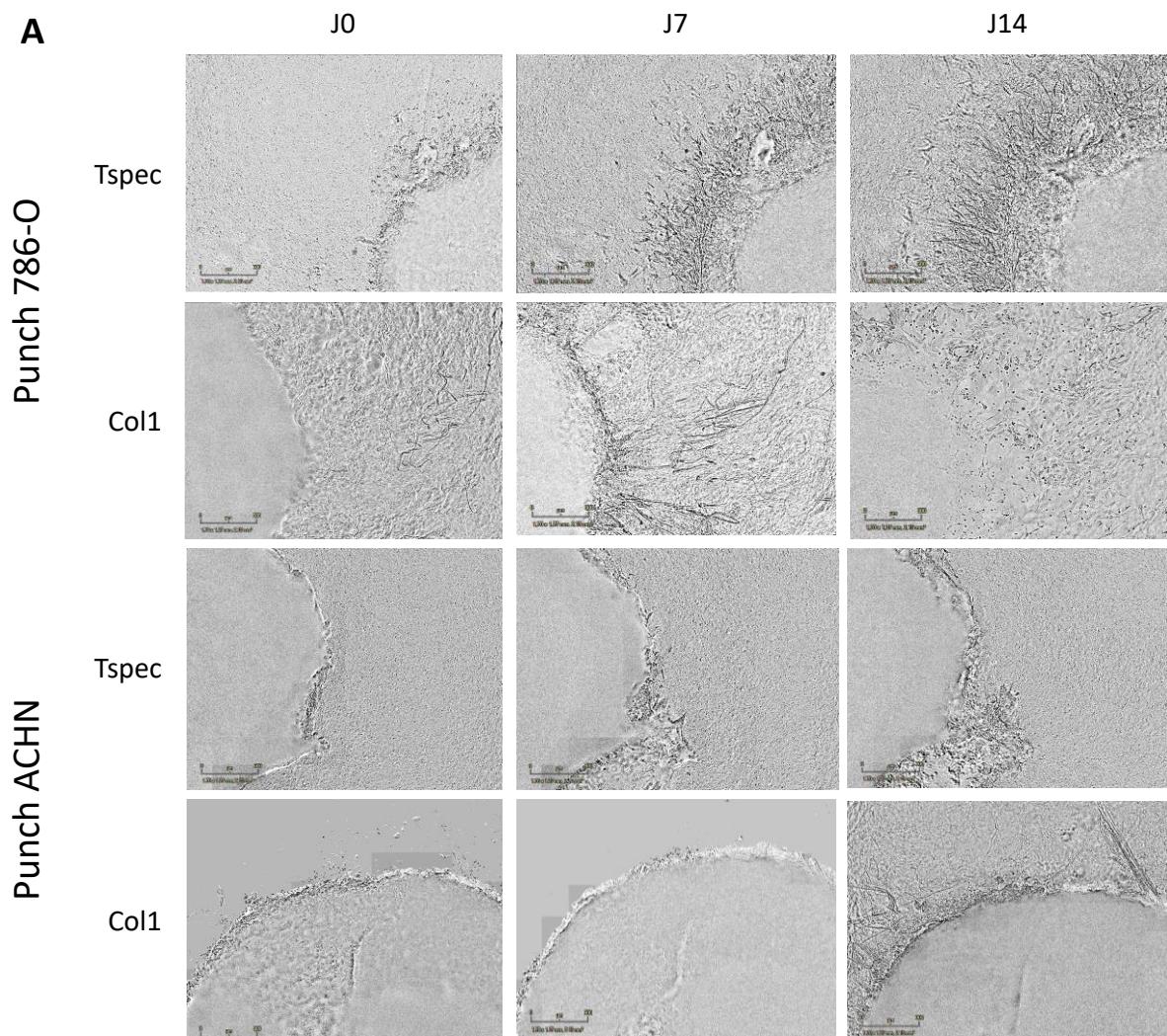


Figure 68 : Evaluation de la capacité invasive de punchs dérivés de tumeurs de souris A : Images de l'invasion à 0, 7 et 14 jours dans les conditions de culture indiquées, en milieu de culture DMEM complet. Images prises à l'Incucyte Zoom, objectif 10x, barre d'échelle = 300 μm. **B :** Quantification de la distance maximale d'invasion (μm) après 14 jours de culture. 786-O : n = 6 punchs, 3 tumeurs ; ACHN : n = 4 punchs, 2 tumeurs ; ANOVA 1W, * p < 0.05 ; **** p < 0.0001.

une capacité métastatique supérieure *in vitro*, puisqu'on observe ici l'invasion, qui n'est qu'une des étapes du processus métastatique. Le dispositif Oncotrap devrait à terme nous permettre de complexifier le modèle, afin d'ajouter les autres étapes, qui peuvent être la cause des différences observées. En effet, il est possible que les cellules ACHN, qui sont des cellules qui poussent en clusters et dont les bourgeonnements invasifs sont très cohésifs, soient plus performantes à la survie dans la circulation par exemple, expliquant la différence *in vivo*.

Par la suite, l'impact du milieu de culture sur la capacité invasive des tumeurs ACHN a été évalué. Les coupes de tumeur ont été incluses dans du TissueSpec Kidney, et cultivées en présence de DMEM complet, de TumorMACS ou de Milieu Os. Les résultats d'invasion sont présentés dans la Figure 69.

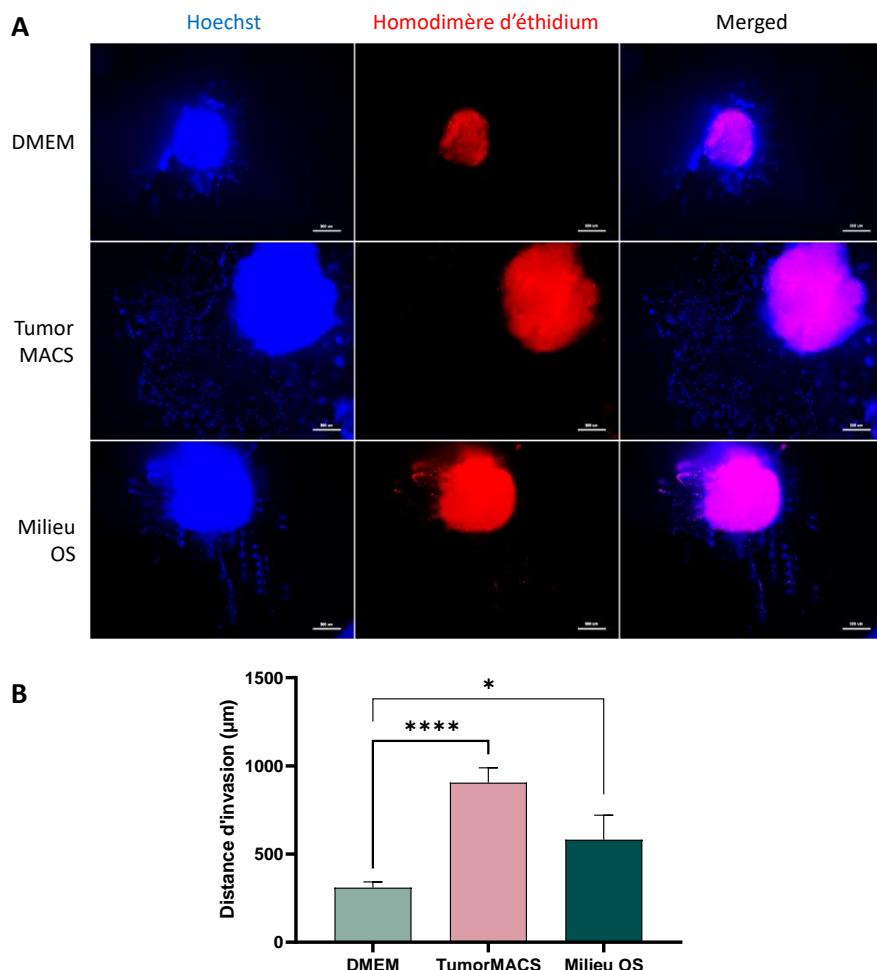


Figure 69 : Evaluation de la capacité invasive des punches ACHN dans différents milieux de culture. A : Invasion après 14 jours de culture dans le Tspec dans les 3 milieux de culture indiqués, les cellules ont été marquées avec de l'hoechst et de l'homodimère d'éthidium pour évaluer la viabilité cellulaire. Images acquises à l'AxioObserver Zeiss, objectif 2.5x, barre d'échelle = 300 µm. B : Quantification de la distance maximale d'invasion, n= 6 punches, 3 tumeurs. t test, *p<0.05, ****p<0.0001.

Après 14 jours de culture, les punchs ACHN ont envahi dans toutes les conditions de culture (Figure 69 A). Néanmoins, comparée au DMEM ($\sim 300 \mu\text{m}$) la distance maximale à laquelle les cellules sont capables d'envahir est triplée en présence de TumorMACS ($\sim 900 \mu\text{m}$) et doublée dans le Milieu Os ($\sim 600 \mu\text{m}$) (Figure 69 B). Par conséquent, les milieux TumorMACS et Milieu Os semblent promouvoir l'invasion des cellules tumorales ACHN, plus particulièrement le TumorMACS. Le TumorMACS favorisant les cellules tumorales, il n'est pas étonnant d'observer une augmentation significative de l'invasion. De plus, cette augmentation avait aussi été notée pour les tumoroïdes ACHN (cf. [Article](#)). Enfin, les cytokines présentes dans le milieu OS semblent favoriser l'invasion, et potentiellement indiquer un attrait des cellules ACHN pour l'os.

Pour conclure, les punchs de tumeurs de souris ont permis de confirmer la pertinence d'utiliser la culture organotypique comme outil prédictif ainsi que l'intérêt d'utiliser le TissueSpec Kidney dans le cadre de l'étude de l'invasion *in vitro*. Concernant le milieu de culture, d'autres tests complémentaires sont à effectuer sur les coupes de tumeurs pour confirmer la pertinence biologique d'en utiliser un plutôt que l'autre. En particulier, ces tests de milieux doivent être répétés sur des tumeurs 786-O pour évaluer l'impact sur cette lignée.

Tumeurs humaines

Des punchs issus de tumeurs humaines ont été inclus dans du TissueSpec Kidney afin d'évaluer leur capacité invasive. Ces punchs ont été cultivés soit en présence de DMEM, leur milieu de culture classique, soit en présence de TumorMACS, qui favorise la croissance des cellules tumorales, comme décrit plus haut. Les résultats sont présentés dans la Figure 70.

Concernant la tumeur MD090 (histologie non interprétable), aucune invasion n'a été notée pendant 14 jours. Au contraire, la tumeur CM095 (CRCC pT1b) a démontré une certaine capacité invasive après 14 jours de culture dans le milieu TumorMACS, contrairement au DMEM. Il semble donc que le TumorMACS favorise l'invasion des cellules tumorales comparé au DMEM. De façon surprenante, la coupe de tissu sain CM095 a envahi le Tspec lorsqu'elle était cultivée dans le DMEM. Néanmoins, le front invasif est très différent de celui observé pour la tumeur CM095. En effet, les cellules invasives de la tumeur CM095 sont isolées, et de formes allongées, faisant penser à des cellules mésenchymateuses. Au contraire, les cellules issues du tissu sain CM095 semblent plus pavimenteuses et cohésives, formant un front

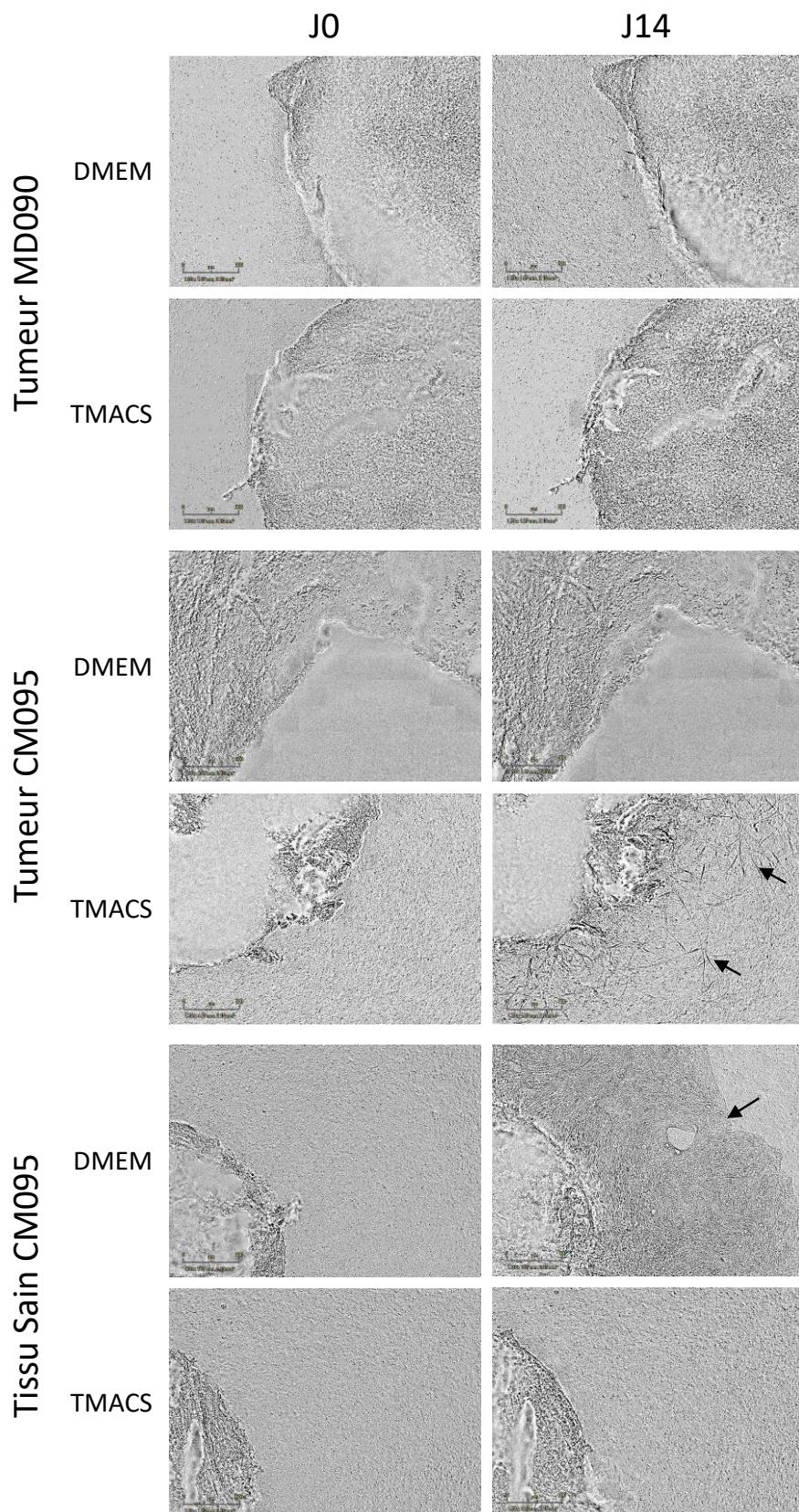


Figure 70 : Evaluation de la capacité invasive de punchs dérivés de tumeurs humaines. Images de la culture des punchs à 0 et 14 jours, provenant des tumeurs MD090 et CM095 ainsi que du tissu sain adjacent à la tumeur CM095. Les flèches noires représentent les front d'invasion. Images acquises à l'Incucyte Zoom, objectif 10x, barre d'échelle = 300μm.

migratoire très franc et droit. Il est possible que le DMEM ait induit la prolifération des cellules de la coupe, qui colonisent la matrice et l'environnement, et que ce ne soit pas de l'invasion. Il serait intéressant de regarder ce processus de manière plus dynamique, afin d'évaluer la prolifération ou la dégradation de la matrice par exemple, et de confirmer par immuno-marquage que ce sont des cellules rénales saines.

Malgré cela, il semble que le TumorMACS soit plus approprié dans ce cas de figure, puisqu'il permettrait une potentielle sélection des cellules tumorales invasives. Ces résultats sont à confirmer sur d'autres tumeurs humaines et tissus sains et sont à mettre en perspective des résultats sur les tumeurs de souris.

2 . 3 . 3 . *Identification des populations invasives*

La partie précédente a démontré qu'il était possible d'évaluer la capacité invasive des tumeurs de souris et probablement humaines, à partir de la culture organotypique. Néanmoins, les coupes de tissus étant hétérogènes et composées des cellules du microenvironnement tumoral, il est primordial de vérifier que les cellules qui s'échappent et envahissent hors des tissus correspondent bien à des cellules cancéreuses. En effet, si ce sont uniquement les fibroblastes, alors notre modèle ne pourrait pas réellement récapituler la capacité invasive des tumeurs.

Dans cet objectif, une tumeur de souris 786-O, incluse dans du TissueSpec, cultivée dans du DMEM et ayant envahi, a été fixée et marquée en immunofluorescence pour détecter les fibroblastes (FAP), les cellules mésenchymateuses (Vimentine), les cellules cancéreuses (CA9) et épithéliales (E-cadhérine). La Figure 71 indique que les cellules ayant envahi l'hydrogel sont en grande majorité cancéreuses (CA9) et mésenchymateuses (Vimentine), et que quelques cellules correspondent à des fibroblastes (FAP). De façon extrêmement intéressante, on observe des spots d'E-cadhérine, semblant faire la jonction entre les cellules invasives. Ce phénotype suggère un mode de migration collectif, qui correspond à un groupe de cellules coordonnées qui sont connectées par des jonctions cellulaires, tel que l'E-Cadhérine, et qui migrent ensembles vers la même direction. Dans ce cas de figure, il semblerait que cela corresponde à de la migration adhérente, c'est-à-dire que toutes les cellules migrent de façon individuelles mais sont adhérentes entre elles, augmentant la capacité invasive globale de la tumeur [316].

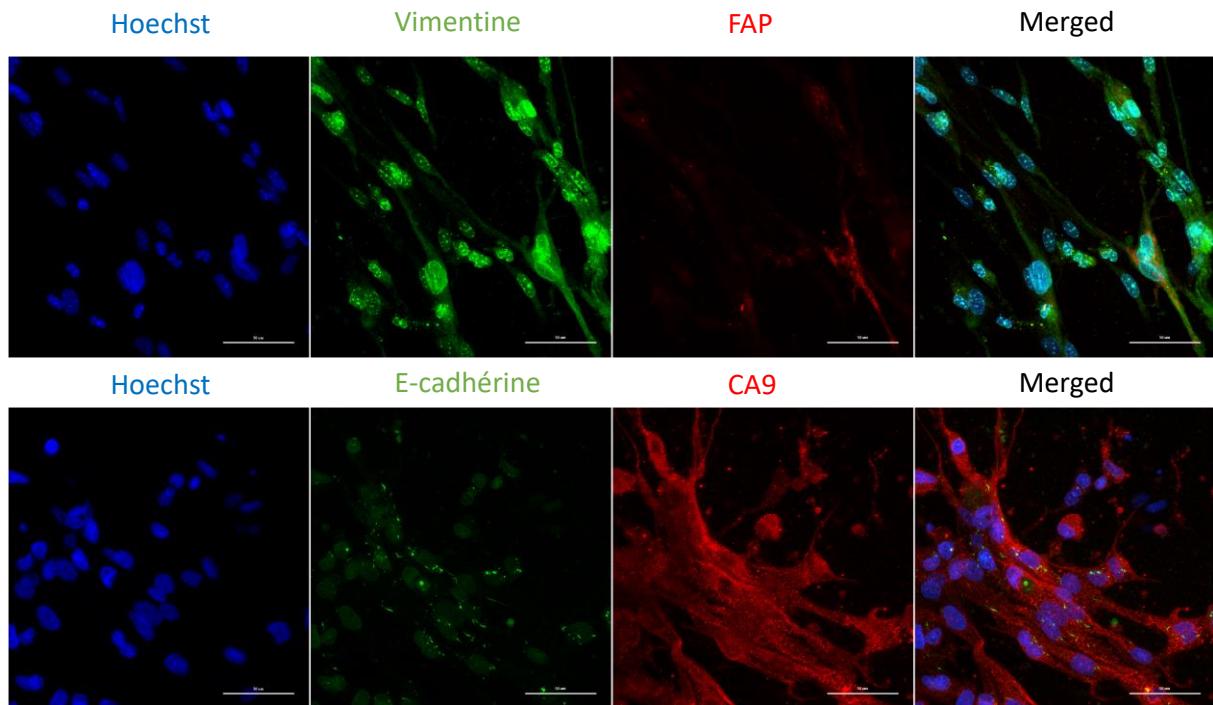


Figure 71 : Caractérisation des cellules invasives d'une tumeur de souris. Les cellules ont été fixées et marquées avec des anticorps anti-FAP, Vimentine, CA9 et E-cadhérine et contre-colorées au Hoechst. Images acquises avec le microscope confocal AiryScan, objectif 40x à immersion, barre d'échelle = 50 µm.

Pour conclure, de la même manière que pour le modèle tumoroïde, le TissueSpec kidney permet de sélectionner les cellules invasives tumorales.

2.4. Discussion et conclusion

L'étude de modèles cellulaires *in vitro* de complexité variable a révélé que la capacité invasive des cellules cancéreuses était dépendante de la composition de la matrice extracellulaire, de la présence du microenvironnement cellulaire tumoral, et des facteurs solubles tel que les facteurs de croissances et les cytokines.

Premièrement, l'étude de l'invasion à partir de sphéroïdes, ne possédant pas de microenvironnement tumoral, ne suffit pas à récapituler totalement les capacités métastatiques *in vivo*. En particulier pour la lignée ACHN, reportée comme la lignée avec le plus haut potentiel métastatique *in vivo*, mais pour laquelle aucune invasion n'est observée *in vitro*. Au contraire, les sphéroïdes 786-O et Caki-1 ont démontré une excellente capacité invasive. Par conséquent, il semble que les cellules ACHN aient besoin des cellules du microenvironnement pour dégrader la matrice et envahir leur environnement. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules ACHN expriment extrêmement peu de MMP sécrétées,

dont les MMP2 et 9, qui sont les acteurs principaux du remodelage matriciel dans le cancer [304], [493]. En effet, d'après les données transcriptomiques de ces trois lignées récupérées sur l'encyclopédie des lignées cellulaires cancéreuses (CCLE Datasets), les cellules ACHN n'expriment presque pas de MMP sécrétés, mais uniquement des MMP membranaires (MT-MMP), contrairement aux 786-O et Caki-1 qui expriment beaucoup de MMP sécrétées en particulier de la MMP2 (Figure 72).

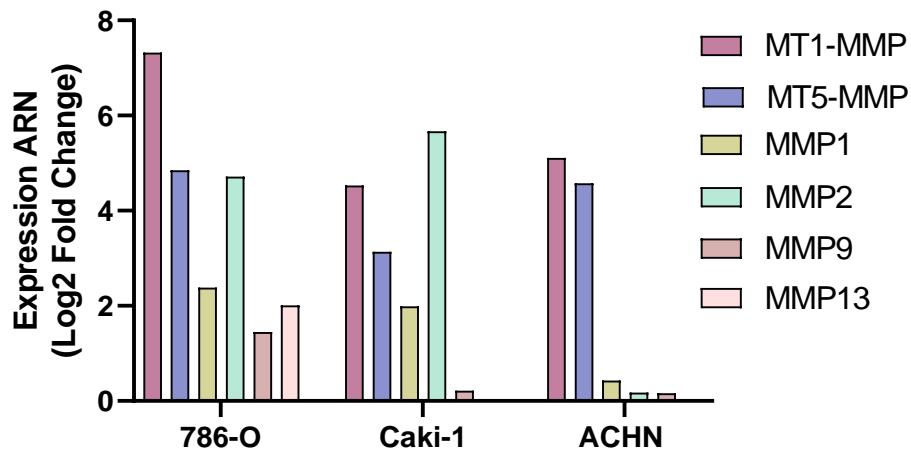


Figure 72 : Expression ARN de certaines MMPs dans les lignées cellulaires. D'après le CCLE dataset (Cancer Cell Lines Encyclopedia), expression ARN en Log fold Change.

D'ailleurs, Cao et al. ont démontré dans le cas du cancer pancréatique, que la MT1-MMP était exprimée à la surface des cellules cancéreuses, induisant la sécrétion de pro-MMP2 par les CAFs. La pro-MMP2 était ensuite activée en MMP2 grâce à la MT1-MMP exprimée sur les cellules cancéreuses, induisant un remodelage de la matrice [493]. Aussi, Monea et al. ont mis en évidence que la MT5-MMP avait une activité protéolytique sur les cadhérines [283], renforçant potentiellement l'action de la MT1-MMP pour favoriser l'invasion. En conclusion, les cellules ACHN auraient besoin des CAFs afin d'envahir, d'où l'absence totale d'invasion sous forme de sphéroïde contrairement aux modèles tumoroïdes et coupes de tissus. De la même manière, les tumoroïdes et coupes de tissus 786-O ont une capacité invasive deux fois supérieure (autour de 1000 µm en moyenne) aux sphéroïdes (500 µm en moyenne), suggérant que pour les deux modèles, le microenvironnement promeut l'invasion. Sachant cela, une des perspectives de ce travail est de produire des tumeurs Caki-1 chez la souris afin d'évaluer le potentiel invasif des modèles tumoroïdes et coupes de tissus issus de cette lignée.

L'invasion est aussi dépendante de la matrice et donc de l'hydrogel utilisé. En effet, les cellules ont une capacité invasive accrue dans le TissueSpec Kidney comparé au collagène I, en particulier les tumoroïdes et coupes de tissus ACHN, qui n'envahissent pas dans le collagène I. Ceci est étonnant, car aucune différence dans l'expression des intégrines n'est notée entre les différentes lignées, et elles expriment toutes les intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$ et $\beta 1$ liant le collagène et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ liant la fibronectine [289]. Néanmoins, les deux lignées expriment peu de MMP clivant le collagène I, en particulier les MMP10 et 19, pouvant partiellement expliquer leur capacité d'invasion inférieure dans le collagène. En effet, le TissueSpec Kidney possédant d'autres composants de la matrice, comme par exemple la fibronectine, les cellules ont d'autres moyens de remodeler la matrice pour envahir. De plus, la présence et l'augmentation de la quantité de fibronectine matricielle est associée à une augmentation de l'invasion et à la présence de métastases dans le cancer [254], [279], [306]. Néanmoins, les différences de capacité invasive entre les 786-O et les ACHN sont inverses à leur capacité métastatique respective *in vivo*. En effet, comme mentionné plus haut, il est possible que les cellules ACHN soient plus performantes à la survie dans la circulation par exemple, expliquant la différence *in vivo*. C'est pourquoi nous devons complexifier le modèle en ajoutant la composante microfluidique afin de prendre en compte les autres étapes du processus métastatique.

Enfin, l'invasion est dépendante des facteurs de croissance et cytokines, comme on l'observe avec les différences de potentiel invasif en fonction du milieu de culture utilisé. Par exemple le Milieu OS, contenant de la BMP2, induit une augmentation de l'invasion des sphéroïdes et des coupes de tissu ACHN incluses dans du TissueSpec Kidney comparé au DMEM. Il a d'ailleurs été noté dans le cancer du sein que la BMP2 favorisait l'invasion et la migration en diminuant l'adhésion cellulaire [494]. De manière opposée, une étude sur le CRCC a démontré qu'une surexpression de la BMP2 dans les lignées Caki-1 et Caki-2 inhibait la migration et l'invasion [495]. D'autres études ont aussi montré que la BMP-2 induisait une transformation ostéogénique dans les lignées ACHN et Caki-2 [496]. Par conséquent, il est clair que ce milieu OS modifie les propriétés intrinsèques des tumeurs et modifie les capacités invasives, n'en faisant pas un bon candidat pour l'étude de l'invasion. Par ailleurs, toutes les lignées ont montré une capacité invasive supérieure, cultivées dans du TumorMACS Kidney. Malheureusement, nous ne connaissons pas la constitution exacte de ce milieu, il serait

intéressant d'en analyser la composition et de tester individuellement les cytokines qui pourraient être responsables d'une augmentation de l'invasion. Par exemple, il est connu que les cellules tumorales rénales expriment fortement le récepteur CXCR4, dont le ligand est CXCL12 (SDF-1), souvent sécrété par les cellules du microenvironnement tumoral pour induire l'invasion et l'angiogenèse [75], [76]. Si c'est le cas, cela pourrait favoriser l'invasion, alors qu'au niveau physiologique, les niveaux de cytokines seraient beaucoup plus bas, et le milieu TumorMACS ne récapitulerait alors pas vraiment les caractéristiques intrinsèques des tumeurs. En particulier, la tumeur humaine CM095, de grade pT1b, a démontré une capacité invasive dans le TumorMACS mais pas dans le DMEM. Au vu du bas grade de la tumeur, il est possible que le milieu induise l'invasion en favorisant les clones cellulaires agressifs, et que ce résultat soit un faux-positif. Au contraire, il est possible que cette tumeur était à un stade précoce au moment du diagnostic mais qu'elle aurait évolué en cancer métastatique si elle n'avait pas été opérée à temps. Afin de répondre à cette question, il faudra analyser d'autres tumeurs et confronter les résultats avec les potentielles rechutes des patients au niveau clinique. A l'inverse, le DMEM a démontré qu'il permettait la sélection des tumeurs de haut grade en particulier sur les tests d'invasion depuis les tumoroïdes humain, ou seul la tumeur MZ076, de grade pT3a, a envahi, ce qui suggère tout de même une pertinence de notre modèle.

Les perspectives de ce travail sont, premièrement, d'explorer les modes de migration et d'invasion. Par exemple en définissant l'impact du milieu de culture sur le mode d'invasion, en marquant les MMPs activés, en regardant les intégrines exprimées et la dégradation de l'hydrogel. De plus, nous avons observé au fil des expériences que le TissueSpec kidney, malgré sa capacité à récapituler certaines caractéristiques invasives, possède une composition inconnue et hétérogène entre les lots, comme le Matrigel. Nous avons d'ailleurs eu des problèmes avec certains lots, avec lesquels les résultats étaient très différents de ce qui est exposé ici. Par conséquent et d'après l'article récent identifiant les composants majeurs de la matrice extracellulaire des CRCC, nous souhaitons développer notre hydrogel personnalisé, contenant les composants principaux décrits [302]. En effet, la matrice de rein sain est composée en majorité de lame basales et donc de collagène IV, alors que le rein tumoral perd l'organisation tissulaire, induisant un remodelage matriciel important, ayant un impact sur le développement tumoral et le potentiel invasif. Plus précisément, nous souhaitons concevoir une matrice à base de collagène I, collagène VI et de fibronectine, dont la rigidité pourra être modulée par l'ajout d'alginate. Pour finir, la perspective principale est de placer ces modèles tumoraux dans l'hydrogel dans la puce microfluidique, dont nous reparlerons dans les perspectives générales du projet Oncotrap.

3 . Développement de niche métastatiques

Le cancer du rein métastase principalement dans les poumons, le foie et l'os. Par conséquent, nous avons choisi d'essayer de développer ces 3 niches métastatiques dans l'objectif à long terme d'une puce possédant 3 compartiments métastatiques récepteurs, afin d'évaluer le tropisme des cellules cancéreuses rénales pour chacun des sites. Nous avons en premier lieu explorer les niches de poumon et de foie, et ce avec 2 techniques différentes, via l'utilisation de poudre de matrice décellularisée et de coupes de tissus frais. Par la suite, et concomitant à l'arrivée de l'équipe BRM dans notre unité, nous avons explorer la possibilité de créer une niche osseuse à l'aide d'un biomatériau sur lesquels sont cultivés des périostes. Les résultats de ces différents tests et développements sont présentés ci-dessous.

3 . 1 . Les poudres de poumon et de foie

Plusieurs études récentes ont montré la faisabilité de cultiver des métastases *in vitro* notamment grâce à l'utilisation de poudres d'organes décellularisés [386], [497]. Dans ces études, ces poudres sont déposées en fine couche dans des boites de culture et des cellules sont cultivées dessus, formant des métastases après un entraînement et adaptation aux conditions de culture [386]. Nous avons produit et testé ces poudres pour étudier la faisabilité et l'attractivité de ces « matrices » (que je nommerai BMS pour BioMaterial Scaffolds) dans nos conditions expérimentales (Figure 73).

Des tests préliminaires ont montré que des concentrations de BMS de foie et de poumon entre 25 et 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ étaient toxiques pour les cellules 786-O (Figure 73 A). En effet, il reste quelques cellules après 25 jours de culture, mais il a fallu 3 ensemencements successifs à des densités cellulaires extrêmement élevées pour avoir quelques cellules viables. De plus, un test de transmigration a mis en évidence pour les cellules 786-O, la répulsivité des BMS déposées à une densité de 25 et 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ au fond des puits (Figure 73 B). Toutefois, des concentrations plus faibles de 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n'induisent pas de mortalité excessive après 4 jours de culture (Figure 73 C). Le même type d'expériences a été réalisé avec des sphéroïdes de 786-O mCherry (tag fluorescent rouge) déposés sur de la BMS de poumon (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dans trois conditions de milieu de culture (DMEM-F12, Milieu conditionné de 786-O et TumorMACS). Après 34 jours de culture un marquage calcéine/hoechst montre que dans les trois types de milieu, la viabilité cellulaire est excellente (Figure 73 D). Néanmoins, il n'y a aucun changement phénotypique

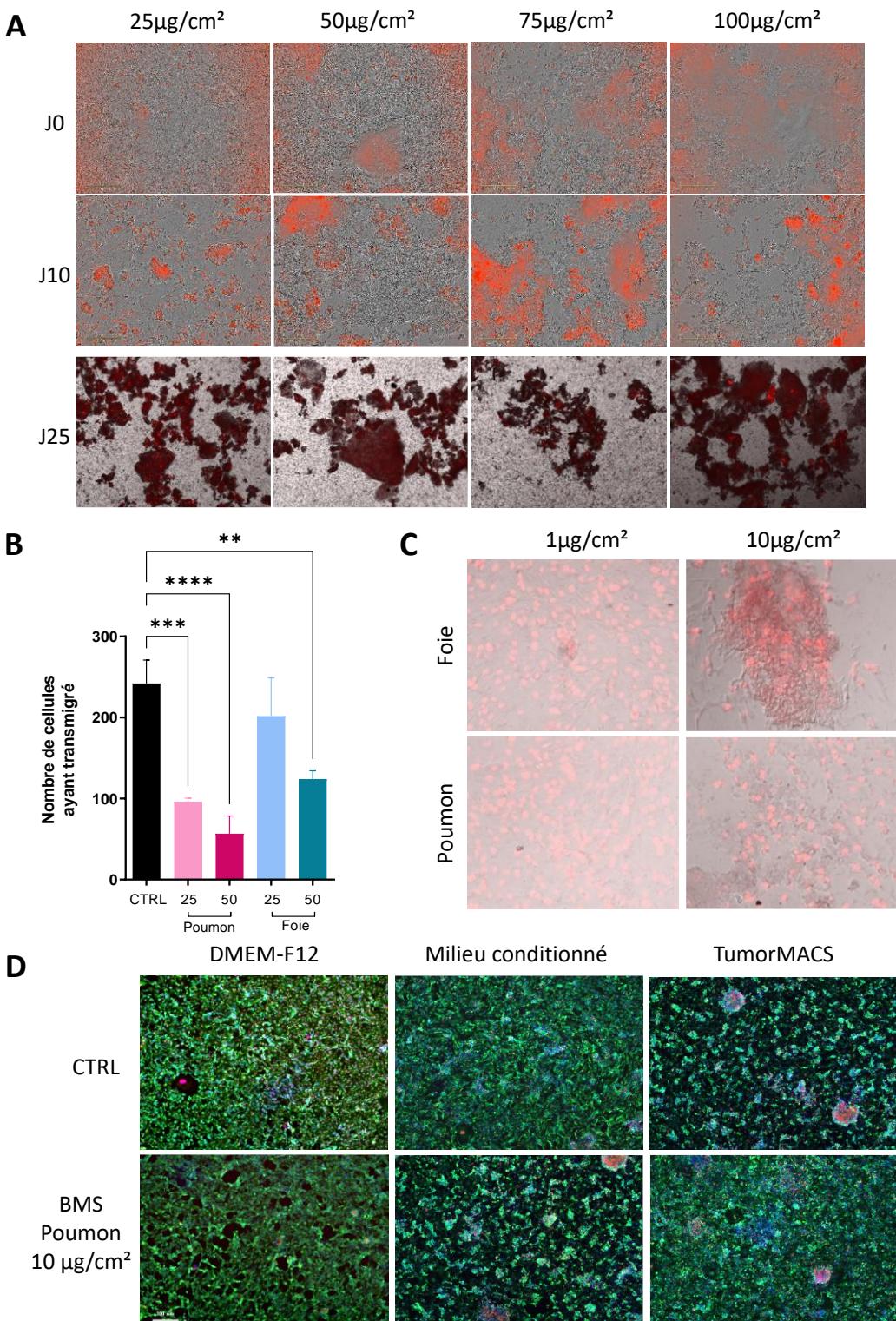


Figure 73 : Développement des poudres d'organes décellularisés pour induire la formation de métastases. A : Culture des 786-O mCherry sur la BMS de poumon aux densités protéiques indiquées. **B :** Nombre de cellules ayant transmigrées à travers des chambres de Boyden placées sur une plaque dont le fond a été recouvert de BMS de foie et de poumon à une densité de 25 et 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Les cellules ayant traversé ont été colorées au Hoechst et comptées après 24h de culture. ANOVA1W, **p<0.01, ****p<0.0001. **C :** Cellules 786-O mCherry après 4 jours de culture sur de la BMS de poumon et de foie à une densité de 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. **D :** Sphéroïdes de 786-O mCherry déposés sur de la BMS de poumon 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dans 3 milieux différents après 34 jours de culture. Marquage Calcéine, Hoechst, mCherry. Barre d'échelle = 300 μm

notable lorsque les cellules sont cultivées dans du DMEM-F12 plus ou moins BMS : également du sphéroïde et prolifération au fond du puit. En revanche, la BMS semble induire la formation d'amas cellulaires et la résistance des sphéroïdes initiaux en présence de milieu conditionné. Néanmoins, ce résultat est mitigé par la condition TumorMACS seul dans laquelle les cellules forment les mêmes amas. De plus, ces amas ne subsistent pas lors de l'ajout de la BMS. Le milieu de culture TumorMACS seul semble donc plus efficace à modifier le phénotype des 786-O, caractéristique de la formation de métastase décrit par Xi Tian et al. [386].

Pour conclure, les résultats obtenus sont mitigés car ils n'ont pas pu être reproduits. Les BMS sont toxiques et induisent une très forte mortalité des cellules cancéreuses au-dessus de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En effet, Tian et al. nous ont informé que les cellules étaient en fait entraînées pendant des mois sur les BMS, pendant lesquels les concentrations de BMS sont graduellement augmentées jusqu'à atteindre 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Par conséquent, mettre les cellules en contact des BMS directement à forte concentration induit une mortalité. Néanmoins, il semble indispensable d'atteindre ces concentrations pour obtenir les métastases décrites dans leur article. Par conséquent, nous en avons conclu que l'utilisation de ces BMS n'était pas compatible avec notre dispositif microfluidique, puisque nous souhaitons mimer une niche pour laquelle les cellules cancéreuses vont développer un tropisme plus rapide.

3 . 2 . Les coupes de tissus frais

Maitrisant la culture organotypique, nous avons eu l'idée d'utiliser des coupes d'organe sain comme « récepteurs » de cellules métastatiques. Des poumons et des foies de souris ont été coupés en tranches de 300 μm et déposés dans des boîtes de culture. Des cellules 786-O mCherry ont ensuite été ensemencées sur la surface de ces coupes puis observées après 3 et 10 jours de culture. Les résultats pour la culture sur les coupes de poumons sont présentés dans la Figure 74.

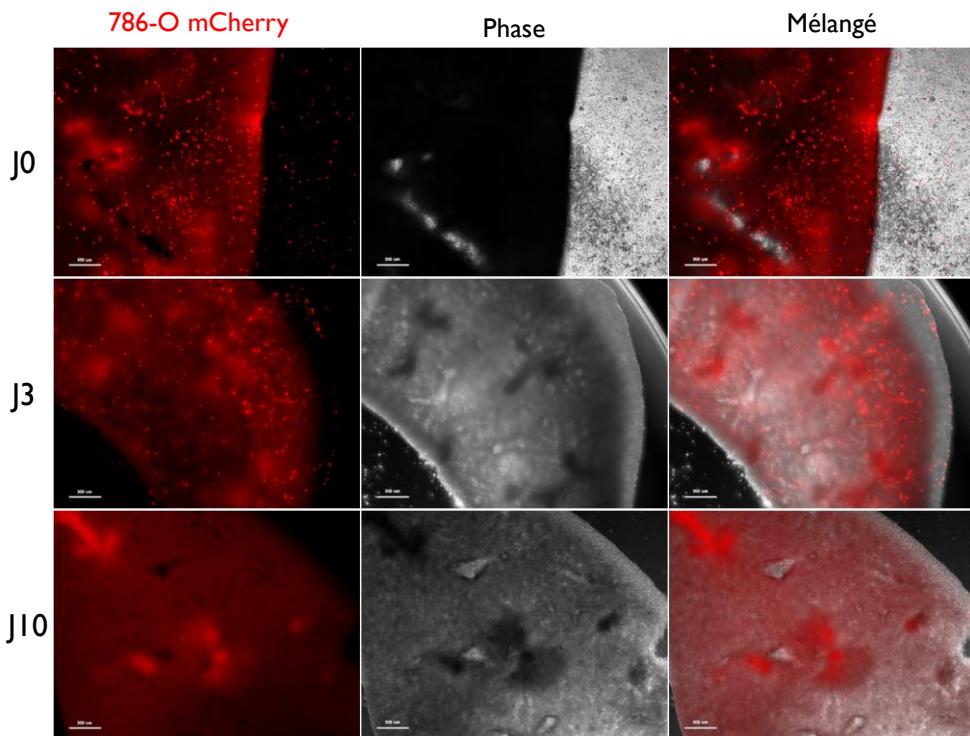


Figure 74 : Culture de cellules tumorales sur des coupes de poumons de souris. Des 786-O mCherry ont été ensemencées sur des coupes de poumons (300 μ m) de souris (J0). Après 3 jours de culture, les coupes ont été déplacées dans d'autres puits sans cellules afin d'observer les cellules ayant adhéré au tissu et de suivre leur prolifération et survie. A 10 jours, plus aucune cellule n'est visible. Images prises à l'AxioObserver Zeiss, objectif 5x, Barre d'échelle = 300 μ m.

La Figure 74 montre l'évolution dans le temps d'une coupe de poumon ensemencée avec des cellules 786-O mCherry. Les cellules survivent pendant 3 jours mais meurent par la suite comme le montre la photo à 10 jours. Pour le foie, qui n'est pas montré ici, l'auto-fluorescence de l'organe rend l'observation très difficile et la survie cellulaire semble encore plus faible que pour le poumon. Au total, la difficulté d'observation et la mortalité cellulaire observée dans ces conditions, rend cette méthode difficilement applicable dans le cadre d'un protocole clinique.

Plus globalement, les BMS et les coupes d'organes sont critiquables d'un point de vue scientifique au vue de leur provenance animale. C'est pourquoi nous envisageons aujourd'hui la co-culture de cellules tumorales avec des cellules humaines pulmonaires et d'hépatocytes.

3.3. La co-culture avec des périostes

L'os est un site métastatique majeur du CRCC. En effet, 35% des patients décédés d'un cancer rénal ont des métastases osseuses et c'est un facteur de mauvais pronostique [498]. Sachant cela et avec l'arrivée de l'équipe BRM, spécialisée sur la régénération osseuse, nous avons décidé de développer une niche osseuse comme récepteur à métastases. Dans ce cadre, nous avons co-cultivé des cellules de périoste avec des sphéroïdes de 786-O mCherry afin d'étudier le tropisme des cellules (Figure 75).

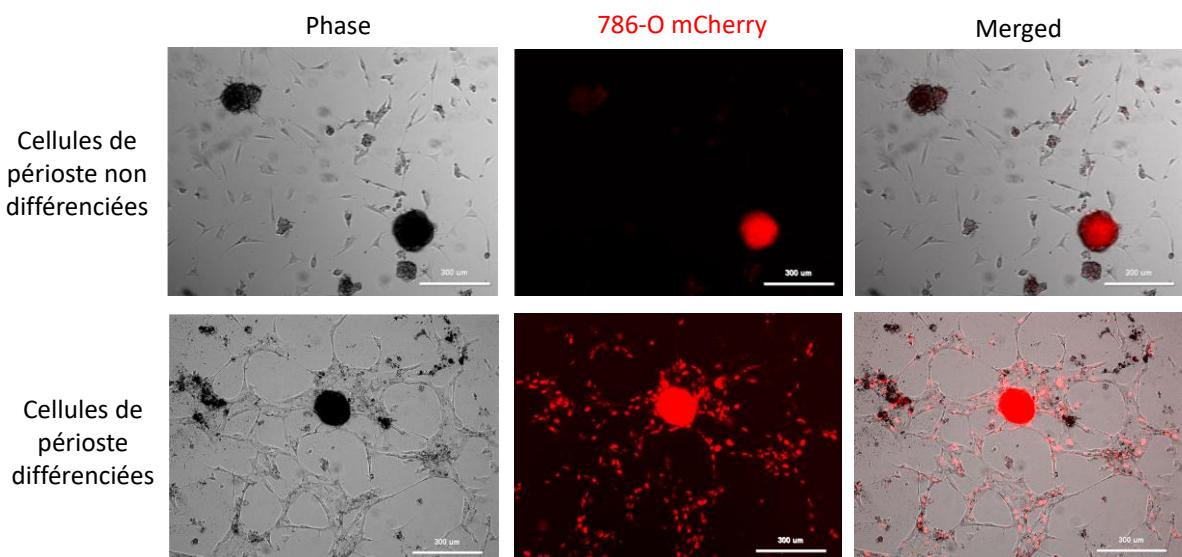


Figure 75 : Co-culture de cellules tumorales et de cellules osseuses. Les cellules souches de périostéum ont été ensemencé sur des biomatériaux contenant ou non de la BMP2 pour induire la différenciation osseuse (panel bas) ou non (contrôle négatif, panel haut). Après différenciation (15 jours), des sphéroïdes 786-O mCherry ont été ajoutés en culture. Les images correspondent à la co-culture après 3 jours. Images prises à l'AxioObserver Zeiss, barre d'échelle = 300 μ m.

Les cellules cancéreuses cultivées en présence de cellules osseuses indifférencierées n'ont démontré aucun tropisme en faveur des cellules non différencierées de périoste. En effet, le sphéroïde reste arrondi, et ne se mélange pas aux cellules souches de périostéum. Par ailleurs cela signifie que les 786-O ne sont pas capables d'adhérer au biomatériaux, qui est le support des périostes. En revanche, en présence de cellules osseuses différencierées, les cellules tumorales se mélangent et migrent le long du réseau cellulaire osseux pour rejoindre les calcifications observées (spots noirs). Il semble donc que les cellules cancéreuses rénales et les cellules osseuses soient compatibles en culture et qu'elles interagissent, formant des réseaux mixtes de périostes et cellules cancéreuses. Attention néanmoins, la BMP2 induisant la transformation ostéogénique des cellules tumorales rénales, il serait judicieux de vérifier que les 786-O ne dérivent pas en cellules osseuses.

3 . 4 . Discussion et conclusion

Les organes métastatiques principaux du CRCC sont les poumons, le foie et l'os. Dans ce cadre, nous avons tenté de développer des niches métastatiques pour chacun de ces organes. Malheureusement, les BMS de poumon et de foie ainsi que les coupes d'organes frais correspondants ne permettaient pas la culture des cellules cancéreuses rénales sur le long terme et induisaient une mortalité excessive. Pour diminuer la toxicité induite par les BMS, nous avons essayé de cultiver les cellules avec du milieu conditionné par des cultures de cellules 786-O, contenant le sécrétome concentré des cellules tumorales. En effet, il est établi que les niches métastatiques nécessitent, en amont de la colonisation cancéreuse, une préparation du microenvironnement via la sécrétion de vésicules et de cytokines. Sans cette préparation amont, les cellules cancéreuses ne survivent généralement pas dans un nouvel environnement, qui inhibe la prolifération des cellules cancéreuses [370]. Néanmoins, il est difficile d'envisager un remodelage de la matrice via ces cytokines puisqu'il n'y a plus les cellules du microenvironnement capables de remodeler les BMS. Une des pistes à explorer serait de décellulariser des organes de rats ayant un CRCC à un stade avancé, pour lesquels les niches pré-métastatiques auraient déjà été préparées *in vivo*. Il est possible que les cellules aient une meilleure survie et soient capables de faire des métastases sur ces BMS. Concernant les coupes de tissu frais, il serait aussi intéressant de récupérer les poumons et foie de souris ayant un CRCC de stade avancé. En effet, les cellules du microenvironnement étant encore présentes dans ce modèle, il est possible que les cellules immunocompétentes du microenvironnement induisent la mort des cellules cancéreuses dans nos expériences. De plus, il serait envisageable de cultiver dans un premier temps les coupes de tissu frais seules et en présence du milieu conditionné des cellules tumorales. Cela permettrait d'induire un remodelage du microenvironnement rendant les coupes plus favorables à la survie des cellules tumorales. Pour conclure, ces méthodes ont été écartées pour la suite du projet, en particulier à cause de l'utilisation du modèle animal, plutôt controversée dans sa compatibilité avec les tumeurs humaines, et d'un point de vue éthique. Par ailleurs, il nous a semblé difficile de mettre en place des cultures d'organes frais dans un dispositif médical à visée clinique.

Le développement de la niche osseuse a été initié par la co-culture de cellules de périostes et de cellules tumorales rénales. Les cellules tumorales ont montré un certain tropisme pour les cellules de périoste, s'étalant à leur surface. Afin de confirmer cet attrait, il serait intéressant

de regarder si ce tropisme est physique ou chimique, par exemple via la culture individuelle de chaque type cellulaire avec le milieu conditionné de l'autre lignée. De plus, il est envisagé des tests de chimio-attraction, d'invasion et de caractérisation des 786-O après co-culture afin de vérifier qu'elles conservent leurs propriétés tumorales et ne deviennent pas osseuses. Ce modèle possède tout de même quelques limites, dont le fait que les périostes soient des cellules humaines primaires extrêmement difficiles à obtenir et que leur différenciation nécessite 15 jours ce qui est très long. De plus, le périoste correspond à la couche externe de l'os, alors que les cellules cancéreuses ont tendance à métastaser dans l'os, au niveau de la cavité médullaire ou du tissu osseux compact. Les cellules cancéreuses interagissent d'ailleurs avec les ostéocytes pour induire un remodelage de la matrice et favoriser leur colonisation [378]. Enfin, le milieu de culture contenant de la BMP2 pourrait modifier les propriétés des cellules tumorales en particulier les capacités invasives [494], [495], [496]. Sachant cela, nous avons décidé de travailler en parallèle sur un modèle d'ostéocytes grâce à la lignée ostéoblastique hFOB 1.19 (human Fetal Osteoblasts) qui est thermosensible [499], [500]. Les ostéoblastes, cultivés à 34°C, sont indifférenciés et prolifèrent puis, placés à 39°C, ils se différencient en ostéocytes en seulement 7 jours. Cette différenciation est d'ailleurs majoritairement maintenue si on replace ensuite les cellules à 37°C dans l'objectif de co-culture avec les cellules tumorales. De plus, ces cellules sont cultivées en DMEM-F12 complet, supplémenté de Néomycine uniquement. Par conséquent, aucune cytokine ou inhibiteur ne viendrait interférer avec notre modèle tumoral rénal.

Pour conclure, notre équipe continue de développer le compartiment métastatique osseux qui semble prometteur dans la conception de notre dispositif microfluidique pour l'étude du potentiel métastatique des tumeurs de patients.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La propagation métastatique des cellules cancéreuses est un processus complexe à plusieurs étapes, responsable de presque 70% des décès par cancer [310]. Face à cet enjeu majeur, notre objectif est de développer des modèles expérimentaux mimant les environnements tumoraux et les niches métastatiques afin de prédire le potentiel métastatique de tumeurs de patients et d'évaluer, de manière personnalisée, la réponse à des traitements anti-métastatiques. Par ailleurs, cela permettrait de surveiller spécifiquement les organes à risque lors du suivi clinique des patients.

Dans cet objectif, j'ai pu développer et caractériser un nouveau modèle de tumoroïde de carcinome rénal chez la souris, transposable à l'homme. Ce modèle est le premier modèle de tumoroïde de CRCC cultivé entièrement en suspension, caractérisé et intégrant le microenvironnement tumoral, en particulier les cellules endothéliales [400], [436], [415], [437], [438]. Les tumoroïdes ont démontré leurs capacités à récapituler les caractéristiques intrinsèques des tumeurs dont ils sont issus, en particulier via la conservation du microenvironnement cellulaire tumoral. De plus, j'ai démontré la faisabilité d'utiliser la culture organotypique comme outil prédictif et qu'il était possible d'évaluer les capacités invasives à partir de ces deux modèles, correspondant à la première étape de la cascade métastatique. Néanmoins, il reste des améliorations à apporter, en particulier en ce qui concerne la composition de l'hydrogel utilisé pour mimer la matrice extracellulaire tumorale. En effet, il est primordial d'en maîtriser sa composition ainsi que ses propriétés biomécaniques pour se rapprocher au plus près des conditions physiologiques des CRCC. De plus, il est important de préciser que l'invasion ne permet pas de récapituler totalement la capacité métastatique des tumeurs, le processus étant bien plus complexe.

Concernant la niche métastatique, nous avons décidé de nous focaliser sur l'os. En effet, des métastases osseuses ont été reportées chez 40% des patients ayant eu un CRCC au cours de leur vie [498]. De plus, le microenvironnement osseux a été identifié comme étant un réservoir à métastases secondaires. Il permet de modifier les cellules cancéreuses ce qui leur facilite la colonisation de multiples autres organes [383], [384]. A noter, seuls quelques modèles d'organes sur puce se concentrent sur l'étude des métastases osseuses [501], [502].

Bien conscients que les capacités invasives seules et la co-culture de cellules tumorales et osseuses ne récapitulent pas les capacités métastatiques globales d'un cancer, l'objectif est d'intégrer ces deux compartiments au sein d'une puce microfluidique. Ce dispositif permettra de récréer les contraintes de flux interstitiel intra-tumoral, le chimiotactisme de l'os pour les cellules tumorales ainsi que la sécrétion par les cellules tumorales de facteurs solubles et de vésicules préparant la niche pré-métastatique. La Figure 76 détaille la conception de la puce microfluidique, produite en partenariat avec le CEA Leti.

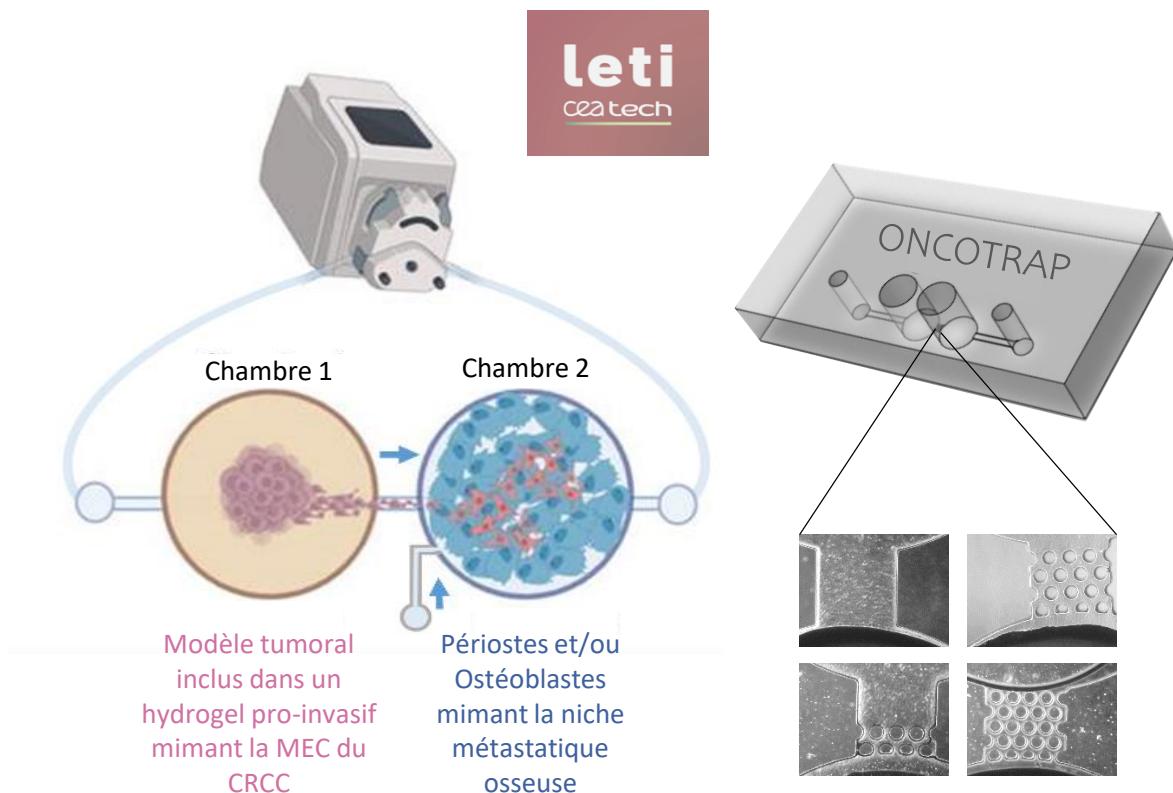


Figure 76 : Oncotrap : Puce microfluidique pour l'étude du potentiel métastatique

La puce est composée de deux chambres cylindriques de 2 mm de diamètres, dont la première correspond au compartiment tumoral primaire et la seconde au compartiment métastatique osseux. La chambre 1 est conçue de sorte à être ouverte sur le dessus, permettant la culture des sphéroïdes, des tumoroïdes et surtout des coupes de tumeurs, qui ne peuvent pas être injectées par les canaux microfluidiques. L'ouverture permet aussi de déposer l'hydrogel de manière localisé, uniquement dans cette chambre. La chambre 2 est fermée et desservie par une seconde entrée qui permet le dépôt de biomatériaux, le cas échéant, ainsi que l'injection des périostes ou des ostéoblastes. Une fois ensemencée, la puce peut être scellée à l'aide d'un film stérile et branchée sur une pompe péristaltique dont le flux est équivalent aux flux

interstitiels (1 à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Par ailleurs, comme on peut l'observer sur les images en bas à droite, le canal central séparant les deux chambres est modulable. Il peut être de différentes longueurs allant de 250 à 750 μm de long et posséder plus ou moins de piliers, restreignant l'espace disponible dans le canal pour les cellules. En effet, nous avons fait le choix de nous dispenser des étapes d'intravasation, de circulation et d'extravasation, afin de diminuer la complexité technologique du modèle pour commencer. Néanmoins, nous souhaitions concevoir un système dans lequel les cellules vont rencontrer des obstacles, permettant de sélectionner les clones tumoraux les plus invasifs et donc au potentiel métastatique plus élevé. En fait, il s'agit de concevoir un système permissif à l'invasion et à la colonisation métastatique, mais qui ne la promeut pas de manière excessive par rapport à ce qui est observé au niveau physiologique. A terme, il sera possible de revoir la conception de la puce afin d'intégrer le système vasculaire en partie centrale. Ce travail sera donc poursuivi dans le laboratoire, en collaboration avec le CEA Leti et l'équipe BRM.

Pour conclure, notre équipe et ses partenaires sont en bonne voie pour concevoir un dispositif médical pour la prédiction du potentiel métastatique des patients.

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse a permis de prouver la faisabilité d'utiliser la létalité synthétique, en particulier la combinaison KU-CX inhibant les kinases ATM et CK2, dans le cadre du traitement du CRCC. Cette combinaison est d'ailleurs utilisée dans le cadre de notre essai préclinique COMBOREIN et a montré de réels bénéfices dans le traitement de coupes de tumeurs de CRCC pour certains patients, par rapport aux thérapies kinases conventionnelles. De plus, le projet Oncotrap a permis la conception d'avatars, utilisables dans le cadre du projet, et plus largement pour le criblage de nouvelles thérapies ciblées et même d'immunothérapies, puisque ces nouveaux modèles conservent le microenvironnement tumoral. D'ailleurs, notre combinaison KU-CX a démontré son efficacité sur le modèle tumoroïde, au même titre que la culture organotypique. Le projet Oncotrap a aussi mis en lumière la possibilité d'évaluer la capacité invasive des tumeurs de patients *in vitro* ce qui est un premier pas vers la prédiction du potentiel métastatique des tumeurs de patients dans un objectif de médecine personnalisée. Pour finir, nous espérons à terme utiliser ce dispositif médical pour évaluer la capacité du KU-CX à inhiber la formation de métastases et plus largement pour trouver de nouvelles thérapies ciblées anti-métastatiques à l'aide de modèles hétérogènes et complexes tels que les tumoroïdes.

ANNEXE : RÔLE DU COLLAGENE VII DANS LA PROGRESSION TUMORALE

COL7A1 est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer gastrique et favorise l'apparition de carcinomes cutanés. Plus précisément, une forte expression de COL7A1, de surcroît intracellulaire, est corrélée à une diminution de la survie des patients de 30% dans les cancers gastriques [308], [309]. COL7A1 a été identifié dans plusieurs autres cancers comme facteur de mauvais pronostique, mais n'a jamais été étudié dans le cadre du CRCC. Notre équipe a donc décidé de travailler sur l'impact de COL7A1 dans le CRCC. Les résultats de ce travail en cours de soumission et auquel j'ai participé, sont présentés ci-dessous. Les analyses informatiques à partir de données transcriptomiques ont été effectuées par Dzenis Koca, et Rémy Jardiller, sous la supervision de Laurent Guyon. J'ai effectué les tests cellulaires (Figure 4), sous la supervision d'Odile Filhol et Claude Cochet, en générant des lignées shCOL7A1 et en évaluant l'impact d'une diminution de COL7A1 sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Finalement, nous y montrons que COL7A1 diminue la survie et est un facteur de mauvais pronostic dans le CRCC [503].

Article

Identification of COL7A1 as a novel prognostic biomarker for patients with clear cell renal cell carcinoma

Dzenis Koca¹, Irinka Séraudie¹, Rémy Jardiller¹, Claude Cochet¹, Odile Filhol¹ and Laurent Guyon^{1*}.

¹Interdisciplinary Research Institute of Grenoble, IRIG-Biosanté, University Grenoble Alpes, CEA, UMR 1292, F-38000 Grenoble, France,

*Correspondence: laurent.guyon@cea.fr; Tel: +33-(0)4-38780453

Abstract: Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) accounts for 75% of kidney cancers. Due to high recurrence rate and treatment options that come with high cost and potential side effects, correct prognosis of patient survival is essential for successful and effective treatment of patients. Novel biomarkers could play an important role in the assessment of overall survival of patients. COL7A1 encodes for the collagen type VII, a constituent of basal membrane. COL7A1 is associated with survival in many cancers, however, prognostic value of COL7A1 expression as a standalone biomarker in ccRCC has not been investigated. We used Kaplan-Meier curves and Cox proportional hazards model to investigate prognostic value of COL7A1, as well as Gene Set Enrichment Analysis to investigate genes that are expressed with COL7A1. COL7A1 expression was used to stratify patients in four groups of COL7A1 expression, where 5-year survival probability of each group was 72.4%, 59.1%, 34.15%, and 8.6% in order of increasing expression. Additionally, COL7A1 expression was successfully used further divide patients of each stage and histological grade in groups of high and low risk. Similar results were obtained in independent cohorts. Knockdown of COL7A1 expression significantly impacted ccRCC cell's ability to migrate and proliferate. To conclude, we defined COL7A1 as a new prognosis marker that can stratify ccRCC patients.

Keywords: ccRCC, patient's prognosis, COL7A1, biomarker, prediction, survival.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

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



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the year 2020, around the world, there was an estimated 431,300 new cases of kidney cancer, accounting for 2.2% of all cancer cases, and nearly 179,300 patients die of this disease [1]. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is a distinct histologic subtype of kidney cancer that accounts for approximately 75% of kidney cancer cases [2]. ccRCC is a highly metastatic cancer; nearly 17% of patients have developed metastasis at the time of diagnosis [3]. The ccRCC subtype is histologically characterized by having transparent (clear), round-shaped cells. The reason for discolouration is the accumulation of lipids inside tumour cells, as the cell goes through epithelial to mesenchymal transition (EMT) and partial adipogenic transdifferentiation [4]. Multiple cancer driver events were identified through the molecular characterization of ccRCC. Some of the most common driver events include mutations and methylation of VHL, PBRM1, BAP1 and SETD2 genes, as well as changes in a chromosomal structure such as loss of 3p and gain of 5q chromosomes [5].

Extracellular matrix (ECM) plays an important role in many cancers. ECM can serve both as mechanical support/scaffold for tumour growth and cell proliferation and migration as well as a modulator of biochemical cues by promoting epithelial-mesenchymal transition, sustaining self-renewal, inducing metabolic reprogramming and accumulating and delivering various growth factors [6]. One of the major structural and functional components of ECM are collagen proteins. The basement membrane Type I collagen is a prevalent component of the stromal ECM; its expression being spatially and temporally regulated to maintain normal cell behavior. Type VII collagen is a protein that belongs to the family of collagens, which is encoded by the Collagen Type VII Alpha 1 Chain (COL7A1) gene. Collagen 7 fibril is formed by intertwining three identical collagen chains, and it primarily functions as an anchoring fibril between the basal membrane and proximal cells of stratified squamous epithelia [7]. Germline mutations in COL7A1 are one of the main causes of dystrophic epidermolysis bullosa, which in turn can increase the chance of squamous cell carcinoma [8]. Increased expression of COL7A1 was also detected in highly metastatic cancer cell lines, as well as in prostate cancer-initiating cell spheroids [9,10]. COL7A1 expression has already been investigated as a potential prognostic biomarker in patients with lung squamous cell carcinoma [11], oesophageal squamous cell carcinoma [12] as well as gastric cancer [13].

Under the scope of “P4” medicine, assessment of patient survival could improve the decision-making in clinical environment. Additionally, certain treatment options are allowed to be used only in cases of poor prognosis. Clinical and biochemistry markers, such as stage and grade of tumor, are often used in assessment of ccRCC prognosis [14]. Recently, we have shown that, for most cancers, survival prediction can be improved by incorporating clinical and transcriptomic data [15]. Additionally, there is an increasing interest in how ECM-related genes could be used to assess survival of ccRCC patients [16–19]. To the best of our knowledge, COL7A1 expression in ccRCC was not investigated as an independent prognostic biomarker in this disease.

The present paper is organized as follows. First, we performed a screening for potential biomarker genes in ccRCC followed by in depth investigation of top result. Secondly, we investigated possible biological implication of COL7A1 through assessment of co-expressed genes. Finally, we performed in-vitro experiments to investigate the impact of COL7A1 on the proliferation and migration of ccRCC cell lines.

2. Materials and Methods

Datasets and processing

The Cancer Genome Atlas (TCGA) is a cancer genomics program that characterized over 20,000 tumoral and peritumoral tissue samples of 33 different cancers, including ccRCC (with acronym KIRC). The transcriptome profiling data of primary tumor tissue and corresponding clinical and pathological information of TCGA:KIRC cohort were obtained using “TCGAbiolinks” package (2.62)[20]. As per recent suggestion [21], we downloaded a harmonized transcriptomic data, which was already TPM normalized. To decrease computational time, only the protein-coding genes, with total expression across samples greater than 10 TPM were retained. Data was further transformed in $\log_2(\text{TPM}+1)$ counts. To deal with multiple samples per patient, only samples that could be found in GDS “FireBrowse” (<http://firebrowse.org/>, accessed on 2 November 2022) were used in downstream analysis.

To validate the results on independent cohorts, we have obtained three additional datasets. Transcriptome profiling data of E-MTAB-1980 dataset was obtained from Array express, while clinical data was obtained from supplementary data of the original publication [22]. GSE167093 dataset was obtained from Genome Expression Omnibus (GEO)[23]. “Braun *et al.*” dataset was obtained from the supplementary data of the corresponding publication [24]. All datasets of independent cohorts were already normalized by original authors. Details on normalization are available in respective publications.

Overview of clinicopathological characteristics of patients in datasets, for which clinical data was publicly available, is available in Table 1.

Table 1 Clinicopathological characteristics of patients with clear cell Renal Cell Carcinoma in four different datasets. Presented are datasets that had publicly available clinicopathological data. Missing data was not taken in consideration when percentage was

	TCGA	E-MTAB-1980	GSE167093	Braun <i>et al.</i>
Total samples	532	101	604	225
Median age at diagnosis years (range)	61 (26-90)	64 (35-91)	62 (23-85)	62 (30-88)
Sex, N (%)				
Female	187 (35.15)	24 (23.8)	247 (41)	61 (27.1)
Male	345 (64.85)	77 (76.2)	357 (59)	164 (72.9)
Tumor grade^a, N (%)				
I	14 (2.7)	13 (13.1)	100 (18.8)	-
II	228 (43.5)	59 (59.6)	304 (57)	-
III	206 (39.3)	22 (22.2)	105 (19.7)	-
IV	76 (14.5)	5 (5.1)	24 (4.5)	-
Missing	8	2	71	225
Tumor stage^a, N (%)				
I	266 (50.3)	66 (65.3)	306 (50.7)	0
II	57 (10.8)	20 (19.8)	98 (16.2)	0
III	123 (23.2)	3 (3)	138 (22.8)	0
IV	83 (15.7)	12 (11.9)	62 (10.3)	225 (100)
Missing	3	0	0	0
EVENTS	175 (32.9)	23 (22.78)	-	173 (76.9)
5 year survival probability % (95% CI)	62.9 (58.2-68.1)	79.6 (71.7-88.3)	-	20.4 (15.5-26.9)

^a Samples with missing information were not included into percentage calculation

Univariable and multivariable Cox model

Cox proportional hazards model (“Cox model” in rest of the text) is one of the most popular methods used in survival analysis. The advantage of Cox model is that it is applicable on continuous variables (without need to set a threshold) and that it can deal with right censored data. Cox model can be represented as:

$$h_i(t) = h_0(t) \cdot \exp(\beta X_i) \quad (1)$$

where $h(t)$ the instantaneous risk of dying for a patient $I = 1, \dots, n$, $h_0(t)$ a common hazard baseline for all patients, β a coefficient to be learnt, and X_i the expression of a given gene

in patient i . If β is significantly positive (resp. negative), the risk increases (resp. decreases) with gene expression: the gene could act as an oncogene (resp. a tumor suppressor). For multivariable Cox model, βX from equation 1 is transformed to $\sum \beta_j X_j$, with X_j being the one of the variables, and β_j being a learned coefficient for variable X_j .

In order to select genes which could be used in clinical environment, two thresholds on genes expression were applied: a) filtering out genes with extremely low expression (median expression = 0), b) filtering out genes that are not variable enough to be precisely measured in clinical environment (quantile 80 – quantile 20 = 0). After filtering process, each remaining gene was used to train a univariable Cox model. For this purpose the R “survival” package (3.3.1) was used [25]. P-value was used to judge goodness of fit of Cox model.

Additionally, univariable Cox model was performed on clinical covariates such as the age of a patient, gender, clinical stage, and histological grade, as well as COL7A1 expression. All mentioned covariates were then used to perform a multivariable Cox model, and changes in a P-value of COL7A1 covariate between the univariate and multivariate Cox model were compared.

Analysis of deviance of multivariable Cox model was used to determine added value of COL7A1 expression, compared to multivariable Cox model based on clinical covariates alone. The analysis of deviance table presents the change in predictive power of model as each of covariates is added to the model, while P-value shows whether the improvement was significant.

Kaplan-Meier curves

COL7A1 expression was divided in groups of High and Low expression using cut point determined by the “surv_cutpoint” function of “survminer” package, version 0.4.9 [26]. Same process was then applied in the other two datasets for which overall survival information were available. Division of COL7A1 expression in five groups of increasing expression was performed by dividing the outlier-free range of expression into five equal sections using the “cut” function. All Kaplan-Meier curves were computed and drawn using packages “survival” and “survminer”.

GSEA

To better understand the biological implication of COL7A1 aberrant expression, we investigated genes that are co-expressed with COL7A1. Gene set enrichment analysis (GSEA) allows us to investigate how does the expression of a set of genes that belongs to a common biological pathway, varies in expression together with COL7A1 [27]. GSEA was performed using the “ClusterProfiler” (4.6.0) package [28]. One of the requirements for GSEA is an ordered vector of genes, based on which enrichment will be calculated. For this purpose, co-expression was investigated through Pearson’s correlation between COL7A1 expression and the expression of other genes available in each investigated dataset individually. Genes sets (pathways) on which GSEA was performed were obtained from the Molecular Signature Database (MSigDB), version 2022.1, with the focus on Hallmark dataset [27,29].

Statistical analysis and data manipulation

All of aforementioned analysis were performed using the R software (4.2.1)[30]. Set of packages contained in “tidyverse”(1.3.2) library (dplyr, ggplot, purr...) were used to manipulate data and to create graphs [31].

Cell culture

ccRCC cell lines 786-O, ACHN and Caki-1 were obtained from ATCC (CRL-1932, CRL1611 and HTB-46 respectively). The cell lines were grown in 10 cm diameter plates in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂) with RPMI 1640 medium (Gibco) containing 10% of fetal bovine calf serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL).

Generation of shCOL7A1 786-O cells

786-O cells were plated into 6-well plates in 2 mL of serum-supplemented RPMI 1640 medium. The day after, adherent cells were infected with Lenti-pLKO.1-puro shRNA COL7A1 virus (Sigma Aldrich) (1–5 MOI (multiplicity of infection)) diluted in 1 mL of serum-supplemented medium containing 8 µg/mL of polybrene (Sigma). After 4h, 1 mL of medium was added to each well and transduction was maintained for 16 h before changing the medium. For stable transduction, puromycin selection started 36 h post-infection (at the concentration of 2 µg/mL) and maintained for 2 weeks.

Western blot

Proteins were extracted from confluent plated cells in Laemmli buffer. Samples were heated 5 min at 100°C. They were separated on a NuPAGE 4–12% Bis Tris gel (BioRad) at 150V for 1h15 and electro-transferred to Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (BioRad) during 1h at 100V. Membranes were saturated for 1 h at room temperature in 3% BSA in TBS-Tween20 0.05% and then incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody diluted in the same saturation buffer. This was followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies and detected by enhanced chemiluminescence. Anti-GAPDH was used as protein loading control. Antibodies used: COL7A1 (Santa Cruz Technologies #sc33710 ; 1/1000^e) and GAPDH (Life technologies #AM4300 ; 1/40 000^e)

RT-qPCR

RNA extraction was performed from confluent plated cells. Trizol was added to cell plates (1.5 mL for a 10 cm petri dish) and extraction solution was transferred in an Eppendorf tube and incubated for 5 min at room temperature (RT). After addition of chloroform (300 µL), stirring, and incubation for 3 min at RT, extraction was centrifuged for 15 min at 12 000 g at 4°C. The resulting upper phase, which is RNA, was transferred into a new tube and 750 µL of isopropanol was added and incubated for 10 min at RT. After centrifugation (10 min, 12 000 g, 4°C), supernatant was removed and the pellet was washed twice with ethanol 75% and 100% with centrifugation in between (5 min, 7 500 g, 4°C). RNA was recovered in RNase free water. Finally, RNA were dosed using Nanodrop.

Reverse Transcription was achieved using the iScript cDNA synthesis kit (BioRad). Briefly, 1 µg RNA was mixed with the 5x iScript Reaction Mix, Reverse Transcriptase and water. Tubes were then incubated in a thermal cycler following this cycle : 5 min at 25°C, 20 min at 46°C and 1 min at 95°C.

Real time quantitative PCR (qPCR) was achieved thanks to the kit Promega GoTaq qPCR Master Mix (BioRad) according to manufacturer instructions. Briefly, pre-diluted (1/10) cDNA were added to the PCR plate as well as the reaction mix containing Taq polymerase and primers (10 µM) and completed with water up to a final volume of 10 µL. qPCR was run using the Biorad C1000 Thermal Cycler following this cycle : 95°C for 2 min, 95°C for 15 sec, 60°C for 45 sec, repeating those steps 39 times and finishing by 95°C for 10 sec and 65°C for 5 sec.

Proliferation & Migration assay

Proliferation and migration were assessed using Incucyte ZOOM (Essen Biosciences) video-microscope. For proliferation, cells were plated in 96-well plate at a density of 5000 cells per well and cell confluence was measured by taking pictures every 2 h for 72 h. Migration assay was performed by plating 30 000 cells per well in a 96-well plate. After overnight cell adhesion, a wound was made using the Wound Maker (Essen Biosciences). Confluence of the wound overtime was measured by taking pictures every 2 h for 24 h. Analysis of confluence was performed thanks to the Incucyte zoom software.

3. Results

Expression of COL7A1 is prognostic of overall survival

With the aim of discovery of novel prognostic biomarkers for ccRCC patients, we have applied a systematic approach to identify genes for which expression levels in tumor is related to overall patient survival. After filtering processes that we previously described, around 17,000 genes remained. We learned a univariable Cox model on all genes that passed filtering, and the resulting table was ordered according to model's P-value. The top ten genes with the lowest P-value are presented in Table 2, with COL7A1 being ranked as a top prognostic gene. To confirm the prognostic power of COL7A1 expression, we learned a univariate Cox proportional hazards model on the independent E-MTAB-1980 dataset. The resulting model was significant, with a P-value of 0.0023, showing that COL7A1 had a prognostic value even in the independent dataset, with patients of different ethnic origin.

Table 2: Results from a univariable Cox model performed on individual genes of the TCGA:KIRC cohort. The table shows the top 10 genes with the lowest P-value. COL7A1 is found at the top of the table.

GENE SYMBOL	P-VALUE	COEFICIENT	HR	RANK
COL7A1	5.1x10 ⁻¹⁹	0.44	1.56	1
CDCA3	6.2x10 ⁻¹⁹	0.74	2.09	2
CRB3	2.1x10 ⁻¹⁸	-0.50	0.60	3
SOWAHB	2.5x10 ⁻¹⁸	-0.52	0.60	4
SLC16A12	4.3x10 ⁻¹⁷	-0.28	0.75	5
SORBS2	1.9x10 ⁻¹⁶	-0.49	0.61	6
CYFIP2	2.3x10 ⁻¹⁶	-0.59	0.55	7
METTL7A	2.7x10 ⁻¹⁶	-0.55	0.57	8
TROAP	5.2x10 ⁻¹⁶	0.61	1.83	9
RGS17	1.1x10 ⁻¹⁵	0.76	2.14	10

To visualize the prognostic capabilities of COL7A1, we have divided TCGA:KIRC patients in groups of High and Low expression (Figure 1A). The resulting Kaplan-Meier curve shows that patients with high COL7A1 expression in tumor have significantly worse prognosis (log likelihood P-value < 0.0001) exhibiting median survival of 4.3 years (3.3-5.25, 95% confidence interval) with 5-year survival probability of 43.7% (34.75-52.5%). For patients with low COL7A1 expression, it was not possible to determine median survival as the survival curve does not cross 50% line; however, this group had a 5-year survival probability of 73.1% (67.8-78.9%).

While the number of patients in E-MTAB-1980 dataset is much lower compared to the TCGA:KIRC dataset, and patients are of predominantly early stages, we can still see the similar stratification of patients according to the risk (Figure 1B). Patients in the high COL7A1 expression group have significantly worse prognosis than the low expression

group (P -value = 0.0014), confirming the results obtained on the TCGA:KIRC dataset. The 5-year survival probability of high expression group was 58.3% (39.8-85.5%), in contrast to 85.2% (77.4-93.7%) in low expression group.

To further investigate the prognostic power of COL7A1, the range of COL7A1 expression in TCGA:KIRC dataset was divided in four equal levels in terms of expression range (Figure 1C). The lowest level of expression is almost identical to the low expression group of Figure 1A. The other three levels of expression showed a gradually increased risk and shorter survival time of patients in relation to COL7A1 expression. The 5-year survival probability of each group from the lowest to the highest COL7A1 expression (Figure 1D) is: 72.4%, 59.1%, 34.15%, and 8.6%.

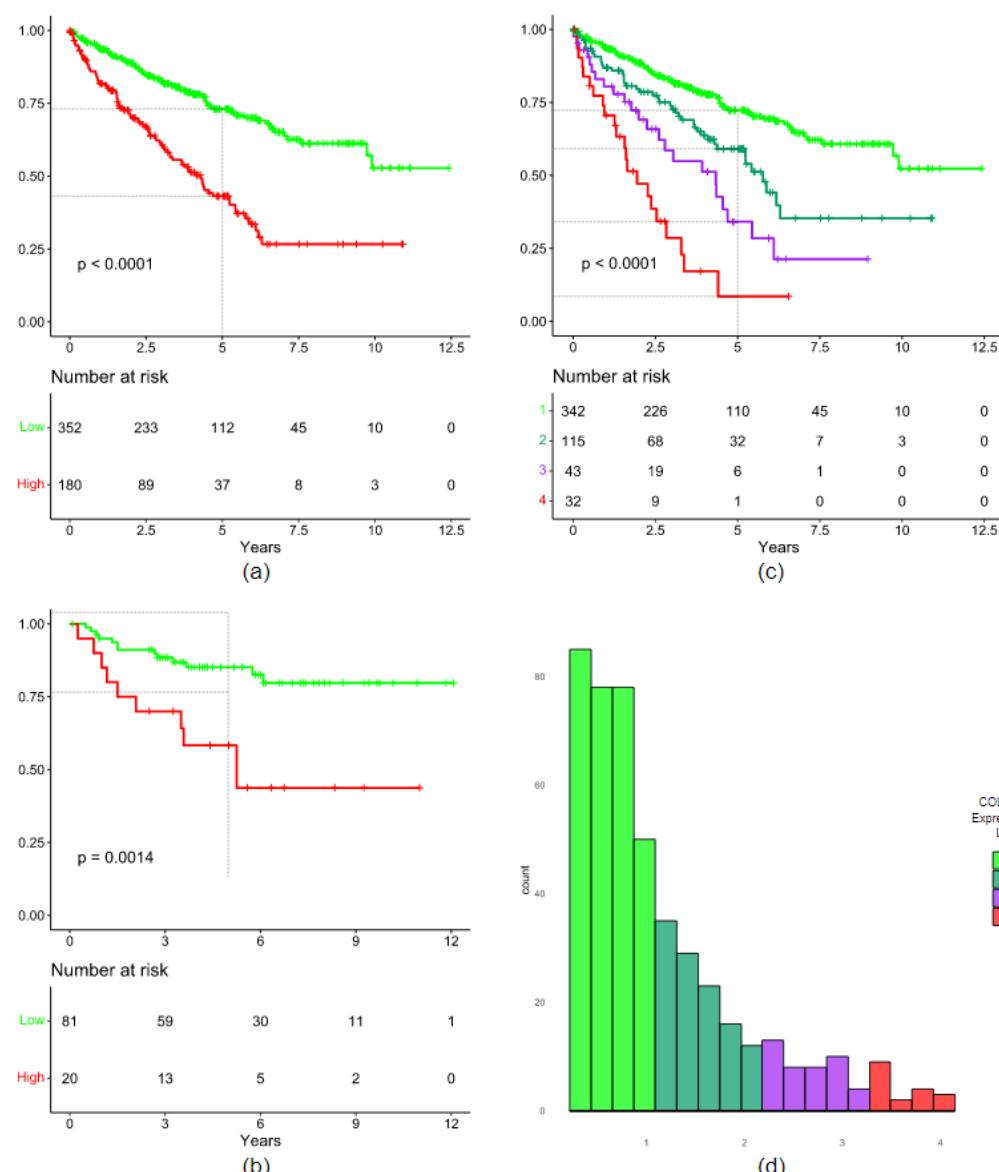


Figure 1: Kaplan-Meier curves showing differences in overall survival probability of patients that are grouped according to COL7A1 expression of the tumor. (A) Kaplan-Meier curve based on the TCGA:KIRC cohort where patients are grouped in groups of Low (green) and High (red) COL7A1 expression. (B) same approach as in A, applied to the E-MTAB-1980 cohort. (C) Kaplan-Meier curve based on the TCGA:KIRC cohort where patients are grouped in four groups of increasing COL7A1 expression. (D) histogram of COL7A1 expression in $\log_2(\text{TPM}+1)$ where colors correspond to groups of subfigure C.

COL7A1 expression can predict patient survival atop of clinical characteristics

Having investigated the predictive power of standalone model based solely on COL7A1 expression, we opted to investigate how COL7A1 expression could be applied in real clinical settings. First, we have investigated COL7A1 expression patterns across samples of different stages and histological grades. When compared to overall expression of protein-coding genes in tumor samples, COL7A1 appears to be, in general, a weakly expressed gene (Figure S1A) with median expression of 0.8 (0.74-0.856), while median expression of all protein-coding genes is 3.058 (3.055-3.06).

Additionally, when comparing the COL7A1 tumor expression across patients with different clinicopathological characteristics, we found that COL7A1 tends to be more expressed in patients with higher stage and grade (Figure S1A). Following this finding, we investigated whether COL7A1 predictive power remains inside these clinical characteristics (stage, grade). Indeed, we observed a significant stratification between patients with low and high COL7A1 expression in all stages (Figure 2). Stratification was most prominent in patients with stage IV tumor with a P-value of 0.00025. The 5-year survival probability for in stage-IV patients was 39.6% (95% CI 26.5%-59.2%) for the low-expression strata, and 11.6% (95% CI 5.1%-26.5%) for the high-expression strata. The 5-year survival probability for stage I patients in low-expression (resp. high-expression) strata was 82.4% (resp. 69.3%), for stage II patients 58.9% (resp. 87.3%), and stage III patients 63.5% (resp. 38.6%). We obtained similar results in two independent cohorts (Figure S2). In addition to improving prediction atop of tumor stage, COL7A1 expression was able to improve survival prediction atop of tumor grade as well (Figure S3). Most prominent effect (P-value of 0.00018) was observed in patients with Grade 3 tumors, where 5-year survival probability of low-expression (resp. high-expression) strata was 42.7% (resp. 13.6%). Although significant, poorest survival prediction was observed for grade 1+2 tumors, which are already of good outcome.

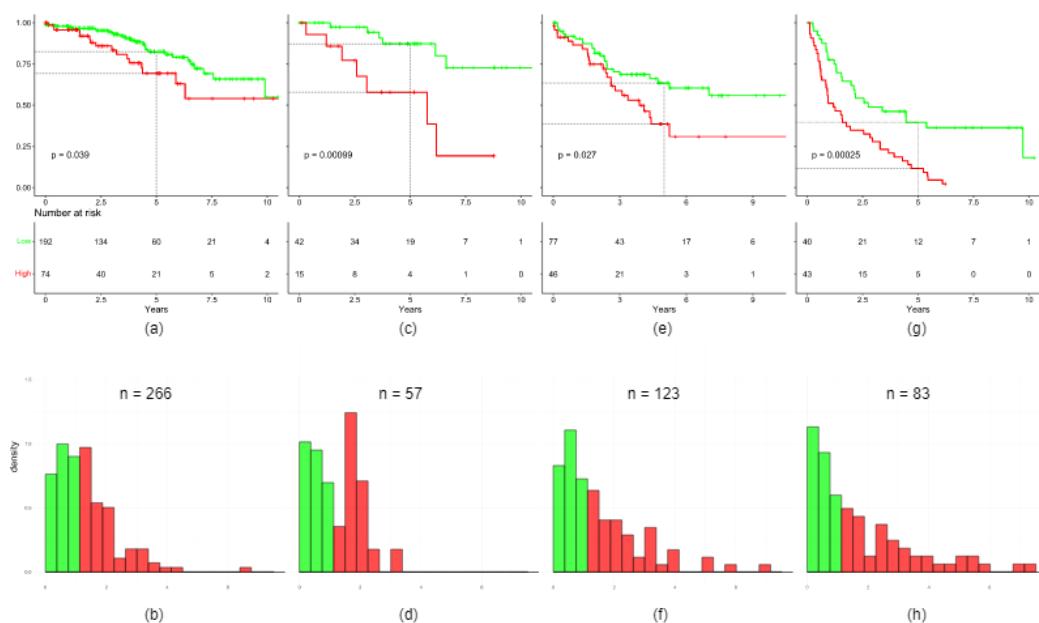


Figure 2: Kaplan-Meier curves and corresponding histograms showing differences in overall survival in the TCGA:KIRC cohort. Patients were split in four subsets according to stage of patients. Patients were divided in groups of Low (green) and High (red) COL7A1 expression. (A-B) Stage I patients. (C-D) Stage II patients. (E-F) Stage III patients. (G-H) Stage IV patients. Expression threshold between Low and High expression groups is the same as for Figure 1A.

COL7A1 expression can improve multivariable Cox model

Using univariable Cox models we investigated how survival prediction based on individual clinical variables compares to prediction based on COL7A1 (Table 3). Interestingly, COL7A1 expression showed better prediction than tumor grade or age of patients. The only clinical variable that shows better prediction than COL7A1 expression is the tumor stage, especially for stage IV tumors. By comparing univariable to multivariable Cox model, COL7A1 gets a particularly low P-value ($P = 6.9 \times 10^{-9}$), meaning that COL7A1 expression retains predictive power even when clinical characteristics are included in the model. To investigate what is the added value of COL7A1 expression to multivariable Cox model based on clinical characteristics alone, we have computed an analysis of deviance table, based on the sequential partial log-likelihood. When variables were added to the model in the order they appear on table, COL7A1 expression shows significant improvement with a P-value of 9.6×10^{-8} , and an increase of log likelihood of 28.45.

Table 3: Results of univariable and multivariable Cox models learned on stage, grade, age of patients and COL7A1 expression in the TCGA:KIRC cohort. The table also contains results from ANOVA performed on multivariable model.

COVARIATE	Univariable Cox model				Multivariable Cox model ^b				ANOVA	
	Coefficient (β)	HR [$\exp(\beta)$]	P-value	Score test	Coefficient (β)	HR [$\exp(\beta)$]	P-value	Chisq	P-value	
STAGE	-	-	1.1×10^{-26}	123.8	-	-	-	95.22	1.7×10^{-20}	
	II	0.22	1.245	0.486	-	0.18	1.20	0.56		
	III	0.91	2.48	1.2×10^{-5}	-	0.55	1.73	0.013		
	IV	1.84	6.32	1.4×10^{-21}	-	1.44	4.23	1.8×10^{-10}		
GRADE*	-	-	5.6×10^{-18}	79.46	-	-	-	14.2	8.3×10^{-4}	
	III	0.64	1.90	6.9×10^{-4}	-	0.36	1.43	0.067		
	IV	1.63	5.10	6.7×10^{-16}	-	0.60	1.83	0.011		
AGE	0.035	1.03	2.5×10^{-6}	22.51	0.036	1.036	1.4×10^{-6}	22.67	1.9×10^{-6}	
COL7A1	0.44	1.56	5.8×10^{-20}	83.67	0.32	1.37	6.9×10^{-9}	28.45	9.6×10^{-8}	

*| Histological grades I and II are combined due to low number of patients in grade I

b| Logrank test (score) for multivariable analysis is 215.3, and Likelihood ratio test is 160.5

COL7A1 expression is correlated with genes involved in cell division, inflammatory response and epithelial to mesenchymal transition, and anti-correlated with metabolism

To infer possible biological mechanisms, we have investigated how COL7A1 expression correlates with expression of other protein-coding genes. As illustrated in Figure 3A, a GSEA analysis to identify the biological functions of correlated genes showed a strong enrichment in cell proliferation pathways (Green stars), inflammation/immune response (Orange squares) and Epithelial to Mesenchymal transition pathway (Blue triangle). Moreover, Supplementary Figures S4 shows that proliferation related genes are more

expressed in tumors also expressing high levels of COL7A1. On the other side, the GSEA analysis showed a strong downregulation in multiple metabolic pathways with the strongest decrease being mitochondrial oxidative phosphorylation for patients with high tumor expression of COL7A1. Interestingly, a strikingly reduced mitochondrial respiratory capacity has been previously observed in primary human ccRCC cells [32]. Additionally, all the 12 mitochondrial genes expressed in the TCGA dataset showed a clear anti-correlation pattern with COL7A1 (Figure 3b and Supplementary Figure S5). Since E-MTAB-1980 and GSE167093 datasets originate from expression arrays, datasets do not contain mitochondrial genes. To investigate expression of genes for which the encoded protein is destined to be a part of mitochondria, we performed GSEA analysis on Cellular Components (CC) of the Gene Ontology database. Most of the genes were found to be anticorrelated with COL7A1 (Figure 3c and 3d).

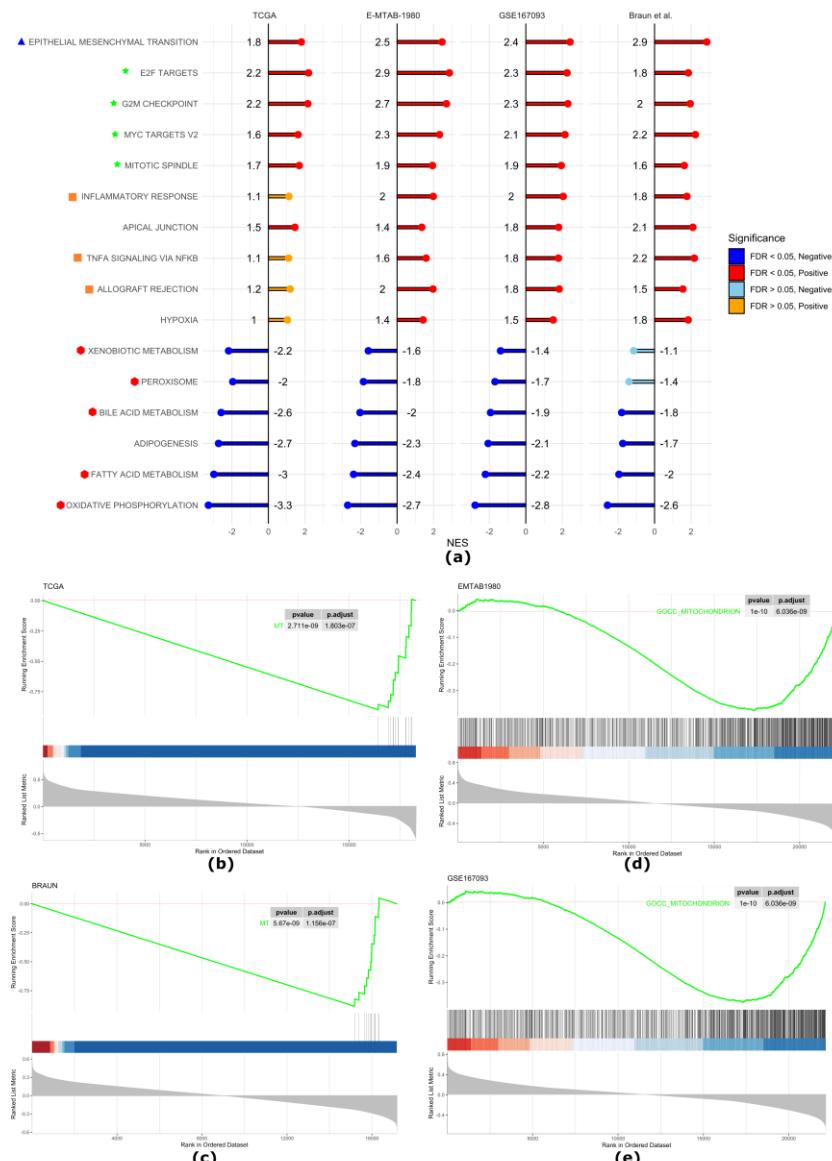


Figure 3: Results from GSEA analysis based on COL7A1 correlation, performed on four different datasets (TCGA:KIRC, E-MTAB-1980, GSE167093 and braun *et al.*). (a) Most enriched HALLMARK pathways among all four datasets; (b) GSEA plot of mitochondrial genes in the TCGA:KIRC cohort; (c) Same as b in Braun et al. data; (d) GSEA plot of GO:CC MITOCHONDRION pathway in the E-MTAB-1980 cohort; (d) same as C on the GSE167093 dataset.

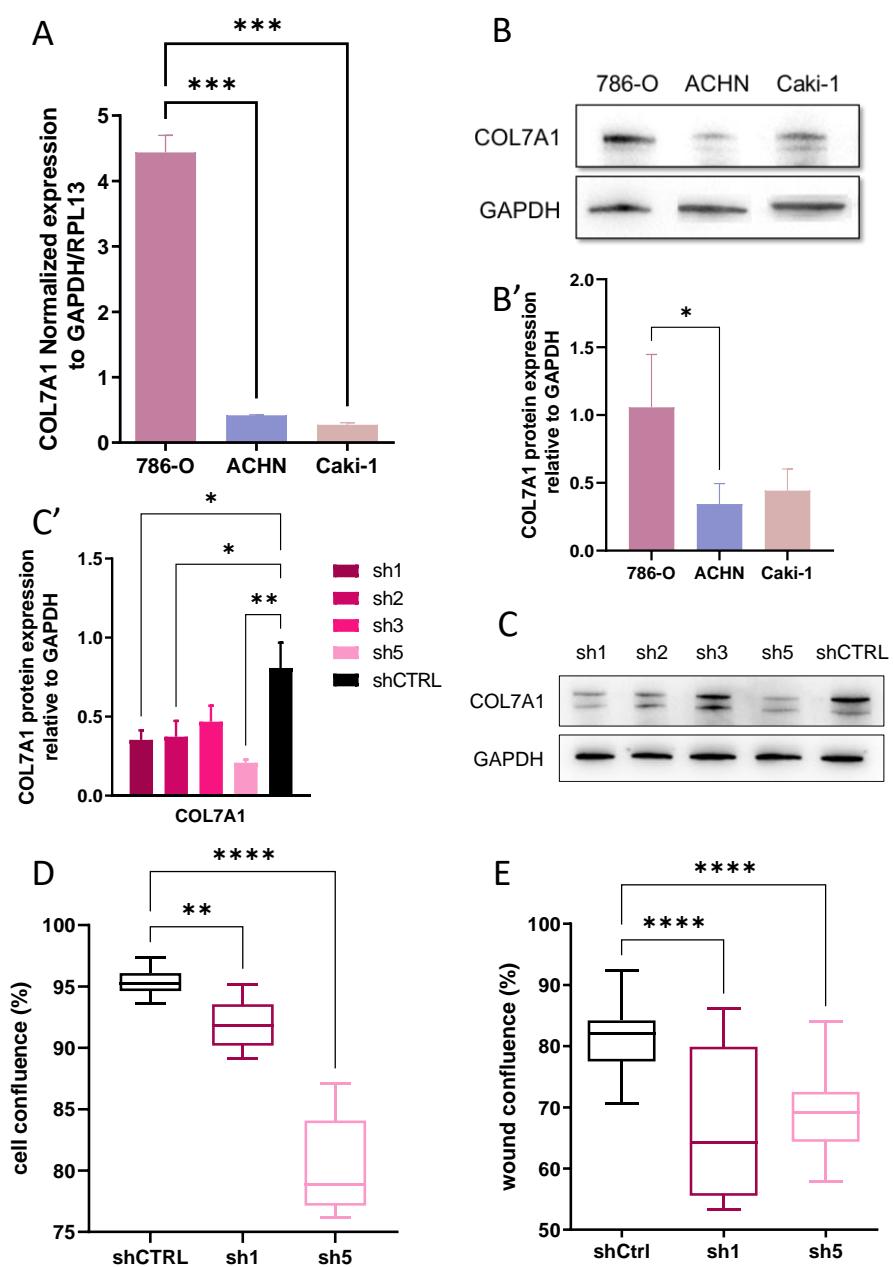


Figure 4: Influence of COL7A1 on proliferation and migration of 786-O ccRCC cells; (A) : RT-qPCR showing expression level of COL7A1 into 3 RCC cell lines : 786-O, ACHN and Caki-1 (n=6); (B): Western blot of COL7A1 protein level into the 3 cell lines and the respectquantification relative to GAPDH (B') (n=3). C, C' : Production of shCOL7A1 786-O cell lines and confirmation through western blot that COL7A1 is knock-down by sh1, 2 and 5 (n=3). D : Proliferation assay showing cell confluence (%) after 48 hours of culture of 786-O shCTRL, sh1 and sh5 cell lines (n= 12). E : Wound healing assay of 786-O shCTRL, sh1 and sh5 cell lines, graph represents wound confluence (%) 10 hours after the scratch (n=24). Statistical analysis was made using unpaired t-test, $p < *0.05$, $**0.01$, $***0.001$, $****0.0001$.

Experimental validation

To validate the transcriptomic analysis, we performed in-vitro experiments to investigate the impact of COL7A1 on the proliferation and migration of ccRCC cell lines. RT-qPCR and western blot analysis revealed differential COL7A1 expression in 786-O, ACHN and Caki-1 RCC cell lines showing that the protein is abundantly expressed in the meta-

static 786-O cells (Figure 4 A, B, B'). Therefore, we performed cell proliferation and migration assays with 786-O cells in which COL7A1 expression has been knockdown (Figure 4 C, C'). COL7A1 knockdown significantly inhibited 786-O cell proliferation (Figure 4 D and Supp. Figure 7) as well as cell migration (Figure 4 E and Supp. Figure 7).

4. Discussion

Over the years, prognosis of ccRCC patients has improved, although its incidence is indeed increasing [3]. According to the 2019 data, around 17% of newly diagnosed patients have developed distant metastasis, and 5-year survival probability of these patients is less than 12% [3]. Early ccRCC cases are asymptomatic and they are often discovered accidentally, during standard medical checkups and CT or ultrasound of the abdomen. Still, reoccurrence occurs in around 30% of patients that undergo surgery, and this includes 10–25% of patients with localized disease [33]. Novel therapeutical options such as targeted therapies and immuno-therapies often come with side effects and high costs, and are often prescribed to patients with intermediate to poor prognosis [34]. Nevertheless, there is an urgent need for biomarker-driven studies with an overarching goal to incorporate newly proven biomarkers for innovative trial designs and to give more accurate and individualized prognosis to patients.

With the advancement of OMIC technologies and methods in machine learning, there has been a huge progress in novel biomarker discovery in ccRCC [35]. In the present work, we have investigated the use of COL7A1 expression as a potential prognostic biomarker in ccRCC. Although, COL7A1 is generally weakly expressed in tumor tissue (in around 70% of the patients), high expression of this gene is a sign of poor prognosis. Additionally, COL7A1 expression is inversely reciprocal to the length of overall survival, meaning that higher the expression of COL7A1, poorer is the patient outcome. Consequently, COL7A1 shows potential to be used either as a binary prognostic factor (low or high expression) or as a continuous prognostic factor. Future predictive models may be improved by incorporation of new biomarkers. By stratifying the Kaplan-Meier curve according to the stage and grade of tumors, we show that COL7A1 can improve the prediction on patient survival based on these two variables. This feature is particularly important for patients with stage III cancers due to their high uncertainty of outcome.

The GSEA analysis showed that high COL7A1 expression could be a sign of multiple other dysregulations in renal tumors. In particular, COL7A1 expression tends to be correlated with genes belonging to pathways that play key roles in cell proliferation, resulting in positive enrichment of “E2F targets”, “MYC targets” “G2M checkpoint” and “mitotic spindle” pathways. Alterations in these signaling pathways were observed in renal carcinoma patients [36–39], where they may lead to uncontrolled cancer cell proliferation, promoting tumor progression and aggressiveness. The GSEA analysis shows strong positive enrichment in “Epithelial to Mesenchymal transition” pathway. [4] previously reported enrichment in this pathway when comparing ccRCC cells to tumor-adjacent kidney tissue, as a signature of dedifferentiation of normal epithelial renal cells.

We also observe anti-correlation between COL7A1 and mitochondrial genes, as well as genes involved in various metabolic pathways. Warburg effect is known to be prominent in ccRCC, and is known to play a role in epigenetic changes of cancer cells [40].

Thus, the incorporation of COL7A1 expression as a valid biomarker into increasingly personalized predictive tools may help to predict outcomes for patients with renal cell carcinoma. Further research of metabolic deregulations in ccRCC as well methods of COL7A1 expression regulations are needed.

Author Contributions: Conceptualization, L.G. and O.F.; methodology, D.K., I.S., R.J. ; software, D.K., L.G. R.J. ; validation, D.K., I.S.; formal analysis, D.K., L.G., I.S. ; investigation, D.K., I.S. ; resources, O.F, L.G.; data curation, O.F, L.G. ; writing—original draft preparation, D.K, C.C., I.S. and L.G ; writing—review and editing, D.K, O.F, C.C. and L.G. ; visualization, D.K., I.S.; supervision, O.F, L.G.; project administration, O.F, L.G.; funding acquisition, O.F.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: This study uses publicly available human datasets. The consent from patients are gathered with the original studies.

Data Availability Statement: Publicly available datasets were analyzed in this study. These data can be found here: <https://gdac.broadinstitute.org/> ; <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-1980/> ; supplementary data of [24] ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE167093> ; . The R script to reproduce the results presented in this article is available at <https://github.com/IRIG-BCI-IMAC/COL7A1-project> (all accessed on 19 December 2022).

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

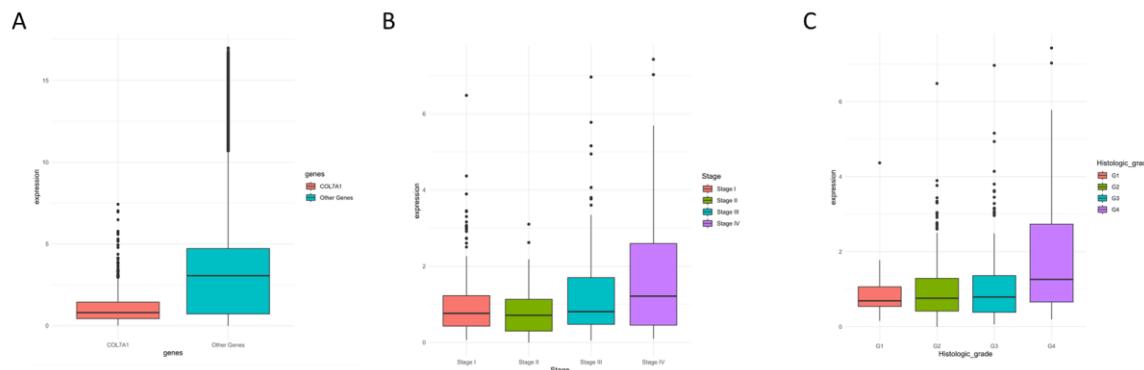
References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:<https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
2. Lopez-Beltran, A.; Scarpelli, M.; Montironi, R.; Kirkali, Z. 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *Eur. Urol.* **2006**, *49*, 798–805, doi:[10.1016/j.eururo.2005.11.035](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.11.035).
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34, doi:[10.3322/caac.21551](https://doi.org/10.3322/caac.21551).
4. Tun, H.W.; Marlow, L.A.; Roemeling, C.A. von; Cooper, S.J.; Kreinest, P.; Wu, K.; Luxon, B.A.; Sinha, M.; Anastasiadis, P.Z.; Copland, J.A. Pathway Signature and Cellular Differentiation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLOS ONE* **2010**, *5*, e10696, doi:[10.1371/journal.pone.0010696](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010696).
5. Turajlic, S.; Xu, H.; Litchfield, K.; Rowan, A.; Horswell, S.; Chambers, T.; O'Brien, T.; Lopez, J.I.; Watkins, T.B.K.; Nicol, D.; et al. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* **2018**, *173*, 595–610.e11, doi:[10.1016/j.cell.2018.03.043](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.043).
6. Nallanthalighal, S.; Heiserman, J.P.; Cheon, D.-J. The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, doi:[10.3389/fcell.2019.00086](https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00086).
7. O'Leary, N.A.; Wright, M.W.; Brister, J.R.; Ciufo, S.; Haddad, D.; McVeigh, R.; Rajput, B.; Robbertse, B.; Smith-White, B.; Ako-Adjei, D.; et al. Reference Sequence (RefSeq) Database at NCBI: Current Status, Taxonomic Expansion, and Functional Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D733–745, doi:[10.1093/nar/gkv1189](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189).
8. Ortiz-Urda, S.; Garcia, J.; Green, C.L.; Chen, L.; Lin, Q.; Veitch, D.P.; Sakai, L.Y.; Lee, H.; Marinkovich, M.P.; Khavari, P.A. Type VII Collagen Is Required for Ras-Driven Human Epidermal Tumorigenesis. *Science* **2005**, *307*, 1773–1776, doi:[10.1126/science.1106209](https://doi.org/10.1126/science.1106209).
9. Chernov, A.V.; Baranovskaya, S.; Golubkov, V.S.; Wakeman, D.R.; Snyder, E.Y.; Williams, R.; Strongin, A.Y. Microarray-Based Transcriptional and Epigenetic Profiling of Matrix Metalloproteinases, Collagens, and Related Genes in Cancer. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19647–19659, doi:[10.1074/jbc.M109.088153](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.088153).
10. Oktem, G.; Sercan, O.; Guven, U.; Uslu, R.; Uysal, A.; Goksel, G.; Ayla, S.; Bilir, A. Cancer Stem Cell Differentiation: TGF β 1 and Versican May Trigger Molecules for the Organization of Tumor Spheroids. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 641–649, doi:[10.3892/or.2014.3252](https://doi.org/10.3892/or.2014.3252).
11. Song, W.; Li, L.; Zhang, J.; Wang, S.; Leng, Z.; Lu, R.; Li, C.; Ma, X.; Wang, T.; Jia, X. Identification of COL7A1 as a Prognostic Biomarker in Lung Squamous Cell Carcinoma; In Review, 2022;
12. Kita, Y.; Mimori, K.; Tanaka, F.; Matsumoto, T.; Haraguchi, N.; Ishikawa, K.; Matsuzaki, S.; Fukuyoshi, Y.; Inoue, H.; Natsugoe, S.; et al. Clinical Significance of LAMB3 and COL7A1 mRNA in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **2009**, *35*, 52–58, doi:[10.1016/j.ejso.2008.01.025](https://doi.org/10.1016/j.ejso.2008.01.025).

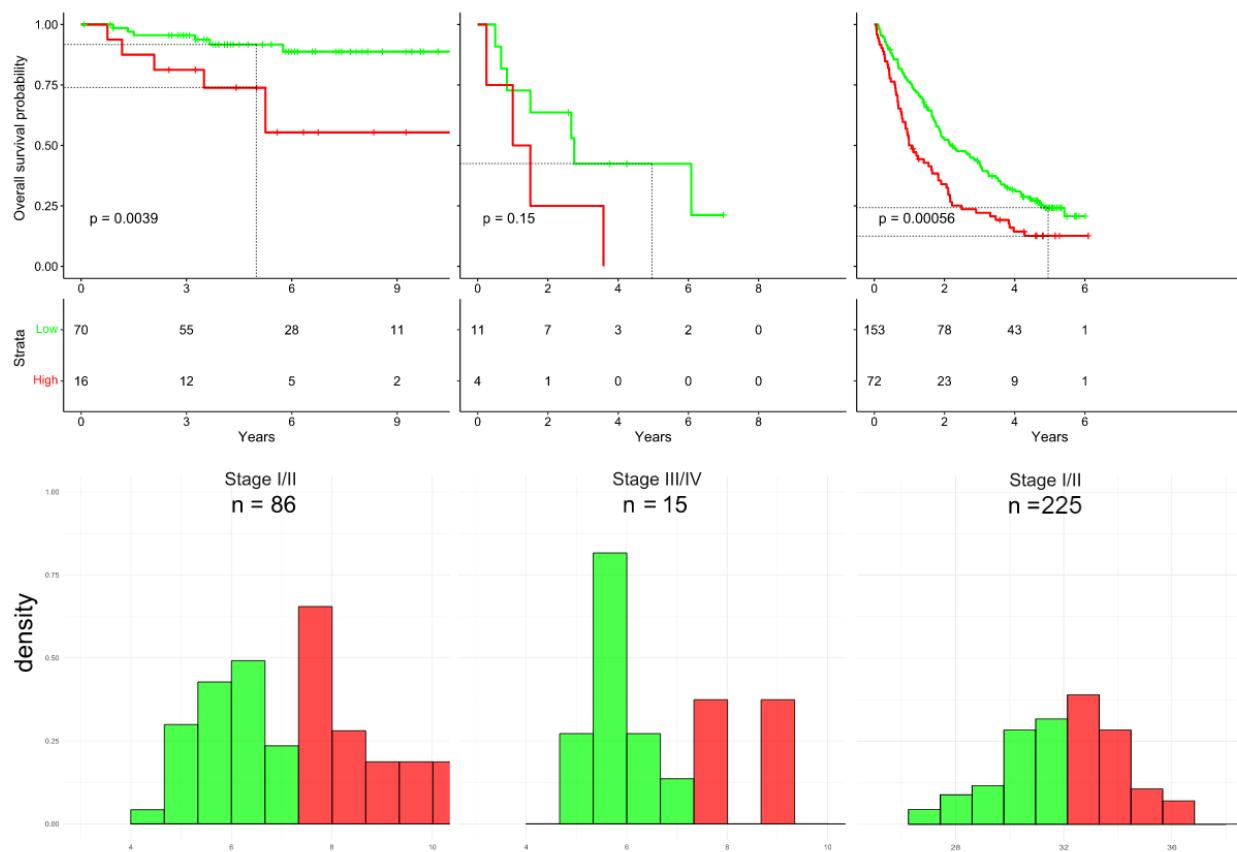
13. POR | Prognostic Value of Highly Expressed Type VII Collagen (COL7A1) in Patients With Gastric Cancer Available online: <https://www.por-journal.com/articles/10.3389/pore.2021.1609860/full> (accessed on 5 December 2022).
14. D’Aniello, C.; Berretta, M.; Cavaliere, C.; Rossetti, S.; Facchini, B.A.; Iovane, G.; Mollo, G.; Capasso, M.; Pepa, C.D.; Pesce, L.; et al. Biomarkers of Prognosis and Efficacy of Anti-Angiogenic Therapy in Metastatic Clear Cell Renal Cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1400, doi:10.3389/fonc.2019.01400.
15. Jardillier, R.; Koca, D.; Chatelain, F.; Guyon, L. Prognosis of Lasso-like Penalized Cox Models with Tumor Profiling Improves Prediction over Clinical Data Alone and Benefits from Bi-Dimensional Pre-Screening. *BMC Cancer* **2022**, *22*, 1045, doi:10.1186/s12885-022-10117-1.
16. Shi, X.; Zhou, X.; Yue, C.; Gao, S.; Sun, Z.; Lu, C.; Zuo, L. A Five Collagen-Related Gene Signature to Estimate the Prognosis and Immune Microenvironment in Clear Cell Renal Cell Cancer. *Vaccines* **2021**, *9*, 1510, doi:10.3390/vaccines9121510.
17. Hou, J.; Lv, Z.; Wang, Y.; Wang, X.; Chen, X.; Wang, K. *Basement Membrane Genes Can Predict the Prognosis of Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma (CcRCC) and Are Correlated with Immune Status*; In Review, 2022;
18. Guo, L.; An, T.; Huang, Z.; Wan, Z.; Chong, T. Comprehensive Analysis of the Collagen Family Members as Prognostic Markers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Transl. Cancer Res.* **2022**, *11*, 1954–1969, doi:10.21037/tcr-22-398.
19. Zuo, Y.; Fu, S.; Zhao, Z.; Li, Z.; Wu, Y.; Qi, T.; Zheng, J.; Du, Q.; Xu, Z.; Yu, N. Sarcomatoid-Associated Gene Risk Index for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front. Genet.* **2022**, *13*.
20. Mounir; Mohamed; Lucchetta; Marta; Silva; C, T.; Olsen; Catharina; Bontempi; Gianluca; et al. New Functionalities in the TCGAbiolinks Package for the Study and Integration of Cancer Data from GDC and GTEx. *PLoS Comput. Biol.* **2019**, *15*, e1006701.
21. Before and After: Comparison of Legacy and Harmonized TCGA Genomic Data Commons’ Data - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31344359/> (accessed on 30 November 2022).
22. Integrated Molecular Analysis of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma | Nature Genetics Available online: <https://www.nature.com/articles/ng.2699> (accessed on 29 November 2022).
23. Laskar, R.S.; Li, P.; Ecsedi, S.; Abedi-Ardekani, B.; Durand, G.; Robinot, N.; Hubert, J.-N.; Janout, V.; Zaridze, D.; Mukeria, A.; et al. Sexual Dimorphism in Cancer: Insights from Transcriptional Signatures in Kidney Tissue and Renal Cell Carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* **2021**, *30*, 343–355, doi:10.1093/hmg/ddab031.
24. Braun, D.A.; Hou, Y.; Bakouny, Z.; Ficial, M.; Sant’ Angelo, M.; Forman, J.; Ross-Macdonald, P.; Berger, A.C.; Jegede, O.A.; Elagina, L.; et al. Interplay of Somatic Alterations and Immune Infiltration Modulates Response to PD-1 Blockade in Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 909–918, doi:10.1038/s41591-020-0839-y.
25. Therneau, T.M. *A Package for Survival Analysis in R*; 2022;
26. Kassambara, A.; Kosinski, M.; Biecek, P. *Survminer: Drawing Survival Curves Using “Ggplot2”*; 2021;
27. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 15545–15550, doi:10.1073/pnas.0506580102.
28. Wu, T.; Hu, E.; Xu, S.; Chen, M.; Guo, P.; Dai, Z.; Feng, T.; Zhou, L.; Tang, W.; Zhan, L.; et al. ClusterProfiler 4.0: A Universal Enrichment Tool for Interpreting Omics Data. *The Innovation* **2021**, *2*, 100141, doi:10.1016/j.inn.2021.100141.
29. Liberzon, A.; Birger, C.; Thorvaldsdóttir, H.; Ghandi, M.; Mesirov, J.P.; Tamayo, P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst.* **2015**, *1*, 417–425, doi:10.1016/j.cels.2015.12.004.
30. R Core Team *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022;
31. Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.D.; François, R.; Gromelund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J.; et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **2019**, *4*, 1686, doi:10.21105/joss.01686.

32. Nilsson, H.; Lindgren, D.; Mandahl Forsberg, A.; Mulder, H.; Axelson, H.; Johansson, M.E. Primary Clear Cell Renal Carcinoma Cells Display Minimal Mitochondrial Respiratory Capacity Resulting in Pronounced Sensitivity to Glycolytic Inhibition by 3-Bromopyruvate. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1585–e1585, doi:10.1038/cddis.2014.545.
33. Makhov, P.; Joshi, S.; Ghatalia, P.; Kutikov, A.; Uzzo, R.G.; Kolenko, V.M. Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 1355–1364, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-1299.
34. Roelants, C.; Pillet, C.; Franquet, Q.; Sarrazin, C.; Peilleron, N.; Giacosa, S.; Guyon, L.; Fontanell, A.; Fiard, G.; Long, J.-A.; et al. Ex-Vivo Treatment of Tumor Tissue Slices as a Predictive Preclinical Method to Evaluate Targeted Therapies for Patients with Renal Carcinoma. *Cancers* **2020**, *12*, 232, doi:10.3390/cancers12010232.
35. Weaver, C.; Bin Satter, K.; Richardson, K.P.; Tran, L.K.H.; Tran, P.M.H.; Purohit, S. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Renal Clear Cell Carcinoma. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2953, doi:10.3390/biomedicines10112953.
36. Liu, Z.-G.; Su, J.; Liu, H.; Yang, X.-J.; Yang, X.; Wei, Y.; Zhu, X.-Y.; Song, Y.; Zhao, X.-C.; Guo, H.-L. Comprehensive Bioinformatics Analysis of the E2F Family in Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Oncol. Lett.* **2022**, *24*, 1–10, doi:10.3892/ol.2022.13471.
37. Shroff, E.H.; Eberlin, L.S.; Dang, V.M.; Gouw, A.M.; Gabay, M.; Adam, S.J.; Bellovin, D.I.; Tran, P.T.; Philbrick, W.M.; Garcia-Ocana, A.; et al. MYC Oncogene Overexpression Drives Renal Cell Carcinoma in a Mouse Model through Glutamine Metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 6539–6544, doi:10.1073/pnas.1507228112.
38. Motzer, R.J.; Banchereau, R.; Hamidi, H.; Powles, T.; McDermott, D.; Atkins, M.B.; Escudier, B.; Liu, L.-F.; Leng, N.; Abbas, A.R.; et al. Molecular Subsets in Renal Cancer Determine Outcome to Checkpoint and Angiogenesis Blockade. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 803–817.e4, doi:10.1016/j.ccr.2020.10.011.
39. Hell, M.P.; Duda, M.; Weber, T.C.; Moch, H.; Krek, W. Tumor Suppressor VHL Functions in the Control of Mitotic Fidelity. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2422–2431, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2040.
40. Luo, Y.; Medina Bengtsson, L.; Wang, X.; Huang, T.; Liu, G.; Murphy, S.; Wang, C.; Koren, J.; Schafer, Z.; Lu, X. UQCRH Downregulation Promotes Warburg Effect in Renal Cell Carcinoma Cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15021, doi:10.1038/s41598-020-72107-2.

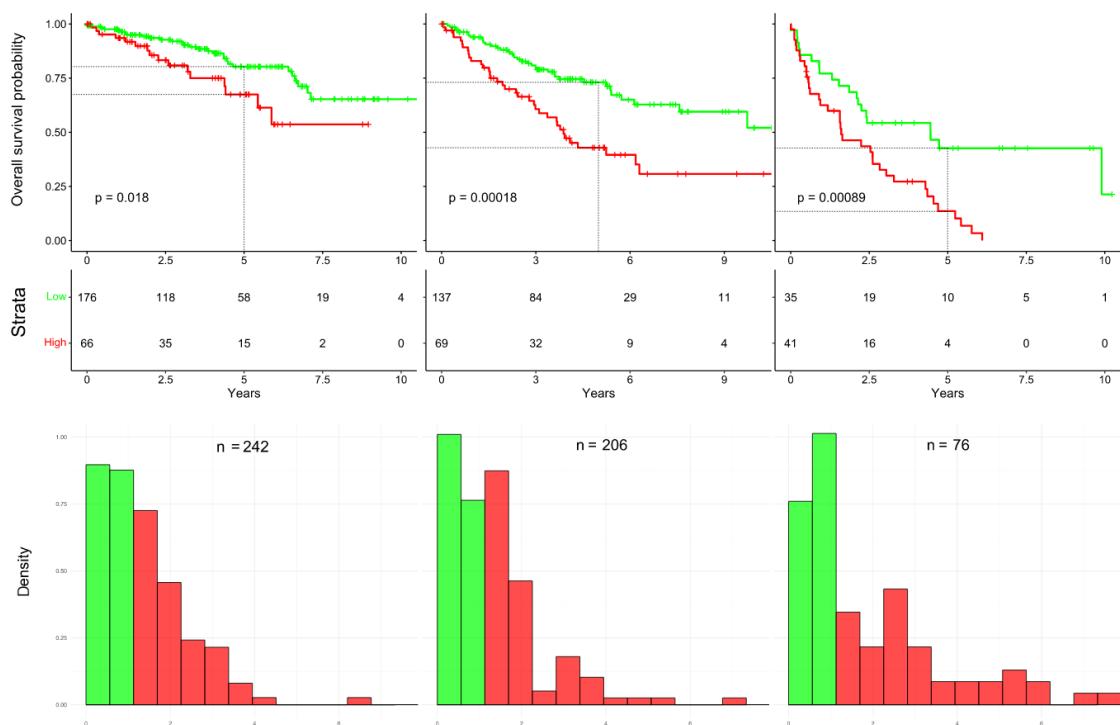
Supplementary figures



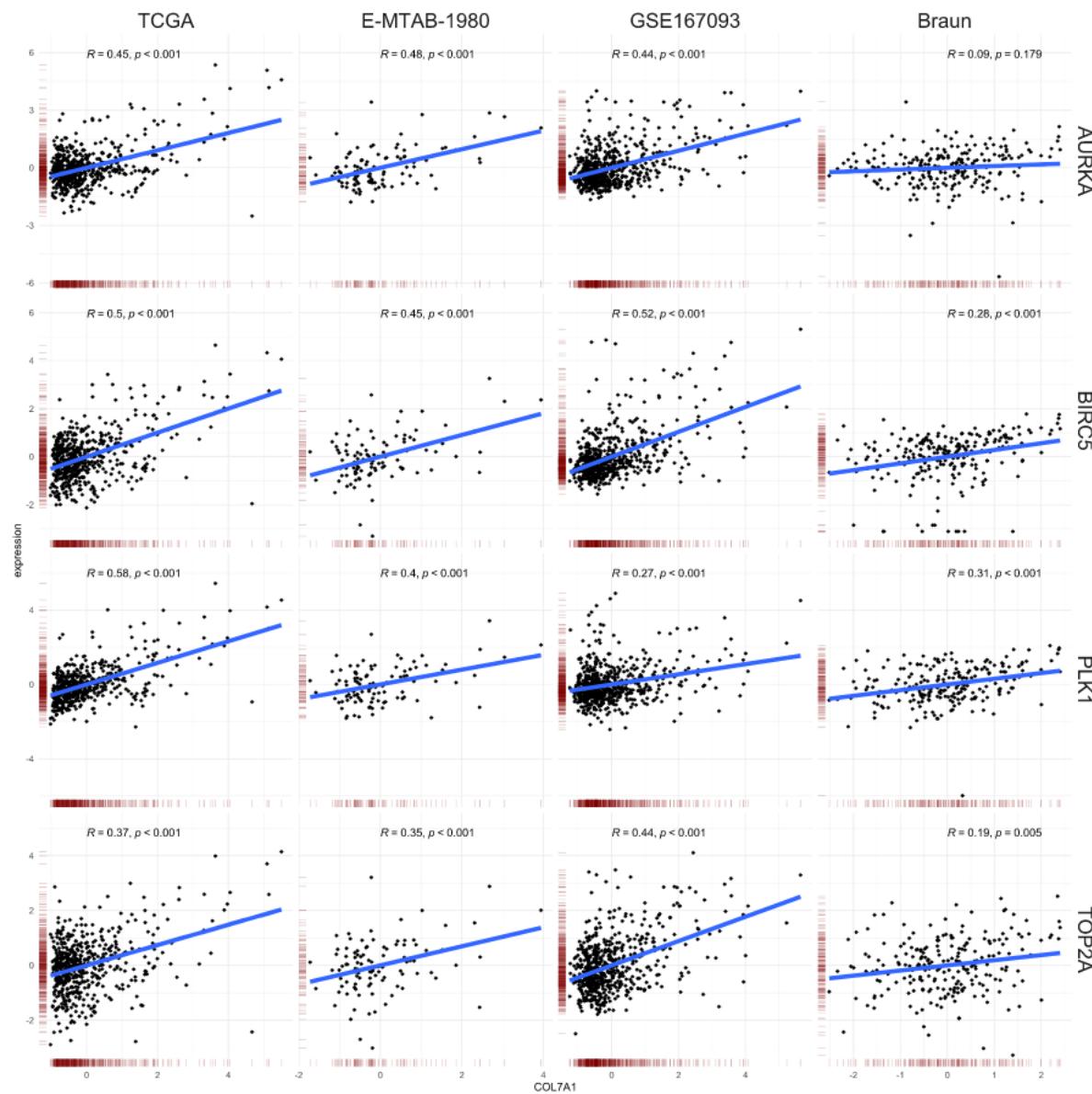
Supplementary Figure S 1: patterns of COL7A1 expression. Expression is in $\log_2(\text{TMP}+1)$: (a) boxplot comparing the expression of COL7A1 and all other expressed protein-coding genes in TCGA:KIRC cohort; (b) boxplot comparing COL7A1 expression among different tumor stages; (c) boxplot comparing COL7A1 expression among different histological-grade tumors. Genes expressing less than 10 TPM in all samples are not shown.



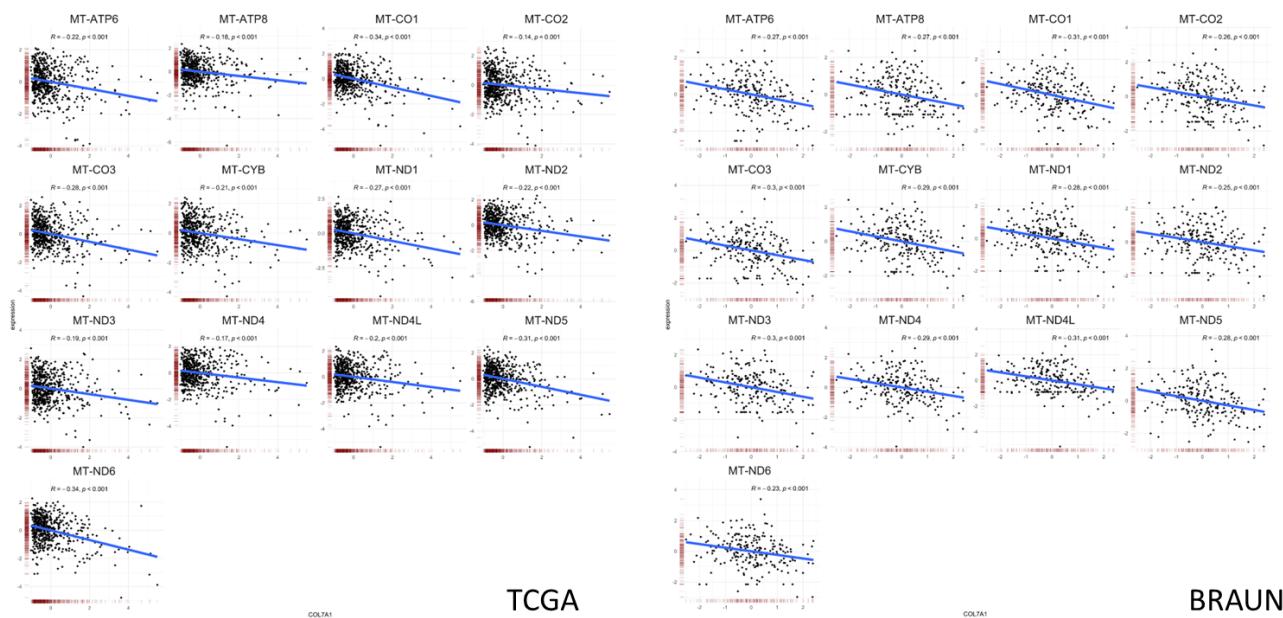
Supplementary Figure S 2: Kaplan-Meier curves and corresponding histograms showing differences in overall survival in E-MTAB-1980 and Braun et al. cohorts. Patients were divided in groups of Low (green) and High (red) COL7A1 expression. Expression threshold between Low and High expression groups is the same as for Figure 1B. Patients of E-MTAB-1980 cohort were split in two groups according to stage. (A-B) stages I and II. (C-D) stages III and IV. (E-F) Braun et al. cohort, containing only stage IV patients.



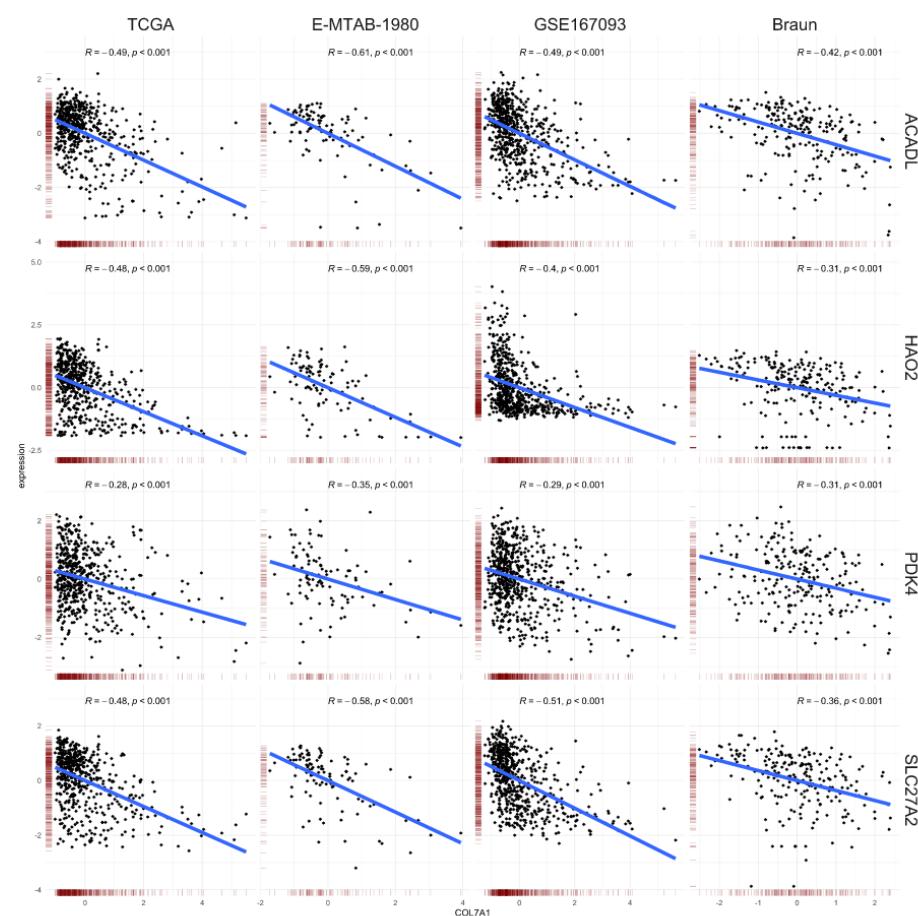
Supplementary Figure S 3: Kaplan-Meier curves and corresponding histograms showing differences in overall survival of the TCGA:KIRC cohort. Patients were split in three subsets according to the grade of patients. Patients were divided in groups of Low (green) and High (red) COL7A1 expression. Expression threshold between Low and High expression groups is the same as for Figure 1A. (A-B) Grade I and II patients. (C-D) Grade III patients. (E-F) Grade IV patients.



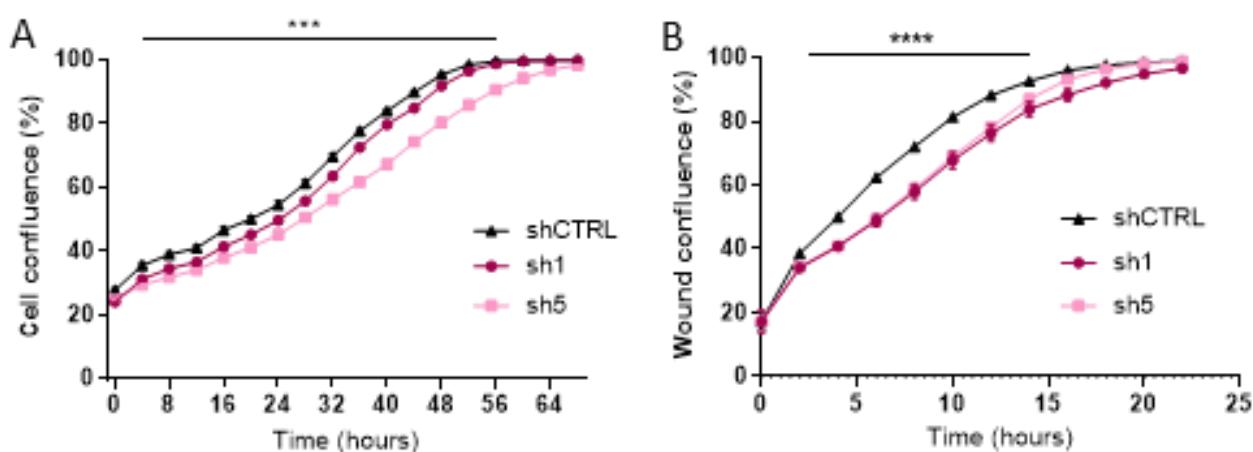
Supplementary Figure S 4: Graphical representation of correlation between *COL7A1* and four core genes belonging to proliferation related pathways, resulting from GSEA analysis.



Supplementary Figure S 5: Graphical representation of correlation between COL7A1 and mitochondrial genes of two RNAseq datasets.



Supplementary Figure S 6: Graphical representation of correlation between COL7A1 and four core genes belonging to metabolism related pathways, resulting from GSEA analysis.



Supplementary Figure S7: Proliferation and Migration assay kinetics of 786-O shCOL7A1 cell lines. A : Proliferation assay showing confluence of cells over time for 70 hours (n=12). B : Scratch assay showing confluence of the wound over time for 24 hours (n=24). Statistical analysis was made using Two-Way ANOVA, $p < *0.05$, $**0.01$, $***0.001$, $****0.0001$.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] T. J. C. Heyden, Robin J.J. Gordon Betts *et al.*, “Gross Anatomy of the Kidney,” Openstack, 2020.
- [2] B. Hallgrímsson, H. Benediktsson, and P. D. Vize, “Anatomy and Histology of the Human Urinary System,” in *The Kidney*, J. B. L. B. Peter D. Vize, Adrian S. Woolf, Ed. 2003, pp. 149–164.
- [3] T. J. C. Heyden, Robin J.J. Gordon Betts *et al.*, “Physiology of Urine Formation,” Openstack, 2020.
- [4] T. J. C. Heyden, Robin J.J. Gordon Betts *et al.*, “The Urinary System and Homeostasis,” Openstack, 2020.
- [5] T. J. C. Heyden, Robin J.J. Gordon Betts *et al.*, “Endocrine Regulation of Kidney Function,” Openstack, 2020.
- [6] C. J. D. Wallis, “Epidemiology and Etiology of Kidney Cancer,” *Urotoday*, 2018. <https://www.urotoday.com/library-resources/kidney-cancer-today/109190-epidemiology-and-etiology-of-kidney-cancer.html?tmpl=component&print=1> (accessed Mar. 23, 2020).
- [7] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [8] A. Znaor, J. Lortet-tieulent, M. Laversanne, and A. Jemal, “International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality,” *Eur. Urol.*, vol. 67, no. 3, pp. 519–530, 2015, doi: 10.1016/j.eururo.2014.10.002.
- [9] V. F. Muglia and A. Prando, “Renal cell carcinoma : histological classification and correlation with imaging findings *,” vol. 48, no. 3, pp. 166–174, 2015.
- [10] J. D. Hunt, O. L. Van Der Hel, G. P. Mcmillan, P. Boffetta, and P. Brennan, “Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking : Meta-analysis of 24 studies,” vol. 108, no. November 2004, pp. 101–108, 2005, doi: 10.1002/ijc.20618.
- [11] B. Ljungberg *et al.*, “The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma,” *Eur. Urol.*, vol. 60, no. 4, pp. 615–621, 2011, doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.049.
- [12] N. Sharifi and W. L. Farrar, “Perturbations in hypoxia detection : A shared link between hereditary and sporadic tumor formation ?,” pp. 732–735, 2005, doi: 10.1016/j.mehy.2005.11.003.
- [13] A. G. Renéhan, M. Tyson, M. Egger, R. F. Heller, and M. Zwahlen, “Body-mass index and incidence of cancer : a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies,” no. November, pp. 569–578, 2007.
- [14] H. Salaün, J. Thariat, M. Vignot, Y. Merrouche, and S. Vignot, “Obésité et cancer,” *Bull. Cancer*, vol. 104, no. 1, pp. 30–41, 2017, doi: 10.1016/j.bulcan.2016.11.012.
- [15] W.-H. Chow, L. M. Dong, and S. S. Devesa, “Epidemiology and risk factors for kidney cancer,” vol. 7, no. 5, pp. 245–257, 2010, doi: 10.1038/nrurol.2010.46.Epidemiology.
- [16] A. Cimadamore *et al.*, “Towards a new WHO classification of renal cell tumor: What the clinician needs to know-a narrative review,” *Transl. Androl. Urol.*, vol. 10, no. 3, pp. 1506–1520, 2021, doi: 10.21037/tau-20-1150.
- [17] B. Escudier *et al.*, “Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and

- follow-up,” *Ann. Oncol.*, vol. 25, no. August, pp. iii49–iii56, 2014, doi: 10.1093/annonc/mdw328.
- [18] N. S. Vasudev, P. J. Selby, and R. E. Banks, “Renal cancer biomarkers: The promise of personalized care,” *BMC Med.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1186/1741-7015-10-112.
- [19] S. Giacosa, “Protéine-kinases et cancer du rein : Découverte et validation d'une nouvelle combinaison d'inhibiteurs ciblant les protéine-kinases ATM et CK2,” Université Grenoble Alpes, 2016.
- [20] A. Y. Warren and D. Harrison, “WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies,” *World J. Urol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1913–1926, 2018, doi: 10.1007/s00345-018-2447-8.
- [21] V. H. Haase, “The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease,” *Kidney Int.*, vol. 69, no. 8, pp. 1302–1307, 2006, doi: 10.1038/sj.ki.5000221.
- [22] T. J. Mitchell *et al.*, “Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal,” *Cell*, vol. 173, no. 3, pp. 611–623.e17, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.02.020.
- [23] M. M. Wolf, W. Kimryn Rathmell, and K. E. Beckermann, “Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications,” *Oncogene*, vol. 39, no. 17. Springer Nature, pp. 3413–3426, Apr. 23, 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1234-3.
- [24] A. Verbiest *et al.*, “Polymorphisms in the Von Hippel e Lindau Gene Are Associated With Overall Survival in Metastatic Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma Patients Treated With VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitors,” *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 16, no. 4, pp. 266–273, 2018, doi: 10.1016/j.clgc.2018.01.013.
- [25] C. Morais, D. W. Johnson, D. A. Vesey, and G. C. Gobe, “Functional significance of erythropoietin in renal cell carcinoma,” *BMC Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 1, 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-14.
- [26] S. K. Parks, Y. Cormerais, and J. Pouysségur, “Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology,” *Journal of Physiology*, vol. 595, no. 8. Blackwell Publishing Ltd, pp. 2439–2450, Apr. 15, 2017, doi: 10.1113/JP273309.
- [27] L. Liao, J. R. Testa, and H. Yang, “The roles of chromatin-remodelers and epigenetic modifiers in kidney cancer,” *Cancer Genet.*, vol. 208, no. 5, pp. 206–214, 2015, doi: 10.1016/j.cancergen.2015.02.008.
- [28] A. M. Nargund *et al.*, “The SWI/SNF Protein PBRM1 Restrains VHL-Loss-Driven Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Cell Rep.*, vol. 18, no. 12, pp. 2893–2906, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.074.
- [29] I. Varela *et al.*, “Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma,” *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 539–542, 2011, doi: 10.1038/nature09639.
- [30] P. M. Brownlee, A. L. Chambers, R. Cloney, A. Bianchi, and J. A. Downs, “BAF180 Promotes Cohesion and Prevents Genome Instability and Aneuploidy,” *Cell Rep.*, vol. 6, no. 6, pp. 973–981, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.012.
- [31] S. Peña-Llopis *et al.*, “BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma,” *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 7, pp. 751–759, 2012, doi: 10.1038/ng.2323.
- [32] F. Li *et al.*, “The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α ,” *Cell*, vol. 153, no. 3, pp. 590–600, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.025.
- [33] S. Carvalho *et al.*, “SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint,” *eLife*, vol. 2014, no. 3, pp. 1–19, 2014, doi: 10.7554/eLife.02482.

- [34] B. Delahunt, J. N. Eble, L. Egevad, and H. Samaratunga, "Grading of renal cell carcinoma," *Histopathology*, vol. 74, no. 1, pp. 4–17, 2019, doi: 10.1111/his.13735.
- [35] B. C. Leibovich *et al.*, "Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: A stratification tool for prospective clinical trials," *Cancer*, vol. 97, no. 7, pp. 1663–1671, 2003, doi: 10.1002/cncr.11234.
- [36] Y. Jiang *et al.*, "Preoperative CT Radiomics Predicting the SSIGN Risk Groups in Patients With Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Development and Multicenter Validation," *Front. Oncol.*, vol. 10, no. July, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00909.
- [37] K. Vander Eeckt, S. Joniau, and H. Van Poppel, "Open surgery for localized RCC," *ScientificWorldJournal.*, vol. 7, pp. 742–752, 2007, doi: 10.1100/tsw.2007.142.
- [38] T. Klatte, S. H. Rossi, and G. D. Stewart, "Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review," *World J. Urol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1943–1952, 2018, doi: 10.1007/s00345-018-2309-4.
- [39] G. Rosiello *et al.*, "Partial nephrectomy in frail patients: Benefits of robot-assisted surgery," *Surg. Oncol.*, vol. 38, no. March 2020, p. 101588, 2021, doi: 10.1016/j.suronc.2021.101588.
- [40] D. C. Ki *et al.*, "Functional and oncological outcomes of open, laparoscopic and robot-assisted partial nephrectomy: a multicentre comparative matched-pair analyses with a median of 5 years' follow-up," vol. 122, pp. 618–626, 2018, doi: 10.1111/bju.14250.
- [41] C. F. J. M. Peeters, R. M. W. De Waal, T. Wobbes, and T. J. M. Ruers, "Metastatic dormancy imposed by the primary tumor: Does it exist in humans?," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 15, no. 11, pp. 3308–3315, 2008, doi: 10.1245/s10434-008-0029-5.
- [42] M. Grant, B. Szabados, T. Kuusk, T. Powles, and A. Bex, "Cytoreductive nephrectomy: does CARMENA (Cancer du Rein Metastatique Nephrectomie et Antiangiogéniques) change everything?," *Curr. Opin. Urol.*, vol. 30, no. 1, pp. 36–40, Jan. 2020, doi: 10.1097/MOU.0000000000000696.
- [43] C. Van Praet *et al.*, "Current role of cytoreductive nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma," *Turkish J. Urol.*, vol. 47, no. 1, pp. S79–S84, 2021, doi: 10.5152/tud.2021.21006.
- [44] S. Dabestani *et al.*, "Local treatments for metastases of renal cell carcinoma: A systematic review," *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 12, pp. e549–e561, 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70235-9.
- [45] J. Seitlinger, M. Prieto, J. Siat, and S. Renaud, "Pulmonary metastasectomy in renal cell carcinoma: A mainstay of multidisciplinary treatment," *J. Thorac. Dis.*, vol. 13, no. 4, pp. 2636–2642, 2021, doi: 10.21037/jtd-2019-pm-10.
- [46] E. Meacci *et al.*, "Lung metastasectomy following kidney tumors: Outcomes and prognostic factors from a single-center experience," *J. Thorac. Dis.*, vol. 9, no. 8, pp. S1267–S1272, 2017, doi: 10.21037/jtd.2017.05.04.
- [47] R. M. Bukowski, "Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: The role of interleukin-2," *Cancer*, vol. 80, no. 7, pp. 1198–1220, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19971001)80:7<1198::AID-CNCR3>3.0.CO;2-H.
- [48] R. Koneru and S. J. Hotte, "Role of cytokine therapy for renal cell carcinoma in the era of targeted agents,"

Curr. Oncol., vol. 16, no. S1, pp. S40–S44, 2009, doi: 10.3747/co.v16i0.417.

- [49] M. Roberto *et al.*, “Metastatic Renal Cell Carcinoma Management: From Molecular Mechanism to Clinical Practice,” *Front. Oncol.*, vol. 11, no. April, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.657639.
- [50] C. Le Tourneau, E. Raymond, and S. Faivre, “Sunitinib: A novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST),” *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 3, no. 2, pp. 341–348, 2007, doi: 10.2147/tcrm.2007.3.2.341.
- [51] J. B. Lee *et al.*, “Tremsirolimus in Asian Metastatic/Recurrent Non-clear Cell Renal Carcinoma,” *Cancer Res. Treat.*, vol. 51, no. 4, pp. 1578–1588, 2019, doi: 10.4143/CRT.2018.671.
- [52] N. Rathi, B. L. Maughan, N. Agarwal, and U. Swami, “Mini-review: Cabozantinib in the treatment of advanced renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma,” *Cancer Manag. Res.*, vol. 12, pp. 3741–3749, 2020, doi: 10.2147/CMAR.S202973.
- [53] M. Thurnher *et al.*, “Renal Cell Carcinoma,” *Handb. Dendritic Cells*, vol. 3, pp. 1117–1127, 2008, doi: 10.1002/9783527619696.ch53.
- [54] R. J. Motzer *et al.*, “Molecular Subsets in Renal Cancer Determine Outcome to Checkpoint and Angiogenesis Blockade,” *Cancer Cell*, vol. 38, no. 6, pp. 803–817.e4, 2020, doi: 10.1016/j.ccr.2020.10.011.
- [55] J. Garcia *et al.*, “Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 86, no. March, p. 102017, 2020, doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102017.
- [56] S. K. Pal *et al.*, “Cabozantinib in Combination With Atezolizumab for Advanced Renal Cell Carcinoma: Results From the COSMIC-021 Study,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 39, no. 33, pp. 3725–3736, 2021, doi: 10.1200/JCO.21.00939.
- [57] N. Shah *et al.*, “The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of multiple myeloma,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 8, no. 2, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1136/jitc-2020-000734.
- [58] T. Powles *et al.*, “ESMO Clinical Practice Guideline update on the use of immunotherapy in early stage and advanced renal cell carcinoma,” *Ann. Oncol.*, vol. 32, no. 12, pp. 1511–1519, 2021, doi: 10.1016/j.annonc.2021.09.014.
- [59] B. I. Rini *et al.*, “Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, no. 12, pp. 1116–1127, 2019, doi: 10.1056/nejmoa1816714.
- [60] R. J. Motzer *et al.*, “Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 378, no. 14, pp. 1277–1290, 2018, doi: 10.1056/nejmoa1712126.
- [61] P. Makhov, S. Joshi, P. Ghatalia, A. Kutikov, R. G. Uzzo, and V. M. Kolenko, “Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: Mechanisms and management strategies,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 7, pp. 1355–1364, 2018, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1299.
- [62] M. Dufies *et al.*, “Plk1, upregulated by HIF-2, mediates metastasis and drug resistance of clear cell renal cell carcinoma,” *Commun. Biol.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–16, 2021, doi: 10.1038/s42003-021-01653-w.
- [63] S. H. Lim *et al.*, “Intrinsic resistance to sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma,” *Asia.*

- Pac. J. Clin. Oncol.*, vol. 13, no. 1, pp. 61–67, 2017, doi: 10.1111/ajco.12465.
- [64] J. S. Carew, K. R. Kelly, and S. T. Nawrocki, “Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy,” *Target. Oncol.*, vol. 6, no. 1, pp. 17–27, 2011, doi: 10.1007/s11523-011-0167-8.
- [65] N. E. Sounni *et al.*, “Blocking lipid synthesis overcomes tumor regrowth and metastasis after antiangiogenic therapy withdrawal,” *Cell Metab.*, vol. 20, no. 2, pp. 280–294, 2014, doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.022.
- [66] M. E. Fiori, S. Di Franco, L. Villanova, P. Bianca, G. Stassi, and R. De Maria, “Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance,” *Mol. Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1186/s12943-019-0994-2.
- [67] C. Montemagno and G. Pagès, “Resistance to Anti-angiogenic Therapies: A Mechanism Depending on the Time of Exposure to the Drugs,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. July, pp. 1–21, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00584.
- [68] D. J. de Klerk, R. J. Honeywell, G. Jansen, and G. J. Peters, “Transporter and lysosomal mediated (Multi)drug resistance to tyrosine kinase inhibitors and potential strategies to overcome resistance,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 12, pp. 1–27, 2018, doi: 10.3390/cancers10120503.
- [69] S. Giuliano *et al.*, “Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux,” *Autophagy*, vol. 11, no. 10, pp. 1891–1904, 2015, doi: 10.1080/15548627.2015.1085742.
- [70] K. J. Gotink *et al.*, “Cross-resistance to clinically used tyrosine kinase inhibitors sunitinib, sorafenib and pazopanib,” *Cell. Oncol.*, vol. 38, no. 2, pp. 119–129, 2015, doi: 10.1007/s13402-015-0218-8.
- [71] T. Asano, “Drug resistance in cancer therapy and the role of epigenetics,” *J. Nippon Med. Sch.*, vol. 87, no. 5, pp. 244–251, 2020, doi: 10.1272/jnms.JNMS.2020_87-508.
- [72] R. Yaeger and R. B. Corcoran, “Targeting alterations in the RAF–MEK pathway,” *Cancer Discov.*, vol. 9, no. 3, pp. 329–341, 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1321.
- [73] S. Zou, Q. Tong, B. Liu, W. Huang, Y. Tian, and X. Fu, “Targeting stat3 in cancer immunotherapy,” *Mol. Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–19, 2020, doi: 10.1186/s12943-020-01258-7.
- [74] M. Gerlinger *et al.*, “Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing,” *New Englant J. Med.*, vol. 366, no. 10, 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
- [75] A. J. Schrader *et al.*, “CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 86, no. 8, pp. 1250–1256, 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600221.
- [76] A. Orimo *et al.*, “Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion,” *Cell*, vol. 121, no. 3, pp. 335–348, 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
- [77] P. Errarte, G. Larrinaga, and J. I. López, “The role of cancer-associated fibroblasts in renal cell carcinoma. An example of tumor modulation through tumor/non-tumor cell interactions,” *J. Adv. Res.*, vol. 21, no. September 2019, pp. 103–108, 2020, doi: 10.1016/j.jare.2019.09.004.
- [78] N. Maishi, D. A. Annan, H. Kikuchi, Y. Hida, and K. Hida, “Tumor endothelial heterogeneity in cancer progression,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 10, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/cancers11101511.

- [79] A. M. Baker *et al.*, “The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 103, no. 5, pp. 407–424, 2011, doi: 10.1093/jnci/djq569.
- [80] C. P. El-Haibi *et al.*, “Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 43, pp. 17460–17465, 2012, doi: 10.1073/pnas.1206653109.
- [81] C. Roelants *et al.*, “Combined inhibition of PI3K and Src kinases demonstrates synergistic therapeutic efficacy in clear-cell renal carcinoma,” vol. 9, no. 53, pp. 30066–30078, 2018.
- [82] M. Santoni *et al.*, “Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 62, no. 12, pp. 1757–1768, 2013, doi: 10.1007/s00262-013-1487-6.
- [83] K. Bi *et al.*, “Tumor and immune reprogramming during immunotherapy in advanced renal cell carcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 39, no. 5, pp. 649-661.e5, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2021.02.015.
- [84] L. Au *et al.*, “Determinants of anti-PD-1 response and resistance in clear cell renal cell carcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 39, no. 11, pp. 1497-1518.e11, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2021.10.001.
- [85] S. Mikami *et al.*, “Significance of tumor microenvironment in acquiring resistance to vascular endothelial growth factor-tyrosine kinase inhibitor and recent advance of systemic treatment of clear cell renal cell carcinoma,” *Pathol. Int.*, vol. 70, no. 10, pp. 712–723, 2020, doi: 10.1111/pin.12984.
- [86] R. Sharma, E. Kadife, M. Myers, G. Kannourakis, P. Prithviraj, and N. Ahmed, “Determinants of resistance to VEGF-TKI and immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–27, 2021, doi: 10.1186/s13046-021-01961-3.
- [87] K. 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.*, vol. 42, no. 5, pp. 1878–1892, 2019, doi: 10.3892/or.2019.7321.
- [88] S. Mikami, R. Mizuno, T. Kosaka, H. Saya, M. Oya, and Y. Okada, “Expression of TNF- α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas,” *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 7, pp. 1504–1514, 2015, doi: 10.1002/ijc.29137.
- [89] X. W. Pan *et al.*, “Identification of a novel cancer stem cell subpopulation that promotes progression of human fatal renal cell carcinoma by single-cell RNA-seq analysis,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 16, no. 16, pp. 3149–3162, 2020, doi: 10.7150/ijbs.46645.
- [90] X. Wang *et al.*, “Cox-2 inhibition enhances the activity of sunitinib in human renal cell carcinoma xenografts,” *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 2, pp. 319–326, 2013, doi: 10.1038/bjc.2012.591.
- [91] A. Mysczyszyn *et al.*, “The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis,” *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 11, no. 6, pp. 919–943, 2015, doi: 10.1007/s12015-015-9611-y.
- [92] M. Z. Noman and S. Chouaib, “Targeting hypoxia at the forefront of anticancer immune responses,” *Oncoimmunology*, vol. 3, no. 12, pp. 1–3, 2014, doi: 10.4161/21624011.2014.954463.
- [93] A. Huang, L. A. Garraway, A. Ashworth, and B. Weber, “Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 19, no. 1, pp. 23–38, 2020, doi: 10.1038/s41573-019-0046-

z.

- [94] L. H. Hartwell, P. Szankasi, C. J. Roberts, A. W. Murray, and S. H. Friend, “Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs,” *Science* (80-.), vol. 278, no. 5340, pp. 1064–1068, 1997, doi: 10.1126/science.278.5340.1064.
- [95] A. Bommi-Reddy *et al.*, “Kinase requirements in human cells: III. Altered kinase requirements in VHL-/Cancer cells detected in a pilot synthetic lethal screen,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 43, pp. 16484–16489, 2008, doi: 10.1073/pnas.0806574105.
- [96] H. E. Nicholson *et al.*, “HIF-independent synthetic lethality between CDK4/6 inhibition and VHL loss across species,” *Sci. Signal.*, vol. 12, no. 601, 2020, doi: doi:10.1126/scisignal.aay0482.
- [97] R. a Gatti *et al.*, “Gene To Chromosome Llq22-23,” pp. 577–580, 1988.
- [98] K. Savitsky *et al.*, “A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase,” *Science* (80-.), vol. 268, no. 5218, pp. 1749–1753, 1995, doi: 10.1126/science.7792600.
- [99] X. Wang *et al.*, “Structure of the intact ATM/Tel1 kinase,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. May, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1038/ncomms11655.
- [100] L. M. Phan and A. H. Rezaeian, “Atm: Main features, signaling pathways, and its diverse roles in dna damage response, tumor suppression, and cancer development,” *Genes (Basel)*., vol. 12, no. 6, pp. 1–11, 2021, doi: 10.3390/genes12060845.
- [101] C. A. Lovejoy and D. Cortez, “Common mechanisms of PIKK regulation,” *DNA Repair (Amst)*., vol. 8, no. 9, pp. 1004–1008, 2009, doi: 10.1016/j.dnarep.2009.04.006.
- [102] X. Jiang, Y. Sun, S. Chen, K. Roy, and B. D. Price, “The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 23, pp. 15741–15746, 2006, doi: 10.1074/jbc.M513172200.
- [103] R. Bosotti, A. Isacchi, and E. L. L. Sonnhammer, “FAT : a novel domain in PIK-related kinases,” vol. 25, no. 5May, pp. 225–227, 2000.
- [104] Y. Shiloh, “ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 3, pp. 155–168, 2003, doi: 10.1038/nrc1011.
- [105] H. Khalil, H. Tummala, and N. Zhelev, “ATM in focus: A damage sensor and cancer target,” *Biodiscovery*, no. 5, pp. 1–60, 2012, doi: 10.7750/biodiscovery.2012.5.1.
- [106] E. Rass, A. Grabarz, P. Bertrand, and B. S. Lopez, “Réparation des cassures double-brin de l’ADN, un mécanisme peut en cacher un autre: La ligature d’extrémités non homologues alternative,” *Cancer/Radiotherapie*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1016/j.canrad.2011.05.004.
- [107] O. Limbo, Y. Yamada, and P. Russell, “Mre11-Rad50–dependent activity of ATM/Tel1 at DNA breaks and telomeres in the absence of Nbs1,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 29, no. 11, pp. 1389–1399, Jun. 2018, doi: 10.1091/mbc.E17-07-0470.
- [108] E. Rass, A. Grabarz, I. Plo, J. Gautier, P. Bertrand, and B. S. Lopez, “Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 8, pp. 819–824, 2009, doi: 10.1038/nsmb.1641.
- [109] S. Watanabe, M. Iimori, D. V. Chan, E. Hara, and H. Kitao, “MDC1 methylation mediated by lysine

- methyltransferases EHMT1 and EHMT2 regulates active ATM accumulation flanking DNA damage sites,” *Sci. Rep.*, no. February, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-29239-3.
- [110] Y. Shiloh and Y. Ziv, “The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 197–210, 2013, doi: 10.1038/nrm3546.
- [111] M. Tatfi, O. Hermine, and F. Suarez, “Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoproliferative disorders in ataxia telangiectasia: Does ATM regulate EBV life cycle?,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JAN, pp. 1–9, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2018.03060.
- [112] S. Ditch and T. T. Paull, “The ATM protein kinase and cellular redox signaling: Beyond the DNA damage response,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 37, no. 1. pp. 15–22, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.tibs.2011.10.002.
- [113] R. E. Klabunde, “Reactive oxygen species,” 2008. [https://www.cvphysiology.com/Blood Flow/BF016](https://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF016) (accessed Sep. 19, 2022).
- [114] C. K. wa. Tsang, Y. Liu, J. Thomas, Y. Zhang, and X. F. S. Zheng, “Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3446, 2014, doi: 10.1038/ncomms4446.
- [115] Z. Guo, S. Kozlov, M. F. Lavin, M. D. Person, and T. T. Paull, “ATM activation by Oxydative stress,” vol. 330, no. October, pp. 517–522, 2010.
- [116] M. Bagheri, R. R. Nair, K. K. Singh, and D. K. Saini, “ATM-ROS-iNOS axis regulates nitric oxide mediated cellular senescence,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1864, no. 1, pp. 177–190, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.008.
- [117] U. Weyemi, C. E. Redon, T. Aziz, R. Choudhuri, D. Maeda, and P. R. Parekh, “NADPH oxidase 4 is a critical mediator in Ataxia telangiectasia disease,” no. 9, 2015, doi: 10.1073/pnas.1418139112.
- [118] M. Bordoni *et al.*, “Nuclear Phospho-SOD1 Protects DNA from Oxidative Stress Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis,” *J. Clin. Med.*, vol. 8, p. 729, 2019, doi: 10.3390/jcm8050729.
- [119] A. H. Rezaeian *et al.*, “A hypoxia-responsive TRAF6-ATM-H2AX signalling axis promotes HIF1 α activation, tumorigenesis and metastasis,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 38–51, 2017, doi: 10.1038/ncb3445.
- [120] L. Song *et al.*, “MiR-18a impairs DNA damage response through downregulation of Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0025454.
- [121] X. Le Guezennec and D. V. Bulavin, “WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 35, no. 2, pp. 109–114, 2010, doi: 10.1016/j.tibs.2009.09.005.
- [122] A. H. Rezaeian, H. Khanbabaei, and G. A. Calin, “Therapeutic potential of the miRNA–ATM axis in the management of tumor radioresistance,” *Cancer Res.*, vol. 80, no. 2, pp. 139–150, 2020, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1807.
- [123] M. Choi, T. Kipps, and R. Kurzrock, “ATM mutations in cancer: Therapeutic implications,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 15, no. 8, pp. 1781–1791, 2016, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0945.
- [124] W. Ren, B. Xue, M. Chen, L. Liu, and X. Zu, “Low Expression of ATM Indicates a Poor Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 17, no. 3, pp. e433–e439, 2019, doi: 10.1016/j.clgc.2019.01.003.

- [125] M. H. Jin and D. Y. Oh, "ATM in DNA repair in cancer," *Pharmacol. Ther.*, vol. 203, p. 107391, 2019, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.07.002.
- [126] P. Wang *et al.*, "INPP4B-mediated DNA repair pathway confers resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia," *Tumor Biol.* 2016 379, vol. 37, no. 9, pp. 12513–12523, Jun. 2016, doi: 10.1007/S13277-016-5111-1.
- [127] I. Hickson *et al.*, "Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxiatelangiectasia mutated kinase ATM," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 24, pp. 9152–9159, Dec. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2727.
- [128] S. E. Golding *et al.*, "Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 8, no. 10, pp. 2894–2902, Oct. 2009, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0519.
- [129] K. Li *et al.*, "ATM inhibition induces synthetic lethality and enhances sensitivity of PTEN-deficient breast cancer cells to cisplatin," *Exp. Cell Res.*, vol. 366, no. 1, pp. 24–33, May 2018, doi: 10.1016/J.YEXCR.2018.03.006.
- [130] M. A. Batey *et al.*, "Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, In Vitro and In Vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 12, no. 6, pp. 959–967, Jun. 2013, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0707.
- [131] M. D. Rainey, M. E. Charlton, R. V. Stanton, and M. B. Kastan, "Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 18, pp. 7466–7474, Sep. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0763.
- [132] M. Shen *et al.*, "Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 38, no. 1, Apr. 2019, doi: 10.1186/S13046-019-1161-8.
- [133] J. Karlin *et al.*, "Orally bioavailable and blood–brain barrier-penetrating ATM inhibitor (AZ32) radiosensitizes intracranial gliomas in mice," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 8, pp. 1637–1647, Aug. 2018, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0975/176630/AM/ORALLY-BIOAVAILABLE-AND-BLOOD-BRAIN-BARRIER.
- [134] K. G. Pike *et al.*, "The Identification of Potent, Selective, and Orally Available Inhibitors of Ataxiatelangiectasia Mutated (ATM) Kinase: The Discovery of AZD0156 (8-{6-[3-(Dimethylamino)propoxy]pyridin-3-yl}-3-methyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,3-dihydro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-one)," *J. Med. Chem.*, vol. 61, no. 9, pp. 3823–3841, May 2018, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B01896/SUPPL_FILE/JM7B01896_SI_003.CSV.
- [135] I. Morgado-Palacin *et al.*, "Targeting the kinase activities of ATR and ATM exhibits antitumoral activity in mouse models of MLL-rearranged AML," *Sci. Signal.*, vol. 9, no. 445, Sep. 2016, doi: 10.1126/SCISIGNAL.AAD8243.
- [136] S. T. Durant *et al.*, "The brain-penetrant clinical ATM inhibitor AZD1390 radiosensitizes and improves survival of preclinical brain tumor models," *Sci. Adv.*, vol. 4, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.1126/SCIAADV.AAT1719.

- [137] L. A. Pinna, "A historical view of protein kinase CK2," *Cell. Mol. Biol. Res.*, vol. 40, no. 5–6, pp. 383–390, 1994, Accessed: Sep. 21, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7735312/>.
- [138] M.-B. Firnau and A. Brieger, "CK2 and the Hallmarks of Cancer," 2022, doi: 10.3390/biomedicines10081987.
- [139] NCBI Gene and National Library of Medicine, "CSNK2A1 casein kinase 2 alpha 1 [Homo sapiens]," 2022. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&doct=default&list_uids=1457&rn=1.
- [140] N. Gene and National Library of Medicine, "CSNK2A2 casein kinase 2 alpha 2 [Homo Sapiens]," 2022. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&doct=default&list_uids=1459&rn=1.
- [141] NCBI Gene and National Library of Medicine, "CSNK2B casein kinase 2 beta [Homo sapiens]," 2022. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&doct=default&list_uids=1460&rn=1.
- [142] K. Niefind, B. Guerra, I. Ermakowa, and O. G. Issinger, "Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme," *EMBO J.*, vol. 20, no. 19, p. 5320, Oct. 2001, doi: 10.1093/EMBOJ/20.19.5320.
- [143] D. Halloran, V. Pandit, and A. Nohe, "The Role of Protein Kinase CK2 in Development and Disease Progression: A Critical Review," *J. Dev. Biol.* 2022, Vol. 10, Page 31, vol. 10, no. 3, p. 31, Jul. 2022, doi: 10.3390/JDB10030031.
- [144] D. W. Litchfield, "Protein kinase CK2 : structure, regulation and role in cellular decisions of life and death," *Biochem. J.*, vol. 369, pp. 1–15, 2003.
- [145] T. Buchou and C. Cochet, "Protein kinase CK2: An enzyme that likes to be different," *Medecine/Sciences*, vol. 19, no. 6–7. Elsevier Masson SAS, pp. 709–716, 2003, doi: 10.1051/medsci/20031967709.
- [146] T. Buchou and C. Cochet, "La protéine kinase CK2 , une enzyme qui cultive la différence," vol. 19, pp. 709–716, 2019, doi: 10.1051/medsci/20031967709.La.
- [147] J. H. Trembley *et al.*, "Protein kinase CK2 – diverse roles in cancer cell biology and therapeutic promise," *Mol. Cell. Biochem.*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s11010-022-04558-2.
- [148] C. E. Ortega, Y. Seidner, and I. Dominguez, "Mining CK2 in cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, pp. 1–25, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0115609.
- [149] M. M. J. Chua, M. Lee, and I. Dominguez, *Cancer-type dependent expression of CK2 transcripts*, vol. 12, no. 12. 2017.
- [150] et al. Roelants C, Giacosa S, Duchemin-Pelletier E, McLeer-Florin A, Tisseyre C, Aubert C, "Dysregulated Expression of Protein Kinase CK2 in Renal Cancer," *Springer Int. Publ.*, vol. 241, no. 5, 2015.
- [151] O. Filhol, S. Giacosa, Y. Wallez, and C. Cochet, "Protein kinase CK2 in breast cancer: The CK2 β regulatory subunit takes center stage in epithelial plasticity," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 17, pp. 3305–3322, 2015, doi: 10.1007/s00018-015-1929-8.
- [152] J. Vilardell *et al.*, "Under-expression of CK2 β subunit in ccRCC represents a complementary biomarker of p-STAT3 Ser727 that correlates with patient survival," *Oncotarget*, vol. 9, no. 5, pp. 5736–5751, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23422.
- [153] E. Silva-Pavez and J. Tapia, "Protein Kinase CK2 in Cancer Energetics," *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 893, Jun. 2020, doi: 10.3389/FONC.2020.00893/BIBTEX.

- [154] E. Ampofo, T. Kietzmann, A. Zimmer, M. Jakupovic, M. Montenarh, and C. Götz, "Phosphorylation of the von Hippel-Lindau protein (VHL) by protein kinase CK2 reduces its protein stability and affects p53 and HIF-1 α mediated transcription," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 42, no. 10, pp. 1729–1735, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.biocel.2010.07.008.
- [155] B. Guerra *et al.*, "Protein kinase CK2 inhibition is associated with the destabilization of HIF-1 α in human cancer cells," *Cancer Lett.*, vol. 356, no. 2, pp. 751–761, 2015, doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.026.
- [156] G. S. Kim, J. E. Jung, K. Niizuma, and P. H. Chan, "CK2 is a novel negative regulator of NADPH oxidase and a neuroprotectant in mice after cerebral ischemia," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 47, pp. 14779–14789, Nov. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4161-09.2009.
- [157] J. L. Gregg *et al.*, "NADPH Oxidase NOX4 Supports Renal Tumorigenesis by Promoting the Expression and Nuclear Accumulation of HIF2 a," no. 12, pp. 3501–3512, 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2979.
- [158] I. Séraudie *et al.*, "Cooperative blockade of CK2 and ATM kinases drives apoptosis in VHL-deficient renal carcinoma cells through ROS overproduction," *Cancers (Basel.)*, vol. 13, no. 3, pp. 1–27, 2021, doi: 10.3390/cancers13030576.
- [159] G. Cozza, L. A. Pinna, and S. Moro, "Protein kinase CK2 inhibitors: a patent review," <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1517/13543776.2012.717615>, vol. 22, no. 9, pp. 1081–1097, Sep. 2012, doi: 10.1517/13543776.2012.717615.
- [160] X. Chen, C. Li, D. Wang, Y. Chen, and N. Zhang, "Recent Advances in the Discovery of CK2 Allosteric Inhibitors: From Traditional Screening to Structure-Based Design," *Mol. 2020, Vol. 25, Page 870*, vol. 25, no. 4, p. 870, Feb. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25040870.
- [161] E. Silva-pavez *et al.*, "CK2 inhibition with silmitasertib promotes methuosis-like cell death associated to catastrophic massive vacuolization of colorectal cancer cells Running title: CK2 precludes methuosis-like death in CRC cells," *Cell Death Dis.*, 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1306-x.
- [162] G. Cozza, A. Venerando, S. Sarno, and L. A. Pinna, "The Selectivity of CK2 Inhibitor Quinalizarin: A Reevaluation," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/734127.
- [163] C. I. Wells *et al.*, "Development of a potent and selective chemical probe for the pleiotropic kinase CK2," *Cell Chem. Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. 546–558.e10, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2020.12.013.
- [164] C. Cochet and R. Prudent, "Protein-kinase CK2 inhibitors and their therapeutic applications," 2008.
- [165] V. Moucadel *et al.*, "Antitumoral activity of allosteric inhibitors of protein kinase CK2," *Oncotarget*, vol. 2, no. 12, pp. 997–1010, 2011, doi: 10.18632/oncotarget.361.
- [166] J. Raaf, E. Brunstein, O. G. Issinger, and K. Niefind, "The CK2 α /CK2 β Interface of Human Protein Kinase CK2 Harbors a Binding Pocket for Small Molecules," *Chem. Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 111–117, Feb. 2008, doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2007.12.012.
- [167] B. Laudet *et al.*, "Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction," *Biochem. J.*, vol. 408, no. 3, pp. 363–373, Dec. 2007, doi: 10.1042/BJ20070825.
- [168] S. Tang *et al.*, "Structure-based Discovery of Novel CK2 α -Binding Cyclic Peptides with Anti-cancer Activity," *Mol. Inform.*, vol. 38, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.1002/MINF.201800089.
- [169] P. Brear *et al.*, "Novel non-ATP competitive small molecules targeting the CK2 α / β interface," *Bioorg.*

Med. Chem., vol. 26, no. 11, pp. 3016–3020, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.BMC.2018.05.011.

- [170] C. Li *et al.*, “Identification and Biological Evaluation of CK2 Allosteric Fragments through Structure-Based Virtual Screening,” *Mol. 2020*, Vol. 25, Page 237, vol. 25, no. 1, p. 237, Jan. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25010237.
- [171] R. Battistutta *et al.*, “Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer,” *Biochemistry*, vol. 50, no. 39, pp. 8478–8488, Oct. 2011, doi: 10.1021/BI2008382/SUPPL_FILE/BI2008382_SI_001.PDF.
- [172] G. Sofia, C. Pillet, C. Cochet, O. Filhol, C. Barette, and E. Soleilhac, “A synthetic lethal drug combination for treating renal cell carcinoma,” *WO2017050842A1*, 2015.
- [173] C. Xie *et al.*, “Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR2/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 40, no. 1, p. 266, Dec. 2021, doi: 10.1186/S13046-021-02069-4.
- [174] S. Giuliano *et al.*, “Resistance to lysosomotropic drugs used to treat kidney and breast cancers involves autophagy and inflammation and converges in inducing CXCL5,” *Theranostics*, vol. 9, no. 4, pp. 1181–1199, 2019, doi: 10.7150/thno.29093.
- [175] J.-J. Patard *et al.*, “Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma,” *2009*, doi: 10.1038/sj.bjc.6605298.
- [176] J. Dagher *et al.*, “Wild-type VHL Clear Cell Renal Cell Carcinomas Are a Distinct Clinical and Histologic Entity: A 10-Year Follow-up,” *Eur. Urol. Focus*, vol. 1, no. 3, pp. 284–290, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.EUF.2015.06.001.
- [177] E. M. Wallace *et al.*, “A small-molecule antagonist of HIF2 α is efficacious in preclinical models of renal cell carcinoma,” *Cancer Res.*, vol. 76, no. 18, pp. 5491–5500, Sep. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0473/660581/P/A-SMALL-MOLECULE-ANTAGONIST-OF-HIF2-IS-EFFICACIOUS.
- [178] J. A. Bertout *et al.*, “HIF2 α inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 34, pp. 14391–14396, Aug. 2009, doi: 10.1073/PNAS.0907357106/SUPPL_FILE/0907357106SI.PDF.
- [179] M. Zimmer, D. Doucette, N. Siddiqui, and O. Iliopoulos, “Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 89–95, Feb. 2004.
- [180] T. M. Brown and E. Fee, “Report on the Typhus Epidemic in Upper Silesia,” *Am. J. Public Health*, vol. 96, no. 12, 2006.
- [181] F. Caiado, B. Silva-Santos, and H. Norell, “Intra-tumour heterogeneity - going beyond genetics,” *FEBS J.*, vol. 283, no. 12, pp. 2245–2258, Jun. 2016, doi: 10.1111/FEBS.13705.
- [182] R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, and C. Swanton, “The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution,” *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 338–345, 2013, doi: 10.1038/NATURE12625.
- [183] P. C. Nowell, “The clonal evolution of tumor cell populations,” *Science*, vol. 194, no. 4260, pp. 23–28, 1976, doi: 10.1126/SCIENCE.959840.
- [184] I. Dagogo-Jack and A. T. Shaw, “Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies,” *Nat. Rev. Clin.*

Oncol. 2017 **152**, vol. 15, no. 2, pp. 81–94, Nov. 2017, doi: 10.1038/NRCLINONC.2017.166.

- [185] T. O. Bui, V. T. Dao, V. T. Nguyen, J. P. Feugeas, F. Pamoukdjian, and G. Bousquet, “Genomics of Clear-cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis,” *Eur. Urol.*, vol. 81, no. 4, pp. 349–361, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.EURURO.2021.12.010.
- [186] A. Sankin *et al.*, “The impact of genetic heterogeneity on biomarker development in kidney cancer assessed by multiregional sampling,” *Cancer Med.*, vol. 3, no. 6, pp. 1485–1492, Dec. 2014, doi: 10.1002/CAM4.293.
- [187] K. Ketola *et al.*, “Subclone Eradication Analysis Identifies Targets for Enhanced Cancer Therapy and Reveals L1 Retrotransposition as a Dynamic Source of Cancer Heterogeneity,” *Cancer Res.*, vol. 81, no. 19, pp. 4901–4909, Oct. 2021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0371.
- [188] A. Jiang *et al.*, “Establishment of a prognosis Prediction Model Based on Pyroptosis-Related Signatures Associated With the Immune Microenvironment and Molecular Heterogeneity in Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Front. Oncol.*, vol. 11, no. November, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.755212.
- [189] C. H. Lee and R. J. Motzer, “Immune checkpoint therapy in renal cell carcinoma,” *Cancer J. (United States)*, vol. 22, no. 2, pp. 92–95, May 2016, doi: 10.1097/PPO.00000000000000177.
- [190] M. R. Junntila and F. J. De Sauvage, “Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response,” *Nat.* 2013 **501**:7467, vol. 501, no. 7467, pp. 346–354, Sep. 2013, doi: 10.1038/nature12626.
- [191] M. Russo *et al.*, “Tumor Heterogeneity and Lesion-Specific Response to Targeted Therapy in Colorectal Cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 6, no. 2, pp. 147–153, Feb. 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1283.
- [192] E. L. Kwak *et al.*, “Molecular heterogeneity and receptor coamplification drive resistance to targeted therapy in MET-Amplified esophagogastric cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 5, no. 12, pp. 1271–1281, Dec. 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0748/42502/AM/MOLECULAR-HETEROGENEITY-AND-RECEPTOR-CO.
- [193] K. Liu, R. Gao, H. Wu, Z. Wang, and G. Han, “Single-cell analysis reveals metastatic cell heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 25, no. 9, pp. 4260–4274, 2021, doi: 10.1111/jcmm.16479.
- [194] A. G. Liddane and J. M. Holaska, “The Role of Emerin in Cancer Progression and Metastasis,” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, *Vol. 22, Page 11289*, vol. 22, no. 20, p. 11289, Oct. 2021, doi: 10.3390/IJMS222011289.
- [195] J. Hu *et al.*, “Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Intratumoral Heterogeneity in ccRCC, which Results in Different Clinical Outcomes,” *Mol. Ther.*, vol. 28, no. 7, pp. 1658–1672, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.YMTHE.2020.04.023.
- [196] K. H. Gessner, W. Y. Kim, and I. A. Zambrano, “Genomic Meta-analysis of Clear-cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC): Aggregating Tumors to Resolve the Complexity of ccRCC,” *Eur. Urol.*, vol. 81, no. 4, pp. 362–363, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.EURURO.2022.01.003.
- [197] A. T. Beksac, D. J. Paulucci, K. A. Blum, S. S. Yadav, J. P. Sfakianos, and K. K. Badani, “Heterogeneity in renal cell carcinoma,” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 35, no. 8, pp. 507–515, 2017, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.05.006.

- [198] M. Yu and I. F. Tannock, “Targeting tumor architecture to favor drug penetration: a new weapon to combat chemoresistance in pancreatic cancer?,” *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 327–329, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.CCR.2012.03.002.
- [199] R. T. Kendall and C. A. Feghali-Bostwick, “Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators,” *Front. Pharmacol.*, vol. 5 MAY, p. 123, 2014, doi: 10.3389/FPHAR.2014.00123/BIBTEX.
- [200] X. Chen and E. Song, “Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts,” *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018 182, vol. 18, no. 2, pp. 99–115, Nov. 2018, doi: 10.1038/s41573-018-0004-1.
- [201] J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. A. Brown, “Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002 35, vol. 3, no. 5, pp. 349–363, 2002, doi: 10.1038/nrm809.
- [202] K. Vuoriluoto *et al.*, “Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer,” *Oncogene* 2011 3012, vol. 30, no. 12, pp. 1436–1448, Nov. 2010, doi: 10.1038/onc.2010.509.
- [203] A. E. Karnoub *et al.*, “Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis,” *Nat. 2007* 4497162, vol. 449, no. 7162, pp. 557–563, Oct. 2007, doi: 10.1038/nature06188.
- [204] K. Pietras, J. Pahler, G. Bergers, and D. Hanahan, “Functions of Paracrine PDGF Signaling in the Proangiogenic Tumor Stroma Revealed by Pharmacological Targeting,” *PLOS Med.*, vol. 5, no. 1, p. e19, Jan. 2008, doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.0050019.
- [205] X. M. Wang, D. M. T. Yu, G. W. McCaughan, and M. D. Gorrell, “Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human stellate cell line,” *Hepatology*, vol. 42, no. 4, pp. 935–945, Oct. 2005, doi: 10.1002/HEP.20853.
- [206] F. Wu *et al.*, “Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer,” *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021 61, vol. 6, no. 1, pp. 1–35, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00641-0.
- [207] M. Nguyen *et al.*, “Dissecting Effects of Anti-cancer Drugs and Cancer-Associated Fibroblasts by On-Chip Reconstitution of Immunocompetent Tumor Microenvironments,” *Cell Rep.*, vol. 25, no. 13, pp. 3884–3893.e3, 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.015.
- [208] J. Pan *et al.*, “Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis,” *Mol. Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 1–14, Nov. 2006, doi: 10.1186/1476-4598-5-56/TABLES/1.
- [209] A. Calon *et al.*, “Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- β -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation,” *Cancer Cell*, vol. 22, no. 5, pp. 571–584, Nov. 2012, doi: 10.1016/J.CCR.2012.08.013.
- [210] X. Ding *et al.*, “HGF-mediated crosstalk between cancer-associated fibroblasts and MET-unamplified gastric cancer cells activates coordinated tumorigenesis and metastasis,” *Cell Death Dis.* 2018 99, vol. 9, no. 9, pp. 1–16, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0922-1.
- [211] L. Zhao *et al.*, “Fibroblast activation protein-based theranostics in cancer research: A state-of-the-art review,” *Theranostics*, vol. 12, no. 4, pp. 1557–1569, 2022, doi: 10.7150/thno.69475.
- [212] A. M. Santos, J. Jung, N. Aziz, J. L. Kissil, and E. Puré, “Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 12, pp. 3613–3625, Dec. 2009, doi:

- 10.1172/JCI38988.
- [213] D. Yang, P. Guo, T. He, and C. A. Powell, "Role of endothelial cells in tumor microenvironment," *Clin. Transl. Med.*, vol. 11, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.1002/CTM2.450.
- [214] D. Ribatti, R. Tamma, S. Ruggieri, T. Annese, and E. Crivellato, "Surface markers: An identity card of endothelial cells," *Microcirculation*, vol. 27, no. 1, p. e12587, Jan. 2020, doi: 10.1111/MICC.12587.
- [215] M. A. Konerding *et al.*, "Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts," *Br. J. Cancer* 1999 805, vol. 80, no. 5, pp. 724–732, Apr. 1999, doi: 10.1038/sj.bjc.6690416.
- [216] S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh, A. Haskell, R. K. Jain, and D. M. McDonald, "Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors," *Am. J. Pathol.*, vol. 160, no. 3, pp. 985–1000, Mar. 2002, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64920-6.
- [217] J. Jiang, Y. L. Tang, and X. H. Liang, "EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 11, no. 8, pp. 714–723, Apr. 2011, doi: 10.4161/CBT.11.8.15274.
- [218] C. M. Wacker and W. R. Bauer, "Neue Ansätze der Magnetresonanztomographie zur Beschreibung myokardialer Mikro-zirkulationsparameter am Menschen," *Herz*, vol. 28, no. 2, 2003, doi: 10.1007/s00059-003-2451-6.
- [219] Y. Mizukami, J. Sasajima, T. Ashida, and Y. Kohgo, "Abnormal tumor vasculatures and bone marrow-derived pro-angiogenic cells in cancer," *Int. J. Hematol.*, vol. 95, no. 2, pp. 125–130, Feb. 2012, doi: 10.1007/S12185-012-1017-X.
- [220] S. Canete-Portillo, M. del C. Rodriguez Pena, D. Wang, D. F. Sanchez, G. J. Netto, and C. Magi-Galluzzi, "Vascular architectural patterns in clear cell renal cell carcinoma and clear cell papillary renal cell carcinoma," *Virchows Arch.*, vol. 479, no. 6, pp. 1187–1196, Dec. 2021, doi: 10.1007/S00428-021-03214-2/TABLES/3.
- [221] J. I. López *et al.*, "CD34 immunostaining enhances a distinct pattern of intratumor angiogenesis with prognostic implications in clear cell renal cell carcinoma," *APMIS*, vol. 125, no. 2, pp. 128–133, Feb. 2017, doi: 10.1111/APM.12649.
- [222] C. N. Tsai *et al.*, "SOX4 activates CXCL12 in hepatocellular carcinoma cells to modulate endothelial cell migration and angiogenesis in vivo," *Oncogene* 2020 3924, vol. 39, no. 24, pp. 4695–4710, May 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1319-z.
- [223] G. Sökeland and U. Schumacher, "The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade," *Mol. Cancer* 2019 181, vol. 18, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2019, doi: 10.1186/S12943-018-0937-3.
- [224] L. C. Boraas and T. Ahsan, "Lack of vimentin impairs endothelial differentiation of embryonic stem cells," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. July, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1038/srep30814.
- [225] E. Wieland *et al.*, "Endothelial Notch1 Activity Facilitates Metastasis," *Cancer Cell*, vol. 31, no. 3, pp. 355–367, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.CCELL.2017.01.007.
- [226] B. Bussolati, I. Deambrosi, S. Russo, M. C. Deregibus, and G. Camussi, "Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells," *FASEB J.*, vol. 17, no. 9, pp. 1159–1161, Jun. 2003, doi:

10.1096/FJ.02-0557FJE.

- [227] Y. Şenbabaoğlu *et al.*, “Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures,” *Genome Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–25, Nov. 2016, doi: 10.1186/S13059-016-1092-Z/FIGURES/8.
- [228] D. A. Braun *et al.*, “Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma,” *Nat. Med.* 2020 266, vol. 26, no. 6, pp. 909–918, May 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0839-y.
- [229] J. Anker, J. Miller, N. Taylor, N. Kyrianiou, and C. K. Tsao, “From Bench to Bedside: How the Tumor Microenvironment Is Impacting the Future of Immunotherapy for Renal Cell Carcinoma,” *Cells*, vol. 10, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/CELLS10113231.
- [230] L. Galanopoulo, “Cancer : la révolution de l’immunothérapie,” 2019. <https://lejournal.cnrs.fr/print/2144> (accessed Oct. 10, 2022).
- [231] G. V. Sharonov, E. O. Serebrovskaya, D. V. Yuzhakova, O. V. Britanova, and D. M. Chudakov, “B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment,” *Nat. Rev. Immunol.* 2020 205, vol. 20, no. 5, pp. 294–307, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41577-019-0257-x.
- [232] S. Chevrier *et al.*, “An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Cell*, vol. 169, no. 4, pp. 736–749.e18, May 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.04.016.
- [233] S. Li *et al.*, “Tumor-educated B cells promote renal cancer metastasis via inducing the IL-1 β /HIF-2 α /Notch1 signals,” *Cell Death Dis.* 2020 113, vol. 11, no. 3, pp. 1–14, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41419-020-2355-x.
- [234] M. D. Iglesia, J. S. Parker, K. A. Hoadley, J. S. Serody, C. M. Perou, and B. G. Vincent, “Genomic analysis of immune cell infiltrates across 11 tumor types,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 108, no. 11, Nov. 2016, doi: 10.1093/jnci/djw144.
- [235] J. J. Luke, R. Bao, R. F. Sweis, S. Spranger, and T. F. Gajewski, “WNT/b-catenin pathway activation correlates with immune exclusion across human cancers,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 25, no. 10, pp. 3074–3083, May 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1942/74038/AM/WNT-CATENIN-PATHWAY-ACTIVATION-CORRELATES-WITH.
- [236] D. A. Braun *et al.*, “Progressive immune dysfunction with advancing disease stage in renal cell carcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 39, no. 5, pp. 632–648.e8, May 2021, doi: 10.1016/J.CCCELL.2021.02.013.
- [237] R. Ostuni, F. Kratochvill, P. J. Murray, and G. Natoli, “Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications,” *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 4, pp. 229–239, 2015, doi: 10.1016/j.it.2015.02.004.
- [238] E. Y. Lin *et al.*, “Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 23, pp. 11238–11246, Dec. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1278.
- [239] M. H. Voss *et al.*, “Correlation of degree of tumor immune infiltration and insertion-and-deletion (indel) burden with outcome on programmed death 1 (PD1) therapy in advanced renal cell cancer (RCC).,” https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.4518, vol. 36, no. 15_suppl, pp. 4518–4518, Jun. 2018, doi: 10.1200/JCO.2018.36.15_SUPPL.4518.

- [240] D. G. DeNardo *et al.*, “CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages,” *Cancer Cell*, vol. 16, no. 2, pp. 91–102, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.CCR.2009.06.018.
- [241] B. Ruffell *et al.*, “Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells,” *Cancer Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 623–637, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.CCR.2014.09.006.
- [242] F. Klug *et al.*, “Low-Dose Irradiation Programs Macrophage Differentiation to an iNOS+/M1 Phenotype that Orchestrates Effective T Cell Immunotherapy,” *Cancer Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 589–602, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.CCR.2013.09.014.
- [243] Y. Şenbabaoğlu *et al.*, “Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures,” *Genome Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–25, Nov. 2016, doi: 10.1186/S13059-016-1092-Z/FIGURES/8.
- [244] A. M. Figel *et al.*, “Human Renal Cell Carcinoma Induces a Dendritic Cell Subset That Uses T-Cell Crosstalk for Tumor-Permissive Milieu Alterations,” *Am. J. Pathol.*, vol. 179, no. 1, pp. 436–451, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.AJPATH.2011.03.011.
- [245] M. Kobayashi, K. Suzuki, M. Yashi, M. Yuzawa, N. Takayashiki, and T. Morita, “Tumor Infiltrating Dendritic Cells Predict Treatment Response to Immunotherapy in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma,” *Anticancer Res.*, vol. 27, no. 2, pp. 1137–1141, Mar. 2007, Accessed: Oct. 11, 2022. [Online]. Available: <https://ar.iarjournals.org/content/27/2/1137>.
- [246] F. Veglia, E. Sanseviero, and D. I. Gabrilovich, “Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity,” *Nat. Rev. Immunol.* 2021 218, vol. 21, no. 8, pp. 485–498, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41577-020-00490-y.
- [247] X. Guan, Z. Liu, J. Zhang, and X. Jin, “Myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma is correlated with CCL2, IL-17 and IL-18 expression in blood and tumors,” *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 27, no. 7, pp. 947–953, Jul. 2018, doi: 10.17219/ACEM/70065.
- [248] J. S. Ko *et al.*, “Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 2148–2157, Mar. 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1332/350618/P/SUNITINIB-MEDIATES-REVERSAL-OF-MYELOID-DERIVED.
- [249] J. S. Ko *et al.*, “Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained,” *Cancer Res.*, vol. 70, no. 9, pp. 3526–3536, May 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3278/655797/P/DIRECT-AND-DIFFERENTIAL-SUPPRESSION-OF-MYELOID.
- [250] Y. Xia *et al.*, “Negative regulation of tumor-infiltrating NK cell in clear cell renal cell carcinoma patients through the exosomal pathway,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 23, pp. 37783–37795, Mar. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.16354.
- [251] P. U. Prinz, A. N. Mendler, D. Brech, I. Masouris, R. Oberneder, and E. Noessner, “NK-cell dysfunction in human renal carcinoma reveals diacylglycerol kinase as key regulator and target for therapeutic intervention,” *Int. J. Cancer*, vol. 135, no. 8, pp. 1832–1841, Oct. 2014, doi: 10.1002/IJC.28837.
- [252] A. N. Miliotou and L. C. Papadopoulou, “CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy,” *Curr.*

Pharm. Biotechnol., vol. 19, no. 1, pp. 5–18, May 2018, doi: 10.2174/1389201019666180418095526.

- [253] A. D. Theocharis, D. Manou, and N. K. Karamanos, “The extracellular matrix as a multitasking player in disease,” *FEBS J.*, vol. 286, no. 15, pp. 2830–2869, 2019, doi: 10.1111/febs.14818.
- [254] E. C. Filipe, J. L. Chitty, and T. R. Cox, “Charting the unexplored extracellular matrix in cancer,” *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 99, no. 2. Blackwell Publishing Ltd, pp. 58–76, Apr. 01, 2018, doi: 10.1111/iep.12269.
- [255] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, “Extracellular matrix structure,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 4–27, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.ADDR.2015.11.001.
- [256] T. Karampitsakos, T. Woolard, D. Bouros, and A. Tzouvelekis, “Toll-like receptors in the pathogenesis of pulmonary fibrosis,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 808, pp. 35–43, 2017, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2016.06.045.
- [257] R. Mittal *et al.*, “Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 231, no. 12, pp. 2599–2621, Dec. 2016, doi: 10.1002/JCP.25430.
- [258] J. K. Mouw, G. Ou, and V. M. Weaver, “Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014 1512, vol. 15, no. 12, pp. 771–785, Nov. 2014, doi: 10.1038/nrm3902.
- [259] N. K. Karamanos *et al.*, “A guide to the composition and functions of the extracellular matrix,” *FEBS J.*, vol. 288, no. 24, pp. 6850–6912, Dec. 2021, doi: 10.1111/FEBS.15776.
- [260] A. Sorushanova *et al.*, “The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development,” *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1002/ADMA.201801651.
- [261] L. A. Llacua, B. J. de Haan, and P. de Vos, “Laminin and collagen IV inclusion in immunoisolating microcapsules reduces cytokine-mediated cell death in human pancreatic islets,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, no. 2, pp. 460–467, 2018, doi: 10.1002/term.2472.
- [262] N. M. Coelho, V. Llopis-Hernández, M. Salmerón-Sánchez, and G. Altankov, “Dynamic Reorganization and Enzymatic Remodeling of Type IV Collagen at Cell–Biomaterial Interface,” *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, vol. 105, pp. 81–104, 2016, doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.06.001.
- [263] P. N. Furness, “Extracellular matrix and the kidney,” *J. Clin. Pathol.*, no. 49, pp. 355–359, 1996.
- [264] B. G. Hudson, S. T. Reeders, and K. Tryggvason, “Type IV collagen: Structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of goodpasture and alport syndromes and diffuse leiomyomatosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 35, pp. 26033–26036, 1993, doi: 10.1016/s0021-9258(19)74270-7.
- [265] J. Lohi *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*, vol. 72, no. 1, pp. 43–49, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970703)72:1<43::AID-IJC6>3.0.CO;2-4.
- [266] M. Barczyk, S. Carracedo, and D. Gullberg, “Integrins,” *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 269–280, Jan. 2010, doi: 10.1007/S00441-009-0834-6/TABLES/4.
- [267] J. Patten and K. Wang, “Fibronectin in development and wound healing,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 170, pp. 353–368, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.ADDR.2020.09.005.
- [268] C. J. Dalton and C. A. Lemmon, “Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling,” *Cells* 2021, Vol. 10, Page 2443, vol. 10, no. 9, p. 2443, Sep. 2021, doi: 10.3390/CELLS10092443.

- [269] J. Halper and M. Kjaer, "Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins," pp. 31–47, 2014, doi: 10.1007/978-94-007-7893-1_3/COVER.
- [270] M. Yamada and K. Sekiguchi, "Molecular Basis of Laminin–Integrin Interactions," *Curr. Top. Membr.*, vol. 76, pp. 197–229, Jan. 2015, doi: 10.1016/BS.CTM.2015.07.002.
- [271] A. Goddi, L. Schroedl, E. M. Brey, and R. N. Cohen, "Laminins in metabolic tissues," *Metabolism*, vol. 120, p. 154775, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.METABOL.2021.154775.
- [272] Y. Yao, "Laminin: loss-of-function studies," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 6, pp. 1095–1115, Mar. 2017, doi: 10.1007/S00018-016-2381-0.
- [273] M. R. Choi, C. H. An, N. J. Yoo, and S. H. Lee, "Laminin gene LAMB4 is somatically mutated and expressionally altered in gastric and colorectal cancers," *APMIS*, vol. 123, no. 1, pp. 65–71, Jan. 2015, doi: 10.1111/APM.12309.
- [274] J. Thomson, M. Singh, A. Eckersley, S. A. Cain, M. J. Sherratt, and C. Baldoock, "Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 89, pp. 109–117, May 2019, doi: 10.1016/j.semcd.2018.07.016.
- [275] T. J. Broekelmann *et al.*, "Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its COOH-terminal domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 49, pp. 40939–40947, Sep. 2005, doi: 10.1074/JBC.M507309200.
- [276] B. Li, D. O. V Alonso, B. J. Bennion, and V. Daggett, "Hydrophobic Hydration Is an Important Source of Elasticity in Elastin-Based Biopolymers," 2001, doi: 10.1021/ja010363e.
- [277] A. Velkova, "Age-related changes in the glycation of human aortic elastin," *Exp. Gerontol.*, Jan. 2004, Accessed: Oct. 13, 2022. [Online]. Available: https://www.academia.edu/27265014/Age_related_changes_in_the_glycation_of_human_aortic_elastin.
- [278] R. V. Iozzo and L. Schaefer, "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans," *Matrix Biol.*, vol. 42, pp. 11–55, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.MATBIO.2015.02.003.
- [279] C. Bonnans, J. Chou, and Z. Werb, "Remodelling the extracellular matrix in development and disease," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014 1512, vol. 15, no. 12, pp. 786–801, Nov. 2014, doi: 10.1038/nrm3904.
- [280] R. El Masri *et al.*, "Extracellular endosulfatase Sulf-2 harbors a chondroitin/dermatan sulfate chain that modulates its enzyme activity," *Cell Rep.*, vol. 38, no. 11, 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110516.
- [281] K. Y. Han, J. Dugas-Ford, M. Seiki, J. H. Chang, and D. T. Azar, "Evidence for the Involvement of MMP14 in MMP2 Processing and Recruitment in Exosomes of Corneal Fibroblasts," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 9, pp. 5323–5329, Aug. 2015, doi: 10.1167/IOVS.14-14417.
- [282] N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, T. Neill, and R. V. Iozzo, "Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases," *Matrix Biol.*, vol. 75–76, pp. 1–11, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.MATBIO.2018.08.007.
- [283] S. Monea, B. A. Jordan, S. Srivastava, S. DeSouza, and E. B. Ziff, "Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins," *J.*

Neurosci., vol. 26, no. 8, pp. 2300–2312, 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3521-05.2006.

- [284] N. Malaquin *et al.*, “Senescent Fibroblasts Enhance Early Skin Carcinogenic Events via a Paracrine MMP-PAR-1 Axis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e63607, May 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0063607.
- [285] C. Gialeli, A. D. Theocharis, and N. K. Karamanos, “Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting,” *FEBS J.*, vol. 278, no. 1, pp. 16–27, Jan. 2011, doi: 10.1111/J.1742-4658.2010.07919.X.
- [286] D. R. Edwards, M. M. Handsley, and C. J. Pennington, “The ADAM metalloproteinases,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 29, no. 5, pp. 258–289, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.MAM.2008.08.001.
- [287] J. P. Villa, G. P. Bertenshaw, J. E. Bylander, and J. S. Bond, “Meprin proteolytic complexes at the cell surface and in extracellular spaces,” *Biochem. Soc. Symp.*, no. 70, pp. 53–63, 2003, doi: 10.1042/BSS0700053.
- [288] S. Rahn and C. Becker-Pauly, “Meprin and ADAM proteases as triggers of systemic inflammation in sepsis,” *FEBS Lett.*, vol. 596, no. 5, pp. 534–556, Mar. 2022, doi: 10.1002/1873-3468.14225.
- [289] G. Marsico, L. Russo, F. Quondamatteo, and A. Pandit, “Glycosylation and Integrin Regulation in Cancer,” *Trends in Cancer*, vol. 4, no. 8, pp. 537–552, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.TRECAN.2018.05.009.
- [290] Y. Takada, X. Ye, and S. Simon, “The integrins,” *Genome Biol.*, vol. 8, no. 5, Jun. 2007, doi: 10.1186/GB-2007-8-5-215.
- [291] J. Xiong *et al.*, “Integrins regulate stemness in solid tumor: an emerging therapeutic target,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 14, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S13045-021-01192-1.
- [292] Y. D. Benoit, J. F. Larrivée, J. F. Groulx, J. Stankova, P. H. Vachon, and J. F. Beaulieu, “Integrin alpha8beta1 confers anoikis susceptibility to human intestinal epithelial crypt cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 399, no. 3, pp. 434–439, 2010, doi: 10.1016/J.BBRC.2010.07.107.
- [293] T. Onodera, T. Sakai, J. C. F. Hsu, K. Matsumoto, J. A. Chiorini, and K. M. Yamada, “Btbd7 regulates epithelial cell dynamics and branching morphogenesis,” *Science (80-)*, vol. 329, no. 5991, pp. 562–565, Jul. 2010, doi: 10.1126/SCIENCE.1191880/SUPPL_FILE/ONODERA_SOM.PDF.
- [294] L. Yang, T. Wang, J. Zhang, Z. Liu, and X. Wang, “Expression of BTBD7 in primary salivary adenoid cystic carcinoma and correlation with Slug and prognosis,” *Cancer Biomarkers*, vol. 17, no. 2, pp. 179–185, Jan. 2016, doi: 10.3233/CBM-160629.
- [295] C. F. Guimarães, L. Gasperini, A. P. Marques, and R. L. Reis, “The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering,” *Nat. Rev. Mater.*, vol. 5, no. 5, pp. 351–370, 2020, doi: 10.1038/s41578-019-0169-1.
- [296] C. Rianna and M. Radmacher, “Influence of microenvironment topography and stiffness on the mechanics and motility of normal and cancer renal cells,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 31, pp. 11222–11230, Aug. 2017, doi: 10.1039/C7NR02940C.
- [297] A. Lyshchik *et al.*, “Elastic moduli of thyroid tissues under compression,” *Ultrason. Imaging*, vol. 27, no. 2, pp. 101–110, 2005, doi: 10.1177/016173460502700204.
- [298] L. Laforgue, M. De, D. Médecine, and L. Laforgue, “Migration de cellules cancéreuses dans des gels de collagène 3D To cite this version : HAL Id : tel-01693486 Migration de cellules cancéreuses dans des gels de collagène 3D

de collagène 3D,” 2018.

- [299] A. Hayn, T. Fischer, and C. T. Mierke, “Inhomogeneities in 3D Collagen Matrices Impact Matrix Mechanics and Cancer Cell Migration,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. November, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.593879.
- [300] S. Patwardhan, P. Mahadik, O. Shetty, and S. Sen, “ECM stiffness-tuned exosomes drive breast cancer motility through thrombospondin-1,” *Biomaterials*, vol. 279, no. October, p. 121185, 2021, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121185.
- [301] O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P. A. Janmey, D. J. Mooney, and V. B. Shenoy, “Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour,” *Nature*, vol. 584, no. 7822, pp. 535–546, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2612-2.
- [302] K. H. Bond *et al.*, “The extracellular matrix environment of clear cell renal cell carcinoma determines cancer associated fibroblast growth,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 23, p. 5873, Dec. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13235873/S1.
- [303] C. Walter, J. T. Davis, J. Mathur, and A. Pathak, “Physical defects in basement membrane-mimicking collagen-IV matrices trigger cellular EMT and invasion,” *Integr. Biol. (United Kingdom)*, vol. 10, no. 6, pp. 342–355, 2018, doi: 10.1039/c8ib00034d.
- [304] F. Toroghi, F. Mashayekhi, V. Montazeri, H. S. Saedi, and Z. Salehi, “Association of MMP-9 promoter polymorphism and breast cancer among Iranian patients,” *Eur. J. Oncol.*, vol. 22, no. 1, pp. 38–42, 2017.
- [305] L. Zhang, J. Shi, J. Feng, H. Klocker, C. Lee, and J. Zhang, “Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 7, no. 4, pp. 327–332, 2004, doi: 10.1038/sj.pcan.4500750.
- [306] S. Majo, S. Courtois, W. Souleyreau, A. Bikfalvi, and P. Auguste, “Impact of Extracellular Matrix Components to Renal Cell Carcinoma Behavior,” *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 625, Apr. 2020, doi: 10.3389/FONC.2020.00625/BIBTEX.
- [307] F. Xu *et al.*, “The Oncogenic Role of COL23A1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10134-2.
- [308] S. Ortiz-Urda *et al.*, “Type VII collagen is required for ras-driven human epidermal tumorigenesis,” *Science* (80-. .), vol. 307, no. 5716, pp. 1773–1776, Mar. 2005, doi: 10.1126/SCIENCE.1106209/SUPPL_FILE/ORTIZ-URDA_SOM.PDF.
- [309] S. E. Oh *et al.*, “Prognostic Value of Highly Expressed Type VII Collagen (COL7A1) in Patients With Gastric Cancer,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 27, p. 1, Aug. 2021, doi: 10.3389/PORE.2021.1609860.
- [310] H. Dillekås, R. S. Michael, and S. Oddbjørn, “Are 90% of deaths from cancer caused by metastases?,” *Cancer Med.*, no. 8, pp. 5574–5576, 2019, doi: 10.1002/cam4.2474.
- [311] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The Hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, 2000, doi: 10.1007/BF03091804.
- [312] D. Hanahan, “Hallmarks of Cancer: New Dimensions,” *Cancer Discov.*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [313] D. R. Welch and D. R. Hurst, “Defining the Hallmarks of Metastasis,” *Cancer Research*, vol. 79, no. 12.

American Association for Cancer Research Inc., pp. 3011–3027, Jun. 15, 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0458.

- [314] J. Fares, M. Y. Fares, H. H. Khachfe, H. A. Salhab, and Y. Fares, “Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41392-020-0134-X.
- [315] J. Majidpoor and K. Mortezaee, “Steps in metastasis: an updated review,” *Med. Oncol.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1007/s12032-020-01447-w.
- [316] K. M. Yamada and M. Sixt, “Mechanisms of 3D cell migration,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019 2012, vol. 20, no. 12, pp. 738–752, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0172-9.
- [317] N. V Krakhmal, M. V Zavyalova, E. V Denisov, S. V Vtorushin, and V. M. Perelmuter, “Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms,” *REVIEWS*, vol. 7, 2015.
- [318] L. Laforgue, “Migration de cellules cancéreuses dans des gels de collagène 3D,” 2018.
- [319] D. Spano, C. Heck, P. De Antonellis, G. Christofori, and M. Zollo, “Molecular networks that regulate cancer metastasis,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 22, no. 3, pp. 234–249, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2012.03.006.
- [320] P. Friedl and K. Wolf, “Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms,” *Nat. Rev. Cancer* 2003 35, vol. 3, no. 5, pp. 362–374, May 2003, doi: 10.1038/nrc1075.
- [321] C. T. Mierke, “Mechanical Cues Affect Migration and Invasion of Cells From Three Different Directions,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. September, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.583226.
- [322] J. Di Martino, E. Henriet, Z. Ezzoukhry, J. G. Goetz, V. Moreau, and F. Saltel, “The microenvironment controls invadosome plasticity,” *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 9, pp. 1759–1768, 2016, doi: 10.1242/jcs.182329.
- [323] D. Yamazaki, S. Kurisu, and T. Takenawa, “Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates,” *Oncogene*, vol. 28, no. 13, pp. 1570–1583, 2009, doi: 10.1038/onc.2009.2.
- [324] A. Jacob and R. Prekeris, “The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 3, no. FEB, p. 4, Feb. 2015, doi: 10.3389/FCELL.2015.00004/BIBTEX.
- [325] D. Dang, J. R. Bamburg, and D. M. Ramos, “ $\alpha\beta\beta$ integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion,” *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 4, pp. 468–477, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.YEXCR.2005.11.011.
- [326] D. A. Potter *et al.*, “Calpain Regulates Actin Remodeling during Cell Spreading,” *J. Cell Biol.*, vol. 141, no. 3, pp. 647–662, 1998, Accessed: Oct. 24, 2022. [Online]. Available: <http://www.jcb.org>.
- [327] N. Yamaguchi, T. Mizutani, K. Kawabata, and H. Haga, “Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin β 1 and PI3K,” *Sci. Reports* 2015 51, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2015, doi: 10.1038/srep07656.
- [328] F. Van Zijl, G. Krupitza, and W. Mikulits, “Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration,” *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 728, no. 1–2, pp. 23–34, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.MRREV.2011.05.002.
- [329] S. Conti, T. Kato, D. Park, E. Sahai, X. Trepat, and A. Labernadie, “CAFs and cancer cells co-migration in 3D spheroid invasion assay,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 2179, pp. 243–256, 2020, doi: 10.1007/978-1-0716-0779-4_19/COVER.

- [330] K. J. Cheung and A. J. Ewald, "A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters," *Science* (80-.), vol. 352, no. 6282, pp. 167–169, Apr. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAF6546.
- [331] K. Wolf, R. Müller, S. Borgmann, E. B. Bröcker, and P. Friedl, "Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases," *Blood*, vol. 102, no. 9, pp. 3262–3269, 2003, doi: 10.1182/blood-2002-12-3791.
- [332] J. Schick and E. Raz, "Blebs—Formation, Regulation, Positioning, and Role in Amoeboid Cell Migration," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, p. 1470, Jul. 2022, doi: 10.3389/FCELL.2022.926394/BIBTEX.
- [333] M. D. Welch, "Previews Cell Migration, Freshly Squeezed," 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.053.
- [334] V. Graziani, I. Rodriguez-Hernandez, O. Maiques, and V. Sanz-Moreno, "The amoeboid state as part of the epithelial-to-mesenchymal transition programme," *Trends Cell Biol.*, vol. 32, no. 3, pp. 228–242, 2022, doi: 10.1016/j.tcb.2021.10.004.
- [335] Y. J. Liu *et al.*, "Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells," *Cell*, vol. 160, no. 4, pp. 659–672, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.007.
- [336] M. Wang *et al.*, "Microchannel Stiffness and Confinement Jointly Induce the Mesenchymal-Amoeboid Transition of Cancer Cell Migration," *Nano Lett.*, vol. 19, no. 9, pp. 5949–5958, Sep. 2019, doi: 10.1021/ACS.NANO lett.9B01597/ASSET/IMAGES/LARGE/NL9B01597_0006.jpeg.
- [337] V. te Boekhorst *et al.*, "Calpain-2 regulates hypoxia/HIF-induced plasticity toward amoeboid cancer cell migration and metastasis," *Curr. Biol.*, vol. 32, no. 2, pp. 412-427.e8, 2022, doi: 10.1016/j.cub.2021.11.040.
- [338] D. Ribatti, "Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis," *Angiogenesis*, vol. 11, no. 1, p. 3, Mar. 2008, doi: 10.1007/S10456-008-9092-6.
- [339] N. Poupard, "Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale," 2018.
- [340] R. Lugano, M. Ramachandran, and A. Dimberg, "Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 9, pp. 1745–1770, May 2020, doi: 10.1007/S00018-019-03351-7/FIGURES/3.
- [341] J. Folkman, "Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?," *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007 64, vol. 6, no. 4, pp. 273–286, Apr. 2007, doi: 10.1038/nrd2115.
- [342] Tocris and Biotechne, *Cancer Research Product Guide*. 2015.
- [343] S. Goel *et al.*, "Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases," *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 3, pp. 1071–1121, 2011, doi: 10.1152/PHYSREV.00038.2010/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0031125910015.jpeg.
- [344] M. Mazzone *et al.*, "Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization," *Cell*, vol. 136, no. 5, pp. 839–851, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.CELL.2009.01.020.
- [345] R. Mazzieri *et al.*, "Targeting the ANG2/TIE2 Axis Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Impairing Angiogenesis and Disabling Rebounds of Proangiogenic Myeloid Cells," *Cancer Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 512–526, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.CCR.2011.02.005.

- [346] M. Pàez-Ribes *et al.*, “Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis,” *Cancer Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 220–231, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.CCR.2009.01.027.
- [347] J. M. L. Ebos, C. R. Lee, W. Cruz-Munoz, G. A. Bjarnason, J. G. Christensen, and R. S. Kerbel, “Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis,” *Cancer Cell*, vol. 15, no. 3, p. 232, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.CCR.2009.01.021.
- [348] J. M. L. Ebos and R. S. Kerbel, “Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 8, no. 4, p. 210, 2011, doi: 10.1038/NRCLINONC.2011.21.
- [349] M. V. Zavyalova *et al.*, “Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis,” *Biochem. 2019* 847, vol. 84, no. 7, pp. 762–772, Jul. 2019, doi: 10.1134/S0006297919070071.
- [350] E. T. Roussos, J. S. Condeelis, and A. Patsialou, “Chemotaxis in cancer,” *Nat. Rev. Cancer* 2011 118, vol. 11, no. 8, pp. 573–587, Jul. 2011, doi: 10.1038/nrc3078.
- [351] J. W. Pollard, “Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 84, no. 3, pp. 623–630, Sep. 2008, doi: 10.1189/JLB.1107762.
- [352] D. Lau *et al.*, “Role of c-Met/β1 integrin complex in the metastatic cascade in breast cancer,” *JCI insight*, vol. 6, no. 12, Jun. 2021, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.138928.
- [353] Y. Zhang *et al.*, “Prostaglandin E2 receptor 4 mediates renal cell carcinoma intravasation and metastasis,” *Cancer Lett.*, vol. 391, pp. 50–58, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.CANLET.2017.01.007.
- [354] G. Kats-Ugurlu *et al.*, “Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma,” *J. Pathol.*, vol. 219, no. 3, pp. 287–293, Nov. 2009, doi: 10.1002/PATH.2613.
- [355] T. Palmela Leitão *et al.*, “Circulating tumor cell detection methods in renal cell carcinoma: A systematic review,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 161, p. 103331, May 2021, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2021.103331.
- [356] T. Pereira-veiga, S. Schneegans, K. Pantel, and H. Wikman, “Circulating tumor cell-blood cell crosstalk : Biology and clinical relevance,” *CellReports*, vol. 40, no. 9, p. 111298, 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111298.
- [357] J. Kapeleris *et al.*, “Cancer stemness contributes to cluster formation of colon cancer cells and high metastatic potentials,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 47, no. 5, pp. 838–847, 2020, doi: 10.1111/1440-1681.13247.
- [358] J. D. Spicer *et al.*, “Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 16, pp. 3919–3927, 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2393.
- [359] Z. J. Que *et al.*, “Jinfukang inhibits lung cancer metastasis by upregulating CX3CL1 to recruit NK cells to kill CTCs,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 275, no. January, p. 114175, 2021, doi: 10.1016/j.jep.2021.114175.
- [360] S. G. J. G. In’t Veld *et al.*, “Detection and localization of early- and late-stage cancers using platelet RNA,” *Cancer Cell*, vol. 40, no. 9, pp. 999-1009.e6, 2022, doi: 10.1016/j.ccell.2022.08.006.
- [361] M. Cristofanilli *et al.*, “Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer,” *n engl j med*, vol. 8, p. 351, 2004, Accessed: Nov. 07, 2022. [Online]. Available: www.nejm.org.
- [362] X. Cheng and K. Cheng, “Visualizing cancer extravasation: from mechanistic studies to drug

- development," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 71–88, 2021, doi: 10.1007/s10555-020-09942-2.
- [363] F. L. Miles, F. L. Pruitt, K. L. Van Golen, and C. R. Cooper, "Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis," *Clin. Exp. Metastasis* 2007 254, vol. 25, no. 4, pp. 305–324, Sep. 2007, doi: 10.1007/S10585-007-9098-2.
- [364] L. Borsig, "Selectins in cancer immunity," *Glycobiology*, vol. 28, no. 9, pp. 648–655, 2018, doi: 10.1093/glycob/cwx105.
- [365] H. Paz, N. Pathak, and J. Yang, "Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis," *Oncogene* 2014 3333, vol. 33, no. 33, pp. 4193–4202, Sep. 2013, doi: 10.1038/onc.2013.393.
- [366] T. A. Allen *et al.*, "Angiopellosis as an Alternative Mechanism of Cell Extravasation," *Stem Cells*, vol. 35, no. 1, pp. 170–180, Jan. 2017, doi: 10.1002/STEM.2451.
- [367] X. Jin *et al.*, "A metastasis map of human cancer cell lines," *Nature*, vol. 588, no. 7837, pp. 331–336, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2969-2.
- [368] J. Aleman and A. Skardal, "A multi-site metastasis-on-a-chip microphysiological system for assessing metastatic preference of cancer cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 116, no. 4, pp. 936–944, 2019, doi: 10.1002/bit.26871.
- [369] R. N. Kaplan *et al.*, "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche," *Nat. 2005 4387069*, vol. 438, no. 7069, pp. 820–827, Dec. 2005, doi: 10.1038/nature04186.
- [370] Y. Liu and X. Cao, "Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche," *Cancer Cell*, vol. 30, no. 5, pp. 668–681, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.CCELL.2016.09.011.
- [371] Y. Wang, Y. Ding, N. Guo, and S. Wang, "MDSCs: Key criminals of tumor pre-metastatic niche formation," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. FEB, p. 172, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00172/BIBTEX.
- [372] H. Wang *et al.*, "Characteristics of pre-metastatic niche: the landscape of molecular and cellular pathways," *Mol. Biomed.*, vol. 2, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S43556-020-00022-Z.
- [373] Z. Gong *et al.*, "Lung fibroblasts facilitate pre-metastatic niche formation by remodeling the local immune microenvironment," *Immunity*, vol. 55, no. 8, pp. 1483-1500.e9, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2022.07.001.
- [374] Y. Guo *et al.*, "Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors," *Mol. Cancer*, 2019, doi: 10.3389/fmolb.2021.703640.
- [375] M. A. López-Lago, S. Posner, T. V. J., A. M. Molina, R. J. Motzer, and R. Chaganti, "Neutrophil Chemokines Secreted by Tumor Cells Mount a Lung Antimetastatic Response during Renal Cell Carcinoma Progression," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 5, pp. 139–148, 2013, doi: 10.1038/onc.2012.201.Neutrophil.
- [376] R. Romero-Moreno *et al.*, "The CXCL5/CXCR2 axis is sufficient to promote breast cancer colonization during bone metastasis," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12108-6.
- [377] P. B. Olkhanud *et al.*, "Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 14, pp. 5996–6004, Jul. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4619/654997/P/BREAST-CANCER-LUNG-METASTASIS-REQUIRES-EXPRESSION.

- [378] Y. Gao, I. Bado, H. Wang, W. Zhang, J. M. Rosen, and X. H. F. Zhang, "Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil," *Dev. Cell*, vol. 49, no. 3, pp. 375–391, 2019, doi: 10.1016/j.devcel.2019.04.012.
- [379] B. Ormseth, A. Onuma, H. Zhang, and A. Tsung, "The Hepatic Pre-Metastatic Niche," *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 3731, vol. 14, no. 15, p. 3731, Jul. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14153731.
- [380] C. Grange *et al.*, "Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 15, pp. 5346–5356, Aug. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0241/649800/AM/MICROVESICLES-RELEASED-FROM-HUMAN-RENAL-CANCER.
- [381] F. Dupuy *et al.*, "PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer," *Cell Metab.*, vol. 22, no. 4, pp. 577–589, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.007.
- [382] M. Esposito *et al.*, "Bone vascular niche E-selectin induces mesenchymal–epithelial transition and Wnt activation in cancer cells to promote bone metastasis," *Nat. Cell Biol.*, vol. 21, no. 5, pp. 627–639, 2019, doi: 10.1038/s41556-019-0309-2.
- [383] W. Zhang *et al.*, "The bone microenvironment invigorates metastatic seeds for further dissemination," *Cell*, vol. 184, no. 9, pp. 2471-2486.e20, 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.011.
- [384] I. L. Bado *et al.*, "The bone microenvironment increases phenotypic plasticity of ER+ breast cancer cells," *Dev. Cell*, vol. 56, no. 8, pp. 1100-1117.e9, 2021, doi: 10.1016/j.devcel.2021.03.008.
- [385] A. Skardal, M. Devarasetty, S. Forsythe, A. Atala, and S. Soker, "A reductionist metastasis-on-a-chip platform for in vitro tumor progression modeling and drug screening," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 113, no. 9, pp. 2020–2032, 2016, doi: 10.1002/bit.25950.
- [386] X. Tian *et al.*, "Organ-specific metastases obtained by culturing colorectal cancer cells on tissue-specific decellularized scaffolds," *Nat. Biomed. engeneering*, no. 2, pp. 443–452, 2018, doi: 10.1002/jbmr.2490.OPG-Fc.
- [387] W. D. Lü *et al.*, "Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103672.
- [388] K. A. Buettner, "Ross Granville Harrison (1870-1959) | The Embryo Project Encyclopedia," 2007. <https://embryo.asu.edu/pages/ross-granville-harrison-1870-1959> (accessed Nov. 22, 2022).
- [389] R. Skloot, *La vie immortelle d'Henrietta Lacks*, Calman-Lev. .
- [390] U. F. Tesler, *A History of Cardiac Surgery*. Cambridge Scholars Publishing, 2020.
- [391] B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees, and G. M. Hutchins, "Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 133, no. 9, pp. 1463–1467, Sep. 2009, doi: 10.5858/133.9.1463.
- [392] W. J. Williams, E. Larson, and T. L. Phillips, "A Neoplastic Connective Tissue Mast Cell Capable of Continuous Growth In Tissue Culture*," Accessed: Nov. 21, 2022. [Online]. Available: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/6/3/361/1071899/361.pdf>.
- [393] M. Wieser *et al.*, "hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics," *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 295, no. 5, pp. 1365–1375, 2008, doi:

- 10.1152/AJPRENAL.90405.2008/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH20100853160006.JPG.
- [394] W. Zakrzewski, M. Dobrzański, M. Szymonowicz, and Z. Rybak, "Stem cells: past, present, and future," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, Feb. 2019, doi: 10.1186/S13287-019-1165-5.
- [395] K. Duval *et al.*, "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture," *Physiology (Bethesda)*, vol. 32, no. 4, pp. 266–277, Jun. 2017, doi: 10.1152/PHYSIOL.00036.2016.
- [396] D. L. Hughes, A. Hughes, Z. Soonawalla, S. Mukherjee, and E. O'neill, "Dynamic physiological culture of ex vivo human tissue: A systematic review," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 12, p. 2870, Jun. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13122870/S1.
- [397] C. H. Wong, K. W. Siah, and A. W. Lo, "Estimation of clinical trial success rates and related parameters," *Biostatistics*, vol. 20, no. 2, pp. 273–286, 2019, doi: 10.1093/biostatistics/kxx069.
- [398] M. Simian and M. J. Bissell, "Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions," *J. Cell Biol.*, vol. 216, no. 1, pp. 31–40, 2016, doi: 10.1083/jcb.201610056.
- [399] T. Sato *et al.*, "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche," *Nature*, vol. 459, no. 7244, pp. 262–265, 2009, doi: 10.1038/nature07935.
- [400] L. Lugand *et al.*, "Methods for Establishing a Renal Cell Carcinoma Tumor Spheroid Model With Immune Infiltration for Immunotherapeutic Studies," *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 3109, Jul. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.898732/BIBTEX.
- [401] W. C. Peng *et al.*, "Inflammatory Cytokine TNF α Promotes the Long-Term Expansion of Primary Hepatocytes in 3D Culture," *Cell*, vol. 175, no. 6, pp. 1607-1619.e15, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.11.012.
- [402] H. Wang *et al.*, "3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration," *Clin. Transl. Sci.*, vol. 14, no. 5, pp. 1659–1680, Sep. 2021, doi: 10.1111/CTS.13066.
- [403] K. Olofsson, V. Carannante, M. Takai, B. Önfelt, and M. Wiklund, "Single cell organization and cell cycle characterization of DNA stained multicellular tumor spheroids," *Sci. Reports 2021* 111, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-96288-6.
- [404] Y. N. Lin *et al.*, "Monitoring cancer cell invasion and T-cell cytotoxicity in 3D culture," *J. Vis. Exp.*, vol. 2020, no. 160, pp. 1–19, Jun. 2020, doi: 10.3791/61392.
- [405] J. Rodrigues, M. A. Heinrich, L. M. Teixeira, and J. Prakash, "3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor–Stroma Interactions," *Trends in Cancer*, vol. 7, no. 3, pp. 249–264, 2021, doi: 10.1016/j.trecan.2020.10.009.
- [406] O. Habanjar, M. Diab-Assaf, F. Caldefie-Chezet, and L. Delort, "3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages," *Int. J. Mol. Sci. 2021, Vol. 22, Page 12200*, vol. 22, no. 22, p. 12200, Nov. 2021, doi: 10.3390/IJMS222212200.
- [407] A. Kamatar, G. Gunay, and H. Acar, "Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 11, p. 2506, Oct. 2020, doi: 10.3390/POLYM12112506.
- [408] M. Ravi, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, and F. D. Paul Solomon, "3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications," *J. Cell. Physiol.*, vol. 230, no. 1, pp. 16–26, Jan. 2015, doi: 10.1002/JCP.24683.

- [409] E. Knight and S. Przyborski, "Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro," *J. Anat.*, vol. 227, no. 6, pp. 746–756, 2015, doi: 10.1111/joa.12257.
- [410] X. xi Xu *et al.*, "Enrichment of cancer stem cell-like cells by culture in alginate gel beads," *J. Biotechnol.*, vol. 177, no. 1, pp. 1–12, May 2014, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2014.02.016.
- [411] M. Choi *et al.*, "Polymer Thin Film-Induced Tumor Spheroids Acquire Cancer Stem Cell-like Properties," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 24, pp. 6890–6902, Dec. 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0927/653359/AM/POLYMER-THIN-FILM-INDUCED-TUMOR-SPHEROIDS-ACQUIRE.
- [412] D. D. Fang *et al.*, "Expansion of CD133+ colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery," *Br. J. Cancer*, vol. 102, pp. 1265–1275, 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605610.
- [413] L. Wang, R. Mezencev, N. J. Bowen, L. V. Matyunina, and J. F. McDonald, "Isolation and characterization of stem-like cells from a human ovarian cancer cell line," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 363, no. 1–2, pp. 257–268, Apr. 2012, doi: 10.1007/S11010-011-1178-6/FIGURES/6.
- [414] L. Broutier *et al.*, "Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation," *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 9, pp. 1724–1743, 2016, doi: 10.1038/nprot.2016.097.
- [415] L. Grassi *et al.*, "Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1453-0.
- [416] G. G. Nair *et al.*, "Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 21, no. 2, pp. 263–274, 2019, doi: 10.1038/s41556-018-0271-4.
- [417] V. Srivastava, T. R. Huycke, K. T. Phong, and Z. J. Gartner, "Organoid models for mammary gland dynamics and breast cancer," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 66, pp. 51–58, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.CEB.2020.05.003.
- [418] D. Hendriks, B. Artegiani, H. Hu, S. Chuva de Sousa Lopes, and H. Clevers, "Establishment of human fetal hepatocyte organoids and CRISPR–Cas9-based gene knockin and knockout in organoid cultures from human liver," *Nat. Protoc.* 2020 161, vol. 16, no. 1, pp. 182–217, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41596-020-00411-2.
- [419] H. Al Reza, R. Okabe, and T. Takebe, "Organoid transplant approaches for the liver," *Transpl. Int.*, vol. 34, no. 11, pp. 2031–2045, Nov. 2021, doi: 10.1111/TRI.14128.
- [420] N. Sachs *et al.*, "Long-term expanding human airway organoids for disease modeling," *EMBO J.*, vol. 38, no. 4, pp. 1–20, 2019, doi: 10.15252/embj.2018100300.
- [421] F. A. Yousef Yengej, J. Jansen, M. B. Rookmaaker, M. C. Verhaar, and H. Clevers, "Kidney Organoids and Tubuloids," *Cells 2020, Vol. 9, Page 1326*, vol. 9, no. 6, p. 1326, May 2020, doi: 10.3390/CELLS9061326.
- [422] F. W. Pagliuca *et al.*, "Generation of functional human pancreatic β cells in vitro," *Cell*, vol. 159, no. 2, pp. 428–439, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
- [423] B. L. LeSavage, R. A. Suhar, N. Broguiere, M. P. Lutolf, and S. C. Heilshorn, "Next-generation cancer organoids," *Nat. Mater.*, vol. 21, no. 2, pp. 143–159, 2022, doi: 10.1038/s41563-021-01057-5.
- [424] T. Sato *et al.*, "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1762–1772, 2011, doi:

- 10.1053/j.gastro.2011.07.050.
- [425] M. Verduin, A. Hoeben, D. De Ruysscher, and M. Vooijs, "Patient-Derived Cancer Organoids as Predictors of Treatment Response," *Front. Oncol.*, vol. 11, no. March, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.641980.
 - [426] B. L. Eckhardt *et al.*, "Clinically relevant inflammatory breast cancer patient-derived xenograft-derived ex vivo model for evaluation of tumor-specific therapies," *PLoS One*, vol. 13, no. 5, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0195932.
 - [427] D. Gao *et al.*, "Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer," *Cell*, vol. 159, no. 1, pp. 176–187, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.08.016.
 - [428] O. Kopper *et al.*, "An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity," *Nat. Med.*, vol. 25, no. 5, pp. 838–849, 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0422-6.
 - [429] M. Chadwick *et al.*, "Rapid Processing and Drug Evaluation in Glioblastoma Patient-Derived Organoid Models with 4D Bioprinted Arrays," *iScience*, vol. 23, no. 8, p. 101365, 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101365.
 - [430] J. M. Ayuso *et al.*, "Glioblastoma on a microfluidic chip: Generating pseudopalisades and enhancing aggressiveness through blood vessel obstruction events," *Neuro. Oncol.*, vol. 19, no. 4, pp. 503–513, 2017, doi: 10.1093/neuonc/now230.
 - [431] S. H. Lee *et al.*, "Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer," *Cell*, vol. 173, no. 2, pp. 515-528.e17, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.017.
 - [432] X. Li *et al.*, "Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 7, pp. 769–777, 2014, doi: 10.1038/nm.3585.
 - [433] L. D. Nadauld *et al.*, "Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 8, p. 428, 2014, doi: 10.1186/s13059-014-0428-9.
 - [434] K. Nanki *et al.*, "Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis," *Cell*, vol. 174, no. 4, pp. 856-869.e17, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.07.027.
 - [435] X. Li *et al.*, "Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05190-9.
 - [436] C. Calandriini *et al.*, "An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15155-6.
 - [437] J. T. Neal *et al.*, "Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment," *Cell*, vol. 175, no. 7, pp. 1972-1988.e16, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.11.021.
 - [438] H. A. Bolck *et al.*, "Tracing Clonal Dynamics Reveals that Two- and Three-dimensional Patient-derived Cell Models Capture Tumor Heterogeneity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma," *Eur. Urol. Focus*, vol. 7, no. 1, pp. 152–162, 2021, doi: 10.1016/j.euf.2019.06.009.
 - [439] S. N. Ooft *et al.*, "Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients," *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, no. 513, pp. 1–10, 2019, doi:

10.1126/scitranslmed.aay2574.

- [440] V. Veninga and E. E. Voest, "Tumor organoids: Opportunities and challenges to guide precision medicine," *Cancer Cell*, vol. 39, no. 9, pp. 1190–1201, 2021, doi: 10.1016/j.ccell.2021.07.020.
- [441] S. Tsai *et al.*, "Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4238-4.
- [442] R. T. H. Tse, H. Zhao, C. Y. P. Wong, P. K. F. Chiu, J. Y. C. Teoh, and C. F. Ng, "Current status of organoid culture in urological malignancy," *Int. J. Urol.*, vol. 29, no. 2, pp. 102–113, 2022, doi: 10.1111/iju.14727.
- [443] K. A. Homan *et al.*, "supp Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro," *Nat. Methods*, vol. 16, no. 3, pp. 255–262, 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0325-y.
- [444] V. Velasco, S. A. Shariati, and R. Esfandyarpour, "Microtechnology-based methods for organoid models," *Microsystems Nanoeng.* 2020 61, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41378-020-00185-3.
- [445] Y. Tang, J. Liu, and Y. Chen, "Agarose multi-wells for tumour spheroid formation and anti-cancer drug test," *Microelectron. Eng.*, vol. 158, pp. 41–45, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.MEE.2016.03.009.
- [446] J. T. Caleffi *et al.*, "Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances," *Life Sci.*, vol. 286, p. 120028, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.LFS.2021.120028.
- [447] L. Broutier *et al.*, "Human Primary Liver Cancer-derived Organoid Cultures for disease modelling and drug screening," *Nat. Med.*, vol. 23, no. 12, pp. 1424–1435, 2017, doi: 10.1038/nm.4438.Human.
- [448] Y. Tang, J. Liu, and Y. Chen, "Agarose multi-wells for tumour spheroid formation and anti-cancer drug test," 2016, doi: 10.1016/j.mee.2016.03.009i.
- [449] C. Corrò, L. Novellasdemunt, and V. S. W. Li, "A brief history of organoids," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 319, no. 1, pp. C151–C165, 2020, doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020.
- [450] R. J. Porter, G. I. Murray, and M. H. McLean, "Current concepts in tumour-derived organoids," *Br. J. Cancer* 2020 1238, vol. 123, no. 8, pp. 1209–1218, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41416-020-0993-5.
- [451] L. A. Low, C. Mummery, B. R. Berridge, C. P. Austin, and D. A. Tagle, "Organs-on-chips: into the next decade," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 5, pp. 345–361, 2021, doi: 10.1038/s41573-020-0079-3.
- [452] H. Lang *et al.*, "Integrated molecular and pharmacological characterization of patient-derived xenografts from bladder and ureteral cancers identifies new potential therapies," *Front. Oncol.*, vol. 12, no. August, pp. 1–16, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.930731.
- [453] H. Lang *et al.*, "Establishment of a large panel of patient-derived preclinical models of human renal cell carcinoma," *Oncotarget*, vol. 7, no. 37, pp. 59336–59359, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10659.
- [454] A. Ootani *et al.*, "Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche," *Nat. Med.* 2009 156, vol. 15, no. 6, pp. 701–706, Apr. 2009, doi: 10.1038/nm.1951.
- [455] L. He and C. Deng, "Recent advances in organotypic tissue slice cultures for anticancer drug development," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 18, no. 15, pp. 5885–5896, 2022, doi: 10.7150/IJBS.78997.
- [456] P. J. Hayden and J. W. Harbell, "Special review series on 3D organotypic culture models: Introduction and historical perspective," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 2020 572, vol. 57, no. 2, pp. 95–103, Nov. 2020, doi: 10.1007/S11626-020-00500-2.

- [457] J. R. Weitz, H. Tiriac, T. H. de Mendoza, A. Wascher, and A. M. Lowy, "Using Organotypic Tissue Slices to Investigate the Microenvironment of Pancreatic Cancer: Pharmacotyping and Beyond," *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 4991, vol. 13, no. 19, p. 4991, Oct. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13194991.
- [458] S. Chakrabarty *et al.*, "A Microfluidic Cancer-on-Chip Platform Predicts Drug Response Using Organotypic Tumor Slice Culture," *Cancer Res.*, vol. 82, no. 3, pp. 510–520, 2022, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0799.
- [459] Y. D. Seo *et al.*, "Mobilization of CD8+ T cells via CXCR4 blockade facilitates PD-1 checkpoint therapy in human pancreatic cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 25, no. 13, pp. 3934–3945, Jul. 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0081/74932/AM/MOBILIZATION-OF-CD8-T-CELLS-VIA-CXCR4-BLOCKADE.
- [460] K. M. Sullivan *et al.*, "Blockade of interleukin 10 potentiates antitumour immune function in human colorectal cancer liver metastases," *Gut*, vol. 0, pp. 1–13, Jun. 2022, doi: 10.1136/GUTJNL-2021-325808.
- [461] C. Roelants *et al.*, "Ex-vivo treatment of tumor tissue slices as a predictive preclinical method to evaluate targeted therapies for patients with renal carcinoma," *Cancers (Basel.)*, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3390/cancers12010232.
- [462] L. Ciraku *et al.*, "An ex vivo brain slice model to study and target breast cancer brain metastatic tumor growth," *J. Vis. Exp.*, vol. 2021, no. 175, Sep. 2021, doi: 10.3791/62617.
- [463] A. F. Oliveira, A. C. S. N. Pessoa, R. G. Bastos, and L. G. de la Torre, "Microfluidic tools toward industrial biotechnology," *Biotechnol. Prog.*, vol. 32, no. 6, pp. 1372–1389, Nov. 2016, doi: 10.1002/BTPR.2350.
- [464] A. Dellaquila, "History of Microfluidics." <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/history-of-microfluidics/> (accessed Nov. 29, 2022).
- [465] S. C. Terry, J. H. Herman, and J. B. Angell, "A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer," *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979, doi: 10.1109/T-ED.1979.19791.
- [466] S. N. Bhatia and D. E. Ingber, "Microfluidic organs-on-chips," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 760–772, 2014, doi: 10.1038/nbt.2989.
- [467] A. Sontheimer-Phelps, B. A. Hassell, and D. E. Ingber, "Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips," *Nat. Rev. Cancer* 2019 192, vol. 19, no. 2, pp. 65–81, Jan. 2019, doi: 10.1038/S41568-018-0104-6.
- [468] D. Huh, Y. S. Torisawa, G. A. Hamilton, H. J. Kim, and D. E. Ingber, "Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 12. Royal Society of Chemistry, pp. 2156–2164, Jun. 21, 2012, doi: 10.1039/c2lc40089h.
- [469] M. Verhulsel *et al.*, "Developing an advanced gut on chip model enabling the study of epithelial cell/fibroblast interactions," *Lab Chip*, vol. 21, no. 2, pp. 365–377, 2021, doi: 10.1039/d0lc00672f.
- [470] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Yuan Hsin, and D. E. Ingber, "Reconstituting organ-level lung functions on a chip," *Science (80-.)*, vol. 328, no. 5986, pp. 1662–1668, Jun. 2010, doi: 10.1126/SCIENCE.1188302/SUPPL_FILE/HUH_SOM.PDF.
- [471] S. Myram *et al.*, "A Multitubular Kidney-on-Chip to Decipher Pathophysiological Mechanisms in Renal Cystic Diseases," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, no. May, pp. 1–16, 2021, doi:

10.3389/fbioe.2021.624553.

- [472] K. A. Homan *et al.*, “Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro,” *Nat. Methods*, vol. 16, no. 3, pp. 255–262, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0325-y.
- [473] J. M. Ayuso *et al.*, “Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June, pp. 1–16, 2016, doi: 10.1038/srep36086.
- [474] D. Caballero, S. Kaushik, V. M. Correlo, J. M. Oliveira, R. L. Reis, and S. C. Kundu, “Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: From chip to the patient,” *Biomaterials*, vol. 149, pp. 98–115, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.10.005.
- [475] Z. Z. Chen *et al.*, “Establishment of a gastric cancer subline with high metastatic potential using a novel microfluidic system,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1038/srep38376.
- [476] K. Aizel *et al.*, “A tuneable microfluidic system for long duration chemotaxis experiments in a 3D collagen matrix,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 22, pp. 3851–3861, 2017, doi: 10.1039/c7lc00649g.
- [477] B. Venzac *et al.*, “Sliding walls: a new paradigm for fluidic actuation and protocol implementation in microfluidics,” *Microsystems Nanoeng.*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41378-019-0125-7.
- [478] P. Mehta, Z. Rahman, P. Dijke, and P. E. Boukany, “Microfluidics meets 3D cancer cell migration,” vol. xx, no. xx, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1016/j.treca.2022.03.006.
- [479] D. H. T. Nguyen *et al.*, “Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 17, pp. 6712–6717, Apr. 2013, doi: 10.1073/PNAS.1221526110/SUPPL_FILE/SM01.MOV.
- [480] D. T. T. Phan *et al.*, “A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 3, pp. 511–520, Jan. 2017, doi: 10.1039/C6LC01422D.
- [481] S. Kim, M. Chung, and N. L. Jeon, “Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis in vitro,” *Biomaterials*, vol. 78, pp. 115–128, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.11.019.
- [482] H. Lee, W. Park, H. Ryu, and N. L. Jeon, “A microfluidic platform for quantitative analysis of cancer angiogenesis and intravasation,” *Biomicrofluidics*, vol. 8, no. 5, p. 054102, Sep. 2014, doi: 10.1063/1.4894595.
- [483] M. B. Chen, J. A. Whisler, J. Fröse, C. Yu, Y. Shin, and R. D. Kamm, “On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics,” *Nat. Protoc.* 2017 125, vol. 12, no. 5, pp. 865–880, Mar. 2017, doi: 10.1038/nprot.2017.018.
- [484] Z. Xu *et al.*, “Design and Construction of a Multi-Organ Microfluidic Chip Mimicking the in vivo Microenvironment of Lung Cancer Metastasis,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 39, pp. 25840–25847, Oct. 2016, doi: 10.1021/ACSAI.6B08746/ASSET/IMAGES/LARGE/AM-2016-08746D_0007.jpeg.
- [485] M. Virumbrales-Muñoz, J. Chen, J. Ayuso, M. Lee, E. J. Abel, and D. J. Beebe, “Lab on a Chip Organotypic primary blood vessel models of clear cell renal cell carcinoma for single-patient clinical trials †,” vol. 20, p. 4420, 2020, doi: 10.1039/d0lc00252f.
- [486] J. Sefkow-Werner *et al.*, “Automated Fabrication of Streptavidin-Based Self-assembled Materials for High-Content Analysis of Cellular Response to Growth Factors,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 14, p.

34125, 2022, doi: 10.1021/ACSAMI.2C08272/ASSET/IMAGES/LARGE/AM2C08272_0007.JPG.

- [487] A. S. L. Yu, "Claudins and the Kidney," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 26, no. 1, pp. 11–19, Jan. 2015, doi: 10.1681/ASN.2014030284.
- [488] R. Zent *et al.*, "Involvement of Laminin Binding Integrins and Laminin-5 in Branching Morphogenesis of the Ureteric Bud during Kidney Development," *Dev. Biol.*, vol. 238, no. 2, pp. 289–302, Oct. 2001, doi: 10.1006/DBIO.2001.0391.
- [489] R. Li *et al.*, "Article Mapping single-cell transcriptomes in the intra-tumoral and associated territories of kidney cancer II Mapping single-cell transcriptomes in the intra-tumoral and associated territories of kidney cancer," pp. 1583–1599, 2022, doi: 10.1016/j.ccell.2022.11.001.
- [490] Y. Li *et al.*, "MicroRNA-200b is downregulated and suppresses metastasis by targeting LAMA4 in renal cell carcinoma," *EBioMedicine*, vol. 44, pp. 439–451, 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.041.
- [491] Y. Liu *et al.*, "Clusterin promotes growth and invasion of clear cell renal carcinoma cell by upregulation of S100A4 expression," *Cancer Biomarkers*, vol. 21, no. 4, pp. 915–923, 2018, doi: 10.3233/CBM-171018.
- [492] M. Korhonen, H. Sariola, V. E. Gould, L. Kangas, and I. Virtanen, "Integrins and Laminins in Human Renal Carcinoma Cells and Tumors Grown in Nude Mice," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 16, pp. 4532–4538, 1994.
- [493] H. Cao, L. Qiang, J. Chen, K. M. Johnson, M. A. McNiven, and G. L. Razidlo, "Synergistic metalloproteinase-based remodeling of matrix by pancreatic tumor and stromal cells," *PLoS One*, vol. 16, no. 3 March, pp. 1–19, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0248111.
- [494] H. Jin *et al.*, "BMP2 promotes migration and invasion of breast cancer cells via cytoskeletal reorganization and adhesion decrease: An AFM investigation," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 4, pp. 1715–1723, Feb. 2012, doi: 10.1007/S00253-011-3865-3/FIGURES/5.
- [495] Y. Mitsui *et al.*, "Inactivation of bone morphogenetic protein 2 may predict clinical outcome and poor overall survival for renal cell carcinoma through epigenetic pathways," *Oncotarget*, vol. 6, no. 11, pp. 9577–9591, Mar. 2015, doi: 10.18632/ONCOTARGET.3445.
- [496] L. Wang, P. Park, F. La Marca, K. D. Than, and C. Y. Lin, "BMP-2 inhibits tumor-initiating ability in human renal cancer stem cells and induces bone formation," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 141, no. 6, pp. 1013–1024, Jun. 2015, doi: 10.1007/S00432-014-1883-0/FIGURES/6.
- [497] B. A. Aguado *et al.*, "Extracellular matrix mediators of metastatic cell colonization characterized using scaffold mimics of the pre-metastatic niche," *Acta Biomater.*, vol. 33, pp. 13–24, 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.043.
- [498] R. E. Coleman, Roodman, Smith, Body, Suva, and Vessella, "Clinical Features of Metastatic Bone Disease and Risk of Skeletal Morbidity," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 20, pp. 6243s-6249s, Oct. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0931.
- [499] M. Subramaniam, S. M. Jalal, D. J. Rickard, S. A. Harris, M. E. Bolander, and T. C. Spelsberg, "Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER α cells: Bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization," *J. Cell. Biochem.*, vol. 87, no. 1, pp. 9–15, Jan. 2002, doi: 10.1002/JCB.10259.
- [500] T. Bessy *et al.*, "Hematopoietic progenitors polarize in contact with bone marrow stromal cells in

response to SDF1,” *J. Cell Biol.*, vol. 220, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.1083/JCB.202005085.

- [501] C. Arrigoni, M. Gilardi, S. Bersini, C. Candrian, and M. Moretti, “Bioprinting and Organ-on-Chip Applications Towards Personalized Medicine for Bone Diseases,” *Stem Cell Rev. Reports* 2017 133, vol. 13, no. 3, pp. 407–417, Jun. 2017, doi: 10.1007/S12015-017-9741-5.
- [502] P. Ribeiro *et al.*, “Microfluidic-based models to address the bone marrow metastatic niche complexity,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 112, pp. 27–36, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2020.05.015.
- [503] D. Koca, I. Séraudie, R. Jardiller, C. Cochet, O. Filhol, and L. Guyon, “COL7A1 expression improves prognosis prediction for patients with clear cell renal cell carcinoma atop of stage,” doi: 10.1101/2023.01.16.524247.